

G‘O‘ZA (*G.HIRSUTUM* L.) GENOMIDAGI *ELONGATED HYPOCOTYL 5* “HY5” GENI RNA INTERFERENSIYASI (RNAI) NATIJASIDA OLINGAN BIOTEKNOLOGIK LINIYALARNING MORFOLOGIK BELGILARINI O‘RGANISH

Mamajonov Bexzod Orifjon o‘g‘li, Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich, Yusupov Abdurahmon Nodirjon o‘g‘li, Obidov Nurdinjon Shuhratjon o‘g‘li, Kamalova Lola Xayriddinovna, Murodov Anvarjon Adxamjon o‘g‘li, Bashirxonov Ziyodulla
Xakimullo o‘g‘li

O‘zR FA Genomika va bioinformatika markazi
Tel: 94 384-10-15 e-mail: mamajonovbexzod@gmail.com

Annotasiya. Yorug‘lik o‘simliklar rivojlanishidagi eng muhim omillardan biri bo‘lib, uning ta‘sirida o‘simliklar o‘sish va rivojlanishdagi barcha jarayonlarni nazorat qiladi. Xususan, yorug‘lik o‘simlik urug‘ining unishidan to vegetatsiya davrining tugashigacha bo‘lgan barcha morfologik va fiziologik jarayonlarni boshqaraishda ishtirok etadi. Shu sababdan, o‘simliklar tomonidan yorug‘likni sifatini aniqlash va miqdorini sezish rivojlanish jarayonida muhim ahamiyat kasb etadi. bZIP tipidagi transkripsiya omili bo‘lgan elongatsiyalangan HYPOCOTYL5 (HY5) o‘simliklardagi fotomorfogenez, ildiz o‘sishi, flavonoidlar biosintezi va to‘planishi, ozuqa moddalarini o‘zlashtirish va abiotik stresslarga javob berish kabi turli fiziologik va biologik jarayonlarni tartibga soluvchi asosiy regulyator vazifasini bajaradi. Ushbu tadqiqotda HY5 genlariga RNK interferensiya usulini qo‘llash orqali o‘simlikda unuvchanlik, erta shonalash, gullash shuningdek, erta hosilga kirish kabi xo‘jalik belgilarini yaxshilashni maqsad qilganmiz. Olingan natijalar nazariy hisob-kitoblarga mos ekanligini ko‘rsatdi.

Kalit so‘zlar. *G‘o‘za (Gossypium hirsutum L), HY5 (Elongated hypocotyl 5), Genom, Ekspressiya, RNKi texnologiyasi.*

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ (РНКИ) ГЕНА УДЛИНЕННОГО ГИПОКОТИЛА 5 «HY5» В ГЕНОМЕ ХЛОПЧАТНИКА (*G.HIRSUTUM* L.)

Мамажонов Бехзод Орифжон угли, Аюбов Мирзакамол Собитжонович,
Юсупов Абдурахмон Нодиржон угли, Обидов Нурдинжон Шухратжон угли,

Камалова Лола Хайриддиновна, Муродов Анваржон Адахамжон угли,
Баширхонов Зиёдулла Хакимулло угли
Центр Геномики и Биоинформатики при АН РУз
Tel: 94 384-10-15 e-mail: mamajonovbexzod@gmail.com

Аннотация: Свет является важнейшим фактором развития растений и регулирует все процессы роста и развития в жизни растений. Свет, в частности, играет роль в регуляции всех морфологических и физиологических процессов, происходящих между прорастанием семян растений и концом вегетационного периода. В результате определение качества и количества света, доступного растениям, имеет решающее значение в процессе развития. Было показано, что удлинённый HYPOCOTYL5 (HY5), транскрипционный фактор типа bZIP, регулирует широкий спектр физиологических и биологических процессов в растениях, включая фотоморфогенез, рост корней, биосинтез и накопление флавоноидов, поглощение питательных веществ и реакцию на абиотический стресс. В этом исследовании мы использовали метод РНК-интерференции на генах HY5 для улучшения агрономически важных показателей, таких как плодовитость, раннее цветение и раннее созревание. Полученные результаты соответствовали теоретическим расчетам.

Ключевые слова. *G'oz* (*Gossypium hirsutum* L), HY5 (*Elongated hypocotyl 5*), геном, экспрессия, технология РНКи.

**MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
BIOTECHNOLOGICAL LINES OBTAINED AS A RESULT OF RNA
INTERFERENCE (RNAi) OF THE ELONGATED HYPOCOTYL 5 "HY5"
GENE IN THE COTTON (*G.HIRSUTUM* L.) GENOME**

Mamajonov Bexzod Orifjon ugli, Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich,
Yusupov Abdurahmon Nodirjon ugli, Obidov Nurdinjon Shuhratjon ugli,
Kamalova Lola Xayriddinova, Murodov Anvarjon Adxamjon ugli, Bashirxonov
Ziyodulla Xakimullo ugli

Center of Genomics and Bioinformatics of the Republic of Uzbekistan
Тел: 94 384-10-15 e-mail: mamajonovbexzod@gmail.com

Abstract. Light is an essential factor for plant development and regulates all growing and developing processes in plant life. Light, in particular, plays a role in the regulation of all morphological and physiological processes that occur between

plant seed germination and the end of the vegetation period. As a result, determining the quality and quantity of light available to plants is critical during the development process. Elongated HYPOCOTYL5 (HY5), a bZIP-type transcription factor, has been shown to regulate a wide range of physiological and biological processes in plants, including photomorphogenesis, root growth, flavonoid biosynthesis and accumulation, nutrient uptake, and abiotic stress response. In this study, we used the RNA interference method on HY5 genes to improve agronomically important traits such as fertility, early flowering, and early maturity. The obtained results were consistent with theoretical calculations.

Key words. Cotton (*Gossypium hirsutum* L), HY5 (*Elongated hypocotyl 5*), Genome, expression, RNAi technology

G'ozda butun dunyo to'qimachilik sanoatida ishlatiladigan tabiiy to'las uchun ekiladigan eng muhim qishloq xo'jalik ekini hisoblanadi. Xitoy, Hindiston va AQSH kabi rivojlangan mamlakatlaridagi paxta yetishtiruvchilar tomonidan zararkunandalarga qarshi salbiy ta'sir qiluvchi BT ([*Bacillus thuringiensis*](#)) genlari, hosildorlik va ertapisharlik kabi morfologik belgilarga ijobiy ta'sir qiluvchi genlar yaxshi ifodalangan paxta navlariga bo'lgan ehtiyoj ortmoqda [1]. Bu esa paxtadagi ertapisharlik, hosildorlik, tola va urug'ning sifat darajasini yaxshilash uchun biotexnologik vositalar va usullardan foydalanib o'simlik xo'jalik belgilarini rivojlanishini tezlashtirish zaruriyatini keltirib chiqarmoqda. Bu jarayon ilmiy tomondan anchagina murakkab bo'lib, o'simlik hujayrasiga maqsadli genlarni, transformatsiya qilish orqali kiritishni talab qiladi. Bu metodining mohiyati shundan iboratki, g'ozda hujayralariga agrobakteriya (*Agrobacterium tumefaciens*) orqali gen kiritib, o'simlik genom qismida, tashqi morfologik va ichki fiziologik o'zgarishlarni hosil qilinadi [2]. Hozirgi kunda dunyo olimlari tomonidan somatik embriogeneza (SE) usuli orqali ko'plab tadqiqotlar amalga oshirilgan bo'lib, u o'simliklar biotexnologiyasida agrobakterium vositachiligi yordamida transformatsiya qilish, o'simlik genomiga begona genlarni kiritish va transgen o'simliklarni olish uchun keng qo'llaniladigan an'anaviy usul hisoblanadi [3]. G'ozda (*G. hirsutum* L) genetikasida somatik embriogeneza jarayonini amalga

o'shishda to'qimalarga maqsadli gen konstruksiyalarini agrobakterium yoki biobolistik bombardimon qilish orqali kiritish usullaridan foydalanish somatik embriogenez usulining muvaffaqiyatli bo'lishida muhim o'rin tutadi [4]. Transformatsiya jarayonidan so'ng hujayrada dedifferentsiatsiyasi va redifferentsiatsiyasi kabi murakkab jarayonlar sodir bo'ladi. Bu esa *in vitro* usulida o'simliklar embrionining rivojlanishi, hujayradagi molekulyar hodisalarni tushunish uchun namunaviy tizim hisoblanadi [5]. O'simlik gipokotel qismiga maqsadli genlarni transformatsiya qilinishi g'o'zaning yosh nihollari to'qimalarida amalga oshiriladi. To'qima hujayralarida Agrobakteriyaning EHA105 shtammi zararlantirilgan pC-KSA ikkilik vektori yordamida fitaz geni va marker neomitsin fosfotransferazasi (NPTII) fermentini to'g'ridan to'g'ri regeneratsiya qilinadi va somatik embriogenez (SE) jarayonida kurtaklar shakllanadi [6]. G'o'zada somatik embriogenez jarayoni embriogenlarning shakllanishida quydagi erta torpeda bosqichi, kech torpedo bosqichi, yurak bosqichi, globulyar bosqichi va kotiledon bosqichlar muhim ahamiyat kasb etishi olimlar tomonidan o'rganilgan. [7]. Transgen o'simlik olish jarayonida o'simlik to'qmasida murakkab molekulyar va fizologik jarayonlar amalga oshadi. Xususan hujayradagi *Arabinogalaktan* oqsillari (AGP) faollashib *in vitro* somatik embriogenezda hujayralarning tez bo'linish jarayonida ishtirok etadi. Bir qator olimlar tomonidan olib borilgan tadqiqotlarga ko'ra *Arabinogalaktan* oqsillari g'o'zada kallus hujayralari tomonidan sintezlanadi. va somatik embriogenez jarayonida hujayralar bo'linishinirag'batlantiradi [8]. So'ngi yillarda olimlar tomonidan paxtada somatik embriogenez usullarni optimallashtirib, o'simlik embrionlariga biobolistik va Agrobacterium vositasida transformatsiya qilish usullari birlashtirib takomillashgan qo'llanma tavsiya qilindi. Bu qo'llanma 1-agrobakteriyalarni tayyorlash, 2-urug'larni sterilizatsiya qilish, 3-g'o'za embrionini kesish, 4-volfram bombardimon qilish orqali kurtaklar hujayralarining shikastlanishi, 5-agrobakteriya vositachiligida transformatsiya, 6-embriionning ko-kulturasi, 7-*in vitro* transgen o'simliklarni qayta tiklash va tanlash, 8-o'simliklarning molekulyar tavsifi kabi bosqichlardan iborat. Bungi kunda bu metod g'o'za genetik

modifikatsiyasi bo'yicha yuqori muvaffaqiyatlarga erishishimizni ta'minlamoqda va global paxtachilikni rivojlantirish yuqori xususiyatlarga ega bo'lgan g'o'za yetishtirish imkonini beradi [9]. O'simlik to'qimasiga maqsadli genni transformatsiya qilishda g'o'zaning Koker-312 liniyasidan embriogen sifatida foydalaniladi. Transformatsiya jarayonida Koker-312 liniyalarining 5 kunlik yosh nihollarining gipokotil to'qimalari ishlatiladi. Transformatsiya jarayonidan so'ng yosh nihol hosil bo'lgunga qadar somotik embriogenez jarayoning bir nechta bosqichlardan o'tadi. Yosh nihollarni o'sish va rivojlanishini rag'batlantirish uchun yetuk embrionlar muhit bilan to'yingan steril vermikulitga joylashtirildi va o'simlikda ildiz va ikkita chin barg paydo bo'lgandan so'ng o'simliklar tashqi muhit sharoitiga moslashtiriladi. Torf, qum va tuproq (1:1:1) aralashmasi bilan to'ldirilgan tuvaklarga ko'chirilib parvarishlanadi. Ushbu jaryon yordamida yetuk o'simliklar olinadi [10].

Ma'lumki HY5 genlari o'simliklarning ko'plab genlarini boshqarishda qatnashadi. Xususan, quyoshning ilk nurlari o'simlik tomonidan sezishi bilan qizil nurlar ta'sirida HY5 genlari faollashadi va fitoxrom va kriptoxrom genlarining faolligini pasaytiradi. Bu esa o'simlikning fizologik va morfologik rivojlanishiga salbiy ta'sir ko'rsatib, rivojlanishdan orqada qolishiga sabab bo'ladi. RNAi texnologiyasini HY5 genlariga qo'llashnilishi natijasida o'simliklarning asosan xo'jalik belgilari rivojlantrishga ta'sir qiluvchi fitoxrom genlarining hujayradagi vazifasi normal holatda davom etadi va o'simlikda ildiz va gipokotel elongatsiyasi, erta gullash, erta pisharlik va hosildorlik kabi belgilari faollashadi va nazoratga nisbatan ko'plab xo'jalik belgilarida yaqol farqlar sezilishi kutilmoqda. Bu tadqiqotni amalga oshirish uchun o'simliklardagi HY5 genlari adabiyotlar yordamida o'rganildi, g'o'za genomidagi nukleotid ketma-ketligi aniqlashtrildi va shu asosida HY5 geni ekspressiyasini pasaytirish uchun genetik konstruksiya loyihalashtrildi. Olingan genetik konstruksiya agrobakteriya vositasida o'simlik hujayrasiga transformatsiya qilindi.

Metadologiya: G'o'zadagi HY5 genining nukleotid ketma-ketligi O'zRFA qoshidagi Genomika va bioinformatika markazida zamonaviy sekvenslash

texnologiyasi yordamida aniqlandi. Shu ketma-ketliklar asosida genetik konstruksiya tuzildi. Bu quydagi jarayonlarni o'z ichiga oladi. Dastlab g'o'zaning yosh barg namunalari yig'ib olindi va STAB usuli bilan genom DNK ajratib olindi. PZR reaksiyasi ishlari amalga oshirildi va reaksiya uchun 50 mkl DNK ishlatildi. PZR reaksiyasi uchun 2.5 mkl 10X Taq buferi, 0.2 mkl dTNP (nuklein trifosfatlar) har biri 25 Mmol, 5 pikamol/ mkl praymeri, 0.2 mkl Taq polimeraza (5 birlik./mkl), suv 25 mkl.gacha. PZR reaksiyasi quydagi tartibda amalga oshirildi.

1 sikl -94°C, 3min; 45 siklda-94°C 1 min; 55°C 1 min; 72°C 2 min; 1sikl-72°C 7 min. ampilifikatsiyalangan DNK 1.5% li agarozda gelida tekshirish ishlari amalga oshirildi. (1.5%- agarozda geli va 0.5 X TBE bufferi -45mM Tris-bromid, 1 mM EDTA, Ph 8.0) va etidium bromid suyqligi bilan bo'yaldi. Olingan PZR maxsuloti TOPO TA klonlovchi vektori hujayrasiga klonlandi. E. Coli bakteriyasining TOP10 kompetent hujayralari ishlatildi (Invitrogen», AQSH). Klonlash va transformatsiya jarayoni ishlab chiqaruvchi yo'riqnomasiga mos ravishda amalga oshirildi. -80°C haroratda saqlanayotgan E. coli bakteriyasi 50 mg/L kanamitsinli LB suyuq ozuqa muhitida (Luria-Berthani; 10 gr/l bakto-tripton, 5gr/l achitqi ekstrakti va 10gr/l xlarod natriy, 15gr/l bakto-agar, Ph 7,2) bir sutka davomida o'stirildi. Ampilifikatsiya qilish yo'li orqali o'zida genetik konstruksiya tutgan E. coli TOPO TA rekombinant plazmidlari saralandi. Rekombinantsiyalangan plazmidalar «Miniprep» usuli yordamida ajratildi (Invitrogen», AQSh). BigDey terminatori yordamida ABI 3101(«Applied Biosystems», AQSh) mashinasida sekvens reaksiyalari amalga oshirildi.

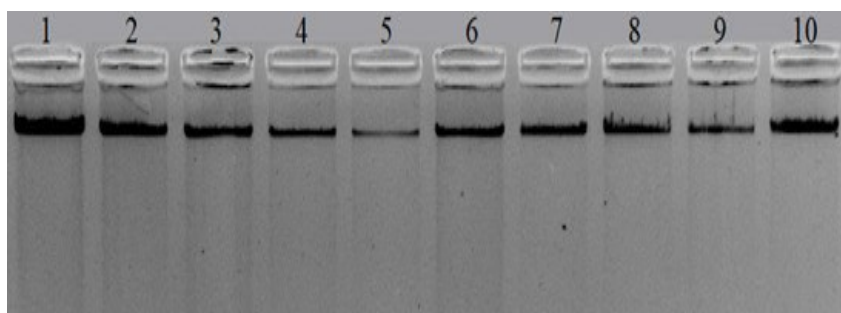
Olingan sekvens natijalari asosida g'o'zada HY5 genining ketma - ketligi "Gene Bank" ma'lumotlar bazasida taxlil ishlari amalga oshirildi. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). G'o'za HY5 genining sekvensi uchun bir nechta praymerlar yaratildi. Ushbu yangi praymerlar yordamida HY5 genlari qayta kolnlandi va qayta sekvens ishlari amalga oshirildi va natijalar tasdiqlandi.

HY5 genlarini o'simlik hujayrasiga kiritish (transformatsiya qilish) ishlari somatik embriogeneza usuli orqali amalga oshirildi va dastlabki regenerat o'simliklar olindi [11]. G'o'za hujayra kulturasida uchun barcha reagentlar

AQShning Phytotechnology Laboratories® kompaniyasidan sotib olindi. T₀ avlod o'simliklarini tuproqqa o'tkazish va issiqxonada ko'paytirish ishlari amalga oshirildi. Olingan yangi regenerant liniya larning genom qismida maqsadli genetik konstruksiya bor yoki yo'qligini tekshirish maqsadida, o'simliklardan namunalar olinib ulardan genom DNK ajratildi va RNAi vektori konstruksiyasi uchun maxsus tuzilgan 35S F va OST R juft praymerlari yordamida PZR reaksiyalarini amalga oshirildi. Transgen va notransgen liniya lar aniqlab olindi.

Olingan natijalar. T₀ avlod. Olingan yangi liniya lar T₀ avlod liniyalar bo'lib, ular orasidan PZR analiz reaksiyasi tahliliga ko'ra o'zida genetik konstruksiya tutgan hamda transgen deb topilgan liniya larni fitotron sharoitida o'stirildi va T₁ avlod urug'larni olindi.

T₁ avlod. Transgen va notransgen o'simliklardan olingan T₁ avlod urug'lari tuvaklarga ekildi va maxsus xona haroratida parvarish qilindi. O'simliklarning yangi barglaridan namunalar olib, genom DNK ajratilda va 0.9 %li agaroz gelida tekshirildi (1-rasmga qarang).

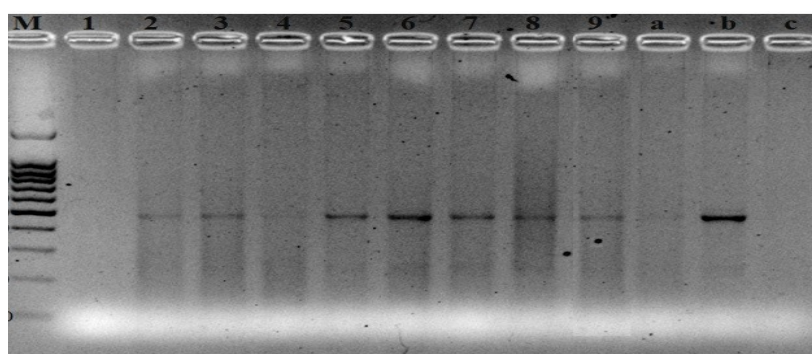


(1-rasmga qarang)

1-rasm. T₁ o'simliklarni genom DNKlarini 0.9% agaroz gelidagi tasviri.

DNK namunalarini RNAi vektor konstruksiyasiga maxsus tuzilgan praymerlar yordamida PZR reaksiyasi amalga oshirilib tekshirildi va transgen liniya lar aniqlandi (2-rasmga qarang).

o'simliklar
foydalanish
olindi
fenotipik



Transgen
kelgusida
uchun tanlab
hamda
kuzatuvlar,

2-rasm. T₁ liniyalarni PZR reaksiyasi bilan tekshirish. 1-9 = transgen liniyalar. a- nazorat liniya b- musbat liniya , c- manfiy (master miks).

o'z-o'ziga chatishtrish ishlari va T_2 avlod o'simliklar olish uchun keyingi tadqiqotlarda foydalanildi. O'simliklarni parvarishlash davomida T_1 avlod transgen va nazorat liniyalarida morfologik va xo'jalik belgilaridagi o'zgarishlar nazorat (C-312) liniyalarning belgilari bilan taqqaslab borildi:

- Transgen va nazorat liniya larining gipokotel elongatsiyasi kuzatildi.
- Transgen va nazorat liniyalarining birinchi shonalash vaqtlari va ochilgangullar soni bilan taqqoslandi.
- Birinchi ko'sak tugishi va ma'lum vaqtdan so'ng ko'saklar sonini nazorat liniya si bilan taqqoslandi va kichik statistik tahlil qilindi.
- Ildiz tizimini tekshirish uchun mahsus sharoit yaratilib, yon ildizlar soni va hajmi nazorat liniya larning ildiz sistemasiga solishtrish yo'li bilan aniqlandi.

T_2 avlod. T_1 o'simliklarni o'stirish davomida liniya larning morfologik belgilarini e'tiborga olgan holda, erta gullash, ko'saklarning ochilish tezligi va ildiz elongatsiyasidagi o'zgarishga qarab T_2 avlodlar uchun o'simliklar saralanib olindi. O'simliklarning PZR reaksiyasining natijasiga ko'ra transgen chiqqan o'simliklarning chigitlari Genomika va bioinformatika markazining maxsus urug'chilik xo'jaligi (MUX) dala tadqiqot maydoniga ekildi. Transgen va nazorat liniya namunalari birgalikda ekildi va qimmatli qishloq xo'jalik belgilari o'rganildi. Har bir transgen va nazorat namunalari uch xil (bir biri bilan takrorlanmaydigan holatda) takrorda ekildi. RNAi va nazorat liniya lardagi xo'jalik belgilarida qanday o'zgarishlar sodir bo'layotganligini kuzatildi va statistik tahlil ishlari olib borildi.

Bizga ma'lumki HY5 genlari o'simliklar genomidagi faoliyati boshqa genlarning faoliyatini boshqarish xususiyati mavjud bo'lib, RNAi texnologiyasi qo'llanilgandan so'ng, nishonlangan HY5 genlari faoliyatida susayish holatlari kuzatiladi bu esa o'z navbatida boshqa genlarning ishlash mexanizimiga ta'sir ko'rsatadi.

Unuvchanlik: Tadqiqotda gen nokaut texnologiyasi urug'larning unuvchanligiga qanchalik ta'sir qilish doirasini o'rganish maqsadida, transgen va nazorat liniya o'simliklar T_2 urug'larini unuvchanlik tadqiqotini amalga oshirildi.

Unga ko'ra dala maydoniga uch xil takrorda chigitlar ekildi. Chigitlar unib, yer yuzasiga chiqqandan so'ng unuvchanlik 7 kun davomida tekishirildi. Unga ko'ra transgen liniya o'simliklari nazorat liniya o'simliklariga qaraganda unuvchanligi yuqori ekanligi kuzatildi va statistik tahlil ishlari amalga oshirildi (1-jadvalga qarang).

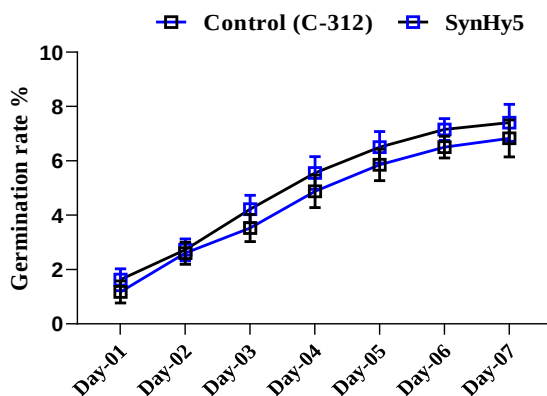
1-jadval.

Days	Samples	Mean	SD	Skewness	Kurtosis	unuvchanligi	Min	Max
Day-01	Control	1,2	0,7	0,01	-0,63	66	0	3
	SynHy5	1,6	0,8	-0,27	-0,33	51	0	3
Day-02	Control	2,6	0,9	0,50	-0,08	35	1	5
	SynHy5	2,7	0,9	-0,20	-0,77	34	1	4
Day-03	Control	3,5	1,2	0,47	-0,65	34	2	6
	SynHy5	4,2	0,9	0,39	0,86	23	2	7
Day-04	Control	4,9	1,4	0,70	-0,13	29	3	8
	SynHy5	5,5	1,1	0,17	-0,40	21	3	8
Day-05	Control	5,8	1,5	-0,05	-1,18	26	3	8
	SynHy5	6,5	1,08	-0,25	-0,74	16	4	8
Day-06	Control	6,5	1,30	-0,58	-0,25	20	3	8
	SynHy5	7,0	1,00	-1,12	1,03	14	4	8
Day-07	Control	6,8	1,17	-1,04	1,30	17	3	8
	SynHy5	7,4	0,84	-1,16	0,31	11	5	8

Yuqoridagi RNAi va nazorat liniya namunalarning unuvchanligining statistik tahlillari ekilgan umumiy chigitlar sonidan 1- kun hisobida nazorat liniyalar 1,2 RNAi HY5 liniya larda esa 1,6 ni tashkil qildi oradi farq sezilarli darajada ekanligi aniqlandi. 2- kunda esa bu ko'rsatkichda transgen va nazorat liniya larda sezilarli darajada farq kuzatilmadi (jadvalda ko'rsatilgan). 3-kunga kelib esa nazorat va RNAi HY5 liniya lar o'rtasidagi farq ham sezilardi ekanligi namoyon bo'ldi. 4-5- kunlarda unuvchanligidagi faqrlar bir ekanligi namoyon bo'ldi. 6-7-kunlarda ham namunalarning unuvchanligidagi o'rtacha farq bir hil ko'rsatkichni ko'rsatdi.

HY5 RNAi mutant liniya laridan ekilgan urug'lardan unib chiqqan urug'larning unuvchanligi umumiy ekilgan chigitlar soniga nisbatan olingada

RNAi HY5 liniya r 96-98% ni tashqil qildi. Nazorat liniya urug'larning unuvchanligi esa 92-94% ni namoyon qildi. SynHY5 RNAi va nazorat (C-312) liniya namunalari unuvchanligini statistik tahlilarga tayangan holda grafiklar yordamida ham taxlilar qilganimizda transgen va nazorat liniya namunalari o'rtasidagi unuvchanligidagi farqlar quydagi ko'rnishdagi grafikni namoyon qildi (3-rasmga qarang).



3-rasm. RNAi HY5 va nazorat liniyalarning unuvchanlikni ko'rsatkichi

Transgen liniya larda unuvchanlikning yuqori bo'lishiga asosiy sabablardan biri PHYA genlari urug'larning faqat endosperm qismida mavjud bo'lib, urug'larning erta unishi va urugkurtak qismining yashil rangda bo'lishini ta'minlaydi. U (PHYA) genlari yorug'lik ta'sirida kuchli transkripsion va post transkripsion regressiyaga uchraydi (folliqi pasayadi). HY5 geni knockout bo'lgandan so'ng esa u yorug'likni sezmaydi va yuqori ekspresion faollikni namoyon qildi.

Ildiz elongatsiyasidagi o'zgarishlar. O'simliklarning yorug'lik ta'sirida morfologik va fizologik rivojlanishi ildiz tizimining qanchalik rivojlanishiga ham bog'liq bo'lib, ko'p hollarda ildiz tizimi yaxshi rivojlangan o'simliklarda yer ustki qismining yaxshi taraqqiy etganligini ko'rishimiz mumkin.

Ildiz elongatsiyasining statistik tahlili.

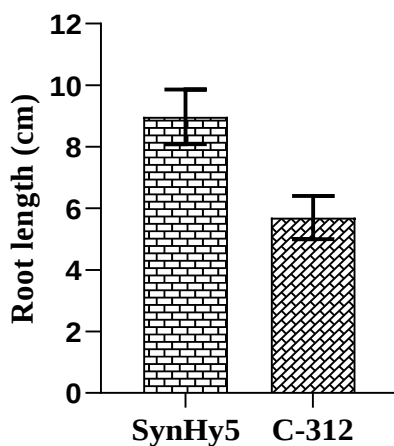
2-jadval.

Samples	Mean	SD	Skewness	Kurtosis	CV	Min	Max
Control	5,7	1,02	0,66	0,054	0,18	4	8

SynHy5	8,9	1,88	0,35	0,952	0,21	5	14
--------	-----	------	------	-------	------	---	----

RNAi HY5 liniya va nazorat liniya o'simliklarning ildiz elongatsiyasidagi o'zgarishni aniqlash maqsadida mutant va nazorat liniya lardan 15 donadan 3 xil takrorda namunalar olindi va ildizlarning rivojlaning hajmi tekshirildi. Unga ko'ra nazorat liniya larning ildiz uzunligining o'rtacha (Mean= 5.7, Min = 4 Max = 8) qiymatni namoyon qildi. Transgen linyalarda esa (Mean= 8.9, Min =5 Max = 14) qiymatni ko'rsatdi. Bundan ko'rinib turibdiki RNAi SynHy5 liniya sining ildiz uzunligi, nazorat liniya larining ildiz uzunligidan o'rtacha farq 3.2 barobarga uzun ekanligini aniqlandi.

Tadqiqotning statistik tahlillariga tayanga holda namunalarning ildiz elongatsiyasi grafik ko'rnishda ifodalaganizmizda va RNAi SynHY5 liniya namunalarning asosiy ildiz elongatsiyasining o'rtacha uzunligi nazorat liniya da namunalarning o'rtacha ildiz uzunligiga qaraganda hajim jihatdan 2 va 4 sm (santimert) katta ekanligi tasdiqlandi (3-rasmga qarang).



3-rasm. Ildiz elongatsiyasining statistik tahlili

Bu o'tkazilgan tadqiqotdan shu ma'lum bo'ldiki o'simlikdagi HY5 genlariga RNAi texnologiyasi qo'llanilib HY5 genlari faoliyatini pasayishi boshqa genlar ekspressiyasini faollashishiga ayniqsa ildiz elongatsiyasiga javob beruvchi fitoxrom genlari eksperssiyasiga o'zining ijobiy ta'sirni ko'rsatib o'simlikning ildiz hajmining ortishiga sabab bo'lishi aniqlandi.

Gullash fazasidagi o'zgarishlar. HY5 genlariga RNAi texnologiyasini qo'llanilishi va ekspressiyasida pasayish holati kuzatilishi o'simlik genomidagi ko'plab boshqa genlarning ishlash mexanizimiga o'z ta'sirini ko'rsatadi. Bu esa o'simliklarning fizologiyasiga ijobiy ta'sir ko'rsatib, o'simlikning morfo-biologik va xo'jalik belgilarni rivojlanishiga asosiy sabablardan biri hisoblanadi. Ayniqsa o'simlikning gullash fazasida gullarning ochilish tendensiyasini faollashtiradi. Bizning tadqiqotda transgen liniya larda nazorat liniya larga qaraganda gullash fazasi faollashgani kuzatildi.

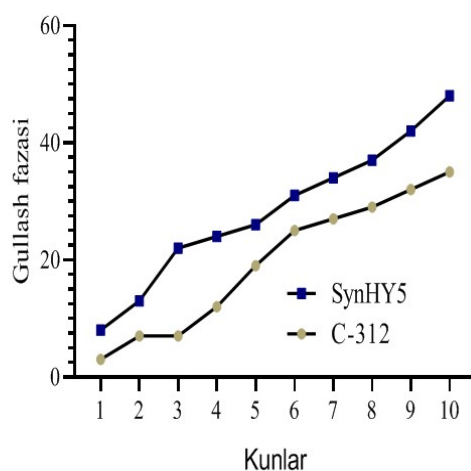
3-jadval.

Gullash fazasining tahliliy statistikasi

Days	Samples	Mean	SD	Skewness	Kurtosis	CV
Day-01	Control	0,24	0,43	1,23	-0,51	1,77
	SynHy5	0,31	0,46	0,84	-1,34	1,50
Day-02	Control	0,28	0,46	0,96	-1,12	1,58
	SynHy5	0,33	0,47	0,73	-1,53	1,43
Day-03	Control	0,35	0,52	1,10	0,18	1,48
	SynHy5	0,42	0,54	0,76	-0,53	1,28
Day-04	Control	0,44	0,58	0,93	-0,06	1,31
	SynHy5	0,44	0,54	0,66	-0,67	1,22
Day-05	Control	0,42	0,54	0,76	-0,53	1,28
	SynHy5	0,53	0,58	0,56	-0,58	1,10
Day-06	Control	0,48	0,72	1,52	2,18	1,48
	SynHy5	0,57	0,65	0,70	-0,48	1,13
Day-07	Control	0,55	0,66	0,78	-0,40	1,18
	SynHy5	0,64	0,60	0,36	-0,60	0,94
Day-08	Control	0,64	0,68	0,58	-0,67	1,05
	SynHy5	0,73	0,78	0,81	0,13	1,06
Day-09	Control	0,6	0,68	0,72	-0,57	1,14
	SynHy5	0,73	0,68	0,40	-0,79	0,93
Day-10	Control	0,71	0,75	0,54	-1,03	1,06
	SynHy5	0,84	0,67	0,66	1,28	0,79

Tadqiqotni amalga oshirishda gen nokaut texnologiyasi qo'llanilgan RNAi SynHy5 liniya si va nazorat sifatida foydalanilgan Koker (C-312) liniya laridan 3 takrordan har bir takrordan 15 tadan namunalar tajriba uchun tanlab olindi va o'simliklarda 10 kun davomida, kunning bir vaqtida gullash intensivligini tekshirish

uchun gullar sanaldi. Tadqiqot yakunida RNAi SynHy5 va nazorat liniya o'simliklarning kunlik gullash intensivligi aniqlandi va statistik taxlil ishlari amalga oshirildi (3-jadvalga qarang). Tadqiqot yakunida esa RNAi SynHy5 va nazorat liniya larning umumiy gullash intensivligining statistik tahlilini o'rtachasi hisoblab chiqarildi va namunalar o'rtasida farqlar umumiy 10 kun davomida sanlagan namunalar o'rtasidagi gullash intensivligining o'rtachasi qiymatidagi farq nazorat va transgen liniya lar orasida $\text{Mean} = 0.07$, $\text{Min} = 0$, $\text{Max} = 0.1$ ga faqr qilishi aniqlandi.



4-rasm. Gullash fazasining statistik tahlil grafikgi.

Amalga oshirilgan dala tadqiqot jarayonlaridagi aniqlangan statistik tahlilarga tayangan holda, namunalarning gullashidagi o'rtacha farqlarni grafiklar orqali tahlil qilindi va yuqoridagi ko'rnishda namoyon bo'ldi. Unga ko'ra RNAi SynHy5 liniya lari gullash soni nazorat liniya namunalarning gullar soniga qaraganda yuqori ekanligi aniqlandi (4-rasmga qarang). Gullash fazasidagi bu farqlanishga asosiy sabab sifatida HY5 genlari RNAi qo'llanilganda o'simlik genomida mavjud bo'lgan gullashga javobgar genlar yaniy, fitoxrom B (PHYB) genlarining ekspressiyasi ortishiga sababchi bo'ladi.

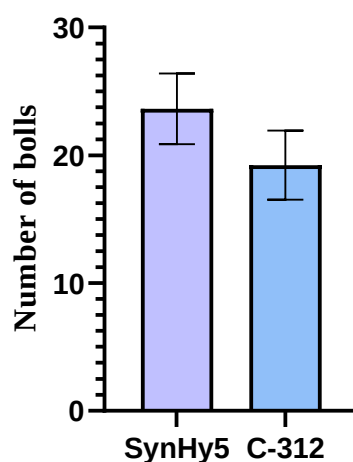
Ko'saklanish fazasi. Yuqoridagi tadqiqotimizdan RNAi SynHy5 liniya larinig ildiz elongatsiyasi ham yaxshi rivojlanganligi ma'lum bo'lgan edi. Shu ma'lumotlarga tayangan holda o'simliklardagi hosil yig'ish jarayonida ham xosildorlik yuqori bo'lishi taxmin qilindi. Dala sharoitida parvarish qilinayotgan

RNAi SynHy5 va nazorat liniya larning hosil yig'ish vaqtida o'tqazilgan tadqiqotlarlar uchun mutant va nazoarat liniya namunalar belgilab olindi. Tadqiqot 3 takror holatda har bir takrorda 15 dona o'simliklarda bir vaqtda ko'saklar soni sanaldi va statistik tahlil ishlari amalga oshirildi(4-jadvalga qarang).

4-jadval.

Ko'saklanish fazasining statistik taxlili.							
Samples	Mean	SD	Skewness	Kurtosis	CV	Min	Max
Control	19,23	2,71	-0,35	-0,58	0,14	14	24
SynHy5	23,63	2,76	-0,45	-0,51	0,11	18	28

Yuqoridagi jadvaldan ko'rinib turibdiki umumiy nazorat va transgen linlardadan 45 tadan namunlar o'rtasidagi ko'saklar sonining o'rtacha yig'indisi nazoarat linylarda o'rtacha Mean 19.23, min-14, max-24. Transgen liniya larda esa o'rtacha Mean 23.63, min-18, max-28 qiymatni namayon qildi. Transgen va nazorat liniya o'simliklar o'rtasidagi umumiy ko'saklar soni bo'yicha o'rtacha farq Mean 4.4 min-4, max-4 farq qilishi aniqlandi. Statistik tahlillarni grafik ko'rnishda ifodallasak quydagi ko'rnishni namoyon qildi.



5-rasm. Ko'saklanish fazasining statistik taxlili.

G'o'zada hosil yig'ish vaqtida amalga oshirilgan statistik tahlillarga tayangan holda RNAi SynHy5 va nazorat liniya namunalaridagi hosil sonlarining yakuniy o'rtacha statistik tahlillardagi farqlarni tasdiqlash uchun grafik ko'rinishga keltridik va quydagicha faqrlar namoyon bo'ldi. Unga ko'ra RNAi SynHy5 liniya namunalardagi hosil soni nazorat liniya namunalaridan o'rtacha 5-8 donaga ko'p ekanligi aniqlandi.

Xulosa. Ushbu tadqiqot zamonaviy biotexnologiya usullaridan foydalangan holda, qishloq xo'jalik ekinlari uchun ahamiyatli bo'lgan g'o'za o'simligining genomidan foydalanib, molekulyar tadqiqotlarni amalga oshirgan holda yangi qimmatli belgilarni nomoyon qiladigan liniya olishni maqsad qilingan. Qo'yilga maqsadni amalga oshirish uchun g'o'za genomidan foydalanib, quyosh nurining uzoq qizil nurlariga javob beruvchi HY5 genlariga gen knockout texnologiyasini qo'llab, HY5 genlarining faolligi pasaytrildi. Natijada HY5 genlari tomonidan boshqariluvchi Fitoxrom genlar oilasi (PHYA, PHYB PHYC PHYD va PHYE) kriptoxrom genlar oilasiga kiruvchi ko'plab genlarning faolligining ortishi va ko'plab metabolitik o'zgarishlar kuzatildi.. Bu o'z navbatida o'simlikning morfologik belgilarida ko'plab ijobiy o'zgarishlar sodir bo'lganligiga olib keldi.. Jumladan o'simlikning ildiz va gipokotel elongatsiyasida yon ildizlarning o'sish tezligi sezilarli ortdi shuningdek, shonalash va gullash fazasida transgen o'simliklarning nazorat o'simliklariga nisbatan faolligi ortgan. Ko'saklari hajmiy jihatdan ko'pligi va nazorat o'simliklariga qaraganda ertapisharlik xususiyatlarini nomoyan qildi. Hozirgi kunda tadqiqotning ustida davomiy izlanishlar olib borilmoqda Xususan o'simlikning hosilili yig'ib olingandan so'ng tola sifat, chigitning miqdoriy sifat ko'rsatkichlari ustida tadqiqotlar davom etmoqda. RNAi qo'llanilgan g'o'za namunalarining morfologik belgilar avladdan avladga o'tish darajasini o'rganish ishlari olib borilmoqda.

Adabiyotlar ro'yhati

1. Rathore KS, Campbell LM, Sherwood S, Nunes E. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Methods Mol Biol*. 2015;1224:11-23. doi: 10.1007/978-1-4939-1658-0_2. PMID: 25416245.
2. Rathore KS, Sunilkumar G, Campbell LM. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Methods Mol Biol*. 2006;343:267-79. doi: 10.1385/1-59745-130-4:267. PMID: 16988351.
3. Zhang B. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Cotton. *Methods Mol Biol*. 2019;1902:19-33. doi: 10.1007/978-1-4939-8952-2_2. PMID: 30543058.
4. Zhu HG, Cheng WH, Tian WG, Li YJ, Liu F, Xue F, Zhu QH, Sun YQ, Sun J. iTRAQ-based comparative proteomic analysis provides insights into somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Mol Biol*. 2018 Jan;96(1-2):89-102. doi: 10.1007/s11103-017-0681-x. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29214424; PMCID: PMC5778175.
5. Ma Z, Liu J, Wang X. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) shoot apex with a fungal phytase gene improves phosphorus acquisition. *Methods Mol Biol*. 2013;958:211-22. doi: 10.1007/978-1-62703-212-4_18. PMID: 23143496.
6. Rao AQ, Hussain SS, Shahzad MS, Bokhari SY, Raza MH, Rakha A, Majeed A, Shahid AA, Saleem Z, Husnain T, Riazuddin S. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.). *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Apr;7(4):291-8. doi: 10.1631/jzus.2006.B0291. PMID: 16532531; PMCID: PMC1447513.
7. Poon S, Heath RL, Clarke AE. A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiol*. 2012 Oct;160(2):684-95. doi: 10.1104/pp.112.203075. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22858635; PMCID: PMC3461548.

8. Rajasekaran K. Biolistic transformation of cotton embryogenic cell suspension cultures. *Methods Mol Biol.* 2013;958:59-70. doi: 10.1007/978-1-62703-212-4_5. PMID: 23143483.
9. Ribeiro TP, Lourenço-Tessutti IT, de Melo BP, Morgante CV, Filho AS, Lins CBJ, Ferreira GF, Mello GN, Macedo LLP, Lucena WA, Silva MCM, Oliveira-Neto OB, Grossi-de-Sa MF. Improved cotton transformation protocol mediated by *Agrobacterium* and biolistic combined-methods. *Planta.* 2021 Jul 3;254(2):20. doi: 10.1007/s00425-021-03666-5. PMID: 34216275.
10. Trolinder NL, Goodin JR. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 1987 Jun;6(3):231-4. doi: 10.1007/BF00268487. PMID: 24248660.
11. Abdurakhmonov, I.Y., et al. (2014) Cotton Germplasm Collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmanov I.Y., Ed., World Cotton Germplasm Collection, InTechOpen, London, Chapter 11, 289309. <https://doi.org/10.5772/56978>