

ARPADA SHO‘R STRESSI VA SHO‘RGA CHIDAMLI GENOTIPLARNI OLISHDA CRISPR CAS9 GENOM TAHRIRINING O‘RNI

Ibrohimova N.M.¹, Ernazarova D.Q.^{1, 2, 3}, Sodiqova M.O.¹, Abdushukurova M.B.,¹
Turayev O.S.¹, Kushanov F.N.^{1, 2, 3}

¹O‘simliklar genetik resurslari ilmiy tadqiqot instituti
Toshkent viloyati, Qibray tumani, Oq-qovoq QFY, Botanika ko‘chasi, 1-uy

²Genetika va o‘simliklar eksperimental biologiyasi instituti 111208 Toshkent viloyati, Qibray
tumani, Yuqori-Yuz mahallasi

³Sharof Rashidov nomidagi Samarqand davlat universiteti 140104, Samarqand
viloyati, Samarqand, Universitet bulvar, 15

Annotatsiya

*Sho‘rlanish qishloq xo‘jaligida hosildorlikni keskin kamaytiruvchi asosiy abiotik stresslardan biridir. Markaziy Osiyo, jumladan O‘zbekiston hududida irrigatsiya maydonlarining katta qismi sho‘rlangan bo‘lib, bu ekinlar barqarorligiga jiddiy xavf tug‘diradi. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) nisbatan sho‘rga chidamli ekinlardan biri bo‘lsa-da, yuqori konsentratsiyali tuz sharoitida hosildorligi pasayadi. Zamonaviy gen muhandisligi vositalari, xususan CRISPR-Cas9 texnologiyasi, sho‘rlanishga javob beruvchi asosiy genlarni tahrirlash orqali barqaror genotiplar yaratishda muhim imkoniyatlar taqdim etmoqda. Ushbu maqolada sho‘rlanishning arpa o‘simligiga ta’siri, fiziologik va molekulyar javob mexanizmlari hamda CRISPR-Cas9 texnologiyasining amaliy qo‘llanish istiqbollari tahlil qilinadi.*

Kalit so‘zlar: arpa, sho‘rlanish stressi, abiotik stressga chidamlilik, CRISPR-Cas9, gen muhandisligi, oziq-ovqat xavfsizligi.

РОЛЬ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR-Cas9 В ПОВЫШЕНИИ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ЯЧМЕНЯ И ПОЛУЧЕНИИ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ГЕНОТИПОВ

Аннотация

*Засоление является одним из основных абиотических стрессов, резко снижающих урожайность в сельском хозяйстве. В регионах Центральной Азии, включая Узбекистан, значительная часть орошаемых земель засолена, что представляет серьезную угрозу для устойчивости сельскохозяйственных культур. Хотя ячмень (*Hordeum vulgare* L.) относительно устойчив к засолению, его урожайность снижается в условиях высокой концентрации солей. Современные инструменты геномной инженерии, в частности технология CRISPR-Cas9, предоставляют значительные возможности для создания устойчивых генотипов путем редактирования ключевых генов, ответственных за реакцию на засоление. В*

данной статье анализируется влияние засоления на ячмень, рассматриваются его физиологические и молекулярные механизмы ответа, а также перспективы практического применения технологии CRISPR-Cas9.

Ключевые слова: ячмень, солевой стресс, устойчивость к абиотическому стрессу, CRISPR-Cas9, геновая инженерия, продовольственная безопасность.

THE ROLE OF CRISPR-Cas9 GENOME EDITING IN INCREASING SALT TOLERANCE IN BARLEY AND OBTAINING SALT-TOLERANT GENOTYPES

Abstract

*Salinity is one of the major abiotic stresses that severely reduces crop yield in agriculture. In Central Asian regions, including Uzbekistan, a significant portion of irrigated lands is saline, posing a serious threat to crop sustainability. Although barley (*Hordeum vulgare* L.) is relatively salt-tolerant, its yield decreases under high salt concentrations. Modern genetic engineering tools, particularly CRISPR-Cas9 technology, offer significant opportunities for creating stable genotypes by editing key genes responsible for the response to salinity. This article analyzes the effects of salinity on barley, examines its physiological and molecular response mechanisms, and explores the prospects for the practical application of CRISPR-Cas9 technology.*

Keywords: *barley, salinity stress, abiotic stress tolerance, CRISPR-Cas9, genetic engineering, food security.*

KIRISH

Shoʻrlanish global miqyosda qishloq xoʻjaligi ishlab chiqarishini cheklovchi asosiy omillardan biridir. FAO [4] maʼlumotlariga koʻra, qishloq xoʻjaligi yerlarining 20 % gacha qismi shoʻrlangan. Markaziy Osiyo, jumladan Oʻzbekistonda irrigatsiya maydonlarining 40–80 % gacha qismi shoʻrlanish muammosiga duch keladi. Bu holat don ekinlari hosildorligini pasaytirib, oziq-ovqat xavfsizligiga tahdid solmoqda.

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) insonlar tomonidan eng qadimiy madaniylashtirilgan ekinlardan biri boʻlib, yovvoyi arpaning (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) areali bilan mos hududda madaniylashgan [15]. Genetik va filogeografik tadqiqotlar asosiy domestikatsiya markazi sifatida Gʻarbiy Osiyoni

ko'rsatilgan bo'lsa, ayrim tadqiqotlarda Sharqiy yarimoy yo'nalishida ikkinchi, mustaqil domestikatsiya mintaqasi ham taklif etilgan [14].

Bugun arpa dunyo bo'yicha to'rtinchi yirik don ekini (makkajo'xori, guruch va bug'doydan keyin) bo'lib, yem-xashak, pivo sanoati va ayrim mintaqalarda to'g'ridan-to'g'ri oziq-ovqat sifatida strategik ahamiyatga ega. So'nggi yillarda arpa mamlakatda muhim yem-xashak hamda sanoat xomashyosi sifatida atigi ~95–100 ming gektar oralig'ida yetishtirib kelinmoqda, bu ko'rsatkichlar sho'rlanish, suv ta'minoti va agrotexnik usullar barqarorligiga ekinning qanchalik sezgir ekanini ko'rsatadi [4]. Shunday bo'lsada, qurg'oqchil va sho'r hududlarga nisbatan yuqori moslashuvchanligi arpa genomikasi va stress fiziologiyasi bo'yicha model ekin sifatidagi rolini mustahkamlaydi [13].

An'anaviy seleksiya sho'rga chidamlilik poligen belgilari bo'yicha ko'p yillik bosqichlarni talab qiladi va ko'pincha *muhit* × *genotip* o'zaro ta'siriga to'qnash keladi. So'nggi o'n yillikda genom tahriri, xususan CRISPR-Cas9, stressni qabul qilish, signal uzatish va ion homeostazini boshqaruvchi regulyator genlarni aniq nishonlab, tezkor modifikatsiya qilish imkonini berdi [8]. Arpa genomining yaxshi xaritalangani va to'qima kulturasi/transformatsiya protokollarining mavjudligi bu platformani amaliy seleksiyaga bog'lashni osonlashtirmoqda. Natijada sho'rga chidamli genotiplarni yaratishda CRISPR-Cas9 — konventsional seleksiyani to'ldiruvchi kuchli vosita sifatida qaralmoqda.

Yuqorida aytib o'tilganidek, arpaning eng muhim xususiyatlaridan biri — uning turli agro-ekologik sharoitlarga yuqori moslashuvchanligidir. U mo'tadil iqlimdan tortib, qurg'oqchil va yarim qurg'oqchil hududlargacha keng tarqalgan bo'lib, boshqa don ekinlariga nisbatan qurg'oqchilik va sho'rlanishga ko'proq chidamlilik ko'rsatadi. Sho'r sharoitlarda arpa ma'lum darajada hosildorligini saqlab qolsa-da, kuchli sho'rlanish muhitida sezilarli pasayish kuzatiladi [10]. Yovvoyi arpa populyatsiyalarida keng genetik xilma-xillik mavjud bo'lib, ular

qurg'oqchilik va sho'rlanishga bardoshlilikda muhim genetik resurs hisoblanadi [12]. Bunday sharoitlarda ildiz tizimining rivojlanishi, ion transporti mexanizmlarining moslashuvchanligi, prolin va glysin-betain kabi osmoprotektantlarning to'planishi hamda antioksidant himoya tizimining faollashuvi asosiy moslashuv strategiyalari sifatida namoyon bo'ladi [9]. Shu ko'p qirrali mexanizmlar arpaning murakkab abiotik stresslarga bardoshlilikda muhim ekin sifatidagi o'rnini yanada mustahkamlaydi.

Shu nuqtai nazardan, zamonaviy biotexnologik yondashuvlar, xususan CRISPR-Cas9 asosidagi genom tahriri arpaning sho'rlanishga chidamliligini oshirishda yangi imkoniyatlar ochmoqda. Tadqiqotimizning maqsadi — gen muhandisligi usullaridan foydalanib, arpa (*Hordeum vulgare* L.) o'simligining sho'rga chidamliligini negativ boshqaruvchi genini tahrirlash orqali chidamli genotiplar olishdan iborat. Bunday yondashuv yordamida ion transporti, osmotik moslashuv va oksidativ himoya kabi mexanizmlarda hal qiluvchi rol o'ynaydigan genlar nishonga olinib, arpaning genetik potentsiali samarali ravishda oshirilishi mumkin.

Mazkur maqsadni amalga oshirish uchun arpaning sho'rlanish stressini boshqarishda muhim rol o'ynaydigan genlar hamda ularni CRISPR-Cas9 tizimida nishonga olish imkoniyatlarini o'z ichiga olgan jadval tuzildi (1 jadval). Ushbu jadvalda ion tashuvchilari (HvHKT1;5, HvNHX1, SOS1), stress-induktsiyalovchi transkripsion omillar (DREB, AREB/ABF), osmoprotektant sintezi uchun mas'ul bo'lgan P5CS, shuningdek, antioksidant fermentlarni (SOD, CAT, APX) kodlovchi genlar keltirilgan. Ularning CRISPR maqsad sifatida tanlanishi sho'rlanishga qarshi ko'p qirrali himoya mexanizmlarini kuchaytirish va yangi chidamli genotiplarni yaratishda ilmiy asos bo'lib xizmat qiladi.

**Arpaning sho‘rlanish stressini boshqarishda muhim genlar va ularni
CRISPR-Cas9 tizimida nishonga olish strategiyalari**

Gen nomi	Vazifasi (sho‘rlanishda)	Tavsiya qilingan CRISPR strategiyasi	Asosiy adabiyotlar
HvHKT1;5 (High-affinity K ⁺ transporter)	Na ⁺ ning ildizdan bargga ko‘tarilishini cheklaydi, K ⁺ /Na ⁺ nisbatini saqlaydi	Foydali allelning allel almashtirilishi va promoter tahrirlash orqali ildizga xos ifoda	Houston et al., 2020; Munns & Tester, 2008
HvNHX1 (Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter)	Na ⁺ ning vakuolaga sekvestrlash (moddalarni biror joyga ajratish yoki qamab qo'yish) orqali sitoplazmadagi toksiklikni kamaytirish.	Yuqori ifodalanish (stress tufayli qo'zg'aluvchan promoter) va promoter muhandisligi.	Apse et al., 1999; Blumwald, 2000
SOS1 (Plasma membrane Na ⁺ /H ⁺ exchanger)	Hujayradan Na ⁺ chiqishini boshqaradi, Na ⁺ homeostazini saqlaydi	Funksiyani kuchaytiruvchi mutatsiya va promoter sozlash.	Shi et al., 2003; Zhu, 2001
HvHAK/AKT (K ⁺ transporters/channels)	K ⁺ uptake va K ⁺ homeostazini ta'minlaydi, Na ⁺ /K ⁺ nisbatini barqarorlashtiradi	Promoter tahrirlash orqali ildiz ifodasini oshirish.	Chen et al., 2007; Nevo & Chen, 2010
DREB (HvDREB1/CBF)	Stress-inducible TF, osmolyut va stress genlarini faollashtiradi	CRISPRa (activation), stress-inducible overexpression	Nakashima et al., 2009; Ashraf & Foolad, 2013
AREB/ABF (ABA-responsive TFs)	ABA signalizatsiyasi orqali stomata yopilishi, osmoprotektant biosintezini boshqaradi	Promoter engineering, CRISPRa/i orqali nozik boshqaruv	Fujita et al., 2011; Zhu, 2002
P5CS (Δ ¹ -pyrroline-5-carboxylate synthase)	Prolin biosintezini boshqaradi, osmolyut yig'ilishini kuchaytiradi	Moderate overexpression (stress-inducible), promoter tuning	Szabados & Saviouré, 2010
Antioxidant genes (SOD, CAT, APX)	ROSni kamaytiradi, oksidativ stressdan himoya qiladi	Targeted upregulation (stress-inducible promoters)	Gill & Tuteja, 2010; Munns & Tester, 2008

Yuqoridagi jadvalda keltirilgan genlar shoʻrlanishga qarshi turli xil fiziologik va biokimyoviy mexanizmlarni ifodalaydi. Masalan, HvHKT1;5, SOS1 va HvNHX1 genlari ion homeostazini saqlashda markaziy rol oʻynaydi: ular Na^+ ning ildizdan bargga oʻtishini cheklash, sitoplazmadagi ortiqcha Na^+ ni vakuolaga sequester qilish va hujayradan chiqarish orqali Na^+ toksikligini kamaytiradi. Bu uch genning birgalikdagi tartibga solinishi shoʻrlanishga chidamlilikda “ion exclusion + tissue tolerance” strategiyasini shakllantiradi.

Boshqa tomondan, P5CS va DREB/AREB oilasiga mansub transkripsion faktorlar osmoprotektantlarning sintezi va stress-inducible genlarning faollashuviga bevosita taʼsir qiladi. Bu genlarning tahriri osmotik moslashuv va ABA signalizatsiyasini yaxshilab, suv muvozanatini saqlash hamda fotosintez jarayonining barqarorligini taʼminlashi mumkin. Shuningdek, antioksidant tizimiga oid genlar (SOD, CAT, APX) shoʻrlanish stressida yuzaga keluvchi ikkilamchi oksidativ zararni kamaytiradi. Bu genlarni stress-inducible promoterni oʻzgartirish orqali faollashtirish ROS darajasini nazorat ostida ushlab turishga imkon beradi.

Oʻzbekiston sharoitida tuproq shoʻrlanishi koʻproq ionik stress (Na^+ va Cl^- toʻplanishi) bilan bogʻliq boʻlgani uchun, ayniqsa HvHKT1;5, HvNHX1 va SOS1 genlari ustuvor nishon sifatida ajralib turadi. Shu bilan birga, qurgʻoqchil iqlim va yuqori bugʻlanish tufayli ABA yoʻnalishi (AREB/ABF) va osmoprotektant biosintezi (P5CS) ham muhim qoʻshimcha nishonlar hisoblanadi. Demak, multiplex CRISPR yondashuvi orqali ushbu genlarning kombinatsiyalangan tahriri barqaror va energetik jihatdan samarali shoʻrlanishga chidamli arpa genotiplarini yaratishga imkon beradi.

XULOSA

Ushbu tadqiqot shuni koʻrsatadiki, CRISPR-Cas9 gen tahriri texnologiyasi arpaning shoʻrga chidamliligini oshirishda katta salohiyatga ega. Anʼanaviy seleksiya usullari uzoq vaqt va murakkab irsiy belgilar ustida ishlashda cheklangan

bo'lsa, CRISPR-Cas9 usuli bizga aniq genlarni maqsadli o'zgartirishga imkon beradi. Ammo, bu texnologiyadan samarali foydalanish uchun, avvalo, arpaning sho'rlanish stressiga javob berishining molekulyar va fiziologik mexanizmlarini chuqur tahlil qilish zarur. Xususan, O'zbekiston sharoitiga xos bo'lgan tuproq sho'rlanishiga javob beruvchi HvHKT1;5, HvNHX1, SOS1 kabi ion transporti genlari, shuningdek, P5CS, DREB/AREB kabi osmotik va signal uzatish yo'llaridagi genlarning funksional vazifalarini to'liq o'rganish maqsadga muvofiqdir.

Kelgusi tadqiqotlarda, bu genlarning faoliyatini tushunishga asoslanib, multiplex CRISPR (bitta tajriba jarayonida bir nechta genni bir vaqtda tahrirlash texnologiyasi) kabi zamonaviy yondashuvlar orqali bir necha genlarni bir vaqtning o'zida tahrirlash rejalashtirilgan. Shunday qilib, bu tadqiqotni amalga oshirish orqali nafaqat yuqori hosildor va sho'rga chidamli arpa genotiplarini yaratiladi, balki qishloq xo'jaligida hosildorligi barqaror oshiriladi va oziq-ovqat xavfsizligi ta'minlanadi.

Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati:

1. Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in Arabidopsis. *Science*, 285(5431), 1256–1258.
2. Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 431–434.
3. Chen, Z., Newman, I., Zhou, M., Mendham, N., Zhang, G., & Shabala, S. (2007). Screening plants for salt tolerance by measuring K^+ flux: a case study for barley. *Plant, Cell & Environment*, 28(10), 1230–1246.
4. FAO. (2021). The state of the world's land and water resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
5. Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509–525.

6. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
7. Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2020). The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11, 611.
8. Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., ... & Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*, 16(1), 258.
9. Mano, Y., Omori, F., Takamizo, T., & Kindiger, B. (2012). QTL mapping of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*, 186(2), 277–288.
10. Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
11. Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2009). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science*, 4, 267.
12. Nevo, E., & Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 670–685.
13. Newton, A. C., Flavell, A. J., George, T. S., Leat, P., Mullholland, B., Ramsay, L., & White, P. J. (2011). Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Security*, 3(2), 141–178.
14. Poets, A. M., Fang, Z., Clegg, M. T., & Morrell, P. L. (2015). Barley landraces are characterized by geographically heterogeneous genomic origins. *Genome Biology*, 16(1), 173.
15. Pourkheirandish, M., & Komatsuda, T. (2007). The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Annals of Botany*, 100(5), 999–1008.
16. Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2003). The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell*, 15(1), 19–32.
17. Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89–97.
18. Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66–71.
19. Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273.