

ЎЗБЕКISTON RESPUBLIKASI FANLAR AKADEMIYASI  
АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКISTАН

**ЎЗБЕКISTON  
BIOLOGIYA  
JURNALI**

**4**

---

**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:  
*Альберт қисрони*  
*Рестелла Альберта*  
*Restella albertii (Regel) Pobed.*

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

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

## **СОРТОВОЙ СОСТАВ ВИНОГРАДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ СЕЛЕКЦИИ В УЗБЕКИСТАНЕ**

silkhom@mail.ru

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Тожибаева Д.И., Арзуманов А.Ш., Абдукаримов А.А.

### **ЎЗБЕКИСТОНДАГИ ЎРТА ОСИЁ УЗУМ СЕЛЕКЦИЯСИ НАВЛАРИНИНГ ТАРКИБИ**

Ушбу мақолада Ўзбекистон ампелографик коллекциясидаги Ўрта Осие узум навлари селекцияси хилма-хиллиги баҳоланди. Тадқиқ этилаётган навлар морфологик белгилар асосида текширилди. Навларни дастлабки баҳолаш натижадалари асосида, уларнинг тахминий озуқавий ва тижорат қиймати ҳамда улардан фойдаланиш йўналишлари бўйича маълумотлар олинди.

Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Тожибаева Д.И., Арзуманов А.Ш., Абдукаримов А.А.

### **СОРТОВОЙ СОСТАВ ВИНОГРАДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ СЕЛЕКЦИИ В УЗБЕКИСТАНЕ**

В данной работе приведена оценка сортового состава винограда среднеазиатской селекции из узбекской ампелографической коллекции винограда. Исследуемые сорта анализировались по морфологическим признакам. В результате были получены данные, по предварительной оценке, сортов, их предполагаемой пищевой и товарной ценности и направленности использования.

Salakhutdinov I.B., Khurshut E.E., Rajapov F.S., Bikmetova D.I., Arzumanov A.Sh., Abdugarimov A.A.

### **THE COMPOSITION OF GRAPE VARIETIES OF CENTRAL ASIATIC SELECTION IN UZBEKISTAN**

This paper provides an assessment of the composition of Central Asian selection grapes of Uzbek ampelographic collection. The studied varieties were evaluated according to some morphological characters. In result, preliminary data for observed varieties were obtained such as estimated nutritional and commercial value and direction of use.

Виноград – одно из древнейших возделываемых растений. Культивируется уже на протяжении 6-9 тысяч лет и является источником национального богатства многих стран мира [1].

Средняя Азия - один из центров по выращиванию винограда. За многие столетия здесь были созданы в большом разнообразии великолепные местные сорта винограда с замечательными технологическими качествами и отличными вкусовыми характеристиками. Здесь возделываются ультраскороспелые и позднеспелые, бессемянные и пригодные для длительного зимнего хранения, относительно устойчивые к низким температурам и грибным болезням сорта. Лучшие образцы восточной эколого-географической группы до настоящего времени считаются непревзойденными в мировом сортименте по целому ряду биологических и хозяйственных признаков [2].

Объектом исследования в данной работе является оценка сортимента винограда среднеазиатской селекции из коллекции Научно-исследовательского института растениеводства (НИИР МСВХ РУз). В общей сложности было проанализировано 344 узбекских и таджикских сорта. Целью исследований являлся анализ их предполагаемой пищевой и товарной ценности или направленности использования по качественным и количественным признакам.

Для отбора целевых сортов использовали 15 дескрипторов механического состава грозди (табл. 1). Этот тип дескрипторов, в отличие от ампелографических, дает возможность оценить товарные свойства исследуемых сортов.

Был проведен анализ каталожных записей в коллекции винограда НИИР МСХ РУз. Всего было просмотрено свыше 1350 записей. Критерием отбора образцов служили страна происхождения и наличие описания по дескрипторам механического состава грозди. Описание коллекционных об-

разцов по данным дескрипторам проводилось с 1949 по настоящий момент. В последующем статистическом анализе использовались усредненные значения по всем годам описания. В итоге были отобраны 181 сорт узбекской и 163 сорта таджикской селекции.

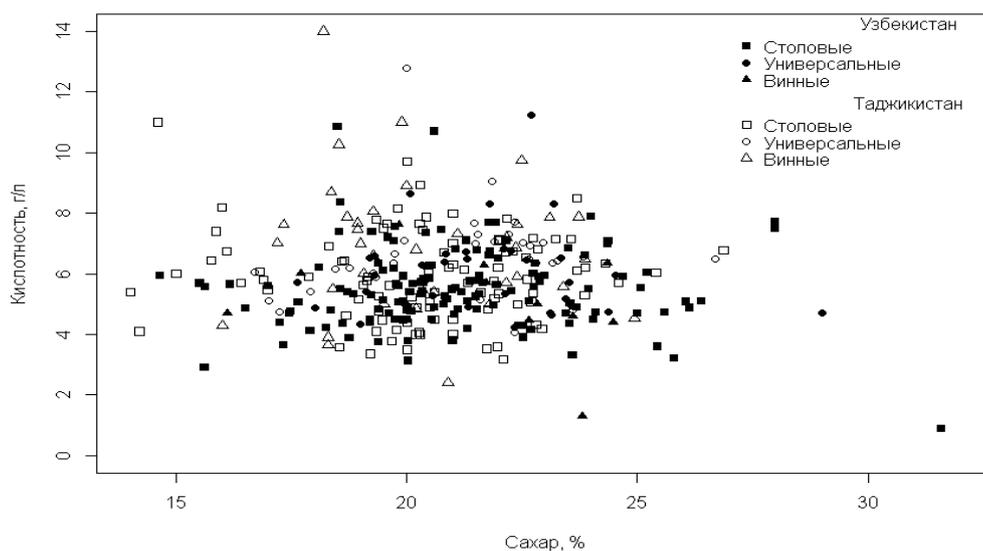
Таблица 1.

**Список дескрипторов, по которым описывались исследуемые образцы**

№	Дескриптор
1	Средний вес грозди (грамм)
2	Среднее кол-во (ягод/гроздь)
3	Средний длина грозди (см)
4	Средний ширина грозди (см)
5	Сок (%)
6	Мякоть (%)
7	Кожица (%)
8	Вес всех семян (%)
9	Вес гребня (%)
10	Вес 100 ягод (грамм)
11	Вес 100 семян (грамм)
12	Раздавливание ягод
13	Отрыв ягод
14	Сахар (%)
15	Кислотность (г/л)

Далее был проведен статистический анализ для оценки разнообразия фенотипов и предварительной оценки, их предполагаемой пищевой и товарной ценности или направленности использования. Статистический анализ признаков и построение результирующих диаграмм проводили в системе R [3].

Изначально был проведен анализ по соотношению содержания сахара и кислотности в соке исследуемых сортов. Для производства сухих вин к сортам винограда предъявляются следующие требования: содержание сахара 17-21% и содержание кислоты 7-10 г/л. Однако для многих технических сортов эти показатели являются немного ниже. Поэтому основным отборочным критерием нами было выбрано содержание кислоты ( $\geq 6$  г/л) и содержание сахара (16 - 22%). В результате сорта условно были разделены на винные, универсальные и столовые (рис. 1).

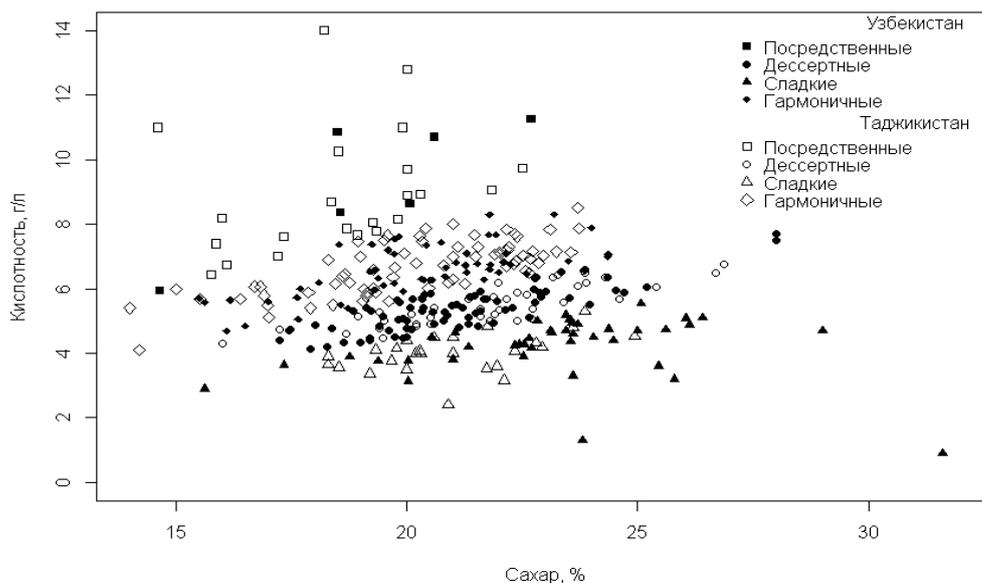


**Рис. 1.** Распределение сортов по параметрам содержания сахара (%) и кислоты (г/л).

В результате получена пропорция потенциально винных к столовым как 26% к 74% у узбекских, и 60% к 40% у таджикских сортов.

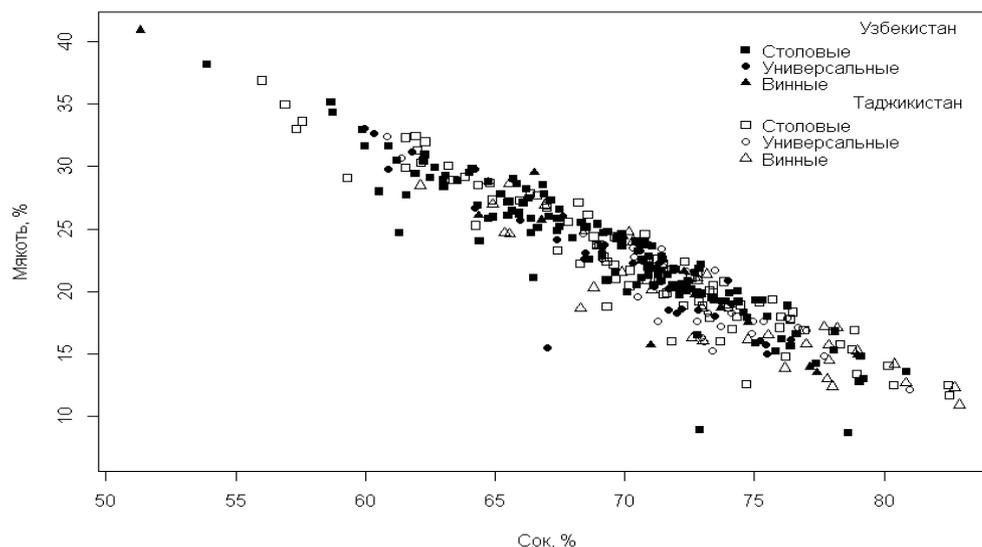
Также для винных сортов предъявляется и такой критерий, как пропорция содержания кислоты по отношению к сахару, что может определять тип сорта и в конечном итоге вкусовые качества вина. По соотношению содержания кислоты/сахара сорта условно можно разделить так (Рис. 2): 1:1 – Посредственные; 1:2 – Гармоничные; 1:3 – Десертные; 1:4 и выше – Сладкие;

Таким образом под критерии качественного материала для производства сухих вин попадает лишь 20 узбекских (11%) и 32 таджикских сорта (22%). Тем не менее, большинство сортов, попавшие в разряд винных и универсальных, согласно нашему анализу могут быть использованы для производства десертных вин и коньячных спиртов.



**Рис. 2.** Распределение сортов по соотношению содержания сахара (%) и кислоты (г/л).

Помимо сахаристости и кислотности немаловажным критерием для винных сортов также является высокое содержание сока (как правило, данный показатель должен находится примерно на уровне 70-90% от общей массы ягоды). С этой целью было рассмотрено распределение исследуемых сортов по критериям содержание сока и мякоти от общей массы ягоды (рис. 3).

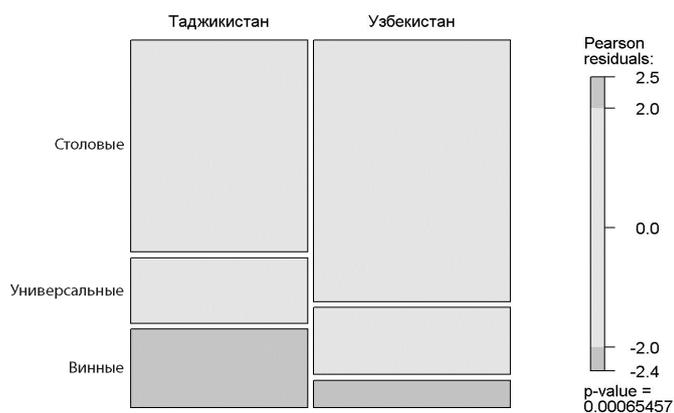


**Рис. 3.** Распределение сортов по процентному содержанию сока и мякоти от общей массы ягоды.

В результате проведенных выше анализов видно, что большинство сортов винограда узбекской селекции (73%) пригодны для употребления в свежем виде, производства сока, а также сушеной продукции, 19% могут быть использованы как универсальные сорта, и только 14 сортов (4%) из исследованных могут быть классифицированы как чисто винные.

В случае таджикского сортимента видно преобладание сортов винной направленности (рис.4). А само распределение выглядит следующим образом: 60% могут быть использованы для употребления в свежем виде, производства сока, а также сушеной продукции, 18% как универсальные сорта и 22% как чисто винные.

Как видно из результатов, по сравнению с таджикскими сортами у узбекских сортов лишь 14 сортов попадают под разряд винных, таджикские сортимент включает в себя больше образцов (32 сорта) представляющих интерес для виноделия (рис 4). Но с другой стороны узбекский сортимент больше представлен столовыми сортами (некоторые из которых являются крупноплодными), кишмишами и изюмами.



**Рис. 4.** Сравнительное распределение сортов таджикской и узбекской селекции по типу их использования.

Полученные результаты полезны для понимания сортового состава среднеазиатских сортов, малоизученный в данном аспекте, а сами данные могут быть применены как для подбора сортов с целью получения более качественных виноматериалов с привлечением местных сортов, которые, в отличие от европейских сортов, наиболее адаптированы к климатическим условиям Узбекистана, или использования их в селекционных экспериментах для получения новых высококачественных сортов винограда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Носульчак В.А. Сортовой состав виноградных насаждений СССР (по материалам Всесоюзной переписи 1940, 1947, 1953, 1970 и 1984 гг.) // Краснодар; 2015.
2. Рубан Н.Г. Сорта винограда Средней Азии // Ташкент: Издательство “ФАН” Узбекской ССР; 1972.
3. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing // R Core Team. 2016.

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

**ВЛИЯНИЕ РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ГЕНА ФИТОХРОМА A1 НА АКТИВНОСТЬ  
ФЕРМЕНТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ХЛОПЧАТНИКА**

e-mail: venera\_k75@mail.ru

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

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

**FITOXROM A1 GENNING RNK INTERFERENTSIYASI G'O'ZANING FOTOSINTETIK FERMENTLAR  
FAOLLIGIGA TA'SIRI**

G'o'zaning gen-nokaut liniyalari va navlarida fotosintez parametrlaini (kvant chiqishi, fotosintetik pirimentlarning tarkibi – a va b xlorofillar, antotsianlar va karotinooidlar, Kalvin sikli fermentlarning – ribulozo-1,5-bifosfatkarboksilaza va fosfoenolpiruvat karboksilaza – faolligi) qiyosiy o'rganilgan.

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

**ВЛИЯНИЕ РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ГЕНА ФИТОХРОМА A1 НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ  
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ХЛОПЧАТНИКА**

Было проведено сравнительное изучение параметров фотосинтетической системы (квантовый выход, содержание фотосинтетических пигментов – хлорофиллов а и b, антоцианов и каротиноидов, активность ферментов цикла Кальвина – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и фосфоенолпируват карбоксилазы) у ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника.

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

**INFLUENCE OF RNA INTERFERENCE OF THE PHYTOCHROME A1 GENE ON THE ACTIVITY OF  
PHOTOSYNTHETIC APPARATUS ENZYMES**

A comparative study of the parameters of the photosynthetic system (quantum yield, the content of photosynthetic pigments - chlorophylls a and b, anthocyanins and carotenoids, the activity of the Calvin cycle enzymes - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase) in gene-knockout cotton varieties and lines was carried out.

Фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к колебаниям условий окружающей среды процессов в растительной клетке. При этом изменения функций фотосинтетического аппарата возникают достаточно быстро, уже в первой фазе неспецифического ответа растений на стресс и могут служить индикатором их адаптационного потенциала [1, 2]. Действие различных факторов на фотосинтетический аппарат реализуется через весь комплекс физических, фотохимических и энзиматических реакций, возникающие изменения во многом универсальны, их результатом в целом является торможение фотосинтеза [3 – 5].

Вместе с тем, имеются литературные данные о том, что содержание и состояние фитохрома В у хлопчатника обуславливает более высокую устьичную проводимость, скорость транспирации и скорость фотосинтеза в расчете на единицу площади листа, а также повышенное содержание фотосинтетических пигментов и УФ-поглощающих пигментов (в основном флавоноиды) [6]. Кроме того, результаты KEGG анализа транскриптов 142 ДЭГ, проведенного у RNAi линий хлопчатника с сайленсингом гена *PHYA1*, показал участие генов, связанных с фиксацией углерода, в реализации эффектов нокаута данного гена [7].

В связи с вышеизложенным, а также учитывая факт, что ген-нокаутные сорта серии Порлок обладают повышенной урожайностью, было интересным исследовать изменения фотосинтетической активности различных сортов хлопчатника, включая сорта серии Порлок.

Для определения фотосинтетической активности генотипов хлопчатника использовался метод, основанный на измерении параметров флуоресценции хлорофилла при возбуждении импульсно-ам-

плитудно-модулированным светом с помощью РАМ-флуориметра MINI-PAM (Watzl, Германия). Эффективность фотосинтеза оценивали по показателю квантового выхода фотохимического процесса в фотосистеме II – параметру «YIELD», который рассчитывается по формуле:  $YIELD = (F' - M) / (F' + M)$ , где F – интенсивность флуоресценции на данный момент времени, а F' – максимальная интенсивность, наиболее полно характеризующая эффективность первичной, световой фазы фотосинтеза.

Для определения активности рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы (RuBPC) экстракцию фермента проводили видоизмененным методом Sayre et al. (1979) [8]. Активность RuBPC определяли по методу Camp et al. (1982) [9]. Для определения активности фосфоенолпируват карбоксилазы (PEPC) по 0,2 г каждого образца замораживали в жидком азоте и растирали в ступке с кварцевым песком в 5 мл среды выделения, содержащей 50 мМ трис–HCl (pH 8.0), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 мМ ЭДТА, 10 мкМ меркаптоэтанол. Гомогенат фильтруют через капрон и фильтрат центрифугируют при 20 000 г в течение 15 мин при 4° С. Супернатант используют для определения ферментативной активности PEPC. Для определения активности PEPC по изменению оптической плотности НАДН при 340 нм реакционную среду составляют из следующих реактивов: трис–HCl буфер – 100 мкМ, MgCl<sub>2</sub> – 5 мкМ, NaHCO<sub>3</sub> – 50 мкМ, НАДН – 0,25 мкМ, ФЕП – 10 мкМ, экстракт – 1 мл. Общий объем – 3 мл. В контрольную пробу вносят все, за исключением субстрата (ФЕП).

Для определения содержания хлорофилла брали диски листовой ткани диаметром 4 мм, вырезанных из 8 параллельно уложенных листьев (каждый из которых собран с отдельного растения) с участков листовой пластинки, не содержащих крупные проводящие жилки. Диски экстрагировались в 80% (об/об) ацетоне в течение 24 ч в темноте при комнатной температуре. Оптическая плотность экстракта измерялась при 470, 645 и 663 нм. Содержание хлорофиллов рассчитывалось по следующим формулам:

$$\begin{aligned} \text{Chl a (мг} \times \text{г}^{-1} \text{ сырого веса)} &= (12,72 \times D_{663}) - (2,58 \times D_{645}) \\ \text{Chl b (мг} \times \text{г}^{-1} \text{ сырого веса)} &= (22,87 \times D_{645}) - (4,67 \times D_{663}) \end{aligned}$$

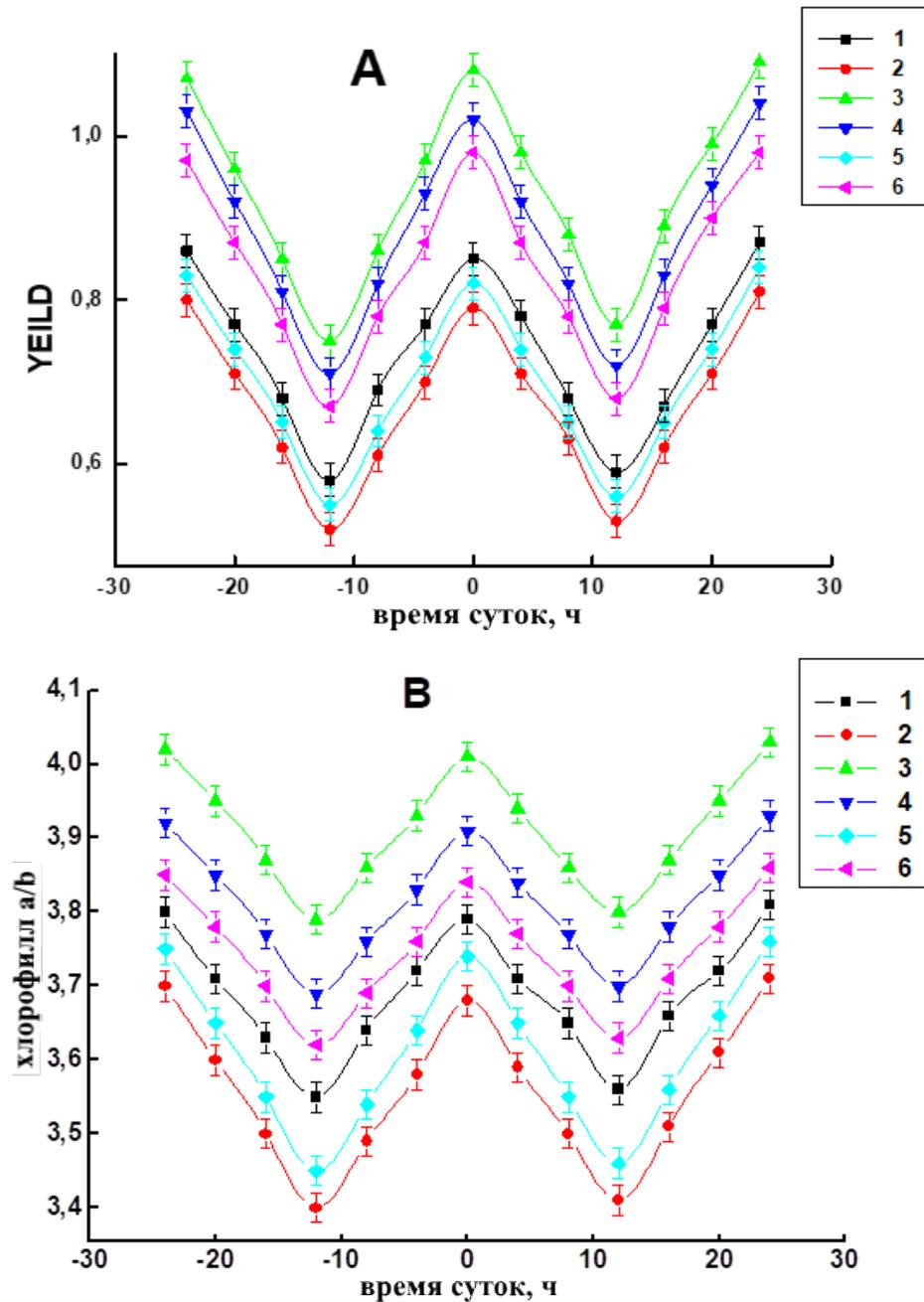
Для определения каротиноидов и ксантофиллов навеску листьев, равную 0,5 г, тщательно растирают в сухой фарфоровой ступке с 1–2 г безводного сернокислого натрия и небольшим количеством углекислого кальция до сухого зеленого порошка. Измельченный растительный материал переносят на стеклянный фильтр и настаивают в течение 5 мин с 3–5 мл растворителя (смесь этилового спирта и ацетона в отношении 3:1). Небольшими порциями растворителя из растительного порошка на фильтре вымывают все пигменты в пробирку, вставленную в колбу Бунзена. Для окончательной экстракции пигментов порошок промывают порцией этилового спирта. Экстракт концентрируют на роторном испарителе. Количественное определение каротиноидов и ксантофиллов проводят после разделения методом ТСХ на пластинках Мерск, используя в качестве подвижной фазы смесь петролейного эфира, хлороформа и изопропилового спирта в соотношении 9 : 7 : 1 об/об [10]. Оптическую плотность растворов каротина и ксантофиллов измеряют на спектрофотометре при следующих длинах волн: каротин (в ацетоне) – 450, ксантофиллы (в ацетоне) – 445 нм.

Циркадные часы – это механизм, который позволяет организму адаптировать многие транскрипционные, физиологические и биохимические процессы к естественным суточным циклам [11, 12]. Из литературы известно, что различные экофизиологические признаки (например, общие уровни усвоения CO<sub>2</sub>, уровень углеводного обмена и эффективность фотосинтеза) зависят от циркадных часов [13, 14]. Более конкретно, циркадные ритмы, которые близки к 24 часам и резонируют с циклами окружающей среды, вероятно, оптимизируют суточный ход газообмена [15]. Транскриптомные исследования на типичных генотипах *Arabidopsis* также указывают на то, что ключевые гены, связанные с газообменом и функцией ФС II, регулируются на основе суточных ритмов [15]. Кроме того, количественное изменение циркадных часов связано с фотосинтезирующими признаками в сегрегирующих потомствах и в культурах типа *Brassica rapa* и *Hordeum vulgare* [15, 16]. Таким образом, циркадные часы становятся важным регулятором газообмена и параметров флуоресценции хлорофилла. Тем не менее его влияние на биофизическую активность обеих фотосистем остается плохо охарактеризованным, в результате чего вопросы механистической связи между циркадными часами и газовым обменом на уровне листьев, а также фотозащиты остаются неразрешенными [17].

В связи с этим, целью исследования являлась характеристика циркадных ритмов флуоресценции хлорофилла, содержания ключевых пигментов и активности ключевых ферментов цикла Кальвина у

модифицированных и немодифицированных сортов хлопчатника (*Gossypium hirsutum*).

Для определения предельных возможностей эффективного усвоения квантов света фотосинтетическим аппаратом сравниваемых генотипов растений нами был проведен анализ циркадных ритмов параметра квантового выхода YEILD. Для этих экспериментов были использованы молодые листья хлопчатника на стадии цветения. Полученные результаты показали, что рост квантового выхода фотосистемы II наблюдался в темное время суток, достигая максимума в полночь (рис. 1, А). После восхода солнца (начиная с 4 часов утра) и по мере роста интенсивности света выявлялся спад параметра YEILD, достигая минимума в полдень. С наступлением темноты этот показатель вновь возрастал и к 24 часам приближался к своему предельному значению. Эти данные хорошо коррелируют с литературными данными о циклическом изменении активности фотосинтетического аппарата хлопчатника в зависимости от времени суток [15, 18].



**Рис. 1.** Суточные ритмы параметров активности фотосинтетического аппарата у ген-нокаутного сорта Порлок-1. А – изменение квантового выхода, В – изменение отношения хлорофилла a/b. По оси абсцисс – время суток. 1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Баявут-2, 6 – Порлок-1.  $p \leq 0,05$

При этом необходимо отметить, что, несмотря на сходство общей направленности циркадных ритмов у контрольных и RNAi растений, наблюдалось значительное различие в абсолютных значениях параметра YEILD. Так, у растений RNAi сортов наблюдалось статистически достоверное более высокое значение параметра квантового выхода, чем у нетрансформированных растений, что позволяет предположить большую устойчивость к фотоингибированию и, вследствие этого, большая эффективность работы фотосинтетического аппарата, что хорошо коррелирует с данными о повышенной урожайности данных сортов [19].

Кроме того, ритмы фотосинтеза можно объяснить синтезом / деградацией хлорофилла и его связывающих белков, который наблюдался у ряда растений, где содержание фотосенсибилизирующего комплекса II достигает максимума в полдень, совпадающего с минимальным отношением хлорофилла a/b [18]. В связи с этим было исследовано влияние нокаута гена фитохрома A1 на содержание и соотношение хлорофиллов в листьях хлопчатника. Полученные результаты показали, что отношение хлорофиллов a/b также имеет циркадную цикличность, достигая максимума в полночь (рис. 1, B).

При исследованиях пигментного аппарата по соотношению хлорофиллов (Chl a/b), судят не только о чувствительности различных форм хлорофилла к действию неблагоприятных факторов, но и оценивают степень сохранности фотосистем. Считается, что снижение показателя Chl a/b может свидетельствовать о повреждениях белков комплекса ФС II и связанной с этим деградацией хлорофилла a [15]. Увеличение же этого отношения говорит о большей функциональной активности светособирающих комплексов как ФС I, так и ФС II и высоким соотношением ФС II/ФС I [15, 18].

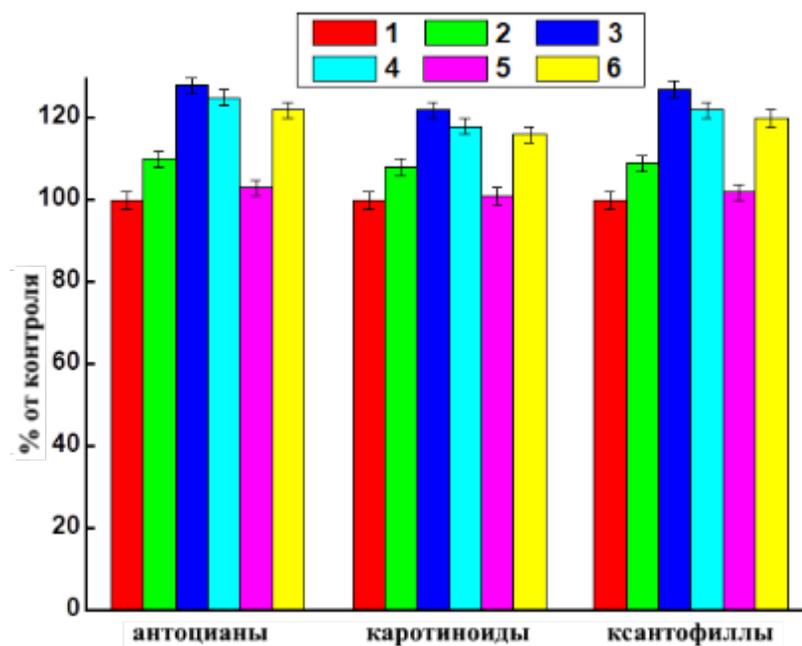
Таким образом, наблюдаемая у RNAi сортов меньшая амплитуда колебаний отношения хлорофиллов a/b может свидетельствовать о большей, по сравнению с контрольными растениями, устойчивости фотосинтетического аппарата и, как следствие, большей эффективности фотосинтеза.

Вопрос о том, является ли фотоингибирование растений стресс-реакцией или это регуляторный процесс, направленный на согласование световых реакций фотосинтеза со сложной и разветвленной последовательностью реакций метаболизма, до сих пор остается дискуссионным [15, 20]. При этом фотоингибирование часто связано с повреждением фотосинтетического аппарата при длительной высокой освещенности. Одним из наиболее часто повреждаемых компонентов, как предполагают, является белок D1 реакционного центра фотосистемы II [21]. В настоящее время очевидно, что фотоингибирование, возникающее в результате сочетания высокой плотности светового потока с другими факторами стресса, такими как засуха, температурный стресс, засоление, оказывает важное влияние на растения в естественных условиях. У растений имеется ряд фотоадаптивных и фотозащитных механизмов на различных уровнях: от всего растения до листьев и тилакоидной мембраны хлоропластов, позволяющих избегать минимизировать фотоингибирование при высокой освещенности. К одному из таких механизмов можно отнести наличие в хлоропластах каротиноидов, которые обеспечивают решающий вклад в фотозащиту хлоропластов [20].

В связи с этим, нами было исследован уровень антоцианов и каротиноидов в листьях хлопчатника трансформированных и нетрансформированных сортов. Результаты исследований показали более высокое содержание антоцианов (на 25%) и каротиноидов (на 20%) в листьях RNAi-сортов хлопчатника по сравнению с контрольными (рис. 2).

Полученные результаты хорошо согласуются с фенотипической особенностью данных сортов – насыщенной пигментацией листьев (т.н. «антоциановый загар»), который присутствует на листьях этих генотипов на протяжении физиологически активного периода растений [19]. По-видимому, повышенное содержание пигментов в листьях RNAi-сортов хлопчатника делает их более устойчивыми к фотоингибированию, и, как следствие, обеспечивает относительно высокий потенциал фотосинтетического аппарата у хлопчатника, по сравнению с исходными генотипами.

У высших растений существует обширная и скоординированная циркадная регуляция метаболических путей, связанных с фиксацией CO<sub>2</sub>. Циркадные часы координируют транскрипцию компонентов фотореактивного пути, которые локализованы в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Транскрипты, кодирующие компоненты цикла Кальвина, регулируются циклически, а временные запасы крахмала управляются именно циркадным хронометрированием. Поэтому представляется, что комплексная циркадная регуляция, а не один конкретный путь или ген, обуславливает увеличение продуктивности растений, которое возникает в результате суточного регулирования [22].



**Рис. 2.** Содержание каротиноидов и ксантофиллов у ген-нокаутного сорта хлопчатника Порлок-1. 1 – Кокер-312, 2 – ноль сегрегант, 3 – Т 1-7, 4 – Т 31-10, 5 – АН-Баявут-2, 6 – Порлок-1. Данные приведены в % от контроля.  $P \leq 0,05$

Скорость фиксации  $\text{CO}_2$  рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой (RuBPC) представляет собой потенциальную контрольную точку для соединения циркадных часов с фотосинтезом. Циркадные колебания фиксации  $\text{CO}_2$  происходят независимо от ритмов устьичного открытия, поскольку чистая фиксация  $\text{CO}_2$  колеблется в условиях, когда концентрация межклеточного  $\text{CO}_2$  и устьичной проводимости постоянна [22].

На основании этих данных была исследована суточная активность основных ферментов цикла Кальвина – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBPC) и фосфоенолпируват карбоксилазы (PEPC) у различных ген-нокаутных и исходных (нетрансформированных) сортов хлопчатника (рис. 3).

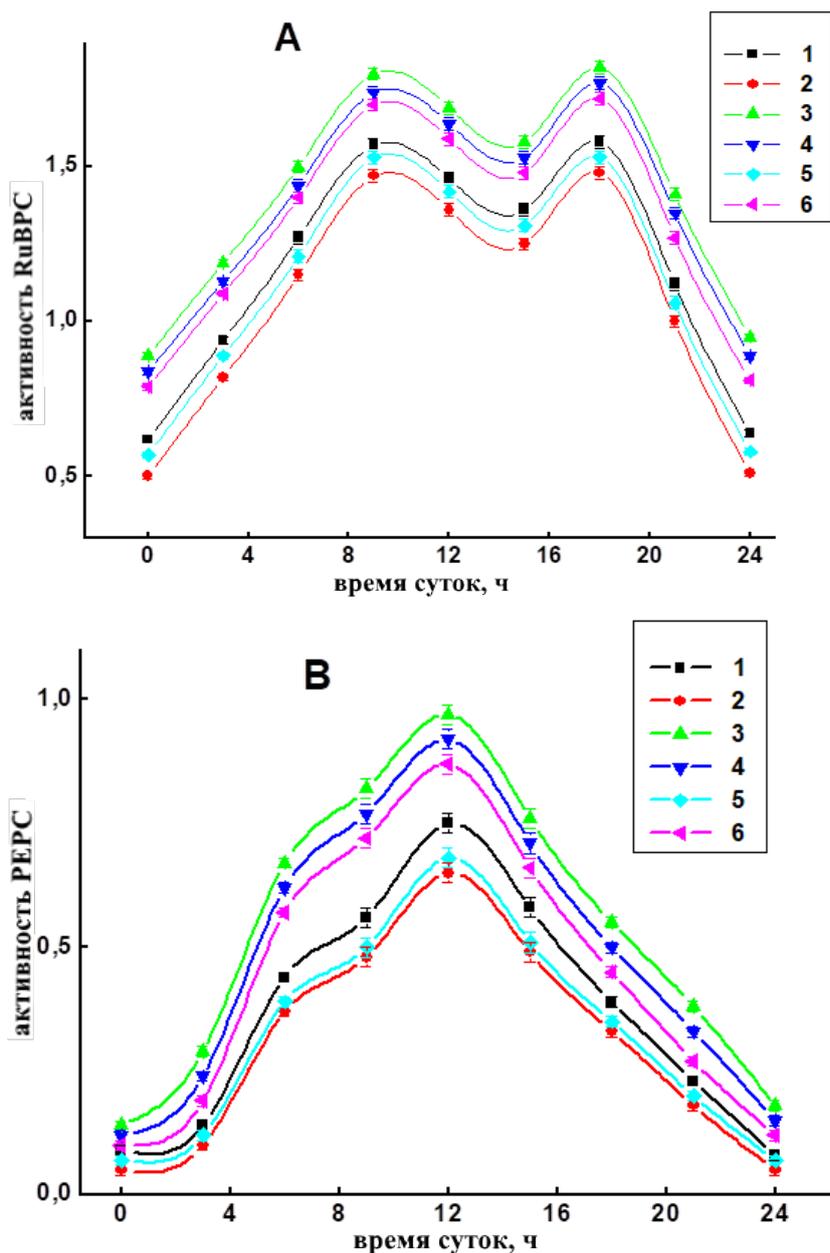
График уровня активности RuBPC в суточной динамике в фазу бутонизации – начала цветения имел «седловидный» характер и у всех исследованных нами сортов, начиная с 8 ч, уровень активности RuBPC повышался и достигал максимальной величины к 9-10 ч, незначительно снижаясь к 14-15 ч, вновь практически достигая максимума к 18-19 ч, а затем плавно снижался до минимума в ночное время (рис. 3, А).

При этом между модифицированными и исходными сортами были выявлены достоверные различия при уровне значимости  $P \leq 0.05$ . Так, у сорта Порлок-1 разница в активности RuBPC была на 15% выше, чем у исходного сорта Кокер-312, использованного для трансформации, и на 10% выше, чем у родительского сорта АН-Баявут-2 (рис. 3, А), что хорошо коррелирует с данными о более высокой урожайности данных сортов [19].

При исследовании активности другого фермента цикла Кальвина – PEPC было обнаружено, что его активность у всех исследованных сортов была существенно ниже активности RuBPC, что позволяет отнести хлопчатник к растениям с  $\text{C}_3$ -типом фотосинтеза (рис. 3, В), что хорошо коррелирует с литературными данными [23]. Однако активность данного фермента (PEPC) у ген-нокаутных сортов была достоверно выше, чем у немодифицированных сортов, что согласно имеющимся литературным данным может оказывать влияние на элонгацию волокна хлопчатника [24]. Кроме того, ферментативная активность PEPC имела четко выраженную циркадную зависимость, достигая максимума в полдень и снижаясь практически до нуля в полночь (рис. 3, В).

Изменения карбоксилазной активности ферментов в течение дня могут быть связаны с эндогенными факторами: с функционированием устьичного аппарата, определяющего скорость поступления и диффузии  $\text{CO}_2$ -потока к центрам карбоксилирования; с интенсивностью самого процесса

карбоксилирования в цикле Кальвина-Бенсона; со скоростью регенерации акцептора  $\text{CO}_2$  – рибулозо-1,5-бисфосфата; с накоплением крахмала в хлоропластах и его метаболизацией в течение всего дня и т.д. Ограничивающим или усиливающим активность RuBPC фактором может выступить любой из вышеперечисленных компонентов фотосинтетического аппарата. Так, достижение максимальной карбоксилазной активности фермента RuBPC к 10 ч и 18 ч, возможно, связано с тем, что открытость и низкое диффузионное сопротивление устьиц  $\text{CO}_2$ -потоку приводили к увеличению концентрации  $\text{CO}_2$  в межклетниках листа и в центрах карбоксилирования, а это, в свою очередь, обусловило повышение активности RuBPC и скорости регенерации акцептора  $\text{CO}_2$  – рибулозо-1,5-бисфосфата. Незначительное снижение уровня активности RuBPC к 15 ч, возможно, объясняется повышением температуры воздуха в дневное время, что приводит к закрытию устьичной щели, с накоплением большого количества крахмала в хлоропластах, препятствующим доступу  $\text{CO}_2$  к центрам карбоксилирования.



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

Таким образом, суммируя все данные можно отметить, что динамика всех исследованных параметров фотосинтеза носила четко выраженный циркадный характер, что хорошо согласуется с данными литературы [15, 18]. Кроме того, результаты исследования влияния инсерции RNAi векторной конструкции к гену фитохрома A1 показали, что данная вставка оказывает положительное влияние на фотосинтетическую активность ген-нокаутных растений по сравнению с контрольными растениями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Elferjani R., Soolanayakanahally R. 2018. Canola Responses to Drought, Heat, and Combined Stress: Shared and Specific Effects on Carbon Assimilation, Seed Yield, and Oil Composition. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1224.
2. Yi X.-P., et al. 2018. Changes in activities of both photosystems and the regulatory effect of cyclic electron flow in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L) under water deficit. *Journal of Plant Physiology*. 220: 74–82.
3. Peng J., et al. 2016. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. *PLoS ONE* 11(5): e0156241
4. Ullah A., et al. 2017. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal*. 15: 271–284.
5. Li X., et al. 2018. Relationships between carbon fluxes and environmental factors in a drip-irrigated, filmmulched cotton field in arid region. *PLoS ONE*. 13 (2): e0192467.
6. Rao A.Q., et al. 2011. Phytochrome B mRNA expression enhances biomass yield and physiology of cotton plants. *African Journal of Biotechnology*. 10 (10): 1818-1826.
7. 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.
8. Sayre R.T., Kennedy R.A., Pringnitz D.J. 1979. Photosynthetic enzyme activities and localization in *Mollugo verticillata* populations differing in the levels of C3 and C4 cycle operation. *Plant Physiol*. 64: 293–299.
9. Camp P.J., Huber S.C., Burke J.J., Moreland D.E. 1982. Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves. I. Basis for the reduction of photosynthesis. *Plant Physiol*. 70:1641–1646.
10. Demmig B., Winter K., Kriiger A., Czygan F.-Ch. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light. *Plant Physiol*. 84: 218-224.
11. Sanchez S.E., Kay S.A. 2016. The Plant Circadian Clock: From a Simple Timekeeper to a Complex Developmental Manager. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8: a027748.
12. Resco de Dios V., Gessler A. 2018. Circadian regulation of photosynthesis and transpiration from genes to ecosystems. *Environmental and Experimental Botany*. 152: 37-48.
13. Litthauer S., et al. 2015. Phototropins maintain robust circadian oscillation of PSII operating efficiency under blue light. *The Plant Journal*. 83: 1034-1045.
14. Jones M.A. 2017. Erratum to: Interplay of Circadian Rhythms and Light in the Regulation of Photosynthesis-Derived Metabolism. In: *Progress in Botany*. Eds. Cánovas F., Lüttge U., Matyssek R. Springer, Cham. 79: 357-358.
15. Yarkhunova Y., et al. 2018. Circadian rhythms are associated with variation in photosystem II function and photoprotective mechanisms. *Plant Cell Environ*. 41 (11): 2518-2529.
16. Dakhiya Y., et al. 2017. Correlations between circadian rhythms and growth in challenging environments. *Plant physiology*. 173: 1724-1734.
17. Greenham K., McClung C.R. 2015. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics*. 16: 598-610.
18. García-Plazaola J.I., et al. 2017. Endogenous circadian rhythms in pigment composition induce changes in photochemical efficiency in plant canopies. *Plant Cell Environ*. 40: 1153-1162.
19. 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.

20. Pinnola A., Bassi R. 2018. Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. *Biochemical Society Transactions*. 46: 467–482.
21. Choudhury N.K., Behera R.K. 2001. Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplast constituents. *Photosynthetica*. 39 (4): 481-488.
22. Dodd A.N., et al. 2014. The circadian regulation of photosynthesis. *Photosynth Res*. 119: 181-190.
23. Pettigrew W. T., Gerik T.J. 2007. Cotton Leaf Photosynthesis and Carbon Metabolism. *Advances in Agronomy*. 94: 209-236.
24. Li Y., et al. 2010. Suppression of *GhAGP4* gene expression repressed the initiation and elongation of cotton fiber. *Plant Cell Rep*. 29: 193-202.

**M.M. KHOLMURADOVA, O.S. TURAEV, I.S. NORMAMATOV, J.K. NORBEKOV,  
S.M. NABIEV, F.N. KUSHANOV**

**STATISTICAL EVALUATION OF DROUGHT TOLERANCE  
OF COTTON NAM FOUNDERS**

khalmuradova.maftuna@mail.ru

Center of Genomics and Bioinformatics AS RUz

M.M. Xolmuradova, O.S. Turayev, I.S. Normamatov, J.K. Norbekov, S.M. Nabiyev, F.N. Kushanov

**G‘O‘ZANING UAK POPULYATSIYASI BOSHLANG‘ICH NAMUNALARINING QURG‘OQCHILIKKA  
CHIDAMLILIGINI STATISTIK BAHOLASH**

Maqolada g‘o‘zaning uyali assotsiativ kartalashtirish (UAK) populyatsiyasi boshlang‘ich ashyolarining qurg‘oqchilikka chidamliligi bo‘yicha olib borilgan tadqiqot natijalari yoritilgan. *GLM* statistik modeli tahlillari asosida ota-ona namunalari o‘rganilgan fenotipik belgilar bo‘yicha o‘zaro keskin farqlanishi namoyon bo‘ldi. Olingan natijalar asosida tegishli UAK populyatsiyasi tanlab olinadi va g‘o‘zaning qurg‘oqchilikka chidamlilik belgilari bilan genetik bog‘langan DNK markerlarini identifikasiya qilishda foydalaniladi.

M.M. Холмурадова, О.С. Тураев, И.С. Нормаматов, Ж.К. Норбеков, С.М. Набиев, Ф.Н. Кушанов

**СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ИСХОДНЫХ ФОРМ ГАК ПОПУЛЯЦИИ  
ХЛОПЧАТНИКА**

В статье изложены результаты гнездового ассоциативного картирования (ГАК) в исследовании засухоустойчивости родительских форм хлопчатника. На основании анализа статистической модели *GLM* родительские образцы показали значительные различия между изученными фенотипическими признаками. На основании полученных результатов будут отобраны соответствующие популяции ГАК и идентифицированы ДНК-маркеры, связанные с засухоустойчивостью хлопчатника.

M.M. Kholmuradova, O.S. Turaev, I.S. Normamatov, J.K. Norbekov, S.M. Nabiev, F.N. Kushanov

**STATISTICAL EVALUATION OF DROUGHT TOLERANCE OF COTTON NAM FOUNDERS**

This paper highlights the results of the study on drought tolerance of parental genotypes of cotton-nested association mapping population (NAM). The results of the *GLM* statistical analysis showed that the parental genotypes of NAM population sharply differ from each other by various phenotypic traits. The appropriate NAM populations will be selected and identification of DNA markers that associated with drought tolerance of cotton based on obtained results.

Cotton (*Gossypium* ssp) is one of the most important natural fiber crops in the world. Water scarcity that effects drought stress in plants is one of the major issues facing humanity today [1]. Drought or water scarcity is complex phenomenon that negative effects to the cotton plant physiology, grows and yield [2].

Adequate and timely supply of water is main factor for normal growing and developing of cotton plant. Water is necessary source throughout the life of cotton plant for normal functioning of all vital processes (biochemical and physiological), from germination to maturity.

The lack of rain and insufficient irrigation water causes serious problems in the irrigation of cotton in arid and semi-arid regions. Drought is considered the most critical factor among the abiotic stresses that negative effects to the cotton fiber quality and yield [3]. Drought stress negative effects to the turgor pressure, division and growth of cotton plant cells. Irrigation during the flowering and development of cotton bolls are the most important stages that determine cotton yield [4]. Therefore, to study the drought resistance of cotton (*G.hirsutum* L) is not only theoretical interest, but also practical significance in the sector.

There are several achievements made by scientists as a result of studying the molecular basis of drought resistance in cotton. However, many identified DNA markers (QTLs) are non-functional for the reason of they mapped on genetically limited “biparental” mapping populations [5]. Diverse mapping approaches have been developed to identify of DNA markers associated with economically important traits of plants. The nested association mapping (NAM) has the potential for greater power of QTL detection, more accurate estimation of QTL effects, better resolution of QTL positions compared with other tools [6]. The implementation of this technology to the molecular-genetic studies of cotton will allow mapping of economically important and unique genetic loci in cotton.

According to the NAM strategy, to identify of agronomic important genomic regions in cotton, requires development of multi-parental mapping population by crossing common parent with multiple diverse genotypes, as well, molecular and phenotypic evaluate of parental genotypes (founders) in the field condition [7].

The main purpose of this research was to determine the phenotypic variation of drought tolerance of cotton genotypes using statistical methods. Creating of drought tolerant varieties using molecular selection methods is an effective approach to addressing one of the most pressing problems, such as water scarcity in agriculture.

The main objectives of this research is phenotypic evaluation and statistical analysis of cotton NAM founders aim to determine their diversity in the field condition. As well, estimation of variations of breeding founders of NAM population based on the results obtained.

To achieve the goals of the study we conducted variety of morpho-biological observations in the cotton plants, as well used statistical programs aim to evaluate the reliability of obtained data.

Field experiments design. The field experiments were conducted at the Special seed-growing unit of The Center of Genomics and Bioinformatics. The experimental samples sawn in three replications with randomizing method in two conditions, optimal and water scarcity regimes. The experimental plants were irrigated under the “1x2x1” (one times irrigation until the blossom, two times irrigation during the blossom and one times irrigation after the blossom of plants) irrigation scheme in optimal regime and under the “0x1x0” (only one times irrigation of plants during the blossom) irrigation scheme in water scarcity regime.

The phenotypic assessment and statistician analysis. The morphological and biological data such as, plant height, number of bolls, number of monopodial and simpodial branches, height of the first simpodial branch were collected during the budding and crop ripening of plant vegetation. All collected data were statistically analyzed using *GLM* (General Linear Model) of *ANOVA* (Analysis Of Variances).

The 20 cotton NAM founders, such as Namangan-77 (as a common parent), KK-1796, KK-1795, L-1000, C-9006, KK-1086, Catamarca 811, C-9008, L-N1, L-141, Hapicala 19, 0-030, C-4769, L-45, Zangi-Ota, Saenr Pena 85, C-2025, KK-602, SAD-35-11 and C-417 (19 divers founders) that characterized by LD (linkage disequilibrium) parameters, unique QTL alleles, different fiber quality and several other morpho-biological traits were used in this study.

The results of the statistical analysis showed that some experimental samples have almost the same parameters in both optimal and water scarcity regime. In particular, L-45 and SAD-35-11 cotton genotypes less differ from each other by the plant height in both irrigation regime. However, the height of L-N1 and L-141 lines were significantly higher in optimal regime than water scarcity.

The trait of height of the first simpodia has positive correlation with yield’s early maturity. In this study, the height of the first simpodia of cotton plants was lower in drought condition than plants in optimal irrigated regime.

Naturally, abiotic stresses, such as water scarcity causes early flowering and early maturity in cotton normal condition. However, water scarcity negative effects to the yield and fiber quality traits.

Knowing the inheritance of monopodial branching traits of cotton NAM population from which parent is an important to the mapping of genomic regions or genes that may be attend in controlling this trait. Therefore, different morpho-biological observations were conducted in the founders of NAM population. Each of the parental genotypes showed different results in two different environments according to the monopodial branches.

The lowest indicator was shown in L-45 by monopodial branching, there was no any monopodial branch in plants that grown in drought condition, and there was an average of 1 monopodia in plants that grown in optimal condition. The highest level was an average of 2.1 on the L-N1, while the water deficit was 0.6.

When analyzed the number of sympodial branches that effects cotton yield the Namangan-77 cultivar which is common parent of NAM population was shown the highest indicator by this trait.

This variety had an average of 12.5 branches in drought condition and 15.5 branches when it was grown in optimal condition. The Zangi-Ota cotton line showed the lowest indicators, such as, 9.5 in optimal regime, 7.1 in water scarcity regime.

The number of bolls is one of the most important indicator of cotton yield. The cultivar Namangan-77 was shown the highest potential by the number of bolls in both regime (20 in optimal and 12 in water scarcity) and the lowest was shown in KK-1795 (6 and 10 respectively), Zangi-Ota (10 and 9 respectively), SAD-35-11 (12 in both irrigation regime) and S-417 (12 and 10 respectively) cotton lines.

The study showed that the number of bolls of experimental samples varied under optimal and drought conditions, as well, identified genotypes with the highest characteristics under the drought.

In summary, the founders of NAM population showed different level of resistance in drought condition. This allow us properly choose of respective NAM population for genetic mapping of QTLs that associated with cotton drought tolerance. It is necessary correctly selecting of wide genetic segregating NAM families to fine map of interested economically important traits in cotton.

According to the results of analysis showed contrast by the trait of plant height between the common parent Namangan-77 and KK-1796, KK-1795, L-1000, C-9006, KK-1086, Catamarca 811, C-9008 and C-417 NAM founders. Accordingly, the genetic segregated NAM families obtained based on respective parental genotypes further increases efficiency of mapping genes that attended to control the trait of plant height;

There is a great efficiency to map of height of the first fruit branch in use of NAM families that derived through crossing Namangan-77 with KK-1795, C-9008, Hapicala 19, 0-030, C-4769, L-45, Zangi-Ota, Saenr Pena 85, C-2025, KK-602, SAD-35-11 and C-417 because of highly segregation between parental genotypes;

The sharp distinctions between Namangan-77 and 0-030, L-45, Zangi-Ota, C-417 lines give an advantage in mapping of genes related to the trait of number of monopodial branches using NAM families that derived respective founders;

The use of NAM families that obtained based on the common parent and KK-1086, Hapicala 19, 0-030, C-4769, Zangi-Ota, Saenr Pena 85, C-2025, KK-602, C-417 lines in identification of genes participating in the control of the number of sympodial branches shows a high potential due to differences between NAM founders;

The sharp differences between Namangan-77 and 2, 3, 5 and 6 lines by the number of cotton bolls lead to extensive genetic segregation of the respective NAM families and increase the reliability of the genetic mapping of this trait.

The obtained results can allow us to molecular evaluate and genetic tagging of cotton drought resistance based on NAM population. The diversity of drought resistance in parental genotypes causes the wide genetic segregation of NAM population by this trait and further increases the potential for genetic mapping.

## REFERENCES

1. Rampino P. 2006. Drought stress Responses in Wheat: Phisiological and Molekular analysis of Resistant and Sensitive Genotypes. Plant, cell, Environ., pp. 365-375.
2. Muhammad Iqbal, Mueen Alam Khan, Muhammad Naeem, Usman Aziz, Javeria Afzal and Muhammad

- Latif. 2013. Inducing Drought Tolerance in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Accomplishments and Future Prospects. World Applied Sciences Journal 21 (7): 1062-1069.
3. Wiggins MS, Leib BG, Mueller TC, Main CL. 2013. Investigation of physiological growth, fiber quality, yield, and yield stability of upland cotton varieties in differing environments. J. Cotton Sci. 17:140-148.
  4. Han HL, Kang FJ. 2001. Experiment and study on effect of moisture coerce on cotton producing. Trans. CSAE 17:37-40.
  5. Ozod Turaev, Fakhridin Kushanov, Abdusalom Makamov, Mukhtor Darmonov, Naim Husenov, Bakhtiyor Rakhmanov. Statistical analysis for stability of fiber quality traits of cotton NAM founders. Proceedings of the III Tashkent International innovation forum. 2017. P. 176-182.
  6. Ogut, F., Bian, Y., Bradbury, P. et al. Joint-multiple family linkage analysis predicts within-family variation better than single-family analysis of the maize nested association mapping population. Heredity 114, 552–563 (2015). <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.123>
  7. Abdurakhmonov, I.Y.; Kohel, R.J.; Yu, J.Z.; Pepper, A.E.; Abdullaev, A.A.; Kushanov, F.N.; Salakhutdinov, I.B.; Buriev, Z.T.; Saha, S.; Scheffler, B.E.; Jenkins, J.N. & Abdulkarimov, A. (2008). Molecular Diversity and Association Mapping of Fiber Quality Traits in Exotic *G. hirsutum* L. Germplasm. Genomics, Vol. 92, No. 6, (October 2008), pp.478-487.

**<sup>1</sup>КАМБУРОВА В.С., <sup>2</sup>АХУНОВ А.А., <sup>2</sup>ХАШИМОВА Н.Р., <sup>1</sup>ДАРМАНОВ М.М.,  
<sup>2</sup>БАБАЕВА Д.Т., <sup>1</sup>УСМАНОВ Д.Э., <sup>1</sup>МАМАТКУЛОВА Г.Ф.**

### **ВЛИЯНИЕ БИОСТИМУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ХЛОПЧАТНИКА СОРТА ПОРЛОК-4**

e-mail: venera\_k75@mail.ru

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

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии АН РУз

Kamburova V.S., Akhunov A.A., Xashimova N.R., Darmanov M.M., Babaeva D.T.,  
Usmanov D.E., Mamatkulova G.F.

### **PORLOQ-4 G'O'ZA NAVNING GEN EKSPRESSIYA VA ANTIOKSIDANT FERMENTLAR FAOLLIGIGA BIOSTIMULYATORLARNING TA'SIRI**

Porloq-4 g'o'za navning o'sish va rivojlanishiga, gen ekspressiyasiga va antioksidant fermentlarning faolligiga ta'siri o'rganilgan. Natijalar shuni ko'rsatdiki, DAG-1 va Bioduks preparatlar barcha o'rganilgan ko'rsatkichlarga ijobiy ta'sir qilgan.

Камбурова В.С., Ахунов А.А., Хашимова Н.Р., Дарманов М.М., Бабаева Д.Т.,  
Усманов Д.Э., Маматкулова Г.Ф.

### **ВЛИЯНИЕ БИОСТИМУЛЯТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У ХЛОПЧАТНИКА СОРТА ПОРЛОК-4**

Было изучено влияние биостимуляторов на рост и развитие, уровень экспрессии генов и активность антиоксидантных ферментов хлопчатника сорта Порлок-4. Результаты показали, что препараты ДАГ-1 и Биодукс оказывали положительный эффект на все исследованные параметры.

Kamburova V.S., Akhunov A.A., Xashimova N.R., Darmanov M.M., Babaeva D.T.,  
Usmanov D.E., Mamatkulova G.F.

### **INFLUENCE OF BIOSTIMULANTS ON THE GENE EXPRESSION AND THE ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN POPLOQ-4 COTTON VARIETY**

The effect of biostimulants on growth and development, the gene expression level and the antioxidant enzymes activity of cotton variety Porloq-4 was studied. The results showed that the preparations DAG-1 and Biodux had a positive effect on all the studied parameters.

Известно, солевой стресс вызывает дисбаланс клеточных ионов, что приводит к ионной токсичности, осмотическому стрессу и выработке активных форм кислорода (АФК), что влияет на рост растений, их морфологию и выживание [1, 2]. Солевой стресс вызывает чрезмерное образование АФК, таких как супероксидные анионы, перекись водорода и гидроксильные радикалы [3 – 7]. Солеустойчивые растения могут не только более эффективно регулировать движение ионов и воды, но также должны иметь лучшую антиоксидантную систему для эффективного удаления АФК. У большинства растений более высокие уровни активности антиоксидантных ферментов рассматриваются как один из возможных механизмов устойчивости к абиотическим стрессам [3 – 7].

В тоже время существует несколько экологически безопасных схем для улучшения продуктивности сельскохозяйственных культур при различных абиотических стрессах. Одно из таких применений включает укрепление систем естественной защиты растений за счет использования полезных микробов и природных биостимуляторов [8, 9].

В связи с вышеизложенным, основной целью исследования было исследование влияния биостимуляторов на экспрессию генов ферментов антиоксидантной системы у ген-нокаутного сорта хлопчатника Порлок-4 в условиях, выращенного в условиях Сырдарьинской области.

Объектом исследования был сорт хлопчатника Порлок-4, принадлежащий к типу хлопчатника *G. hirsutum*, и биопрепараты ДАГ-1 и Биодукс, использованные для обработки при выращивании этого сорта в условиях Сырдарьинской области. Препарат ДАГ-1 на основе глицирризиновой кислоты из корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L. был получен в Институте биоорганической химии АН РУз. Препарат Биодукс использовали в качестве стандарта.

Полевые эксперименты для выбранных биостимуляторов были выполнены с помощью рандомизированного полного блочного дизайна с тремя повторностями. Обработка семян проводилась путем замачивания семян в растворе биостимулятора согласно инструкции производителя. Кроме того, в процессе вегетации проводилась обработка кустов хлопчатника суспензией препарата. В качестве контроля использовались необработанные семена хлопчатника. Фенотипические наблюдения проводились на экспериментальном участке.

*Обработка семян для биохимических исследований.* Оголенные семена хлопчатника были выдержаны в течение 8 ч в водном растворе ( $10^{-7}$  М) препарата ДАГ-1 и Биодукс (в концентрации 0,03%, рекомендуемый изготовителем). Затем семена, завернутые в бумажные «рулоны» помещали в отдельные сосуды с раствором NaCl, контрольные - в воду. После 7 суток изучали активность ферментов.

Содержание белка определяли по методу Лоури [10]. Определение активности POD проводили спектрофотометрически по методу Бояркина (1951) [11]. Общую активность SOD определяли спектрофотометрически при длине волны 560 нм (NBT) согласно Giannopolitis и Ries (1977) [12] с некоторыми модификациями [13]. Активность каталазы определяли в соответствии с методом Aebi (1971) [14].

Тотальная РНК выделена с помощью метода Wu et al. (2002) [15]. 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 РНКазу 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° C в течение 5 мин, затем 45 циклов: 10 с при 95° C, 15 с при 60° C и 15 с при 72° C. 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 [16]. Все реакции были выполнены с тремя повторностями. Метод 2<sup>-ΔΔCt</sup> был использован для расчета относительной экспрессии дифференциально экспрессированных генов [17]. Все праймеры были разработаны с использованием специального программного

обеспечения Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) и Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

В работе были использованы праймеры для RT-PCR, представленные в табл. 1.

Таблица 1.

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

№	Название праймера	Праймерная последовательность (5'→3')	Кодируемый белок
1.	GhSOD1-f	CATCTCTCACGCACTCTGTCTGTC	Цитозольная Cu/Zn супероксид-дисмутаза 1
2.	GhSOD1-r	CCTTAGCCATTTCTGTCTGTG	
3.	GhAPX1-f	TCGTTGCCGTTGAGATTAC	Цитозольная аскорбатпероксидаза 1
4.	GhAPX1-r	TGGTAGCATCAGGAAGACG	
5.	GhCAT1-f	TGATAAGTTGCTCCAGACTCG	Каталаза изоформа 1
6.	GhCAT1-r	CTTCGTGGTGATTGTTGTGA	
7.	GhSOD-f	TCCTCTCTCCGGGCCACACT	Цитозольная Cu/Zn супероксид-дисмутаза
8.	GhSOD-r	ACTCCGCTCACCAGGACCAA	
9.	GhPOD1-f	CCAATCTGGGTCCGGCAAACC	Пероксидаза изоформа 1
10.	GhPOD1-r	CCAGGGGTCCCGTCACGTTT	
11.	GhCAT-f	GCCTGTTGGCCGCTTGGTTT	Каталаза
12.	GhCAT-r	GGAACCACAATGGCAGGGCAAAA	
13.	GhAPX-f	AGCGTGGCACTCAGCTGGAA	Цитозольная аскорбатпероксидаза
14.	GhAPX-r	CAACGGCAACGACACCAGCAA	
15.	GhGPX-f	CAGTGCATTGTGGAAGGCAGGAA	Глутатионпероксидаза 2
16.	GhGPX-r	GGGAGGCGTCTTCAGCCATGT	
17.	GhGR-f	CAGTGCATTGTGGAAGGCAGGAA	Глутатионредуктаза
18.	GhGR-r	GGGAGGCGTCTTCAGCCATGT	
19.	GhUBI-f	GAGACGTAGTTAGAAAGGAAG	Убиквитин
20.	GhUBI-r	AGTACGTTCCCATTCGGGAAC	

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием пакета программ OriginPro 7.0. Данные представлены как средняя  $\pm$  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.

Растительные ферменты, особенно антиоксидантные ферменты, играют центральную роль в различных физиологических процессах на протяжении жизненного цикла растений – от прорастания до старения [3 – 7], и оценка активности антиоксидантных ферментов (SOD, POD и CAT) необходимо для прояснения адаптивных возможностей растений к стрессовым воздействиям.

В связи с этим, перед полевыми исследованиями по выявлению эффекта различных стимуляторов на рост-развитие и урожайность хлопчатника сорта Порлок-4 была проведена сравнительная оценка функционирования антиоксидантной системы в 7-суточных проростках, семена которых были обработаны препаратами ДАГ-1 Биодукс в условиях 100 мМ NaCl засоления (табл. 2).

Результаты исследований показали различный характер в активности SOD в условиях засоления (табл. 2): большая активность фермента наблюдалась при использовании препарата ДАГ-1. Определение активности POD показало, что наибольшая активность фермента выявлена у пророст-

ков предобработанных препаратом Биодукс, выросших на фоне засоления (табл. 2). В тоже время отмечалась высокая активность САТ при действии ДАГ-1 в условиях солевого стресса (табл. 2).

Таблица 2

**Активность антиоксидантных ферментов  
при действии биостимуляторов в условиях 100 мМ NaCl засоления**

№	Варианты опыта	Активность ферментов (ед/мг белка)		
		SOD	POD	САТ
1	Контроль (вода)	21,6±0,92	112,9±6,88	72,5±2,87
2	ДАГ-1	120,8±7,23	105,6±7,21	93,4±1,28
3	Биодукс	26,0±1,55	374,6±9,36	64,1±3,40

Таким образом, предобработка семян хлопчатника Порлок-4 препаратами ДАГ-1 и Биодукс оказывала стимулирующее влияние на антиоксидантную систему проростков сорта Порлок-4 на фоне 100 мМ NaCl засоления: так препарат ДАГ-1 индуцировал активность SOD и САТ, в то время как Биодукс преимущественно стимулировал активность POD.

На следующем этапе исследований были проведены фенотипические исследования влияния биостимуляторов на рост и развитие хлопчатника сорта Порлок-4 в условиях полевого эксперимента в Сырдарьинской области, почвы в которой отличаются умеренной степенью засоления. При этом было показано, что обработка биостимуляторами статически достоверно изменяла всхожесть семян хлопчатника (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние биостимуляторов на всхожесть семян хлопчатника сорта Порлок-4**

№	Препарат	Дата посева	Дата появления первых всходов	Среднее число всходов на гектар
1	Контроль	01.05.2019	07.05.2019	202 ± 4
2	ДАГ-1	01.05.2019	06.05.2019	218 ± 3
3	Биодукс	01.05.2019	06.05.2019	198 ± 6

Так, обработка семян хлопчатника сорта Порлок-4 препаратом ДАГ-1 увеличила среднюю всхожесть семян на 8% по сравнению с контрольными необработанными семенами. Тогда как обработка препаратом Биодукс статистически достоверно не повлияла на всхожесть семян (табл. 3).

Кроме того, результаты исследования показали, что обработанные препаратами образцы имели более высокое количество плодоземелетов по сравнению с контрольными. Вместе с тем у обработанных образцов наблюдалось более раннее формирование первого настоящего листа, бутонизация, цветение и созревание хлопка. Окончательные результаты показали, что образцы, обработанные биопрепаратами, имели более высокий выход волокна, чем контрольные образцы (табл. 4).

При этом обработка препаратом ДАГ-1 существенно увеличивала как общее число коробочек, так и урожайность хлопчатника сорта Порлок-4. Тогда как обработка препаратом Биодукс увеличивала общее число коробочек и урожайность менее значительно (табл. 4).

Таблица 4

**Влияние биостимуляторов на параметры развития хлопчатника сорта Порлок-4**

№	Препараты	Средняя высота, см	Число плодовых ветвей	Число саженцев	Общее число коробочек	Число коробочек на одном растении	Вес одной коробочки	Урожайность, ц/га
1	Контроль	100 ± 4	12,0 ± 2,2	102 ± 5	950,0 ± 10,0	9,3 ± 1,1	4,6 ± 0,6	43 ± 3,8
2	ДАГ-1	105 ± 2	13,0 ± 1,5	115 ± 3	1100,0 ± 15,0	9,6 ± 0,8	5,0 ± 0,4	52 ± 3,3
3	Биодукс	104 ± 5	13,3 ± 2,6	87 ± 6	1010,0 ± 17,0	11,6 ± 1,5	4,9 ± 0,7	47 ± 4,2

В дальнейшем был проведен лабораторный анализ ряда параметров качества волокна. Согласно результатам анализа было выявлено, что образцы, обработанные препаратами, имели более высокий выход волокна и массу 1000 семян по сравнению с контрольными необработанными образцами. Так, при обработке препаратом ДАГ-1 выход волокна, масса 1000 семян и длина волокна были статистически выше, чем в контроле (табл. 5).

Таблица 5

**Влияние биостимуляторов на ряд параметров качества волокна хлопчатника сорта Порлок-4**

№	Препарат	Вес 1000 семян, г	Выход волокна, %	Длина волокна, мм
1	Назорат	112,0 ± 2,2	33,9 ± 0,9	35,8 ± 0,21
2	ДАГ-1	115,5 ± 1,8	35,2 ± 0,7	36,1 ± 0,15
3	Биодукс	113,0 ± 1,9	34,5 ± 0,9	35,9 ± 0,18

Целью дальнейших исследований было выявление наличия зависимости между фенотипическими проявлениями влияния биостимуляторов и изменениями уровня экспрессии генов антиоксидантной системы, которая, как известно из литературы, минимизирует окислительные повреждения, вызванные продуцированием активных форм кислорода во время солевого стресса [3 – 7].

Для достижения этой цели на первом этапе молекулярно-генетических исследований, используя *in silico* ПЦР, были идентифицированы кандидатные гены, и на их основе были сконструированы ген-специфичные праймеры с помощью программного обеспечения Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) (табл. 1). В дальнейшем сконструированные праймеры были использованы для определения уровня экспрессии генов антиоксидантной системы в реакции одношаговой обратной транскрипции.

При определении уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов было обнаружено статистически значимое изменение экспрессии соответствующих генов под влиянием биостимуляторов (табл. 6).

Таблица 6

**Влияние биостимуляторов на уровень экспрессии генов антиоксидантной системы хлопчатника сорта Порлок-4**

Образец	Название генов		Tgt Cp	Ref. Cp	Отношение	
	Мишень	Референс	Среднее	Среднее	Tgt/Ref.	Норм
Контроль	SOD1	UBC1	32.92±2.5	42.68±3.1	2.91E4±0.52E4	1.00±0.05
ДАГ-1	SOD1	UBC1	25.76±1.8	40.84±2.5	4.51E4±1.18E4	1.55±0.07
Биодукс	SOD1	UBC1	27.97±1.9	42.84±3.2	3.11E4±0.74E4	1.07±0.04
Контроль	POD1	UBC1	31.90±2.3	42.68±3.1	2824.4±127.1	1.00±0.03
ДАГ-1	POD1	UBC1	30.13±2.1	40.84±2.4	3730.6±241.6	2.60±0.1
Биодукс	POD1	UBC1	31.57±2.2	42.84±3.3	2742.7±115.3	2.93±0.15
Контроль	CAT	UBC1	28.77±2.0	42.66±3.1	277.57±51.2	1.00±0.04
ДАГ-1	CAT	UBC1	26.27±1.8	41.94±1.9	1.66E4±0.41E4	13.17±1.2
Биодукс	CAT	UBC1	28.73±1.9	44.40±2.9	2.32E4±0.72E4	17.24±2.3
Контроль	APX	UBC1	29.27±2.0	40.92±2.7	1376.8±98.4	1.00±0.06
ДАГ-1	APX	UBC1	28.10±1.7	42.43±2.9	2.53E4±0.41E4	11.32±0.9
Биодукс	APX	UBC1	29.43±2.1	42.20±2.8	2.85E4±0.47E4	25.01±1.2
Контроль	GPX	UBC1	34.86±2.7	40.53±2.6	66.16±13.5	1.00±0.05
ДАГ-1	GPX	UBC1	35.72±2.4	42.43±3.0	131.01±22.8	2.00±0.09
Биодукс	GPX	UBC1	37.92±3.1	44.20±3.4	81.70±21.3	1.60±0.07
Контроль	GR	UBC1	34.64±2.3	42.24±3.1	253.81±31.4	1.00±0.04
ДАГ-1	GR	UBC1	35.23±2.5	41.94±2.9	173.43±27.2	0.56±0.04
Биодукс	GR	UBC1	37.47±3.1	44.40±3.2	134.23±22.8	0.90±0.05

Уровни экспрессии генов были нормализованы с использованием гена убиквитина GhUBQ7 в качестве эталона. Значение  $P \leq 0,05$ . SOD – супероксиддисмутаза, POD – пероксидаза, CAT – каталаза, APX – аскорбатпероксидаза, GPX – глутатионпероксидаза, GR – глутатионредуктаза.

Как видно из табл. 6, уровень экспрессии гена супероксиддисмутазы (SOD) *GhSOD* у образцов хлопчатника сорта Порлок-4, обработанных препаратами ДАГ-1 и Биодукс, был увеличен по сравнению с референс-образцами, не подвергавшимися обработке. SOD обычно считается первой линией системы антиоксидантной защиты [4, 18]. SOD играет центральную роль в защите растений от токсического воздействия активных форм кислорода [18, 19]. Кроме того, было установлено, что гиперэкспрессия SOD в некоторых трансгенных растениях повышает их устойчивость к стрессу [19 – 21]. Следовательно, полученные результаты по увеличению уровня экспрессии гена *GhSOD* под влиянием биостимуляторов свидетельствуют о влиянии данных препаратов на активность SOD, что согласуется с имеющимися литературными данными [22, 23].

Неспецифические пероксидазы (POD) относятся к мультифункциональным ферментам [24] и обезвреживают пероксид водорода, используя для этого различные восстановители [18]. Они являются гомосодержащими гликопротеинами. Пероксидазы кодируются большим количеством генов [24]. Ранее в литературе было показано, что пероксидазы как мультифункциональный фермент участвуют в адаптации растений к засолению [4, 25 – 28]. На основании этих данных и результатов по влиянию биостимуляторов на уровень экспрессии гена *GhSOD* мы провели исследования влияния данных препаратов на уровень экспрессии гена *GhPOD*. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии гена *GhPOD* под влиянием препаратов ДАГ-1 и Биодукс статистически достоверно увеличился (табл. 6). Эти данные хорошо коррелируют с данными литературы [22, 23].

Каталаза (CAT) является гемосодержащим ферментом, катализирующим разложение  $H_2O_2$ . Каталаза локализована преимущественно в пероксисомах, глиоксисомах и митохондриях [18, 29]. В ответ на солевой стресс повышение активности каталазы зарегистрировано у различных растений, включая хлопчатник [4, 18]. Основываясь на этих данных литературы, нами было исследовано изменение уровня экспрессии гена *GhCAT* у хлопчатника сорта Порлок-4 под воздействием биостимуляторов. Как видно из табл. 6, растений хлопчатника, подвергавшихся обработке биостимуляторами ДАГ-1 и Биодукс, наблюдалось значительное увеличение уровня экспрессии гена *GhCAT* по сравнению с контрольными необработанными растениями. Эти данные хорошо согласуются с имеющимися литературными данными [22, 23].

Аскорбатпероксидаза (APX) обезвреживает  $H_2O_2$  с участием аскорбиновой кислоты [30]. Она локализована в хлоропластах, цитоплазме, митохондриях, пероксисомах и апопласте [31]. APX принимает участие в антиоксидантной защите растений в условиях солевого стресса, однако характер изменения активности фермента зависит от видовых особенностей [4, 27, 32 – 35]. На основании этих данных нами было изучено влияние препаратов ДАГ-1 и Биодукс на уровень экспрессии гена *GhAPX* у хлопчатника сорта Порлок-4. При этом было выявлено, что уровень экспрессии гена *GhAPX* у образцов, обработанных биостимуляторами ДАГ-1 и Биодукс, был существенно выше, чем у контрольных необработанных образцов (табл. 6). Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными [22, 23].

Глутатионпероксидазы (GPX) представляют собой семейство ключевых ферментов, участвующих в обезвреживании как пероксида водорода, так и липидных пероксидов [18]. GPX локализована в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и клеточных стенках [36]. Глутатионредуктаза (GR) обеспечивает поддержание пула восстановленного глутатиона [18, 20]. Глутатионредуктаза локализована в хлоропластах, пероксисомах, митохондриях и цитозоле [18]. Имеются сведения об участии ферментов метаболизма глутатиона в адаптации растений к засолению [33, 37 – 39]. Основываясь на этих данных литературы, нами было исследовано влияние биостимуляторов на уровень экспрессии генов *GhGPX* и *GhGR* у сорта хлопчатника Порлок-4, выращенного в условиях естественного засоления средней степени в Сырдарьинской области. Результаты исследования показали, что влияние биостимуляторов на уровень экспрессии генов ферментов метаболизма глутатиона было разнонаправленным (табл. 6). Так, уровень экспрессии гена *GhGPX* статистически значимо повышался при обработке семян хлопчатника препаратами по сравнению с контрольными образцами. В то время как уровень экспрессии гена *GhGR* под воздействием биостимуляторов ДАГ-1 и Биодукс несуще-

ственно уменьшался (табл. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии биостимуляторов ДАГ-1 и Биодукс на уровень экспрессии генов антиоксидантных ферментов, что хорошо коррелирует с данными по активности ферментов.

Суммируя приведенные в статье данные, следует отметить, что фенотипические данные по положительному влиянию биостимуляторов на рост и развитие хлопчатника (более ранняя всхожесть, формирование первого настоящего листа, бутонизация, цветение и созревание хлопка), а также урожайность и ряд параметров качества волокна, были подтверждены молекулярно-генетическими и биохимическими результатами, свидетельствуя о том, что эффект препаратов реализуется уже на молекулярном уровне.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gaber M.A. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behaviour* 5: 369–374.
2. 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.
3. Zhang L., et al. 2014. Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity. *PLoS ONE* 9(11): e112807.
4. 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.K., Shanker C. Janeza Trdine (Croatia): InTechOpen. 463–480.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N. 2014. Understanding and engineering growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal*. 12(9): 1193–1206.
9. Chatterjee A., et al. 2019. Beneficial Microorganisms and Abiotic Stress Tolerance in Plants. In *Approaches for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Plants*, eds. Hasanuzzaman M. et al.: CRC Press (USA). 473–502.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
11. Бояркин А.Н. 1951. Быстрый метод определения активности пероксидаз. *Биохимия*. 16 (6): 352–355.
12. Giannopolitis C.N., Ries S.K. 1977. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59:309–314.
13. Полесская О. Г. 2007. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва: КДУ. 137 с.
14. Aebi H. 1971. Catalases. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3: 273–286.
15. 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.
16. Fu W., 2015. Acyl-CoA N-Acyltransferase Influences Fertility by Regulating Lipid Metabolism and Jasmonic Acid Biogenesis in Cotton. *Scientific Reports*. 5: 11790.
17. 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.
18. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. 2017. Функционирование антиоксидантной системы растений при солевом стрессе. *Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія*, вип. 3. 42: 23–45.

19. Ван В., и др. 2016. Особенности генной экспрессии и механизмы регуляции супероксиддисмутазы, ее физиологическая роль в растениях при стрессе. Биохимия. 81 (5): 625 – 643.
20. Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
21. Ermakov A., Bobrovskikh A., Zubairova U., Konstantinov D., Doroshkov A. 2019. Stress-induced changes in the expression of antioxidant system genes for rice (*Oryza sativa* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.). PeerJ 7:e7791.
22. Ахунов А.А., Голубенко З., Абдурашидова Н.А., Мустакимова Э.Ч. 2014. Анализ функционирования защитных систем хлопчатника в условиях засоления и дефицита влаги. Узбекский биологический журнал. 6: 3-7.
23. Хашимова Н.Р., Мамасолиева М.А., Гафуров М.Б. 2016. Супрамолекулярный комплекс глицеризиновой кислоты с салициловой кислотой – экологически безопасный индуктор устойчивости хлопчатника. Узбекский химический журнал. 4: 92-96.
24. Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. 2003. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. Gene. 288: 129-138.
25. Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. J Plant Res. 126: 293–304.
26. Singh D., Roy B.K. 2016. Salt stress affects mitotic activity and modulates antioxidant systems in onion roots. Braz. J. Bot. 39: 67-76.
27. Vijayalakshmi T., Vijayakumar A.S., Kiranmai K., et al. 2016. Salt stress induced modulations in growth, compatible solutes and antioxidant enzymes response in two cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L. cultivar TSF1 and cultivar SM) differing in salt tolerance. Amer. J. Plant Sci. 7: 1802-1819.
28. Ahanger M.A., Agarwal R.M. 2017. Salinity stress induced alterations in antioxidant metabolism and nitrogen assimilation in wheat (*Triticum aestivum* L.) as influenced by potassium supplementation. Plant Physiol. Biochem. 115: 449-460.
29. Guan L.M., Scandalios J.G. 2000. Hydrogen peroxidemediated catalase gene expression in response to wounding. Free Radical Biol. Med. 28: 1182-1190.
30. Noctor G., Mhamdi A., Foyer C.H. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. Plant Physiol. 164: 1636-1648.
31. Foyer C.H., Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. Antioxid. Redox Signal. 11: 861-906.
32. Srivastava A.K., Srivastava S., Lokhande V.H., et al. 2015. Salt stress reveals differential antioxidant and energetics responses in glycophyte (*Brassica juncea* L.) and halophyte (*Sesuvium portulacastrum* L.). Front. Environ. Sci. 3:19.
33. AbdElgawad H., Zinta G., Hegab M.M., et al. 2016. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. Front. Plant Sci. 7:276.
34. Taïbi K., Taïbi F., Abderrahim L.A., Ennajah A., et al. 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South Afr. J. Bot. 105: 306-312.
35. Yasar F., Uzal O., Yasar O. 2016. Antioxidant enzyme activities and lipidperoxidation amount of pea varieties (*Pisum sativum* sp. *arvense* L.) under salt stress. Fresenius Environ. Bull. 25: 37-42.
36. Zelinova V., Mistrík I., Pavlovkin J., Tamas L. 2013. Glutathione peroxidase expression and activity in barley root tip after short-term treatment with cadmiumhydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. Protoplasma. 250: 1057-1065.
37. Waskiewicz A., Gładysz O., Szentner K., Golinski P. 2014. Role of glutathione in abiotic stress tolerance. In Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling, ed. Ahmad P.: Academic Press is an imprint of Elsevier (USA). 149-181.
38. Štolfa I., Špoljarić Maronić D., et al. 2016. Glutathione and related enzymes in response to abiotic stress. In Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses, eds. D.K. Gupta et al.: Springer International Publishing (Switzerland). 183-211.
39. Vighi I.L., Benitez L.C., Amaral M.N., et al. 2017. Functional characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress. Biol. Plant. 61: 540-550.

**ABDULLAEV S.A., BOLKIEV A.A., SULTONOVA SH.A., ABDULLAEV A.N., ESHMURZAEV J.B.,  
UBAYDULLAEVA Kh.A., BURIEV Z.T., KHURSHUT E.**

**DETERMINATION OF POLLEN VIABILITY OF BISEXUAL  
AND FUNCTIONAL MALE FLOWERS OF CENTRAL ASIAN POMEGRANATE**

sadullaabdullevich@mail.ru

Center of Genomics and Bioinformatics AS RUZ, Laboratory of Transgenomics and tissue culture

Абдуллаев С.А., Болкиев А.А., Абдуллаев А.Н., Султонова Ш.А., Эшмурзаев Ж.Б., Убайдуллаева Х.А.,  
Буриев З.Т., Хуршут Э.

**МАХАЛЛИЙ АНОР НАВЛАРИНИ ЧАНГЛАНТИРИШ ҚОБИЛИЯТИНИ АНИҚЛАШ**

Марказда Ўрта Осиё анор навларининг турли гул жинсларининг фертилик ва (оталантириш қобилияти) стерлик хусусиятини тадқиқ қилиш бўйича бир катор ишлар олиб борилмоқда. Чанг споралари ҳисоби ва морфологик белгилари микроскоп остида тадқиқ қилинди. Маълумотлар ва чанг споралари фертиллигини баҳолашнинг тўғрилигини тасдиқлаш учун чанг доналари 3 хил БК (Brewbaker and Kwack (BK), агароза, FDA сунъий озуқа мухитлари танлаб олинди. Тадқиқот натижаларига қўра шуни хулоса қилиш мумкинки, Туя тиш нави чанг доналарини фертилик қобилиятини аниқлашда FDA эритмаси назоратга нисбатан энг аниқ натижалар олинди.

Абдуллаев С.А., Болкиев А.А., Абдуллаев А.Н., Султонова Ш.А., Эшмурзаев Ж.Б., Убайдуллаева Х.А.,  
Буриев З.Т., Хуршут Э.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ МЕСТНЫХ СОРТОВ ГРАНАТА**

В центре ведется работа с различными типам мужской и женской стерильности и фертильности, в том числе с оригинальным типом мужской фертильности у граната. Для подсчета и изучения морфологических признаков пыльцевых зерен образцы просматривали под микроскопом. Для подтверждения достоверности данных и определения фертильности пыльцы был проведен опыт по проращиванию пыльцевых зерен на 3 разных питательных средах методом, раствор- БК (Brewbaker and Kwack (BK), агароз, раствор FDA. По результатам можно сделать заключение, что для определения процент жизнеспособности сорта Туя Тиш при обработке растворами FDA показал более точные результатов по сравнению с контролем.

Abdullaev S.A., Bolkiev A.A., Sultonova Sh.A., Abdullaev A.N., Eshmurzaev J.B., Ubaydullaeva Kh.A.,  
Buriyev Z.T., Khurshut E.

**DETERMINATION OF POLLEN VIABILITY OF LOCAL POMEGRANATE VARIETIES**

The center is working to determine various types (male and female flower) viability, including the original type of male fertility in the pomegranate cultivar. To count and study the morphological features of pollen grains, the samples were examined under a microscope. To confirm the reliability of the data and determine the viability of pollen, an experiment was carried out on germinating pollen grains on 3 different nutrient media by the method, solution - BK (Brewbaker and Kwack (BK), agarose, FDA solution. Tuya Tish, when treated with FDA solutions, showed more accurate results compared as control.

The world of plant kingdom strikingly beautiful with its tropical plants as avocado (*Persea americana*), fig (*Ficus carica*), pomegranate (*Punica*), orange (*Citrus × sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), lemon (*Citrus limon*), grapefruit (*Citrus paradisi*), olive (*Olea europaea* L), persimmon (*Diospyros*), jujube (*Ziziphus jujuba* Mill), pistacia (*Pistacia*), mespilus medlar (*Mespilus*), laurus (*Laurus*).

In the condition of Uzbekistan pomegranate (*Punica granatum*) is widely cultivated throughout all regions and it has been cultivated since ancient times. *P. granatum* is grown for its large and juicy fruits, which is attractive with its red color, and due to its high adaptation to all kinds of soil and climate, (including tolerance of drought, salt, iron chlorosis and active calcium carbonate) and production process has been reached on the industrial level.

Uzbekistan is a sun Republic with an extreme continental climate that expressed in sharp amplitudes

with an average difference of 11° C between day and night, and it leads to some problems in the cultivation of high quality pomegranates. The sharply cross of temperature is negatively affected and leads to split of pomegranate fruits or lower temperature in the winter season till minus 25° C lead to plant death. To meet export market standards, the fruit has to be of a certain size; this is related to pollination success and consequently to seed number [Derin and Eti 2001]. The domestication over the thousands of years, pomegranates have gathered many genetical changes in their genome, allowing the species to adapt, spread, and successfully grow in different ecological conditions. Pollens in these terms have a significant contribution to their genetic makeup [1,3].

There are some reports about pomegranate pollen studies, determining pollen morphology (Erdtman, 1971; Zhao and Xiao, 1996; Yin et al., 2011), pollen tube growth (Gadzeet al., 2011), *in vitro* germination capability (Derin and Eti, 2001; Engin and Hepaksoy, 2003, Engin and Gökbayrak, 2017), *in vitro* germination with different hormones (Engin and Gökbayrak, 2015; Engin and Gökbayrak, 2016); *in situ* viability (Gökbayrak and Engin, 2018).

In the nature Pomegranate (*Punica granatum L.*) has two types of flowers, a condition referred to as andromonoecy. In other words, hermaphrodite flowers (bisexual) and male flowers (functional male flowers) develop on the same plant. Sometimes, the same pomegranate tree can carry three types of flowers, namely hermaphrodite, male and intermediate forms [4].

*In vitro* germination involves germinating the pollen on artificial media and determining germinability and pollen tube growth. Agar, sucrose and boron (B) are the most widely used medium for determining *in vitro* pollen germination and tube growth [5]. Pomegranate pollen is reported to have a higher germination rate in 15% sugar-containing germination medium compared to 10% sugar-containing medium [6].

There are few studies on the reproduction biology of pomegranate. Effective factors to germination, production and viability of pollens are not known enough [5]. Pomegranate is an andromonoecious species having two type flowers on the same plant, in other words, hermaphrodite flowers (bisexual) and male flowers (functional male flowers) that develop on the same plant. *In vitro* study of pollen viability, germination is an important in modern taxonomy. There are no reports *In vitro* pollen viability, germination among Asian pomegranate cultivars. This research aimed to study pollen viability one of the Asian pomegranate cultivar of “Tuya Tish”.

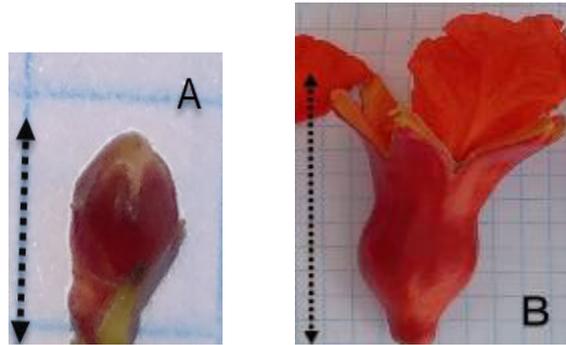
For *in vitro* studies was selected 4 years old *Punica granatum L* cultivar of “Tuya Tish”, and the plants have been grown at the experimental field of Center of Genomics and Bioinformatics. The formation of pomegranate flowers buds and pollen occurred from the beginning of April until the end of May. To avoid physiological deterioration and out pollination flowers bud was bagged with white paper 58% transmission of sun light. To determine pollen viability, bisexual and functional male flowers were collected into plastic box with ice from the early hours 6:00 till 17:00 from healthy plants. Before storing in a refrigerator flowers buds fixed in a solution (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH- 70%, CHCl<sub>3</sub>- 30%, and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>- 10%, FeCl<sub>3</sub>- 1 gramm) for 48 h, then transferred to 70% (v/v) ethanol into brown glass vials. Vials were stored in a refrigerator at +4 °C until examined.

Anthers were slowly detached from the flowers with forceps under MSZ5000 microscope (90x, China). Anthers after sterilization with FAA (37% formaldehyde, 70% ethanol, 98% acetic acid in a ratio of 10:80:10 v/v) which preserved in 70% ethanol for 24 h, transferred into the medium for studying pollen germination under *in vitro* condition. For estimating pollen viability/ germination was using three mediums, Brewbaker, FDA (fluorescent diacetat) test and as control taken agar method agar -0,2 mg/mL, sucrose - 10 mg/mL and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -5 ppm (Forlani and Rotundo, 1977).

Brewbaker and Kwack (BK) medium contains H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-0,1mg/mL, Ca(NO<sub>3</sub>)· 4H<sub>2</sub>O - 0,3 mg/mL, MgSO<sub>4</sub>· 7 H<sub>2</sub>O -0,2 mg/mL, KNO<sub>3</sub> -0,1 mg/mL, sucrose -10 mg/mL, agar - 0,5 mg/mL; pH 6.5. FDA (Fluorescent diacetat-Thermo Fisher®) 2 mg fluorescent diacetat and 1.71 g sucrose in 10 ml dH<sub>2</sub>O. Agar method contains – agar 0,2 mg/mL, sucrose+ 10 mg/mL and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> -5 ppm.

In order to develop a methodology to evaluate pollen quality, it is necessary to establish different stages that make it possible to estimate quality in terms of viability and germination through the optimization of *in vitro* pollen germination [6]. The appearance of Asian “Tuya tish” pomegranate cultivar flower buds in the axils was noticed from middle of April and this period finished end of May (photo 1).

Tuya tish had two types flowers on the same tree, hermaphrodite flowers (bisexual) and male flowers (functional male flowers). Flower bud length reached at 3 cm on 12-14 May in both bisexual and functional



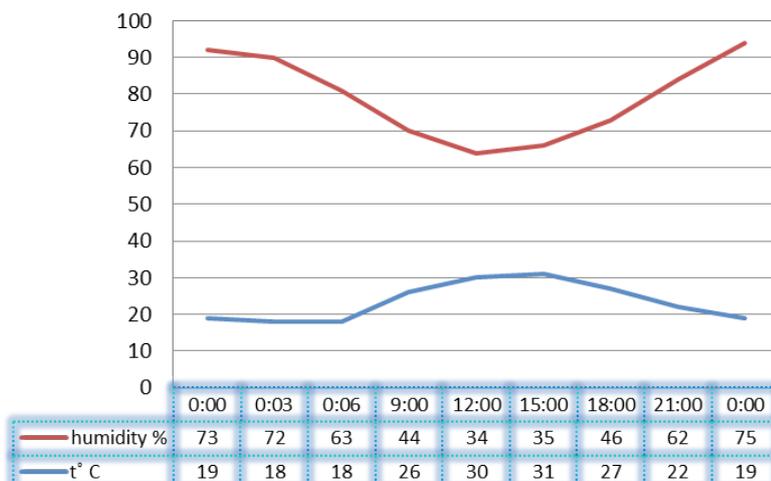
**Photo 1.** Developing stage of “Tuya tish” flower bud, a- 0,4 –cm (25 April), b- 5,5 cm (12 May).

male flowers and there were no differences between both flower bud in the develop intensity. But the number between bisexual and functional male flower ratios had different quantity, a functional male was significantly more than bisexual. The blooming period in the selected hermaphrodite flowers and functional male flowers lasted 16 days over study period (photo 2).



**Photo 2.** Developing stage of “Tuya tish” cultivar, (selected bisexual flower), (from left to right) 25 April – 12 May. A- length 1.5 cm, weight- 0,032 rpamm, B-length 5,5 cm, weight 9,071 gr.

Collected flowers in a different time of a day reflected significant differences pollen viability in in vitro condition, despite composition of solution. Collection of selected flowers for pollen viability study was organized in 22 may, and maximum high temperature and the lowest humidity was detected at 15:00 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Value of temperature °C and humidity (%) in the experimental field during collection of pomegranate flowers (22 may, 2020)

When we evaluated the effect of *in vitro* medium on the viability of pomegranate pollen, a statistically significant difference was found between male and hermaphrodite flowers (1 table).

Table 1

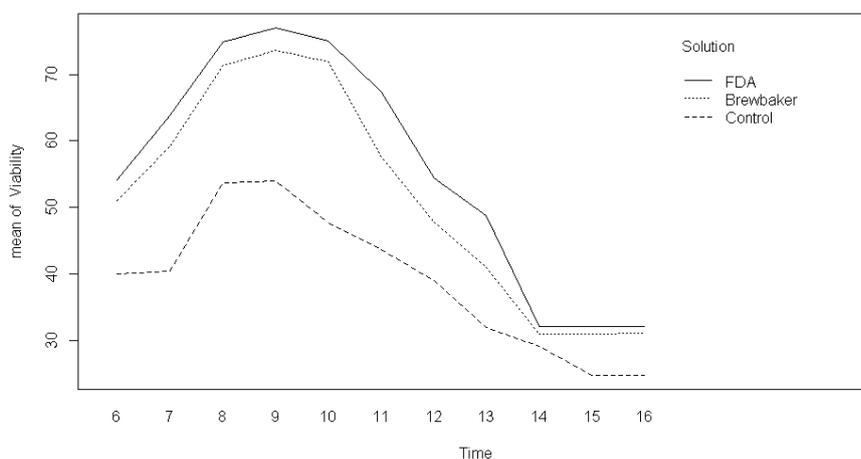
**Analysis of the viability of pomegranate pollen collected from experimental field Tuyu Tish cultivar, in 22 May and at eleven time points (staminate flower)**

	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Median
Brewbaker	51.4	59.2	71.5	73.9	71.9	59.5	46.7	40.6	31	31.0	31.0	51.5
Control	39.9	40.4	53.9	53.9	48.5	43.3	39.0	31.9	29	24.8	24.7	39.9
FDA	54.1	63.9	75.0	77.0	75.1	67.5	54.2	48.8	32	32.0	32.0	54.4
Medians (by hours)	51.4	59.2	71.5	73.9	71.9	59.5	46.7	40.6	31	31.0	31.0	NA

According to many research papers, agar –media with sucrose could not illustrate all potential percentages of pollen viability. Significant differences in the viability of pomegranate pollen grains were detected among 11times of a day (Table 1). The FDA and Brewbaker solution showed higher pollen viability than variety Agar with with sucrose& H3BO3 which is selected as control. Pollen in FDA and Brewbaker solution showed viability values of 94,9 % and 84%, lower percent of viability detected in a control medium, 77,5%, when flowers of pomegranate were collected at 9:00 am, and temperature of day reached to 24°C and humidity 46%.

Pollen at the higher viability started in all three medium, which is collected pomegranate flowers from 7:00 am, temperature rate began to increase from 18 °C to 24 °C and relative humidity decreased from 63% to 44%, in FDA variant pollen viability percent was detected form 84,3% to 86,3%, in Breabacker solution between 82% -84,9% respectively. The lowest percent of pollen viability was counted in control variant 66-73% at the same time of a day.

Flowers collected at 12:00 h, when temperature and relative humidity were approximately 30.1°C and 34%; respectively, were more unviable in three medium, FDA-77%, Breabacker -74%, agar medium 66,9%, than pollen collected at 10:00h and 11:00h, when temperature ranged between 27.6 and 28.7°C and relative humidity ranged between 27.6% and 28.2%, FDA-89,7%, 85,9%, Breabacker-85,3,3%, 82%, agar medium 79,3%, 73% (Fig. 2).



**Fig. 2.** Tuyu tish cultivar- male flower's pollen viability rate.

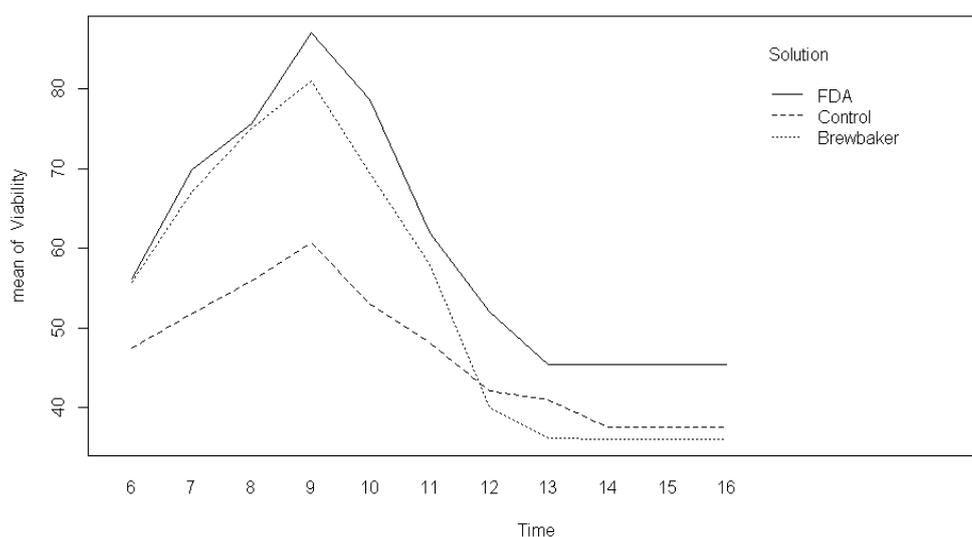
Pollen grains obtained from the male flowers at 15:00 and 16:00 when temperature and humidity of a day were 30.3°C - 29,1°C and relative humidity 35%, showed the lowest viability in control agar media (control) 40,3 %. Pollen viability value between two hours were same in control media, when FDA illustrated 60,1 %, at 15:00, and the lowest pollen viability 55,5% at 16:00, and in the second Brewbaker medium pollen viability ranged 54% in first time and the lowest 46,3% in the end of afternoon.

We also tested pollen viability and in vitro germination of bisexual on pomegranate variety 'Tuyu Tish (Table 3) using three medium. According to result pollen germination in *in vitro* condition the three medium test and the results did not exhibit any statistically significant differences, although staminate (male) flowers had slightly higher viable pollens (Fig. 3).

**Analysis of the viability obtained pollen from pomegranate bisexual flowers, Tuya Tish cultivar, in 22 May and at eleven time points**

hours	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Median
Brewbaker	55.2	67.0	75.0	81.1	70.0	58.0	40.0	36.1	36.0	36.0	36.0	55.2
Control	47.5	51.8	55.9	60.8	52.9	48.1	42.1	40.9	37.6	37.4	37.4	47.5
FDA	56.1	69.7	76.0	87.1	79.0	64.0	51.0	45.0	45.0	45.0	45.0	56.1
Medians (by hours)	55.2	67.0	74.7	81.1	70.0	58.0	42.1	40.9	37.6	37.4	37.4	NA

We also tested pollen viability and in vitro germination of bisexual on pomegranate variety ‘Tuya Tish’ (Table 2) using three mediums. The evaluation of the effect of the solution on the percentage of viability indicates that the percentage of viability both staminate and bisexual flowers remained constant till at 9:00 am when the temperature of the day reached to 24°C and humidity 46%. Bisexual flower pollen viability in agar media ranged 63-35%, the highest point detected 77,5%, and the lowest 35% with 31 °C and relative humidity 35%. With regards to the FDA, the highest percent 91% was detected at 9:00 am when Brewbacker demonstrated 84%, and the lowest rate of FDA was at 16:00 with 52.7%, this value in the second medium was 42% (Fig. 3).



**Fig. 3.** Tuya tish cultivar- bisexual flower’s pollen viability rate.

**Conclusion.** The *in vitro* study of pomegranate pollen grains viability can provide relevant information on the best day and time of the day for pollen collection. Thus, it might help to improve the efficiency of fruit breeding, and provide information on pollen germination and viability that allow future pollen usage in the field.

#### LITERATURE

1. Chen, L., Tong, Q.Q., Gao, Q.K. et al. 1997. Observations on pollen morphology of 8 species and 1 variety in genus *Camellia*. *Tea Science* 17:183-188.
2. Erdtman, G. 1969. *Handbook of Palynology - an Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores*. Munksgaard, Copenhagen, p. 3-20.
3. Erdtman, G. 1971. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms*. Hafner Publishing Company, New York, p.10-18.
4. Engin, H., Gökbayrak, Z., Altunbaş, D. (2015). Effect of epibrassinolide, gibberellic acid and naphthalene acetic acid on pollen germination of some pomegranate cultivars. *COMU J. Agric. Fac.*, 3(2):

- 19-25.
5. Guo, X.F., Wang, L.Y. and Yuan, T. 2005. Study on pollen morphology of 4 wild herbaceous peony. *Scientia Silvae Sinicae* 41:184-188.
  6. Huang, L.S., Li, S.L., Fu, C.S. et al. 1993. Comparative observations on morphological characteristics of pollen of *Pyrus* in China. *Acta Horticulturae Sinica* 20:17-22.
  7. Lansky, E.P. and Newman, R.A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 109:177-206.
  8. Lu, L.D., Liu, S.X., Deng, C.L., Lu, Z.Y., Wang, X.F. and Gao, W.J. 2007. Studies on classification of pomegranate cultivars by RAPD analysis. *Journal of Fruit Science* 24:634-639.
  9. Mars, M. 2000. Pomegranate plant material: genetic resources and breeding a review. *Options Mediter. Ser.* 42:55-62.

ИМАМХОДЖАЕВА А.С., КАДЫРОВА Ш.Б., МАМАДЖАНОВ А.

### БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ХЛОПЧАТНИК И НАСЛЕДОВАНИЕ *NPT II* ГЕНА В ЕГО ПОТОМСТВЕ

iazadaxan@gmail.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Mamadjanov A.

### BIOTECHNOLOGIC G'O'ZA VA UNING AVLODLARIDAGI *NPT II* GENINI NASLIDAN NASLIDA NAMOYON BULISHI

Maqolada biotechnologic o'simlik yaratishda foydalanilgan selektiv marker genlarining ayrimlari to'grisida qisqa adabiyot sharhi keltirilgan. Shuningdek g'o'za hujayralarni transformatsiya qilish uchun tayyorlangan genkonstruksiyaqidagi neomycin phosphotransferaza II (*npt II*) geni haqida ma'lumot berilgan. Porlock seriyali g'o'za navlarida mazkur gen keying avlodda nomuvofiqlikni namoyon etadi.

Имамходжаева А.С., Кадырова Ш.Б., Мамаджанов А.

### БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ХЛОПЧАТНИК И НАСЛЕДОВАНИЕ *NPT II* ГЕНА В ЕГО ПОТОМСТВЕ

В статье приводится краткий обзор о некоторых селективных маркерных генах, используемых в биотехнологии растений, а также о наследовании гена неомицинофосфотрансферазы II (*npt II*), включенном в генконструкцию, которой трансформированы клетки хлопчатника. В сортах серии Порлок данный ген проявляет нестабильный характер наследования.

Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Mamadjanov A.

### BIOTECHNOLOGICAL COTTON AND INHERITANCE OF THE *NPT II* GENE IN ITS OFFSPRING

The article provides a brief overview of some selective marker genes used in plant biotechnology, as well as the inheritance of the neomycin phosphotransferase II (*npt II*) gene included in the gene construct that transformed cotton cells. In varieties of the Porlock series, this gene exhibits an unstable inheritance pattern.

Развитие и совершенствование методов генетической инженерии, а также разработка методов переноса генетического материала в растительную клетку и методов регенерации из отдельных клеток полноценных трансформантов (в условиях *in vitro*), позволило произвести модификацию геномов ряда видов растений. Использование специальных методов генетической инженерии: технологией рекомбинантных ДНК, клонирования генов, и агробактериальной трансформации сделало возможным использование в селекции растений всего многообразия ценных генов, существующих в природе, что привело к интенсивному развитию производственного выращивания генетически

модифицированных сельскохозяйственных культур [1]. При создании биотехнологических растений и их внедрении в сельское хозяйство в качестве коммерческих культур наиболее важным моментом является достижение высокого и стабильного уровня экспрессии перенесенных целевых генов, как среди исходных трансформантов и их потомков от самоопыления, так и у гибридов от их скрещивания. Однако на нормальное функционирование перенесенных геном (экспрессию) внутрение защитные механизмы клетки, приобретенные в ходе эволюции. Один из таких механизмов – метилирование, присоединение метильной группы к множественным повторам, C-G богатые прокариотическим участкам Мультимеризованные комплексы, состоящие из нескольких копий T-ДНК разделенных фрагментами векторной и растительной ДНК, мейотически нестабильны, что может привести к эксцизии привнесенного гена (трансгена) [2,3,4].

С точки зрения биобезопасности трансгенные растения не должны содержать генов устойчивости к антибиотикам и других «посторонних» фрагментов ДНК, которые могут быть перенесены вместе с векторной ДНК. Однако использование селективных маркерных генных системы облегчают трансформационный этап создания биотехнологических генотипов и позволяет относительно просто идентифицировать нужные клетки объектов исследований. Без их, без селективных генов, растительные клетки с интегрированным генетическим вектором, просто невозможно отыскать в огромном количестве клеток родительского генотипа. Есть два основных класса таких генов: гены устойчивости к антибиотикам и к гербицидам. Выбор того или иного из них зависит от объекта трансформации и задач. Для хлопчатника в «кассете экспрессии» был использован ген неомицифосфорансферазы (*npt II*), обеспечивающий клеткам устойчивость к канамицину.

Гены устойчивости к антибиотикам используются в важных этапах производства растений-трансформантов: 1) предпосевная трансформация для отбора бактерий во время рутинных операций молекулярной биологии и манипулировании трансгенами при создании векторов экспрессии; и 2) во время самого процесса отбора клеток растения, в которые стабильно интегрированы введенные ген-конструкции. Но каково их состояние в последующих этапах после регенерации, какова их функциональность и наследований – вопрос, поднимаемый учеными в связи с проблемами биобезопасности трансгенных объектов [5]. Постоянное присутствие этих селективных маркеров (генов устойчивости) а также и ДНК чужеродного происхождения, особенно в пищевых культурах, вызывает все большую обеспокоенность общественности. Создание безселективно-маркерного генно-инженерного растения является одним из новых проектов в области биотехнологических исследований растений.

Объектом наших исследований был хлопчатник серии Порлок, полученными технологией РНК-интерференции на основе отечественных сортов [6]. В результате генетической трансформации сортов Ан-Баявут-2, С-6524, Ташкент-6 и Наманган-77 проявился эффект воздействия на ген фитохрома (*PHYA1*) и получено улучшение агрономических характеристик. Для хлопчатника серии Порлок характерна раннеспелость, высоко-урожайность, хорошо развитая корневая система, удлинение волнока, по сравнению к родительским сортам [7].

В ген-конструкции для трансформации клеток хлопчатника в векторе, как обязательный элемент будущей селекции на средах выращивания, присутствует *npt II* ген, обеспечивающий устойчивость к канамицину [8]. Однако чужеродные гены в геноме трансформированных объектов стало вызывать опасение и широко обсуждаться среди общественности с точки зрения непредсказуемого эффекта, возможного горизонтального переноса генов устойчивости в другие геномы и т.д. [9,10]. На основании этого стали проводиться исследования по получению безмаркерных (без селективного маркера) трансформантов. И одновременно с этим развиваются технологии удаления (высечения или эксцизии) этих генов [11].

Нами выполняется работа по поиску в популяциях биотехнологического хлопчатника генотипов, не несущих ген канамицинустойчивости, с последующим их размножением, и получении так называемого биобезопасного сорта (согласно требованиям международной коммерциализации). В ходе этих работ выявленные нами данные свидетельствуют о наследовании гена *npt II* в последующих генерациях.

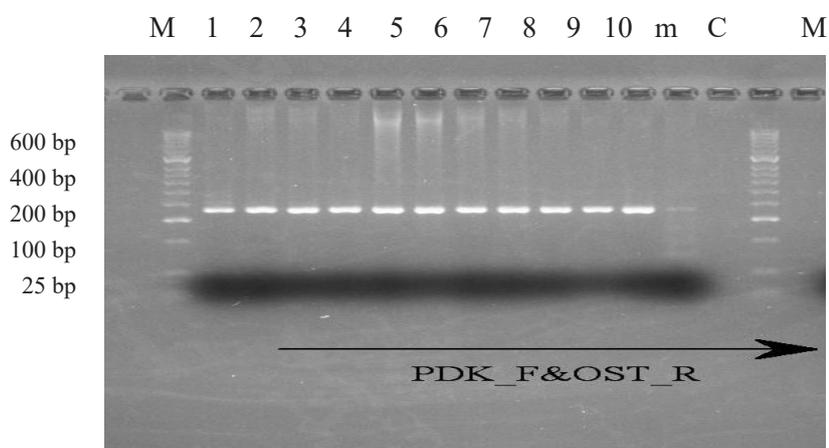
Работы проведены на биотехнологических сортах хлопчатника серии Порлок, полученных техникой РНК-интерференции (*PHYA1 RNAi*). В ходе работ использованы методы выделения геномной ДНК из листьев хлопчатника (базовый метод – с реагентом STAB), ПЦР (полимеразная цепная реакция) с сайт-специфичными праймерами (для 35S, PDK и *kan* генов), продукты амплификации и ДНК проверяя-

ли электрофорезом в агарозном геле (0,9% и 1,5 %).

Хлопчатник высевали как в полевых, так и в тепличных условиях с соблюдением агротехнических мероприятий. Индивидуальные отборы от самоопыления анализировали по требуемым характеристикам (выход и длину волокна, вес хлопка-сырца, вес 1000 семян, число семян и т.д.).

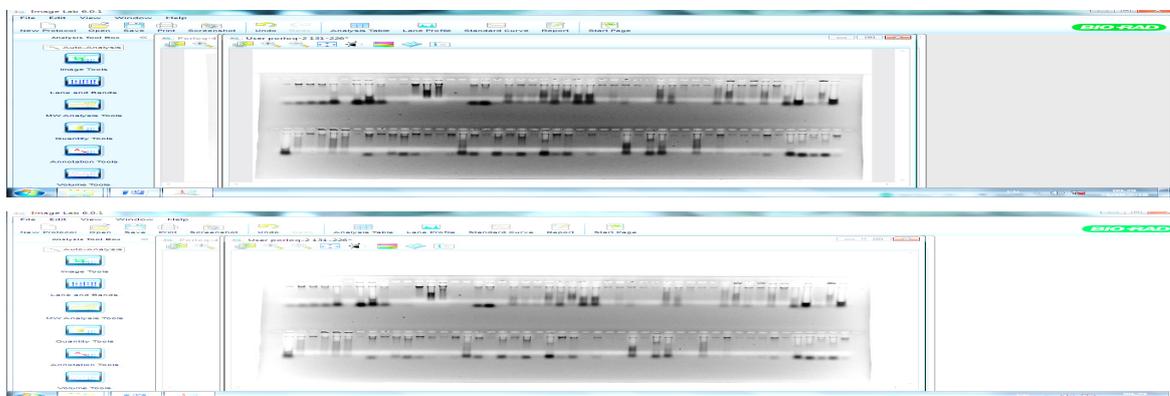
Как приведено выше сорта серии Порлок по происхождению имеют разных родителей. Хлопчатник сорта Порлок-1 создан на базе местного сорта Ан-Баявут-2, одним из родителей сорта Порлок -2 был сорт хлопчатника С-6524, из сорта Ташкент-6 был получен Порлок-3, а на основе Наманган-77 создан Порлок-4. В генотипе каждого из вышеприведенных портов серии Порлок проверено наличие ген-конструкции, которая и дала эффект интерференции, выразившейся в улучшении некоторых хозяйственно-ценных характеристик. Представлял интерес характер наследования селективного гена неомицинофосфотрансферазы II в популяциях этих сортов.

С этой целью был проведен молекулярно-генетический анализ на основе ПЦР-скрининга растений для определения в их геноме векторной PHVA1 RNAi конструкции. При ПЦР использованы пары праймеров (PDK-F/OST R).



**Рис. 1.** Электрофореграмма амплифицированных продуктов ПЦР с праймерами PDK-F/ OST R (в 1,5%-ном агарозном геле). М – маркер; m – мастер mix; С – ноль-сегрегант

Полученные результаты амплификации являются свидетельством присутствия характерных для ген-конструкции участков в геноме хлопчатника, так как согласно схеме структур фрагмента ген-конструкции, вызывающего эффект РНК интерференции, в них имеется промотора, гены PHVA1 в правильном (F) и реверсном (R) состоянии и между ними - интронная часть (PDK) и завершает фрагмент терминатор (OCS) [12]. Далее, для идентификации селективного маркерного гена поставлена ПЦР с праймером для гена устойчивости к канамицину.



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации ПЦР с праймером kan (ДНК хлопчатника сорта Порлок-2)

В большей части образцов получены продукты амплификации, что свидетельствует о наличии у исследуемых образцов хлопчатника участка генома, где присутствует ген *npt II*. И только в нескольких пробах нет синтеза продуктов амплификации. Обобщая результаты трех повторностей ПЦР, получили, что в среднем для 10,39% образцов амплификации не наблюдалось. Для популяции хлопчатника сорта Порлок-3 таких образцов было 20,8%. При мониторинге трех повторностей образцов ДНК хлопчатника сорта Порлок-4, в среднем для 6,81% образцов реакция ПЦР имела негативный результат. Мониторинг проводится второй год и результаты

Процент "безканамициновых" растений в популяции биотехнологических сортов хлопчатника



Таким образом, в проанализированных случайных выборках популяции у большей части биотехнологических растений *npt II* ген экспрессировался стабильно, и его наследование наблюдалось вот уже в восьмой генерации (посев сорта). Однако какой закономерности может подчиняться такое наследование чужеродных генетических элементов, предстоит в перспективе узнать.

По литературным источникам, при изучении стабильности наследования гена *npt II* в случайной выборке независимо полученных трансгенных растений табака, учеными выявлено, что он в первые поколения гибридов этот маркер экспрессировался стабильно и наследовался в соответствии с законами Менделя для моно- и дигибридного типов расщепления [13, 14]. Однако в последующих поколениях трансформантов ими выявлен мозаичный характер проявления селективного маркерного гена в клетках соматической ткани листовой пластинки у трансгенного растения табака Nu [15]. По мнению ученых, отклонения от ожидаемых расщеплений, вплоть до полной потери экспрессии перенесенных генов происходит в зависимости от интеграции разного числа копий трансгенов в геноме трансформантов. Согласно приводимой ими классификации групп наследования *npt II*, 5,9% популяции составляют генотипы с отклонением от менделевского типа наследования, и 1,9% - может выявиться полная потеря экспрессии трансгенов. Для подтверждения такого предположения в применении к хлопчатнику следует определить число инсерций у биотехнологических сортов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермишин, А. П. Биотехнология растений и биобезопасность: пособие / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова. – Минск : БГУ, 2015. – 359 с.
2. Ванюшин, Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика / Б. Ф. Ванюшин // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9.
3. Саложин, С.В. Метилирование ДНК как один из основных эпигенетических маркеров / С.В. Саложин, Е.Б. Прохорчук, Г.П. Георгиев // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 5.
4. Дефлер, В. О биологическом значении метилирования ДНК / В. Дефлер // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 5.
5. Borys Chong-Pérez and Geert Angenon Strategies for Generating Marker-Free Transgenic Plants. / Genetic Engineering. <http://dx.doi.org/10.5772/55573>.
6. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Abdugarimov 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
7. Abdurakhmonov IY, Buriev ZT, Saha S, Jenkins JN, Abdugarimov A, Pepper AE. 2014. Cotton PHYA1 RNAi Improves Fiber Quality, Root Elongation, Flowering, Maturity and Yield Potential in *Gossypium hirsutum* L.

- Egypt PCT 1344/2014, Receipt No.:960304, August 25, 2014. Awarded in 2018, printing.
8. Имамходжаева А.С., Курбонов А., Мамазаров Ш., Мухаммадов Й., Кадырова Ш. Выявление свободных от селективного маркерного гена генотипов среди популяций биотехнологического сорта хлопчатника. // Вестник российской сельскохозяйственной науки. Москва. 2020г. №3. 2020 г.С. 70-72.
  9. Goldstein D.A.. Human Safety and Genetically Modified Plants: A Review of Antibiotic Resistance Markers and Future Transformation Selection Technologies / Goldstein D.A.[et al.] // J. Appl. Microbiol. - 2005. - V. 99. -P. 7-23.
  10. Upadhyaya C.P. An Update on the Progress towards the Development of Marker-Free Transgenic Plants / Upadhyaya C.P. [et al.] // Bot. Stud. - 2010. - V. 51. - P. 277-292.
  11. NarendraTuteja, SebastinRaveendar, RanjanSahoo. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern // Journal of Biosciences 37:167-197. 2012. DOI: 10.1007/s12038-012-9187-5
  12. Рузибоев Х.С. Создание новых сортов хлопчатника с использованием технологии РНК интерференции// Автореферат диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам. Ташкент. 2018.
  13. Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А., Филипенко Е.А., Шумный В.К. Стабильность экспрессии гена *npt II* в популяции трансгенных растений табака // ДАН. 1999. Т. 369. С. 420-423.
  14. Дейнеко Е.В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений (на примере *Nicotiana tabacum L.*)// Автореферат диссертации на соиск.уч.ст. докт. биол.наук. Москва. 2004.
  15. Маренкова (Новоселя) Т. В., Дейнеко Е. В., Шумный В. К. Мозаичный характер проявления гена *npt II* у трансгенных растений табака NU 21// Генетика, 2007, Том 43, № 7, С. 943-954.

**NORMAMATOV I.S., TURAEV O.S., KHOLMURADOVA M.M.,  
MAKAMOV A.Kh., KUSHANOV F.N.**

**MOLECULAR AND PHENOTYPIC ASSESSMENT OF UPLAND COTTON GENOTYPES  
IN SALINITY STRESS**

ilyosnormamatov@gmail.com

Center of Genomics and Bioinformatics AS RUz

Normamatov I.S., Turaev O.S., Kholmuradova M.M., Makamov A.X., Kushanov F.N.

**SHO‘RLANISH STRESSIDA O‘RTA TOLALI G‘O‘ZA GENOTIPLARINI MOLEKULAR  
VA FENOTIPIK BAHOLASH**

Maqolamizda, g‘o‘zaning UAK (uyali assotsiativ kartalashtirish) populyatsiyasi boshlang‘ich namunalaringing sho‘rga chidamliligini molekulyar va fenotipik jihatdan baholash natijalari keltirilgan. Chidamlilikni molekulyar baholashda dunyo olimlarining bu borada erishgan yutuqlari asosida aniqlangan chidamlilik DNK markerlaridan foydalanildi. Dala tajribalari ikki hudud Sirdaryo viloyatining sho‘rlangan muhitida va Toshkent viloyatida optimal muhitda amalga oshirildi. Ma‘lumotlarning statistik tahlili ANOVA statistik paketida amalga oshirildi.

Нормаматов И.С., Тураев О.С., Холмурадова М.М., Макамов А.Х., Кушанов Ф.Н.

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОТИПОВ СРЕДНЕВОЛОКНИСТОГО  
ХЛОПЧАТНИКА ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ**

В нашей статье изложены результаты молекулярных и фенотипических оценок солеустойчивости основателей ГАК (гнездового ассоциативного картирования). При молекулярной оценке мы использовали ДНК-маркеры, связанные с солеустойчивостью. Полевые опыты проводились в двух регионах засоленных почв Сырдарьинской области и в оптимальных условиях Ташкентской области. Анализ данных проводился с использованием ANOVA.

## MOLECULAR AND PHENOTYPIC ASSESSMENT OF UPLAND COTTON GENOTYPES IN SALINITY STRESS

Our paper highlights the results of molecular and phenotypic assessments of the salinity tolerance of cotton NAM (nested association mapping) founders. In the molecular assessment, we used DNA markers associated with salinity tolerance. Field experiments were conducted in two regions the saline soil of Syrdarya region and in the optimal environment of Tashkent region. The data analysis was performed using ANOVA.

Since the beginning of civilization, human activity posing has been a threat to the stability and resilience of the planet. Human impact on the environment can have strong negative consequences [1]. Soil salinization is one of the biggest issues negatively affecting agricultural crop production all over the world [2, 3, 4, 5]. More than five hundred million hectares of land used for crop production and agriculture are losing their fertility due to salinization [6]. Existing difficulties of global food security can only be solved by restoring the productivity of these saline soils or by developing of salt-tolerant crop varieties. Two main approaches are used in plant breeding processes to improve the salinity tolerance of agricultural crops: 1) direct selection from plants grown under the natural conditions or under the salinity stress; 2) to increase of resistance to salinity stress based on existing resistant genes of plants using genomic approaches [7]. The soil salinity has a negative impact to the various physiological and metabolic processes in plants, as well as the assimilation of organic compounds in plant cells. As a result, the susceptibility of plants to the various extreme conditions increases, which leads sharply decrease plant productivity and quality.

Today, taking into account the above-mentioned, it is necessary to develop simple and inexpensive biological methods that increase the resistance of plants to salinity stress, as well it is required to create new varieties of agricultural crops that can grow in highly saline soils. One of the main tasks facing scientists is to create salinity resistant crop varieties through the employment of new molecular-genetic approaches to identify salt-tolerance genes.

As noted in the previous articles, the scientists of the Center of Genomics and Bioinformatics have developed nested association mapping (NAM) population to dissect the genetic architecture of Upland cotton [8]. The main objective of this study is phenotypically and molecularly evaluation of salinity tolerance of the parental genotypes of NAM population (NAM founders). 20 Upland cotton germplasm accessions (NAM founders - Namangan-77, KK-1796, KK-1795, L-1000, C-9006, KK-1086, Catamarca 811, C-9008, L-N1, L-141, Hapicala 19, 0-030, C-4769, L-45, Zangi-Ota, Saenr pena 85, C-2025, KK-602, SAD-35-11, C-417) were used as research materials.

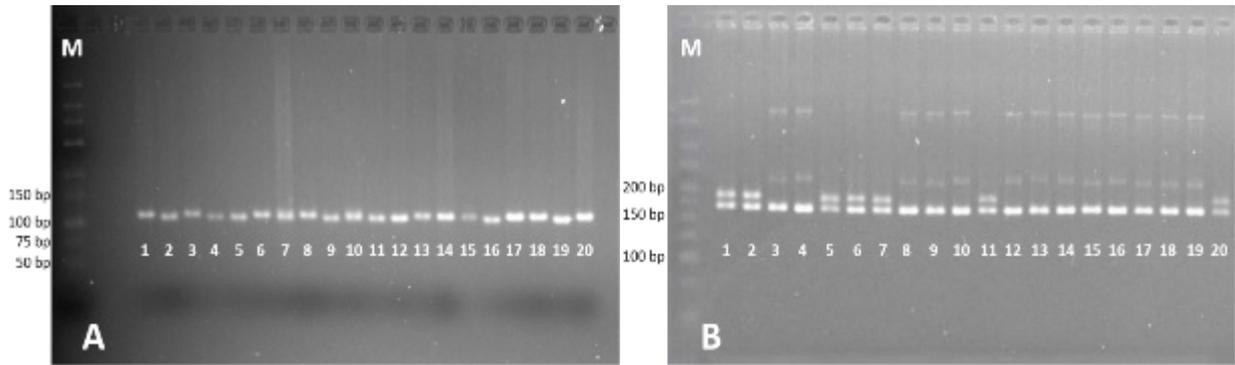
Molecular-genetic approaches. The fresh leaves were collected from each plant samples individually. The genomic DNA was extracted from leaf tissues using modified CTAB method [9]. The quality and quantity of genomic DNA was identified in 0.9% agarose gel compare with lambda ( $\lambda$ ) phage DNA concentration. PCR analysis were conducted using DNA markers that associated with salinity tolerance in cotton. PCR analysis were performed to determine the polymorphisms between common parent Namangan-77 and 19 parental genotypes, as well the allelic status of parents were scored directly by the presence or absence of amplicon. Out of twelve DNA markers associated with salinity tolerance, BNL3140 [10] and BNL3594 [11] were polymorphic between common parent Namangan-77 and parental genotypes (Fig. 1).

Field works, phenotypic data collection and analysis. The research samples were planted in two regions, experimental field of the Special seed-growing unit of the Center for Genomics and Bioinformatics and Cotton Breeding, Seed Production and Agrotechnologies Research Institute Syrdarya Branch, using a randomized complete block design in three replications and was maintained in the same agro-technical regime.

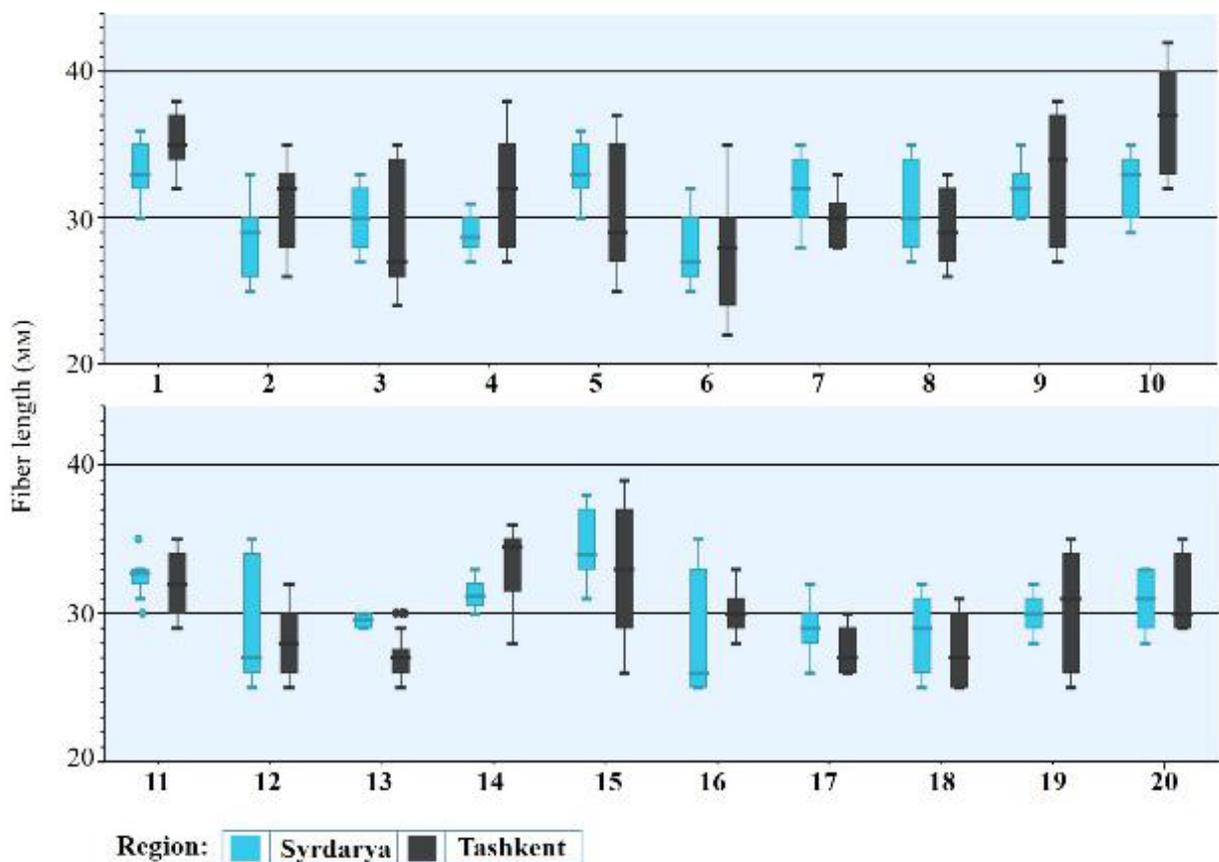
Several important morpho-biological parameters were studied in the field condition, such as the number of monopodial and sympodial branches, branching type, the number of bolls, boll weight, the degree of stem hair, height of the first sympodia (Hs), the weight of 1000 seeds, fiber staple length and fiber percentage. All collected data prepared to the analysis in Microsoft® Office EXCEL 2019, and were analyzed using ANOVA, One Way ANOVA and GLM (general linear model) of NCSS 19 statistical software package.

The staple fiber length of Namangan-77 was 30 mm in the optimal environment (Tashkent) and was 34 mm in the saline environment (Syrdarya). The saline soil had a negative effect to the the staple fiber length of Namangan-77. One of the important agronomic traits is 1000 seed weight. As a result, the research sam-

ples was diverse by this trait. According to the results, the lowest rate was 92 g in L-1000 that grown in saline soil and the highest rate was 140 g in Zangi Ota in optimal condition. The lowest value was 98.5 g in KK-1796, and the highest value was 143.5 g in the optimal environment.



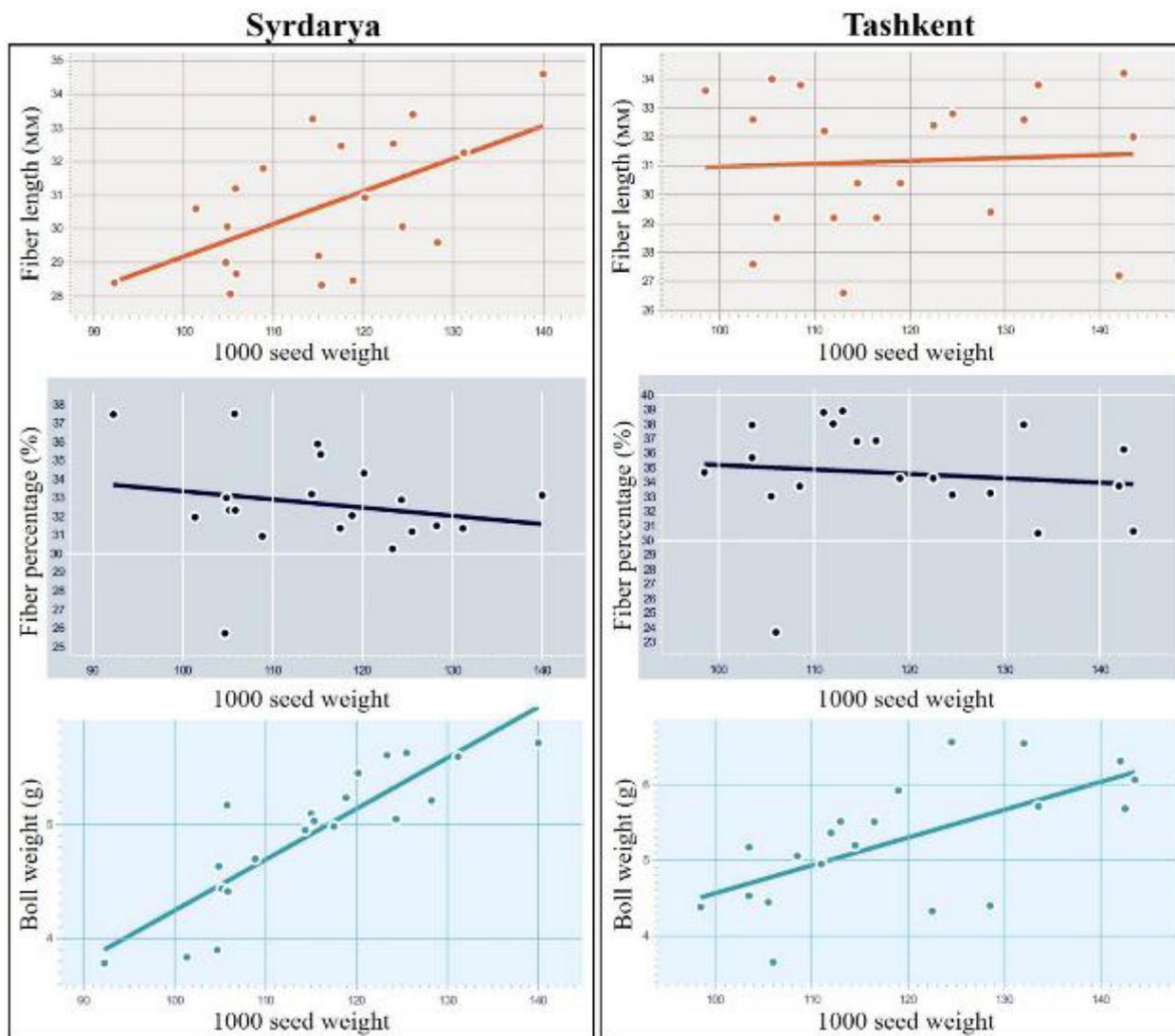
**Fig. 1.** Electrophoregram of NAM founders using (A) BNL3140 and (B) BNL3594 DNA marker that associated with salinity tolerance. **M** – Molecular-weight size marker; **1**-Namangan-77, **2**-KK-1796, **3**-KK-1795, **4**-L-1000, **5**-C-9006, **6**-KK-1086, **7**-Catamarca 811, **8**-C-9008, **9**-L-N1, **10**-L-141, **11**-Hapicala 19, **12**-0-030, **13**-C-4769, **14**-L-45, **15**-Zangi-Ota, **16**-Saenr pena 85, **17**-C-2025, **18**-KK-602, **19**-SAD-35-11, **20**-C-417.



**Fig. 2.** Comparison of “fiber length” of NAM founders in different experimental conditions. **1**-Namangan-77, **2**-KK-1796, **3**-KK-1795, **4**-L-1000, **5**-C-9006, **6**-KK-1086, **7**-Catamarca 811, **8**-C-9008, **9**-L-N1, **10**-L-141, **11**-Hapicala 19, **12**-0-030, **13**-C-4769, **14**-L-45, **15**-Zangi-Ota, **16**-Saenr pena 85, **17**-C-2025, **18**-KK-602, **19**-SAD-35-11, **20**-C-417.

Comparing samples from both environments, Namangan -77, KK-1086, Catamarca 811, C-9008, L-45, Saenr pena 85, C-2025, and C-417 were almost not differing by this trait. This means that the samples are

slightly more resistant to the salinity than other genotypes. According to the results obtained by fiber percentage, the highest rate was 37-38% in L-1000 and L-45 genotypes respectively in saline soil, L-1000, L-45, Saenr pena 85, C-2025, SAD-35-11 and C-417 showed 38-39% in optimal condition.



**Fig. 3.** Correlation analysis of 1000 seed weight of NAM founders that grown in two environment.

The results of correlation analysis showed that the 1000 seed weight was positive correlated with fiber length and boll weight. It is assumed that as the seed cotton yield increases, the boll weight and fiber length will also increase, thus boll weight has a direct influence on cotton yield.

In summary, the fiber length of common parent Namangan-77 were decreased in salinity condition. However, the fiber length of C-9006, KK-1086, Hapicala 19, Zangi-Ota and KK-602 were stable, as well Catamarca 811, 0-030, C-4769 and C-2025 were increased. These diversities of NAM founders will allow to fine map of genomic regions that attending to control of fiber length in cotton using respective NAM families.

The parental forms of NAM population with contrast indicators will become an invaluable resource for future molecular genetic mapping in cotton. Parental genotypes grown under the different conditions also serve to identify QTLs that are genetically linked to the traits such as salt and drought tolerance.

#### REFERENCES

1. G. Varallyay. Soil data-base for long-term field experiments and sustainable land use *Agrokémia és Talajt.*, 43 (1994), pp. 269-290
2. Association Analysis of Salt Tolerance in Asiatic cotton (*Gossypium arboreum*) with SNP Markers.

- Tussipkan Dilnur, Zhen Peng, Zhaoe Pan, Koffi Kibalou Palanga, Yinhua Jia, Wenfang Gong, Xiongming Du. Int J Mol Sci. 2019 May; 20(9): 2168. Published online 2019 May 1. doi: 10.3390/ijms20092168. PMID: PMC6540053
- Peng Z., He S., Sun J., Xu F., Jia Y., Pan Z., Wang L. An Efficient Approach to Identify Salt Tolerance of Upland Cotton at Seedling Stage. Acta Agron. Sin. 2014;40:476–486. doi: 10.3724/SP.J.1006.2014.00476.
  - Jia Y.H., Sun J.L., Wang X.W., Zhou Z.L., Pan Z.E., He S.P., Pang B.Y. Molecular Diversity and Association Analysis of Drought and Salt Tolerance in *Gossypium hirsutum* L. Germplasm. J. Integr. Agric. 2014;13:1845–1853. doi: 10.1016/S2095-3119(13)60668-1.
  - Rasool S., Ahmad A., Siddiqi T. O., Ahmad P. (2013). Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. Acta Physiol. Plant. 35 1039–1050. 10.1007/s11738-012-1142-4
  - Imadi S. R., Kazi A. G., Ahanger M. A., Gucl S. and Ahmad P. 2015 Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. J. Genet. 94, 525–537
  - Ashraf, Muhammad & Aisha, Nudrat. (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. Biotechnology advances. 27. 744-52. 10.1016/j.biotechadv.2009.05.026.
  - О.С. Тураев, А.А. Туланов, М.М. Дарманов, А.Х. Макамов, Ф.Н. Кушанов, А.С. Имамходжаева, Ш.Э. Шерматов, З.Т. Буриев, А.Т. Аддылова, А. Абдукаримов, И.Ю. Абдурахмонов. Разработка популяций гнездового ассоциативного картирования хлопчатника для исследования агрономических важных признаков. Узбекский биологический журнал. 2016 г. Ст.21-26.
  - Paterson, A.H., Brubaker, C.L. & Wendel, J.F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep* 11, 122–127 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF02670470>
  - Muhammad Saeed, Guo Wangzhen and Zhang Tianzhen. Association mapping for salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm from US and diverse regions of China. Australian Journal of Crop Science (AJCS) 8(3):338-346 (2014). ISSN:1835-2707.
  - Abdelraheem Abdelraheem, Vasu Kuraparthi, Jinfa Zhang. Identification of Drought and Salt Tolerant Cotton Germplasm and Associated Markers in the U.S. Upland Germplasm Pool. American Society of Agronomy, November 7, 2016. poster number 163-1322. Phoenix Convention Center North, Exhibit Hall CDE.

**НОРОВ Т.М., БУРИЕВ З.Т., УБАЙДУЛЛАЕВА Х.А., АБДУРАХМОНОВ И.Ю.**

**СОЗДАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ХЛОПЧАТНИКА, УСТОЙЧИВЫХ  
К БОЛЕЗНЯМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИИ  
(*RNAi*) И ИХ ИНТРОГРЕССИЯ В МЕСТНЫЕ СОРТА**

zabar75@yahoo.com

Центр геномики и биоинформатики АН РУз

Norov T.M., Buriev Z.T., Ubaydullaeva X.A., Abduraxmonov I.Yu.

***RNAi* TEXNOLOGIYASIDAN FOYDALANIB VILT KASALIGIGA CHIDAMLI BIOTEXNOLOGIK  
LINIYALAR YARATISH VA MAHALLIY NAVLARGA INTROGRESSIYA QILISH**

Tadqiqotda g'o'zada vilt kasalligini qo'zg'atuvchi fitopatogen zamburug'i (*Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*) ning makro va mikrokonidiy hosil qilishda ishtirok etadigan FoSTUA genining *RNAi* texnologiyasi yordamida nokaut qilish yoritilgan. O'zida pSyn-FoSTUA vektor konstruksiyasini tutgan genotiplar mahalliy navlar bilan o'zaro duragaylanib olingan gibrid liniyalarni kasallik qo'zg'atuvchi fitopatogen mikroorganizmga chidamliligi o'rganilgan.

Норов Т.М., Буриев З.Т., Убайдуллаева Х.А., Абдурахмонов И.Ю.

## СОЗДАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ХЛОПЧАТНИКА, УСТОЙЧИВЫХ К БОЛЕЗНЯМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РНК ИНТЕРФЕРЕНЦИИ (*RNAi*) И ИХ ИНТРОГРЕССИЯ В МЕСТНЫЕ СОРТА

В исследовании описаны линии, в которых с помощью технологии РНК интерференции были «нокаутированы» ген *FoSTUA*. Этот ген участвует в образовании микро и макро-конидий фитопатогенного гриба (*Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*), вызывающего болезнь увядания у хлопчатника. Генотипы гибридных линий, содержащие векторную конструкцию *pSyn-FoSTUA*, а также скрещенные с местными местными сортами, были изучены на устойчивость к болезнетворным фитопатогенным микроорганизмам.

Norov T.M., Buriev Z.T., Ubaydullaeva Kh.A., Abduraxmonov I.Yu.

## ESTABLISHMENT OF BIOTECHNOLOGICAL LINES RESISTANT TO WILT DISEASE USING *RNAi* TECHNOLOGY AND INTROGRESSION TO LOCAL VARIETIES

In this study we described that *RNAi* technology of the *FoSTUA* gene, which is involved in the macro and microconidia production of the phytopathogenic fungus (*Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum*), which causes wilt disease in cotton. Genotypes containing the *pSyn-FoSTUA* vector construct were cross-bred with local varieties, and the resistance of the obtained hybrid lines to phytopathogenic microorganisms was studied.

Хлопчатник является одной из лидирующих в мире товарных культур, приносящих в бюджет хлопкосеющих стран огромную прибыль. Поэтому селекционные программы этих стран, в том числе и Узбекистана, направлены на создание новых и высококачественных сортов хлопчатника, устойчивых к различным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Однако, несмотря на усилия селекционеров, ежегодно на полях из-за патогенов теряются огромные площади посевов хлопчатника. Одним из таких патогенов является *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* (FOV), который вызывает вилт хлопчатника [1]. В настоящее время в США угроза распространения FOV имеет первостепенное значение, так как на хлопковых полях Калифорнии была обнаружена новая высокопатогенная 4-я раса FOV [2]. Все это указывает на необходимость ускорения создания новых устойчивых к вилту сортов хлопчатника.

Целью данной работы является создание биотехнологических линий хлопчатника, содержащих *RNAi* векторную конструкцию гена *FoSTUA* гриба, позволяющая подавлять экспрессию этого гена в растительных клетках и способствующая устойчивости хлопчатника к фузариозному вилту (*Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum*). Кроме того, целью работы является оценка относительной устойчивости к фитопатогенным микроорганизмам этих линий, а также интрогрессия ценных хозяйственных признаков местным сортам хлопчатника.

В рамках данного исследования учеными Центра были исследованы несколько генов *Fusarium oxysporum* (FOV), которые играют важную роль в онтогенезе данного патогена. Одним из таких генов является ген *FoSTUA*, регулирующий образование микро и макро-конидий фузариозного гриба [3]. Этот ген был уже секвенирован в нашей лаборатории из генома местной расы гриба FOV. Кроме того, из генома местной расы FOV мы клонировали и секвенировали ген *Lae1* [4], который регулирует синтез ряда вторичных метаболитов патогена таких, как бикаверин, фумонизины, фузариозная кислота и фузарины. Эти гены или их фрагменты были выбраны как кандидатные последовательности для создания бинарных векторных конструкций, которые вызывают *RNAi* генов-мишеней, тем самым подавляя функции данных генов [5]. В рамках пилотных исследований был получен ряд *RNAi* векторных конструкций для данных генов.

Материалы и методы. В качестве донорного генотипа были использованы биотехнологические линии T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub> поколения, содержащие векторную конструкцию *pSyn-FoSTUA*, а в качестве реципиента были взяты местные сорта (Бухоро-6, Бухоро-102, Равнак-1, Равнак-2). Контрольным растением служили устойчивые и средне-устойчивые к вилту сорта (Тошкент-1 и 108-Ф). Для генотипирования были использованы методы ПЦР и гель-электрофореза ДНК образцов, полученных методом СТАВ из вышеописанных растений.

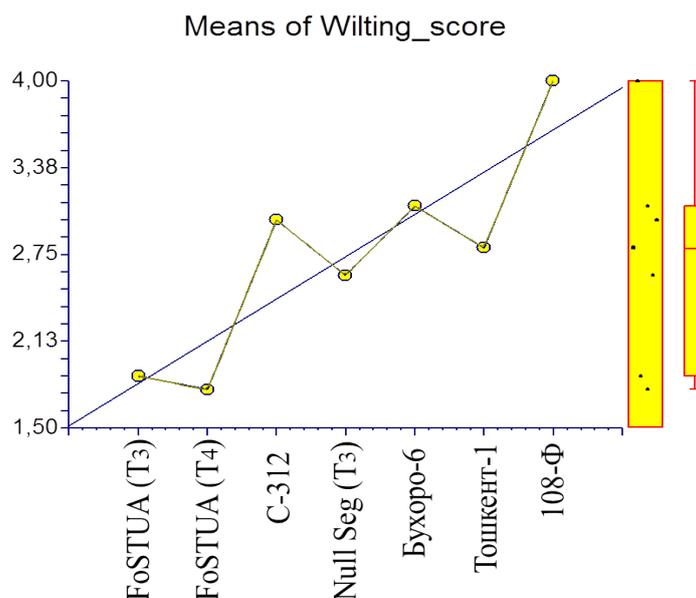
Заражение растений возбудителями болезней. Образцы растений были заражены в фитотронных условиях 316 штаммами микроорганизмов *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (FOV) из коллекции

Института генетики и экспериментальной биологии АН РУз. Заражение фитопатогенными грибами происходит через ворсинки и далее по проводящим тканям корневой системы.

Оценка устойчивости к болезням и статистический анализ результатов. Исследования по оценке биотехнологических линий на устойчивость к болезни вилта были проведены в лаборатории Центра геномики. Признаки заболевания оцениваются по 5 бальной шкале.

Результаты оценки были проанализированы с использованием ANOVA (GLM - General Linear Model).

Результаты статистического анализа показали, что при заражении фузариозным вилтом растения FosTUA T<sub>3</sub> и FosTUA T<sub>4</sub> являлись наиболее устойчивыми к болезням (1,5-1 балла по 5-бальной шкале), а сорт 108-Ф был наиболее не устойчивым к болезням (4-балла).



**Рис. 1.** GLM-анализ образцов, зараженных фузариозным вилтом.  
1 - FoSTUA T<sub>3</sub>; 2 - FoSTUA T<sub>4</sub>; 3 - C-312; 4 - Ноль сегрегант T<sub>3</sub>; 5 - Бухоро-6;  
6 - Тошкент-1; 7 - 108-Ф.

Таблица 1.

**Устойчивость исследуемого растительного материала к поражению фузариозным вилтом**

Образцы	Среднее значение степени зараженности	Стандартное отклонение (SE)	Эффект устойчивости
FoSTUA T <sub>3</sub>	1,8	0,4	1,5
FoSTUA T <sub>4</sub>	1,7	0,4	1,4
C-312	3	0,5	2,7
Ноль сегрегант T <sub>2</sub>	2,6	0,4	2,3
Бухоро-6	3,1	0,4	2,8
Тошкент-1	2,8	0,4	2,5
108-Ф	4	0,4	3,7

Исследуемые образцы были также проанализированы с помощью одностороннего ANOVA (One-Way ANOVA) и в множественном тесте статистического анализа Крускала Уоллиса (Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test). Результаты анализа показали, что растения FosTUA T<sub>3</sub> и FosTUA T<sub>4</sub> также были более устойчивы к фузариозному вилту по сравнению с контрольными образцами Бухара-6, C-312 и 108-Ф (табл. 2). Было подтверждено, что ноль-сегреганты FosTUA T<sub>3</sub> и FosTUA T<sub>4</sub> (не имеющие необходимого аллеля гена в геноме), были устойчивее к болезням чем растения сорта

Ташкент-1. Это противоречит первоначальному предположению о том, что ноль-сегреганты должны быть менее устойчивыми, т.е. должны были показать обратное.

Таблица 2.

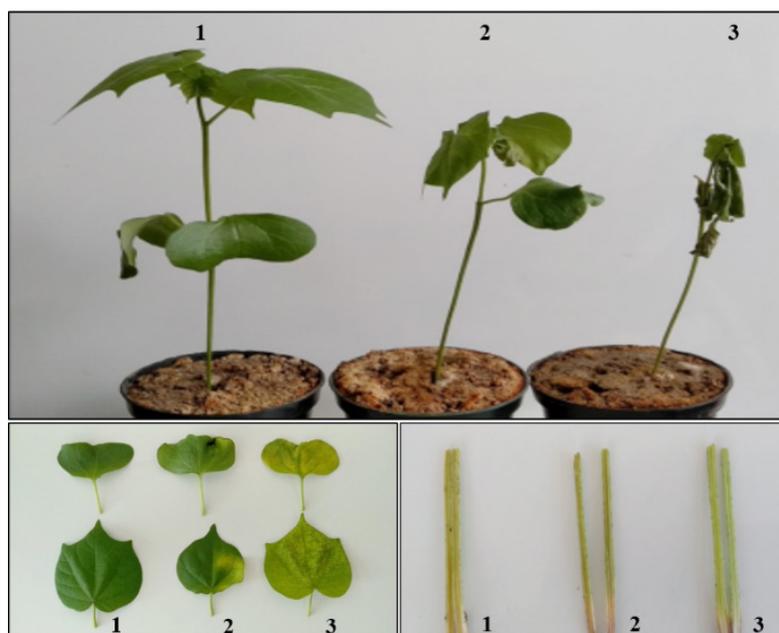
**Тест анализ Крускала Уоллиса устойчивости к фузариозному вилту**

Степень зараженности	FosTUA T3	FosTUA T4	C-312	Ноль сегрегант T2	Бухоро-6	Тошкент-1	108-Ф
FosTUA T3	0	0,2853	1,3037	0,92	1,8136	1,353	3,1539**
FosTUA T4	0,2853	0	1,599	1,2516	2,174	1,7007	3,5577**
C-312	1,3037	1,599	0	0,5184	0,3024	0,1188	1,5336
Ноль сегрегант T2	0,92	1,2516	0,5184	0	0,9478	0,4614	2,3694
Бухоро-6	1,8136	2,174	0,3024	0,9478	0	0,4863	1,4216
Тошкент-1	1,355	1,7007	0,1188	0,4614	0,4863	0	1,908
108-Ф	3,1539**	3,5577**	1,5336	2,3694	1,4216	1,908	0

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

\*\* Тест Бонферонни: если значение  $Z > 3,0381$ , медианы значительно различаются.

Поклоения  $T_3$  и  $T_4$ , которые содержат генетическую конструкцию pSyn-FoSTUA, показали устойчивость к фитопатогенным грибам и получили 1,5-1 балла соответственно. Линии хлопчатника C-312, выбранные в качестве контрольного растения, и линии с конструкцией pSyn-FoSTUA, которые подверглись сегрегации, демонстрировали неустойчивость и оценены в 2,5-2 балла соответственно. У саженцев 108-Ф, которые считаются наиболее сильным индикатором фитопатогенного микроорганизма, вызывающего вилт, через 5–6 дней после заражения грибковым мицелием появились симптомы, и семена потеряли тургорность.



**Рис. 2.** Растения хлопчатника после инокуляции грибом *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

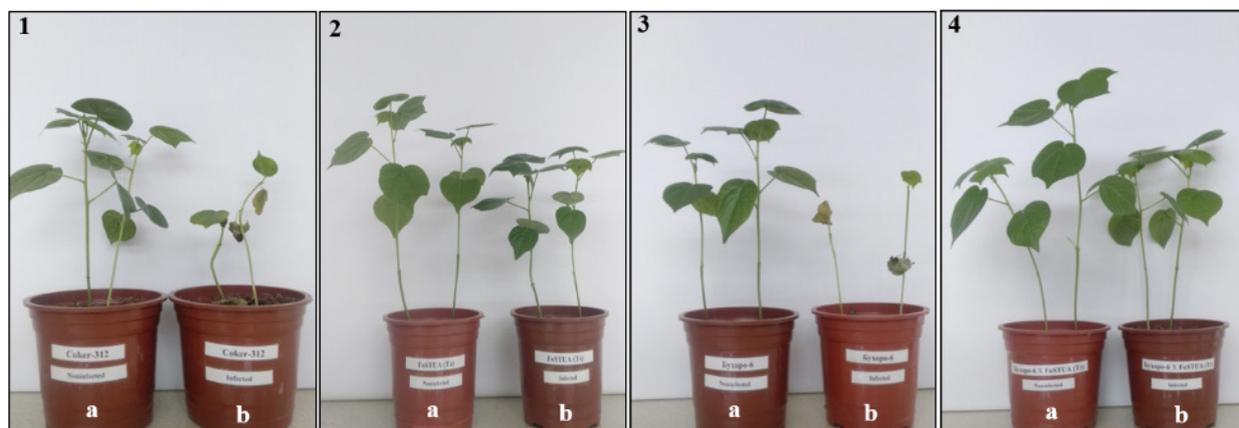
1– FosTUA  $T_3$  (незараженные растения, лист, стебель); 2– FosTUA Null Seg  $T_2$  (зараженные растения, лист, стебель); 3– C-312(зараженные растения, лист, стебель).

При сравнении таких признаков как площадь поверхности листа, рост растений, сухая масса листа, сухая масса куста зараженных растений T<sub>3</sub> поколения, которые имеют конструкцию рSyn-FoSTUA, и тех, которые не имеют (С-312 (контроль)), с растениями, посаженными на незараженную почву, было выявлено, что и у них много схожих признаков со здоровыми растениями, кроме того выявлено, что ткани растений С-312, Fostua Null Seg были обезвожены за счёт фитопатогенов (рис. 1). Признаки заболевания наблюдались в тканях всех растений.

В целях интрогрессии вышеуказанной генной конструкции в местные сорта полученные вилтоустойчивые биотехнологические линии скрещивали с сортом Равнак-2, созданным в нашем центре с применением технологии маркер-ассоциированной селекции, и сортом Бухара, который играет значительную роль хлопководстве в республике, но не является устойчивым к вилту. Гибриды F<sub>2</sub> были посажены в почву для изучения устойчивости к болезням, в качестве контроля были посажены растения-доноры и реципиенты и линия С-312.

Образцы высевали 4 раза (3 эксперимента, 1 контроль) в 5 повторах, а искусственное заражение грибом производили на стадии 2-3 настоящих листьев. Через 2 недели (14 дней) после заражения листья проявляли симптомы болезни и оценивались по 5-балльной шкале. Согласно результатам, гибриды поколения F<sub>2</sub> Равнак-1 × FoSTUA и Равнак-2 × FoSTUA показали устойчивость по сравнению с донорным и рецессивным генотипами.

Установлено, что гибриды, полученные в результате скрещивания с сортом Бухара, который неустойчив к болезням, но высевается на больших площадях в южных районах республики, оказались более устойчивыми к фитопатогену. Было определено, что выбранные в качестве контроля сорта Бухара-6 и Бухара-102 и линия С-312 проявили симптомы заболеваемости в 2,5-3 балла по 5-балльной шкале. У FoSTUA (T<sub>4</sub>) и гибридов этот показатель составляет 0-1 балл. Это позволяет заключить, что у этих растений под влиянием возбудителя сохранилась тургорность (рис. 2).



**Рис. 3.** Гибриды Бухара-6 x FoSTUA и симптомы заболеваемости у контрольных образцов.

1. **a**-С-312 не заражен (0 балл), **b**-С-312 заражен (4 балл);
2. **a**-FoSTUA (T<sub>4</sub>) не заражен (0 балл), **b**-FoSTUA (T<sub>4</sub>) заражен (0 балл);
3. **a**-Бухоро-6 не заражен (0 балл). **b**-Бухоро-6 заражен (5 балл);
4. **a**-Бухоро-6 x FoSTUA F<sub>2</sub> не заражен (0 балл). **b**-Бухоро-6 x FoSTUA F<sub>2</sub> заражен (0 балл).

Таким образом, технология RNAi способна повлиять на устойчивость к различным биотическим (в частности, *Fusarium oxysporum*) и абиотическим стрессам в результате частичного или полного прекращения активности определенных генов, участвующих в регуляции ценных хозяйственных признаков растений хлопчатника. Внедренная конструкция рSyn-FoSTUA, позволила уменьшить экспрессию гена FoSTUA гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, что привело к устойчивости к болезни. Эти линии были посажены на экспериментальном поле и скрещены с созданными в центре сортами Равнак и местными бухарскими сортами. Полученные гибридные линии также проявляли устойчивость к фитопатогенным грибам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sh. Egamberdiev, I. Salahutdinov, A. Abdullaev, et al. 2014. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 3 by single-base extension method and allele-specific polymerase chain reaction. *Can. J. of Plant Pathol.* 36: 216–223.
2. Ulloa M., Hutmacher R. B., Roberts P. A., et al. 2013. Inheritance and QTL mapping of *Fusarium* wilt race 4 resistance in cotton. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1405–1418. 10.1007/s00122-013-2061-5.
3. Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P., Zamore P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development.* 17: 49-63.3.
4. Ohara T., Inoue I., Namiki F., Kunoh H., Tsuge, T. 2004. REN1 is required for development of microconidia and macroconidia, but not of chlamydospores, in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* 166: 113-124.
5. Abdurakhmonov I.Y., Devor E.J., Buriev Z.T., et al. 2008. Small RNA regulation of ovule development in the cotton plant, *G. hirsutum* L. *BMC Plant Biol.* 8 (93): 1-12.

**XUSENOV N.N., TURAYEV O.S., UMEDOVA M.E., ORZIQULOVA B.I.,  
BOYQOBILOV U.A., KUSHANOV F.N.**

### **GENETIC PYRAMIDING OF FIBER QUALITY TRAITS, WILT AND INSECT RESISTANCE INTO UPLAND COTTON**

naimhusenov@mail.ru

Center of Genomics and Bioinformatics AS RUz

Xusenov N.N., Turayev O.S., Umedova M.E., Orziqulova B.I., Boyqobilov U.A., Kushanov F.N.

### **O'RTA TOLALI G'O'ZAGA TOLA SIFATI, VILT VA HASHAROTLARGA CHIDAMLILIK BELGILARINI GENETIK PIRAMIDALASH**

Maqolada, g'o'zaning tola sifati, vilt kasallikari va hasharotlarga chidamlilik belgilarini bir genotipga genetik jamlash bo'yicha olib borilgan tadqiqot natijalari keltirilgan. Tolas sifati, kasallik va zararkunandalarga chidamlilikni molekulyar baholashda dunyo va yurtimiz olimlarining bu borada erishgan yutuqlari asosida aniqlangan chidamlilik DNK markerlaridan foydalanildi. Ma'lumotlarning statistik tahlili ANOVA statistik paketi va Microsoft Excel dasturida amalga oshirildi.

Хусенов Н.Н., Тураев О.С., Умедова М.Е., Орзикулова Б.И., Бойқобиллов У.А., Кушанов Ф.Н.

### **ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПИРАМИДИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КАЧЕСТВА ВОЛОКНА, УСТОЙЧИВОСТИ К ВИЛТУ И НАСЕКОМЫМ У СРЕДНЕВОЛОКНИСТОГО ХЛОПЧАТНИКА**

В данной статье изложены результаты генетического пирамидирования признаков качества волокна, устойчивости к вилту и насекомым у средневолокнистого хлопчатника. Для молекулярной оценки качества волокна, устойчивости к болезням и вредителям были использованы международные ДНК маркеры, а также маркеры разработанные на основе достижений наших ученых. Статистическая обработка данных проводилась пакетом ANOVA и программой Microsoft Excel.

Xusenov N.N., Turayev O.S., Umedova M.E., Orziqulova B.I., Boyqobilov U.A., Kushanov F.N.

### **GENETIC PYRAMIDING OF FIBER QUALITY TRAITS, WILT AND INSECT RESISTANCE INTO UPLAND COTTON**

This paper highlights the results of genetic pyramiding of fiber quality, wilt, and sucking pest resistance traits into upland cotton. In the molecular assessment, we used DNA markers associated with fiber quality, wilt, and insect resistance. The data analysis was performed using ANOVA and Microsoft Excel.

Cotton is the most important natural fiber source that is mainly grown as an important cash crop in more than 70 countries including USA, China and Uzbekistan [1]. Therefore, scientists are conducting extensive research on improving of cotton fiber quality and yield, as well cotton drought tolerance, pathogen and insect resistance. Improving this kind of cotton traits demands to use of modern breeding technologies. DNA-markers technology is one of the more stable and accurate techniques in plant breeding. Molecular breeding is more efficient than conventional breeding methods with its resource savings and it takes less time to create new varieties. Another advantage of this technology is that it enhances the possibilities of creating new cultivars with complex traits by combining several interested traits-responsive genes or quantitative trait loci (QTL) into one genotype.

Abdurakhmonov et al. have reported genetic diversity, population characteristics, the extent of linkage disequilibrium (LD), and association mapping of fiber quality traits in *G. hirsutum* germplasm grown in two diverse environments, Uzbekistan and Mexico. An average of ~20 SSR markers was associated with main fiber quality traits in two environments [2]. The marker-assisted selection technology were implemented to the cotton breeding using DNA markers associated with main fiber quality traits that identified in previously research (association mapping approach) [3, 4, 5].

Indian scientists were identified cotton sucking pest (jussid) resistance and yield related QTL using SNP (single nucleotide polymorphism) markers. Simple interval mapping and single marker analysis were used and identified 11 and 24 associated QTLs, respectively. However, composite interval mapping detected only seven QTLs, of which five were associated with jussid injury resistance and leaf pubescence with 8.83-11.64% phenotypic variance explained. One QTL each for seed cotton yield and boll weight was detected [6]. Mi Ni were developed transgenic cotton pyramids that combine protection from Bt and RNAi against *Helicoverpa armigera*, one of the most destructive pests of cotton [7].

Many genes and QTL have been identified for resistance to the *fusarium* and *verticillium* wilt in cotton. Guo at al. developed cotton inbred populations by pyramiding *Verticillium* wilt resistance related QTLs. By performing multiple comparison analysis and examining the effects of each allele, they detected four elite QTLs (NAU905, NAU2754, NAU3053 and NAU6598) significant for *Verticillium* wilt resistance, pyramiding these elite alleles increased the disease resistance of inbred lines [8]. Wang et al., identified fusarium wilt resistance related QTLs using two intraspecific (cross between *Gossypium hirsutum* L.) and interspecific (cross between *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium bardence* L.) F<sub>2</sub> populations [9]. Thus, they recommended an opportunity to understand the genetic control of resistance to FW in *G. hirsutum* and *G. barbadence*, as well as to conduct MAS in breeding programs to develop FW resistant cultivars.

However, the molecular studies were not implemented on the creation of new varieties with high fiber quality, wilt, and insect resistance using marker-assisted gene pyramiding in cotton. The main goal of our study is to combine fiber quality, wilt and insect resistance traits into a single genotype using DNA marker technology.

In this study, we used upland cotton germplasm accessions as donor genotypes, such as fusarium wilt resistant genotypes Las Brenas 347, L-237025N517, Cokers -124, Mebane B-1, Tamcot sp, PD 648, DPZ 554085, L-4112-1, RS – 89 and Pramukh. As well, used verticillium wilt resistant genotypes Stoneville 213-2208, Hopi jones 79-4480, Rex, PD 747, Meade 14-2, PD 6520, Typ 4 AVB 5, Type 4 AVB6 and Deltopine 14. Moreover, the sucking pest resistant genotypes were used as donors C-4790, Stoneville 2 B, C-4790, Acala 3080, New Impr, Paymaster 111, 289A/43, C-8266, Type 4 g H3 g Montseral Sea Island, Upland, Ryad 285N6/108+109, Ryad 548 №6/33, C-1305 and Fibre Verte. Elite cotton cultivars Ravnak-1, Ravnak-2, L-1, L-2, L-3, L-4, Baraka, Sakhovat, Tafakkur with superior fiber quality were used as recipient genotypes, and Sulton, Bukhara-6, Bukhara-102, Omad, Namangan-77, L-25, Stoneville-508, S-42-517, Duli were used as control genotypes.

Molecular approaches. The genomic DNA extraction from the fresh cotton leaf tissues was performed using CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) method with some modifications. The DNA concentration was determined visually by comparing lambda phage DNA with the exact concentration using the gel-electrophoresis. The PCR amplicons were detected using 3.5% agarose in the Alpha Imager gel-documentation system. Genotyping was performed according to Reddy et al. (2001).

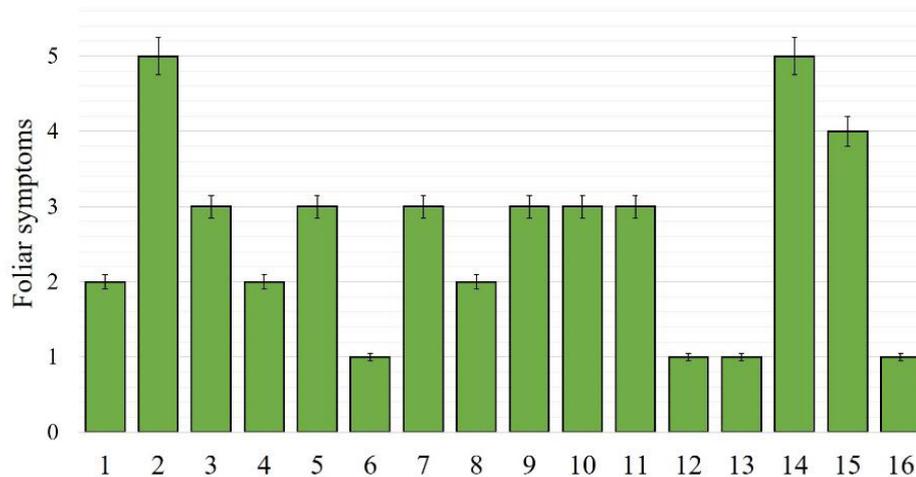
Molecular selection carried out using BNL1604 that associated with fiber quality traits, BNL3255 and JESPR220 fusarium wilt resistance related DNA markers and BNL2646, BNL3502 and NAU1014 DNA markers associated with verticillium wilt resistance, as well we used BNL1693 and BNL2884 DNA mark-

ers related pest resistance in cotton.

**Phenotypic and statistical evaluations.** Morphological and biological aspects, fiber quality traits, verticillium wilt and sucking pest resistance of cotton genotypes were observed in the field and laboratory conditions. The verticillium wilt resistance of cotton genotypes were tested in the experimental field of Cotton breeding, seed production and cultivation agrotechnologies research institute as Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications. As well, the fusarium wilt and sucking pest resistance of cotton genotypes were tested in the laboratories of Plant resistance and Marker assisted selection of The Center of Genomics and Bioinformatics.

The results of statistical analysis showed that Ravnaq-1, Las Brenas 347, Mabane B-1, Tupe 4 and Hopijones 79 were highly resistant to the verticillium wilt pathogen. However, Stonevilles 508, Duli, Tamcot sp., S-4-517 were susceptible to the verticillium wilt, and other genotypes showed moderate resistance the current pathogen ( $\alpha = 0.05$ ).

The number of studies showed that the density of cotton leaf and stem trichomes positively correlated with sucking pest resistance in cotton. The sixteen sucking pest resistant accessions were selected from the Upland cotton germplasm. The spider mites (*Tetranychus turkestanii*) caused white to yellow speckles to form on the upper surface of the cotton leaves were evaluated on a scale from one to five (Fig.1).



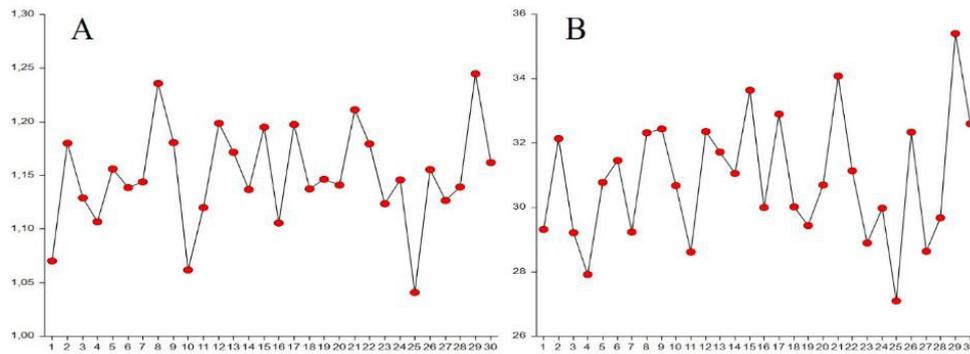
**Fig. 1.** Artificial infestation and damage evaluation of sucking pest resistant cotton genotypes. 1-C-8022, 2-Omad, 3-Stoneville 2 B, 4-C-4790, 5-Acala 3080, 6-New Impr, 7-Paymaster 111, 8-289A/43, 9-C-8266, 10-Type 4 g, 11-Upland, 1-Ryad 285, 13-Ryad 548, 14-Namangan-77, 15-C-1305, 16-Fibre Verte.

According to the analysis, New Impire, Fibre Verte, Ryad 285, Ryad 548 were showed high resistance to the spider mites, Stoneville 2 B, Acala 3080, Paymaster 111, C-8266, Type 4 g and Upland were showed medium resistance, as well as Omad, Namangan-77 and C-1305 varieties had different levels of susceptibility.

Statistical analysis showed that the fiber length and strength of cotton varieties that derived through molecular breeding technology were higher than other genotypes (Fig. 2). This means that the fiber quality traits of hybrid genotypes obtained based on them. The fiber quality traits of Las Brenas 347, Mabane B-1 and Hopijones 79 were relatively low, which have high resistance to the verticillium wilt. However, Ravnaq-1 and Tupe 4, which were both resistant, have high fiber quality.

According to the results of analysis, nineteen wilt resistant cotton genotypes that have five wilt resistance QTL in their genome have been involved to cross with Ravnak-1, Ravnak-2, L-1, L-2, L-3, L-4 that derived though molecular breeding approach aim to implement of marker assisted gene pyramiding.

Eighteen multiple parental highbred combinations with high fiber quality and wilt have been developed including eight combinations with Ravnak-1, six with Ravnak-2, two with L-1, from one combination with L-2 and L-3. As well, twenty-two hybrid combinations were obtained aim to combine fiber quality and sucking pest resistance related QTL into one genotype.



**Fig. 2.** Fiber quality traits of cotton genotypes. **A**-Fiber length (inch), **B**-Fiber strength.

1-237025N517, 2-Buxoro-6, 3-Cokers-124, 4-Deltopine-14, 5-DPZ-554085, 6-Duli, 7-Hopijones-79-4480, 8-L-1, 9-L-2, 10-L-25, 11-L-3, 12-L-4, 13-L-4112-1, 14-Las-Brenas-347, 15-Meade-14-2, 16-Mebane-B-1, 17-PD747, 18-PD-648, 19-PD-6520, 20-Pramukh, 21-Ravnaq-1, 22-Ravnaq-2, 23-Rex, 24-RS-89, 25-S-42-517, 26-Stoneville-213-2208, 27-Stoneville-508, 28-Tamcot sp, 29-Typ4 AVB5, 30-Typ-4 AVB-6.

## REFERENCES

1. Sukumar Saha, David M. Stelly, Dwaine A. Raska, Jixiang Wu, Johnie N. Jenkins, Jack C. McCarty, Abdusalom Makamov, V. Gotmare, Ibromkhim Y. Abdurakhmonov and B.T. Campbell. Chromosome Substitution Lines: Concept, Development and Utilization in the Genetic Improvement of Upland Cotton. Chapter in the book Plant breeding, 2012. January 11th 2012. ISBN: 978-953-307-932-5 DOI: 10.5772/35585
2. Abdurakhmonov, Ibromkhim & Saha, Sukumar & Jenkins, Jonnie & Buriev, Zabardast & Shermatov, Shukhrat & Scheffler, Brain & Pepper, Alan & Yu, John & Kohel, Russell & Abdurakarimov, Abdusattor. (2009). Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in *G-hirsutum* L. variety germplasm. *Genetica*. 136. 401-17. 10.1007/s10709-008-9337-8.
3. Kushanov FN, Buriev ZT, Shermatov SE, Turaev OS, Norov TM, Pepper AE, et al. (2017) QTL mapping for flowering-time and photoperiod insensitivity of cotton *Gossypium darwinii* Watt. *PLoS ONE* 12(10): e0186240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186240>
4. Darmanov, Mukhtor Muxammadovich; Turaev, Ozod Sunnatalievich; Tulanov, Akmal Abrorovich; and Komilov, Doniyor Juraevich (2019) "Determination of candidate genes and proteins in QTL regions associated with fiber quality traits". *Scientific Bulletin of Namangan State University*: Vol. 1:Iss. 4, Article 17. <https://uzjournals.edu.uz/namdu/vol1/iss4/17>
5. O.S. Turaev, A.Kh. Makamov, M.M. Darmanov, N.N. Husenov, F.N. Kushanov, I.Y. Abdurakhmonov. Molecular and statistical analysis of fiber quality traits on cotton cultivar Tafakkur that derived through MAS technology. "Uzbek Biological Journal". 3-2017. P.36-39.
6. Sankeshwar Mahantesh, Jadhav Mangesh, Adiger Sateesh, Patil Rajesh, Katageri I. (2018). Mapping of QTLs for traits related to leaf pubescence, jassid resistance and yield in cotton (*Gossypium* spp.). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)*. 78. 252. 10.5958/0975-6906.2018.00033.0.
7. Ni M, Ma W, Wang X, Gao M, Dai Y, Wei X, Zhang L, Peng Y, Chen S, Ding L, Tian Y, Li J, Wang H, Wang X, Xu G, Guo W, Yang Y, Wu Y, Heuberger S, Tabashnik BE, Zhang T, Zhu Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. *Plant Biotechnol J*. 2017 Sep;15(9):1204-1213. doi: 10.1111/pbi.12709. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28199783; PMCID: PMC5552478.
8. Xiu-hua Guo, Cai-ping Cai, Dong-dong Yuan, Ren-shan Zhang, Jing-long Xi, Wang-Zhen Guo. Development and identification of *Verticillium* wilt-resistant upland cotton accessions by pyramiding QTL related to resistance. *Journal of Integrative Agriculture*. Volume 15, Issue 3, March 2016, Pages 512-520. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61083-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61083-8).
9. Wang B, Brubaker CL, Summerell BA, Thrall PH, Burdon JJ (2010) Local origin of two vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia. *Evol Appl* 3:505–524.

<sup>1</sup>РАХИМОВА Н.М., <sup>1,2</sup>СОЛИЕВ А.Б.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К РАЗВИТИЮ БЫСТРОТЫ И СИЛЫ У СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

rnbiochemistry@mail.ru

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр спортивной медицины, г. Ташкент

<sup>2</sup>Центр геномики и биоинформатики АН РУз

РАХИМОВА Н.М., СОЛИЕВ А.Б.

### ЦИКЛИК СПОРТ ТУРЛАРИ СПОРТЧИЛАРИДА ТЕЗЛИК ВА КУЧНИНГ РИВОЖЛАНИШИГА МОЙИЛ БЎЛГАН ГЕНЕТИК МАРКЕРЛАРНИ АНИҚЛАШ

Ушбу ишда велоспорт, энгил атлетика ва эшкак эшиш спорт турлари билан шуғулланувчи спортчиларда ACE, PPAR ҳамда ACTN ген полиморфизмларини ўрганиш натижалари келтирилган.

РАХИМОВА Н.М., СОЛИЕВ А.Б.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К РАЗВИТИЮ БЫСТРОТЫ И СИЛЫ У СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА

В работе приведены результаты исследования полиморфизмов генов, ACE, PPAR и ACTN у спортсменов, занимающихся велоспортом, легкой атлетикой и греблей.

RAKHIMOVA N.M., SOLIEV A.B.

### DETERMINATION OF GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH A PREDISPOSITION TO THE DEVELOPMENT OF SPEED AND STRENGTH IN CYCLICAL SPORTS ATHLETES

This paper presents the results of a study of gene polymorphisms of ACE, PPAR and ACTN in athletes engaged in cycling, athletics and rowing

В настоящее время признанным является тот факт, что спортивная одаренность наследственно обусловлена и высоких спортивных результатов может достичь лишь талантливый человек, обладающий определенным набором генетических предпосылок к данной деятельности. сто спортивные результаты во многом определяется степенью выраженности у атлета таких качеств как выносливость, скорость, сила, координация, гибкость, а также их сочетанием [1]. Успешность в каждом виде спорта требует наличия отдельных спортивных качеств. Так, если спринтерам-бегунам требуется наличие скоростных качеств, то марафонцам – бегунам в длительную дистанцию – выносливость и др. [2]. Только в условиях оптимальной комбинации этих качеств и при создании адекватного тренировочного процесса с учетом этих качеств можно добиться хороших спортивных результатов. А эти спортивные качества генетически детерминированы [3]. Поэтому изучения полиморфизма генов ответственные за спортивные качества является одним из приоритетных направлений в спортивной медицины и генетики.

**Цель исследования.** Сравнительное изучение распределения частот аллелей и генотипов генов ACE, PPARG и ACTN3 у спортсменов-велосипедистов, легкоатлетов и гребцов в сравнительном аспекте.

Благодаря расшифровке структуры генома человека стало возможным выявление спектра генетических маркеров, ассоциированных с развитием и проявлением физических качеств, значимыми в условиях спортивной деятельности [4]

К настоящему моменту описано как минимум 6 полиморфизмов генов, ассоциированных с предрасположенностью к занятиям видами спорта, направленными на развитие быстроты и силы (табл.).

**Генетические маркеры, ассоциированные с предрасположенностью к занятиям видами спорта, направленными на развитие быстроты и силы по [5] с доп.**

Ген	Локализация	Полиморфизм	Маркер быстроты/силы
ACE	17q23.3	Alu I/D	D
ACTN3	11q13.1	Arg577Ter (rs1815739 C/T)	R577
AR	Xq11.2-q12	(CAG) <sub>n</sub>	L ( $\geq 22$ )
HIF1A	14q21-q24	Pro582Ser (rs11549465 C/T)	582Ser
PPARA	22q13.31	rs4253778 G/C	rs4253778 C
PPARG	3p25	Pro12Ala (rs1801282 C/G)	12Ala

К числу генов кандидатов ответственный за выносливость организма к физическим нагрузкам и гипоксии относится ген ангиотензинпревращающего фермента - ACE [6]. Ангиотензинпревращающий фермент (ACE) выступает в качестве ключевого регулятора в активности ренин-ангиотензиновой системы. В гене ACE (локализация: 17q23.3) обнаружен инсерционно-делеционный полиморфизм (I/D; наличие или отсутствие 287 п.н. в 16-м интроне), при котором наличие ACE D аллеля ассоциировано с более высоким уровнем циркулирующего ACE и более высокой активностью тканевого фермента [7, 8]. Этот эффект может быть связан с ACE-опосредованной активацией фактора роста ангиотензина-II и повышенной деградацией брадикинина (ингибитора роста) [9]. Здесь важно отметить, что ACE D аллель ассоциируется с приростом динамической силы и мышечной массы, а ACE I аллель – с приростом изометрической силы. Таким образом, ACE D аллель ассоциируется с развитием быстроты, силы и мышечной массы.

Известно, что гены активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR), относящиеся к семейству ядерных рецепторов, участвуют в образовании белков, обладающих свойством специфически связываться с PPAR-чувствительными элементами промоторов генов жирового и углеводного метаболизма и регулировать их транскрипцию [1]. На сегодняшний день известны 3 вида этих транскрипционных белков семейства PPAR: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  и PPAR $\delta$ . Эти белки, будучи транскрипционными факторами, контролируют экспрессию нескольких десятков генов, участвующих в обмене жиров и углеводов. При этом насыщенные и ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты (ЖК), их производные, синтетические средства в виде лекарственных препаратов (фибраты, тиазолидинеидоны), лейкотриены и др.) могут выступать в роли лигандов. Эти гены экспрессируются в тех тканях, где происходит усиленный катаболизм жиров, в частности в медленных мышечных волокнах, печени, сердца и бурой жировой ткани. По данным O. Braissant и соавт. [10], в мышцах ген PPARA экспрессируется в 7 раз больше, чем в жировой ткани.

Исследование Krämer D.K. и соавт. [11], свидетельствует о повышенной экспрессии гена PPARA в скелетных мышцах элитных велогонщиков на длинные дистанции по сравнению с контрольной группой. В то же время в миокарде в условиях эксперимента как снижение, так и повышение экспрессии гена PPARA вызывает его гипертрофию и кардиомиопатию [12].

Исследователями было доказано, что G аллель гена PPARA ассоциируется с преобладанием медленных мышечных волокон у физически активных мужчин [13].

Известно, что ген ACTN3 участвует в регуляции активности альфа-актинин связывающего белка, относящегося к спектриновому семейству белков [14]. По данным D.G.MacArthur и K.N.North [15], альфа-актинины в мышцах опорно-двигательного аппарата формирует ведущий доминантный белковый компонент Z-линии саркомера и стабилизирует сократительный аппарат мышечного волокна. Изоформа альфа-актинина 2 является доминантной изоформой мышц сердца и окислительных мышечных волокон скелета человека. В то же время B.Vincent и соавт. [16], установлено, что изоформа альфа-актинина 3 в большей степени экспрессируется в быстрых гликолитических мышечных волокнах, по сравнению в быстрых окислительных, и практически не экспрессируется в медленных мышечных волокнах. Поэтому недостаток альфа-актинина-3 в быстросокращающихся мышечных волокнах может стать причиной низкого уровня развития скоростно-силовых качеств человека [17-19].

В связи с изложенным в настоящей работе нами была изучена частота распределения аллельно-генотипных вариантов гена ACE, G2528C (rs4253778) и G> A (GLY482SER) (rs8192678) полиморфизмов гена PPAR и ACTN3 у представителей циклических видов спорта - велосипедистов,

легкоатлетов и гребцов.

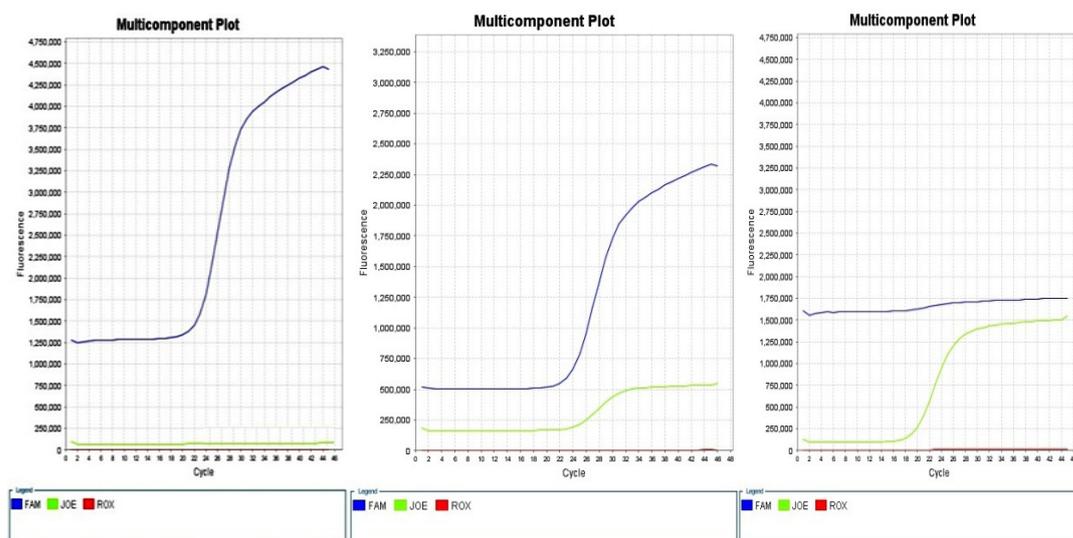
**Материалы и методы исследования.** Исследования проводились на основе выборки спортсменов в 2019 году. Количество спортсменов составляло 60 человек, в возрасте 18-30 лет. Из них 20 спортсменов, занимающихся греблей на байдарке и каноэ, 20 - спортсменов легкоатлетов и 20 - велосипедистов. При отборе конкретных лиц не учитывали их национальную принадлежность. Забор биологического материала для выделения ДНК осуществляли с учетом установленного порядка по правам человека, который производили с письменного согласия испытуемых [6].

Сбор образцов крови спортсменов разной специализации и квалификации проводился на базе спортивных федераций Узбекистана: легкая атлетика, велоспорт, гребля на байдарке и каноэ. Венозная кровь в количестве 1,5 мл была отобрана в 3 мл раствора ЭДТА и хранилась при температуре -20°C.

Выделение ДНК из цельной крови проводилось на наборах реагента Рибо-преп (Россия). Детекции полиморфизма всех генов определяли методом Real-Time ПЦР (набором компании-производителя ООО НПФ «Литех» Москва, Россия).

Для проведения ПЦР-амплификации в реальном времени использовали GeneAmp® ПЦР – ABI 7500 Fast Real-Time PCR с 96-ячеечным блоком. Программа амплификации в реальном времени включала 100 сек предварительной денатурации при 95°C однократно, при 95°C – 15 сек и при 64°C – 40 сек включала 45 повторов. В программу ввели детекторы FAM и JOE. Полученные результаты документировались в виде роста кривых по двум детекторам FAM и JOE в графическом режиме на соответствующей программе (рис.1).

**Полученные результаты.** Результаты анализа частот распределения аллельно-генотипных вариантов гена ACE у спортсменов, независимо от изучаемых видов спорта, представлены на рис. 2. Как видно из представленных данных, среди обследованных спортсменов, независимо от вида спорта, носители Ins/Ins генотипа составило 26,6%, а генотипом Ins/Del – 56,7%. В то же время, среди них удельный вес носителей Del/Del генотипа гена ACE составил лишь 16,7%. Следовательно, результаты исследования свидетельствуют об ассоциации полиморфизма ACE с предрасположенностью к занятиям спортом, распределенной следующим образом: аллель Ins, отвечающая за выносливость, превалирует у обследованных спортсменов по сравнению с аллелью Del, отвечающей за силу и быстроту. Но наиболее распространенным среди спортсменов данных видов спорта является гетерозиготный генотип Ins/Del.

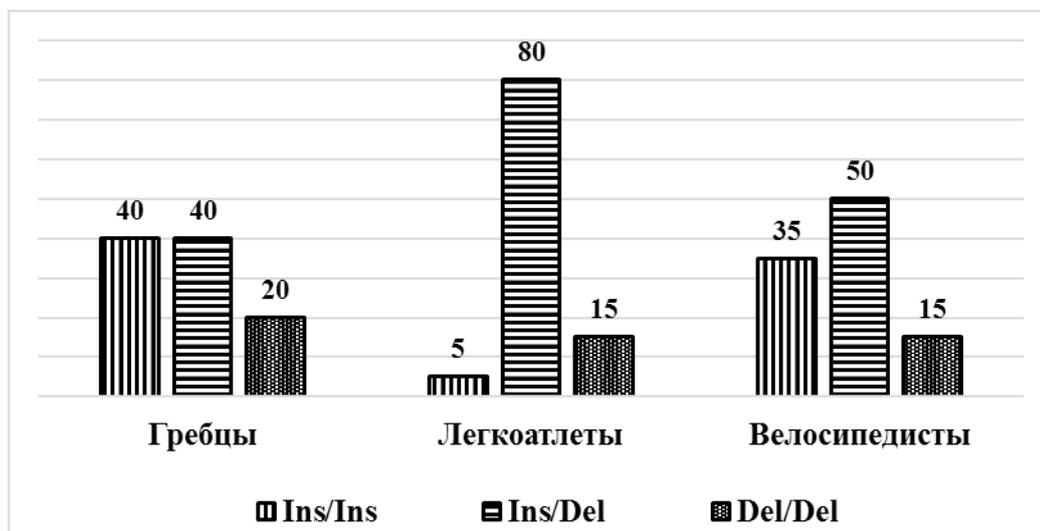


**Рис. 1.** Результат проведения ПЦР в режиме реальном времени генов ACE Ins/Del: А – гомозиготный генотип Ins/Ins; Б – гетерозиготный генотип – Ins/Del, В – гомозиготный генотип Del/Del, PPARA: А- гомозиготный генотип G/G; Б- гетерозиготный генотип – G/C и В-гомозиготный генотип-С/С, ACTN3 С18705Т: А – гомозиготный генотип СС; Б – гетерозиготный генотип СТ и В – гомозиготный генотип ТТ.

Для нас представлял определенный интерес изучение частот распределения аллелей изучаемого гена в зависимости от отдельных видов спорта. Как видно из представленных данных, у спортсменов - гребцов удельный вес носителей Ins/Ins генотипного варианта гена ACE составил 40,0%, Ins/Del генотипного варианта также 40,0% и Del/ Del генотипа данного гена -20,0%. В то же время среди легкоатлетов (бегунов) удельный вес спортсменов с Ins/Ins генотипом гена ACE был в 8 раз ниже таковых у спортсменов-гребцов, а Ins/Del и Del/Del генотипы существенно не отличались. В то же время среди велосипедистов спортсменов- носителей Ins/Ins генотипа было в 7 раз выше по сравнению с таковыми у легкоатлетов и было сопоставимо с генотипами гребцов. А удельный вес спортсменов носителей Del/Del генотипа гена ACE был сопоставим с таковыми у легкоатлетов и был ниже на 25,0% по сравнению с таковыми у гребцов.

Следовательно, среди исследованных спортсменов, независимо от вида спорта, наиболее часто встречаются носители Ins/Del гетерозиготного генотипа гена ACE. В то же время частота встречаемости носителей Ins/Ins и Del/Del генотипов находится в определенной зависимости от изучаемых видов спорта. Их удельный вес наиболее высок среди гребцов и встречается у 2/3 спортсменов. Почти такая же картина имеет место по отношению к генотипам велосипедистов.

На сегодняшний день считается установленным, что наиболее изученным полиморфизмом гена PPAR $\gamma$  является Pro12Ala полиморфизм (rs1801282 C/G), представляющий собой замену нуклеотида С на G в 34 положении экзона В, что приводит к замещению пролина на аланин в аминокислотном положении 12 изоформы белка PPAR $\gamma$ 2.



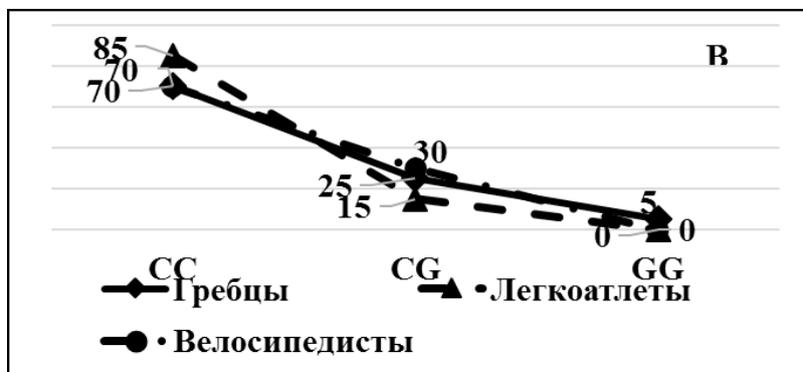
**Рис. 2.** Распределение генотипов гена ACE среди спортсменов гребцов, легкоатлетов и велосипедистов (в %).

Анализ частот распределения генотипов C34G2 (rs1801282) полиморфизма гена PPAR также показывает, что генотип CC, ответственный за окисление липидов и мышечную выносливость, быстроту, взрывную силу имеет место у подавляющего большинства спортсменов независимо от занимаемого вида спорта и превалирует у легкоатлетов-85%, уступая гребцам и велосипедистам-70% (рис.3). А CG гетерозиготный генотип изучаемого гена встречается у каждого пятого спортсмена: велосипедисты-30%, гребцы-25%, легкоатлеты-15%. В то же время GG генотип встречался у единичных спортсменов-гребцов-5%.

Как было изложено выше G аллель гена PPAR $\alpha$  ассоциируется с преобладанием медленных мышечных волокон, высокими показателями мышечной выносливости и отношением МПК (максимальное потребление кислорода) к ЧСС, а также с низким риском развития ожирения [20-23].

Следовательно, у большинства обследованных спортсменов эти качества генетически детерминированы. Можно предположить, что эти спортсмены могут давать лучшие спортивные результаты в коротких дистанциях. Действительно, исследование проведенные группой N. Eunon и соавт. [24], у израильских атлетов показали, что частота GG генотипа гена PPAR $\alpha$  среди стайеров было выше по сравнению со спринтерами. Вместе с тем нельзя считать окончательным прогноз о том, что боль-

шинства обследованных спортсменов могут показать лучшие результаты в коротких дистанциях. Как было указано выше транскрипционные факторы регулируют экспрессию нескольких десятков генов из семейства PPARA, повышая активность одних и подавляя других. В связи с этим требуется оценка их активности (их метилирования) – эпигенетического статуса спортсмена [25]. Это позволило-бы, при носительстве спортсменом определенного аллеля спортивного гена, в той или иной степени точности прогнозировать его спортивные результаты.



**Рис. 3.** Распределение генотипа C34G2(rs1801282) (B) гена PPAR среди спортсменов гребцов, легкоатлетов и велосипедистов (в %).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что частота гетерозиготных генотипов исследуемых полиморфизмов гена PPARA также ощутимо высока. Исследования, проведенные D.M. Flavell и соавт. [26], позволяет предположить, что замена нуклеотида G на C в положении 2528 гена PPARA сопровождается со снижением экспрессии гена и обуславливает нарушение регуляции липидного и углеводного обменов. Более того, изучение носительства данного генотипа среди больных и здоровых показывает, что носители C аллель PPARA имеют сравнительно высокий риск развития атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа и ишемической болезни сердца [27]. В то же время исследование проведенные Y. Jamshidi и соавт. [28] свидетельствует о том, что у носителей генотипа G/C прирост массы левого желудочка в 2 раза, а у носителей генотипа C/C в 3 раза больше по сравнению носителями генотипа G/G. Следовательно, если учесть, что гипертрофия миокарда обусловлена со снижением экспрессии гена PPARA и уменьшением окисления ЖК, то вполне вероятно, что гипертрофический эффект C аллеля связан со снижением освоения ЖК миокардом и повышением использования глюкозы для его энергетических нужд.

Изучение взаимосвязи между Pro12Ala полиморфизмом гена PPARG и площадью поперечного сечения мышечных волокон показывает, что у активных мужчин наличия данного аллеля ассоциировался с большей площадью поперечного сечения медленных мышечных волокон [29], с высокими значениями индекса массы тела у спортсменов и максимальной произвольной силы и ее приростом в ответ на физические нагрузки силовой направленности [30]. Следовательно, нами полученные результаты свидетельствуют о том, что среди изученных спортсменов довольно высок удельный вес тех, у которых мышечная выносливость, обусловленный за счет интенсификации окисления жиров имеет приоритетное значение. Хотя, при этом есть определенное число спортсменов, у которых возможно имеет место силовые качества. Однако их удельный вес заметно меньше, чем спортсмены с потенциальной выносливостью.

Наиболее изученным генетическим маркером физической работоспособности является полиморфизмы гена альфа актинина-3 (ACTN3), участвующего в регуляции сократительного аппарата мышечных волокон и в развитие скоростно-силовых качеств человека [14]. Результаты анализа частот распределения аллельно-генотипных вариантов гена ACTN3 у спортсменов, независимо от изучаемых видов спорта представлены на рис. 4. Как видно из представленных данных, среди обследованных спортсменов, независимо от вида спорта, носители C/C генотипа составили 36,7%, а генотипа C/T – 53,3%. В то же время, среди них удельный вес носителей T/T генотипа гена ACTN3 составил лишь 10,0%. Следовательно, результаты исследования свидетельствуют об ассоциации

полиморфизма АСТN3 с предрасположенностью к занятиям спортом, распределенной следующим образом: аллель С, отвечающая за силу и быстроту, превалирует у обследованных спортсменов по сравнению с аллелью Т, отвечающей за выносливость. Но наиболее распространенным среди спортсменов данных видов спорта является гетерозиготный генотип С/Т.

Для нас представлял определенный интерес изучение частот распределения аллелей изучаемого гена в зависимости от отдельных видов спорта. Результаты этого анализа представлены на рис. 4. Как видно из представленных данных, у спортсменов - гребцов удельный вес носителей С/С генотипного варианта гена АСТN3 составил 25,0%, С/Т генотипного варианта – 65,0% и Т/Т генотипа данного гена -10,0%. В то же время среди легкоатлетов (бегунов) удельный вес спортсменов с С/С генотипом гена АСТN3 было в 1,6 раза выше таковых у спортсменов-гребцов, а С/Т генотип было, наоборот, ниже на 23%, соответственно. А Т/Т генотип практически был одинаковым. В то же время среди велосипедистов спортсмены носители С/С генотипа было еще выше с таковыми у гребцов (в 1,8 раза) и было сопоставимо с легкоатлетами. А удельный вес спортсменов носителей Т/Т генотипа гена АСТN3 было одинаковым как с гребцами, так и легкоатлетами.

Следовательно, среди обследованных спортсменов, независимо от вида спорта, наиболее часто встречается носители С/Т гетерозиготного генотипа гена АСТN3 и одинаково часто встречается носители Т/Т генотипа изучаемого гена. В то же время частота встречаемости носителей С/С генотипа находится в определенной зависимости от изучаемых видов спорта. Их удельный вес наиболее высок среди велосипедистов и легкоатлетов.

Результаты наших исследований свидетельствует о том, что С аллель и СС генотип гена АСТN3 довольно часто встречается среди обследованных спортсменов. Хотя, при этом существует определенные различие в зависимости от изучаемых видов спорта. Среди 2/3 и больше спортсменов занимающихся легкой атлетикой и велоспортом имеют предрасположенность скоростно-силовым проявлениям. В то же время подобные качества может проявить лишь каждый четвертый спортсмен, занимающийся греблей.



Рис. 4. Распределение генотипов гена АСТN3 среди спортсменов гребцов, легкоатлетов и велосипедистов (в %).

Необходимо отметить, что отсутствие в скелетных мышцах белка альфа-актинина 3 не означает наличия патологии или противопоказания к занятию спортом. Так как, альфа-актинин-2 частично компенсирует отсутствие альфа-актинина 3 в Z-дисках быстросокращающихся мышечных волокон. Однако, наличие R577 аллеля гена АСТN3 ассоциировано с высоким скоростно-силовым потенциалом. Как показывает результаты исследования А.М. Druzhevskaya и соавт. [18], почти 14% население России являются носителями ТТ (XX) генотипа и их скелетной мускулатуре практически отсутствует белок альфа-актинина 3. И в наших исследованиях также у 10% спортсменов, независимо от изучаемого вида спорта, имеет место носительство ТТ (XX) генотипа АСТN3. Действительно, по данным ряда исследователей показано, что частота АСТN3 ТТ(XX) генотипа значительно меньше у спортсменов данной направленности. Необходимо подчеркнуть, что XX(ТТ) генотип гена АСТN3 не является архиважным индикатором отсутствия возможности проявления лучших результатов в спринте и силовых видах спорта [1]. Подтверждением этого является, хотя-бы результаты двух спортсменов с таким же генотипом, которые входят в элиту спорта: один из них – мировой рекордсмен

в метании молота, другой – двукратный олимпийский чемпион в прыжках в длину [18]. Исходя из этого можно считать, что частотная характеристика аллельно-генотипных вариантов гена ACTN3 выявленных у обследованных спортсменов позволяет по-иному понять спортивные характеристики и особенности организма спортсмена с учетом носительство генотипов изучаемого гена.

Таким образом результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что среди спортсменов, занимающихся изученными видами спорта, довольно высок удельный вес носителей СТ (RX) - гетерозиготного и СС (RR) - гомозиготного вариантов генотипа гена ACTN3, ответственного за развитие скоростно-силовых качеств спортсмена. Вместе с тем для спортивной успешности требуется наличие определенных аллелей и генотипов данного гена у спортсмена, исходя из вида спорта и обусловленных им специфических требований к физическим качествам. Действительно, наиболее высокое носительство среди изученных видов спорта СС генотипа ACTN3 оказалось среди спортсменов велосипедистов и легкоатлетов.

**Заключение.** Полученные результаты и обзор литературных данных показывает, что среди спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта наиболее высок удельный вес носителей Ins/Del - гетерозиготного и Ins/Ins - гомозиготного вариантов (за исключением легкоатлетов) генотипа гена ACE. Более того, частота распределений аллельно-генотипного вариантов гена ACE находится в определенной зависимости от изучаемых видов спорта. Среди спортсменов наиболее высок процент носительства Ins/Ins, а также Del/Del генотипа гена ACE среди спортсменов-ребцов. У спортсменов, занимающихся циклическими видами спорта наиболее высок удельный вес носителей C/C- гомозиготного вариантов генотипа полиморфизмов гена PPARA C34G2PPARG2 и почти одинаково часто распределены среди велосипедистов, легкоатлетов и гребцов. Частота распределений PPARA (CC) и аллельно-генотипного варианта наиболее высока среди легкоатлетов, по сравнению с гребцами и велосипедистами, PPARA(CG)-у велосипедистов. Среди спортсменов, занимающихся велоспортом, легкой атлетикой и греблей наиболее высок удельный вес носителей СТ (RX) - гетерозиготного и СС (RR) - гомозиготного вариантов генотипа гена ACTN3, по сравнению TT(XX) гомозиготного генотипа. Частота распределений ACTN3C(R) и ACTN3CC(RR) аллельно-генотипного варианта наиболее высока среди велосипедистов и легкоатлетов, по сравнению с гребцами.

Таким образом, полученные данные являются своеобразным подспорьем при оценке физических возможностей и перспектив по спортивной успешности атлетов в изучаемых видах спорта. Более того это указывает на необходимость учета полученных генетических детерминант при планировании и формировании индивидуальных тренировочных программ в предсоревновательных этапах их подготовки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта. – М.: Сов. спорт, 2009, С. 268.
2. Semenova E.A., Fuku N., Ahmetov I.I. Genetic profile of elite endurance athletes // Sports, Exercise, and Nutritional Genomics, 2019 - P. 73-104.
3. Кочергина А.А., Ахметов И.И. Оптимизация тренировочного процесса юных лыжников с учетом их генетической предрасположенности // Физ. культура: воспитание, образование, тренировка. 2006, №1, с. 35-36.
4. *Всеобщая Декларация о геноме человека и правах человека* (11 ноября 1997 г.)
5. Ahmetov II, Rogozkin VA. Genes, athlete status and training - An overview. Med Sport Sci. 2009;54:43-71. doi:10.1159/000235696.
6. Maciejewska-Skrendo A., Sawczuk M., Cięszczyk P., Ahmetov I.I. Genes and power athlete status. // Sports, Exercise, and Nutritional Genomics, 2019. – P. 41-72.
7. Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. Journal of Clinical Investigation, 86 (4): 1343–1346.
8. Danser A.H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. Circulation, 1995, 92 (6): 1387–1388.
9. Murphey L.J., Hachey D.L., Oates J.A., Morrow J.D., Brown N.J. Metabolism of bradykinin in vivo in humans: Identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000;294:263–269.

10. Braissant O., Fougelle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, -beta, and -gamma in the adult rat // *Endocrinology*. – 1996. – Vol. 137. – P. 354–366.
11. Krämer D.K., Ahlsén M., Norrbom J., Jansson E., Hjeltnes N., Gustafsson T., Krook A. Human skeletal muscle fiber type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA // *Acta Physiol. (Oxf.)*. – 2006. – Vol. 188. – P. 207–216.
12. Smeets P.J., Willemsen P. H., Stassen A.P., Ayoubi T., van der Vusse G.J., van Bilsen M. Transcriptomic analysis of PPAR $\alpha$ -dependent alterations during cardiac hypertrophy // *Physiol. Genomics*. – 2008. – Vol. 36. – P. 15–23.
13. Ahmetov I.I., Mozhayskaya I.A., Flavell D.M., Astratenkova I.V., Komkova A.I., Lyubaeva E.V., Tarakin P. P., Shenkman B.S., Vdovina A.B., Natreba A.I., Popov D.V., Vinogradova O.L., Montgomery H.E., Rogozkin V.A. PPAR $\alpha$  gene variation and physical performance in Russian athletes // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 103–108.
14. Дружевская А.М. Полиморфизм гена ACTN3у спортсменов // *Генетические, психофизические и педагогические технологии подготовки спортсменов: Сб. науч. тр.* – СПб, 2006. – С. 58-73.
15. MacArthur D.G., North K.N. A gene for speed? The evolution and function of  $\alpha$ -actinin-3 // *BioEssays*. – 2004. – Vol. 26. – P. 786-795.
16. Vincent B., de Bock K., Ramaekers M. et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution // *Physiol. Genomics*. – 2007. – Vol. 32. – P. 58-63.
17. Ahmetov I.I., Druzhevskaya A.M., Astratenkova I.V. et al. The ACTN3R577X polymorphism in Russian endurance athletes // *Brit. J. Sports Med.* – 2008. – DOI:10.1136 / bjsm.2008.051540.
18. Druzhevskaya A.M., Ahmetov I.I., Astratenkova I.V., Rogozkin V.A. Association of the ACTN3R577X polymorphism with power athlete status in Russians // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2008. – Vol. 103. – P. 631–634.
19. Moran C.N., Yang N., Bailey M.E. et al. Association analysis of the ACTN3R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks // *Europ. J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 15. – P. 88-93.
20. Ахметов И.И., Гаврилов Д.Н., Астратенкова И.В., Комкова А.И., Малинин А.В., Романова Е.Е., Rogozkin V.A., Бальсевич В.К., Лубышева Л.И. Ассоциация полиморфизмов генов с уровнем двигательной подготовленности детей среднего школьного возраста // *Физическая культура: воспитание, образование, тренировка*. – 2008. – № 2. – С. 54–57.
21. Ахметов И.И., Можайская И.А., Любаева Е.В., Астратенкова И.В., Vinogradova O.L., Rogozkin V.A. Ассоциация полиморфизма гена PPAR $\alpha$  с предрасположенностью к развитию скоростно-силовых качеств // *Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряженных физических нагрузок: сб. статей.* – Вып. № 3. – М., 2007. – С. 22–28.
22. Дондуковская Р.Р., Ахметов И.И., Топанова А.А. Физическая работоспособность, фитнес и полиморфизм генов: сб. трудов СПбНИИФК. Итоговая научная конференция. 18–19 декабря 2006 г. – СПб., 2006. – С. 201–205.
23. Ahmetov I.I., Mozhayskaya I.A., Flavell D.M., Astratenkova I.V., Komkova A.I., Lyubaeva E.V., Tarakin P. P., Shenkman B.S., Vdovina A.B., Natreba A.I., Popov D.V., Vinogradova O.L., Montgomery H.E., Rogozkin V.A. PPAR $\alpha$  gene variation and physical performance in Russian athletes // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2006. – Vol. 97. – P. 103–108.
24. Eynon N., Meckel Y., Sagiv M., Yamin C., Amir R., Sagiv M., Goldhammer E., Duarte J.A., Oliveira J. Do PPAR $\alpha$  and PPAR $\beta$  polymorphisms influence sprint or endurance phenotypes? // *Scand. J. Med. Sci. Sports*. – 2009. – DOI:10.1111/j.1600-0838.2009.00930.x.
25. Семенова Е.А., Валеева Е.В., Булыгина Е.А. и др. Применение омиксных технологий в системе спортивной подготовки. // *Ученые записки Казанского Университета. Серия естественных наук*. 2017. Т.159, кн.2. С.232-247.
26. Flavell D.M., Ireland H., Stephens J.W., Hawe E., Acharya J., Mather H., Hurel S.J., Humphries S.E. Peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 582–586.
27. Flavell D.M., Jamshidi Y., Hawe E., Torra I.P., Taskinen M.R., Frick M.H., Nieminen M.S., Kesaniemi Y.A., Pasternack A., Staels B., Miller G., Humphries S.E., Talmud P. J., Syvanne M. Peroxisome prolifer-

- erators-activated receptor  $\alpha$  gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – P. 1440–1445.
28. Jamshidi Y., Montgomery H.E., Hense H-W., Myerson S.G., Torra I.P., Staels B., World M.J., Doering A., Erdmann J., Hengstenberg C., Humphries S.E., Schunkert H., Flavell D.M. Peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$  gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – P. 950–955.
29. Ахметов И.И., Можайская И.А., Любаева Е.В., Виноградова О.Л., Рогозкин В.А. Полиморфизм гена PPAR $\alpha$  и двигательная деятельность человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – Т.146 – №11. – С. 567–569.
30. Ахметов И.И., Можайская И.А., Любаева Е.В., Астратенкова И.В., Виноградова О.Л., Рогозкин В.А. Ассоциация полиморфизма гена PPAR $\alpha$  с предрасположенностью к развитию скоростно-силовых качеств // *Медико-биологические технологии повышения работоспособности в условиях напряженных физических нагрузок: сб. статей*. – Вып. № 3. – М., 2007. – С. 22–28.

## МУНДАРИЖА

Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Тожибаева Д.И., Арзуманов А.Ш., Абдукаримов А.А. Ўзбекистондаги Ўрта Осиё узум селекцияси навларининг таркиби .....	3
Kamburova V.S., Ubaydullayeva X.A., Abdurakhmonov I.Y. Fitoxrom A1 genning RNK interferentsiyasi g'ozaning fotosintetik fermentlar faolligiga ta'siri ...	7
M.M. Kholmuradova, O.S. Turaev, I.S. Normamatov, J.K. Norbekov, S.M. Nabiev, F.N. Kushanov G'ozaning UAK populyatsiyasi boshlang'ich namunalarining qurg'oqchilikka chidamliligini statistik baholash.....	14
Kamburova V.S., Akhunov A.A., Xashimova N.R., Darmanov M.M., Babaeva D.T., Usmanov D.E., Mamatkulova G.F. Porloq-4 g'ozaga navning gen ekspressiya va antioksidant fermentlar faolligiga biostimulyatorlarning ta'siri .....	17
Абдуллаев С.А., Болкиев А.А., Абдуллаев А.Н., Султонова Ш.А., Эшмурзаев Ж.Б., Убайдуллаева Х.А., Буриев З.Т., Хуршут Э. Махаллий анор навларини чанглантириш қобилиятини аниқлаш .....	25
Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Mamadjanov A. Biotechnologic g'ozaga va uning avlodlaridagi <i>npt</i> II genini naslidan naslida namoyon bulishi .....	30
Normamatov I.S., Turaev O.S., Kholmuradova M.M., Makamov A.X., Kushanov F.N. Sho'rlanish stressida o'rta tolali g'ozaga genotiplarini molekulyar va fenotipik baholash.....	34
Norov T.M., Buriev Z.T., Ubaydullaeva X.A., Abduraxmonov I.Yu. <i>RNAi</i> texnologiyasidan foydalanib vilt kasaligiga chidamli biotexnologik liniyalar yaratish va mahalliy navlarga introgressiya qilish .....	38
Xusenov N.N., Turayev O.S., Umedova M.E., Orziqulova B.I., Boyqobilov U.A., Kushanov F.N. O'rta tolali g'ozaga tola sifati, vilt va hasharotlarga chidamlilik belgilarini genetik piramidalash	43
Рахимова Н.М., Солиев А.Б. Циклик спорт турлари спортчиларида тезлик ва кучнинг ривожланишига мойил бўлган генетик маркерларни аниқлаш .....	47

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Салахутдинов И.Б., Хуршут Э.Э., Раджапов Ф.С., Тожибаева Д.И., Арзуманов А.Ш., Абдукаримов А.А. Сортовой состав винограда среднеазиатской селекции в Узбекистане .....	3
Камбурова В.С., Убайдуллаева Х.А., Абдурахмонов И.Ю. Влияние РНК интерференции гена фитохрома A1 на активность ферментов фотосинтетического аппарата хлопчатника .....	7
М.М. Холмурадова, О.С. Тураев, И.С. Нормаматов, Ж.К. Норбеков, С.М. Набиев, Ф.Н. Кушанов Статистическая оценка засухоустойчивости исходных форм ГАК популяции хлопчатника .	14
Камбурова В.С., Ахунов А.А., Хашимова Н.Р., Дарманов М.М., Бабаева Д.Т., Усманов Д.Э., Маматкулова Г.Ф. Влияние биостимуляторов на экспрессию генов и активность антиоксидантных ферментов у хлопчатника сорта Порлок-4.....	17
Абдуллаев С.А., Болкиев А.А., Абдуллаев А.Н., Султонова Ш.А., Эшмурзаев Ж.Б., Убайдуллаева Х.А., Буриев З.Т., Хуршут Э. Определение жизнеспособности пыльцы местных сортов граната .....	25
Имамходжаева А.С., Кадырова Ш.Б., Мамаджанов А. Биотехнологический хлопчатник и наследование <i>npt</i> II гена в его потомстве.....	30
Нормаматов И.С., Тураев О.С., Холмурадова М.М., Макамов А.Х., Кушанов Ф.Н. Молекулярная и фенотипическая оценка генотипов средневолокнистого хлопчатника при солевом стрессе .....	34
Норов Т.М., Буриев З.Т., Убайдуллаева Х.А., Абдурахмонов И.Ю. Создание биотехнологических линий хлопчатника, устойчивых к болезням, с использованием технологии рнк интерференции ( <i>RNAi</i> ) и их интрогрессия в местные сорта.....	38
Хусенов Н.Н., Тураев О.С., Умедова М.Е., Орзикулова Б.И., Бойкобилов У.А., Кушанов Ф.Н. Генетическое пирамидирование признаков качества волокна, устойчивости к вилту и насекомым у средневолокнистого хлопчатника .....	43
Рахимова Н.М., Солиев А.Б. Определение генетических маркеров, ассоциированных с предрасположенностью к развитию быстроты и силы у спортсменов циклических видов спорта .....	47

## CONTENTS

Salakhutdinov I.B., Khurshut E.E., Rajapov F.S., Bikmetova D.I., Arzumanov A.Sh., Abdukarimov A.A. The composition of grape varieties of Central Asiatic selection in Uzbekistan.....	3
Kamburova V.S., Ubaydullayeva Kh.A., Abdurakhmonov I.Y. Influence of RNA interference of the phytochrome A1 gene on the activity of photosynthetic apparatus enzymes.....	7
M.M. Xolmuradova, O.S. Turayev, I.S. Normamatov, J.K. Norbekov, S.M. Nabiyeu, F.N. Kushanov Statistical evaluation of drought tolerance of cotton NAM founders.....	14
Kamburova V.S., Akhunov A.A., Xashimova N.R., Darmanov M.M., Babaeva D.T., Usmanov D.E., Mamatkulova G.F. Influence of biostimulants on the gene expression and the antioxidant enzymes activity in Poploq-4 cotton variety .....	17
Abdullaev S.A., Bolkiev A.A., Sulonova Sh.A., Abdullaev A.N., Eshmurzaev J.B., Ubaydullaeva Kh.A., Buriev Z.T., Khurshut E. Determination of pollen viability of bisexual and functional male flowers of Central Asian pomegranate .....	25
Imamhodjaeva A.S., Kadirova Sh.B., Mamadjanov A. Biotechnological cotton and inheritance of the <i>npt</i> II gene in its offspring.....	30
Normamatov I.S., Turaev O.S., Kholmuradova M.M., Makamov A.Kh., Kushanov F.N. Molecular and phenotypic assessment of upland cotton genotypes in salinity stress .....	34
Norov T.M., Buriev Z.T., Ubaydullaeva Kh.A., Abduraxmonov I.Yu. Establishment of biotechnological lines resistant to wilt disease using <i>RNAi</i> technology and introgression to local varieties .....	38
Khusenov N.N., Turayev O.S., Umedova M.E., Orziqulova B.I., Boyqobilov U.A., Kushanov F.N. Genetic pyramiding of fiber quality traits, wilt and insect resistance into upland cotton .....	43
Rakhimova N.M., Soliev A.B. Determination of genetic markers associated with a predisposition to the development of speed and strength in cyclical sports athletes.....	47

## **Правила оформления статей для Узбекского биологического журнала**

Узбекский биологический журнал публикует оригинальные и обзорные статьи.

Статьи, представленные в редакцию, должны отвечать следующим требованиям:

Статьи принимаются на русском и английском языках. Статья должна быть не более 10 страниц (обзорные – до 15 стр.) компьютерного текста набранного в текстовом редакторе Microsoft Word или RTF, отпечатанного через 1,5 интервала, шрифт Times New Roman, кегль 14. Поля сверху и снизу 2 см, слева 3 см, справа 1,5 см, отступ 1,25 см. Страницы нумеруются единой нумерацией, включая таблицы, рисунки и литературу. Таблицы и рисунки (черно-белые) размещаются внутри текста.

Порядок оформления статьи: название статьи; инициалы и фамилии авторов; название учреждения (учреждений); e-mail контактного лица одного из авторов; аннотации (6-10 строк на узбекском, русском и английском языках с *ключевыми словами*), текст статьи (должен включать Введение, Материалы и методы, Результаты, Заключение), Литература (оформление как в последних номерах журнала).

Статьи и акт экспертизы принимаются по электронной почте e-mail: [bioljournal@umail.uz](mailto:bioljournal@umail.uz) Телефон: (+99871) 232 11 81.

С содержанием и статьями вышедших номеров журнала можно ознакомиться на сайте журнала: <http://www.ubj.academy.uz/ru>

**Редколлегия журнала**

