

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.К/В/Т.13.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ХАШИМОВА НИГОРА РУСТАМОВНА

**ҒЎЗАНИНГ ФИТОПАТОГЕНЛАРГА ҚАРШИ ЧИДАМЛИЛИК
МЕХАНИЗМИНИНГ ШАКЛЛАНИШИ ВА УНИ ТАБИЙ
БИРИКМАЛАР АСОСИДА БОШҚАРИШ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

Докорлик диссертацияси автореферати мунтарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Хашимова Нигора Рустамовна

Вўзанинг фитопатогенларга қарши чидамлилиқ
механизмининг шаклланиши ва уни
табиий бирикмалар асосида бошқариш..... 3

Хашимова Нигора Рустамовна

Механизм формирования устойчивости
хлопчатника к фитопатогенам и пути
ее регуляции на основе соединений
природного происхождения..... 27

Khashimova Nigora Rustamovna

The forming mechanism of cotton resistance to
phytopathogens and methods of their regulation based on
compounds of the natural origin..... 51

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of publications..... 73

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 14.07.2016.К/В/Т.13.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

ХАШИМОВА НИГОРА РУСТАМОВНА

**ҒЎЗАНИНГ ФИТОПАТОГЕНЛАРГА ҚАРШИ ЧИДАМЛИЛИК
МЕХАНИЗМИНИНГ ШАКЛЛАНИШИ ВА УНИ ТАБИИЙ
БИРИКМАЛАР АСОСИДА БОШҚАРИШ**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

3

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.3-4.В3 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб саҳифасига (<http://ss.biochem.uz>) ва «ZiyoNet» таълим ахборот тармоғида ([www. ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Ахунов Али Ахунович

Биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Тилябаев Зоитжон

Биология фанлари доктори, профессор

Турдикулова Шахлохон Ўтқуровна

Биология фанлари доктори, доцент

Цеомашко Наталья Евгеньевна

Биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот: Микробиология институти

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги 14.07.2016.К/В/Т.13.01 рақамли Илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашининг 2016 йил «__»_____куни соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.:

(99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

Докторлик диссертацияси билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63), e-mail: asrarov54@mail.ru).

Диссертация автореферати 2016 йил «___» _____ куни тарқатилди.
(2016 йил «___» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

А.С. Тураев

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш раиси, к.ф.д., профессор

М.И. Асраров

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш илмий котиби
б.ф.д., профессор

Д.А. Кадирова

Фан доктори илмий даражасини берувчи бир
марталик Илмий кенгаш қошидаги бир
марталик илмий семинар раиси, б.ф.д.

4

КИРИШ (докторлик диссертациясига аннотация)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда дунёнинг барча пахта етиштирувчи давлатларидаги асосий муаммолардан бири ғўзанинг фитопатогенлар билан зарарланиши бўлиб, қишлоқ хўжалигига сезиларли даражада зарар етказмоқда. Фитопатогенларга қарши резистентлик белгисига эга янги навларни етиштиришга имкон берувчи маркер ассоциатив биокимёвий, молекуляр-генетик усулларни қўллаш натижасида селекция жараёнларини тезкор технологияларини ишлаб чиқиш, шунингдек, муҳитнинг ноқулай абиотик ва биотик омилларига қарши табиий ҳимоя механизмларини индуцирлаш экологик соф ва самарадор ҳимоя усулларида бири ҳисобланади.

Республикаимиз мустақилликка эришгандан буён мамлакатимиз пахтачилигида юқори ҳосилдорликка эришиш, бу соҳага замонавий фанлар - молекуляр биология, биотехнология ҳамда биоорганик кимё эришган ютуқларини тадбиқ этиш борасида кенг қамровли чора-тадбирлар амалга оширилиб, муайян натижаларга эришилди. Бу борада ғўза касалликларига қарши ҳимоя жараёнларини бошқарувида турли биокимёвий тизимларнинг ролини аниқлаш, ғўзани ҳосилдорлигини стабилловчи экологик усуллар (табиий биологик фаол моддалар асосидаги агропрепаратларни қўллаш) ва воситаларни (маркер ассоциатив тест-тизимлар ва ҳ.к) такомиллашувини алоҳида таъкидлаш мумкин.

Бугунги кунда жаҳонда ўсимликлар иммунитетининг молекуляр-генетик асослари, биологик фаол бирикмалар ёрдамида ғўзанинг иммун тизимини

кучайтириш ва бошқариш ҳисобига уларни патогенларга нисбатан чидамлилигини таъминлаш замонавий биологиянинг долзарб вазифаларидан ҳисобланади. Замбуруғли патогенлар билан зарарланган ғўзанинг фермент тизими ҳолатини баҳолаш, чидамлиликини белгиловчи молекуляр структураларни аниқлаш, иммун-фермент усул ишлаб чиқиш, ғўзанинг системик индуцирланган чидамлилик механизмларини аниқлаш, ғўзанинг ҳимоя воситаларини барча генетик потенциалини фаоллаштириш, глицирризин кислота препаратларини қўллаш асосида ғўза чидамлилигини ошириш технологиясини ишлаб чиқиш кабилар долзарб вазифалардан ҳисобланади.

Ўзбекистон Республикасининг «Қишлоқ хўжалик экинларини зараркунандалар, касалликлар ва ёввойи ўсимликлардан ҳимоя қилиш тўғрисида»ги Қонуни (2000), Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2004 йил 29 мартдаги 148-сон «Ўсимликларни ҳимоя қилиш хизмати тузилмасини такомиллаштириш ва самарадорлигини ошириш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарорида, Вазирлар Маҳкамаси томонидан тасдиқланган 2016 йил 7 февралдаги «2016-2020 йилларда қишлоқ хўжалигини янада ислоҳ қилиш ва ривожлантириш бўйича тадбирларни 2016 йилда амалда жорий этишнинг йўл харитаси»ни ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат

5

қилади.

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

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.

¹Индуцирланган чидамлиликнинг молекуляр механизмларини ўрганишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Institute of Cotton Research, (Хитой), Agricultural Research Centre, Ғазо (Миср), The University of Burdwan (Ҳиндистон), Tottori University (Япония), Auburn University (АҚШ), Биокимё ва генетика институтининг Уфа илмий маркази (Россия), Хужайра биологияси ва ген инженерияси институти (Украина)да олиб борилмоқда.

Қишлоқ хўжалик экинларида фитопатогенларга қарши индуцирланган чидамлиликнинг физиологик-биокимёвий механизмларини аниқлашга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: ғўза гипокотилларида пероксидазалар иштирокида касалликларга чидамлиликни таъминловчи лигнин биосинтези ва тўпланиши ҳамда *Gossypium thurberi* - *V. dahliae* ўзаро таъсирида юзага келадиган жараёнлар регулятор тармоқларининг молекуляр асослари аниқланган (Institute of Cotton Research, Хитой); чидамлилик индукторлари

билан ишловланган нўхат ўсимлиги дурагайларида барқарор белгиларни намоён бўлиши ва уларнинг келгуси авлодда сақланиб қолиш даражаси аниқланган (Agricultural Research Centre, Миср); ўсимликларнинг чидамли турларидаги пероксидаза, полифенолоксидаза ва фенилаланин аммиак-лиаза фаолликларини ортиши, инокуляцияланган ўсимликларда *F. oxysporum* таъсирида биокимёвий жараёнлардаги ўзгаришлар билан ўзаро боғлиқлиги илмий жиҳатдан асослаб берилган (The University of Burdwan, Ҳиндистон); ўсимликларда мураккаб поғонали (каскадли) ҳимоя механизмларининг тизими мавжудлиги ҳамда уларни иммун тизимини стимулловчи кимёвий бирикмалар ёрдамида бошқарилиши исботланган (Auburn University, АҚШ); *Arabidopsis thaliana* ниҳолларида хитин-индуцирланувчи генлар экспрессияси ва кислороднинг фаол шакллари юзага келтирувчи сувда эрувчан хитин нанотолалари олинган (Tottori University, Япония); нобиоцид табиий бирикмаларни қўллаш орқали қишлоқ хўжалиги экинларини касалликка чидамлилигини индуцирловчи биокимёвий усуллар яратилган (Биокимё ва генетика институтининг Уфа илмий маркази, Россия); биоген табиатли бирикмаларнинг муайян синфлари ёрдамида чидамлиликни индуцирловчи янги препаратлар ишлаб чиқилган (Хужайра биологияси ва ген инженерияси институти, Украина).

¹ Диссертациянинг мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи <http://search.ebscohost.com/>, www.proquest.com/, www.intechopen.com, C. Y. He, T. Hsiang and D. J. Wolyn. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* // Plant Pathology – 2002. – V.51. – С.225–230. ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.

Дунёда ғўзада индуцирланган чидамлиликни биокимёвий механизмларини комплекс аниқлаш ҳамда бошқаришнинг эҳтимолга яқин йўллари бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: муҳитнинг ноқулай омилларига нисбатан чидамлилик каби хўжалик жиҳатидан қимматли хусусиятларга эга бўлган ғўзанинг янги тизмалари ва навларини яратиш; селекция ва ноанъанавий биокимёвий маркер-ассоциацияланган услублар асосида ғўзанинг патогенларга чидамли генотипларини аниқлаш; биологик фаол моддалар ва микроэлементлардан фойдаланиш асосида ўсимликларнинг чидамлилигини ошириш усуллари ишлаб чиқиш, уларнинг иммун потенциалини кучайтириш; кучли инфекцион фон ва намлик танқислиги кузатилаётган турли хил тупроқ-иқлимий ҳудудларда ғўзага ишлов бериш бўйича янги илмий асосланган ишланмаларни яратиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Хорижлик олимлар S.Carpin, M. Crevecoeur, M. de Meyer, P. Simon, H. Greppin, C. Penel, E. Delannoy, C.M. Alba, L.M. Lagrimini, Y.F. Cai, J.H. Christensen, G.Bauw, K.G. Welinder, M.van Montagu, W. Boerjan ўсимликларнинг фитопатогенларга қарши ҳимоя механизмларидаги пероксидазаларнинг хусусиятларини аниқлаб мазкур ферментнинг юқори фаоллиги индуцирланган чидамлилик даражаси билан ўзаро боғлиқлиги ва чидамлилик маркери бўлиб хизмат қила олиши асослаб

берилди. Тадқиқотларга кўра, хитин олигомерлари (замбуруғ хужайраси структурасининг таркибий қисми) бир қанча генлар транскрипциясини фаоллаштиради, булар орасига энг чидамсиз бўлган, яъни патоген хужайрасини деградацияловчи стресс оксиллар - хитиназалар учун масъул генлар; лигнин, фитоалексинлар, флаваноидларнинг шаклланиши, салицил кислотанинг синтезида бевосита иштирок этувчи пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза учун масъул генлар киради. Патогенлар билан зарарланмаган ўсимликларга элиситорлар таъсир эттирилганда, хужайрада сигнал йўллариининг бошланғич босқичларини индуцирловчи фаол бирикмалар аниқланди. Бундай ўсимликлар келгусида патогенларнинг таъсирига тезкор ва самаралироқ жавоб қайтаради.

МДХ давлатларида ўсимликлар патогенлар билан таъсирланганда ҳимоя оксилларининг фаолият механизмларини ҳамда фитоиммунитетни самарали бошқарилишига кўмаклашувчи сигнал молекулаларни пайдо бўлишида жавоб реакцияларини ишга тушиш йўллариини аниқлашга; индуцирланган чидамлиликини шакиллантириш концепциясига бағишланган тадқиқотлар олиб борилмоқда, уларнинг натижаларини И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, Р.М. Хайруллин, В.А. Андреева, Л.Г. Яруллина, С.Л. Тютерев, Л.И. Ильинская, И.А. Тарчевский, Л.Ф. Горовойларнинг тадқиқотларида кузатиш мумкин. Улар орасида биоген элиситорлар (хитин, глюкан ва уларнинг олигомерлари), фитогормонлар ва салицил кислотанинг физиологик ўрни фаол ўрганилмоқда.

Республикамизда олиб борилган тадқиқотларда ДНК фрагментлари полиморфизмига асосланган молекуляр маркерларни ўрганиш (И.Й. Абдурахмонов), оксиллар спектри ва оксидоредуктазлар изоэнзимларидан

7

иммунитет намоён бўлишининг ташхисловчи белгиси сифатида фойдаланиш (Р.К. Шодмонов, Ш. Юнусхонов), ғўза, бошоқли дон, картошка экинлари учун иммуностимуляторлар сифатида хитозан асосида янги препаратларни яратиш (С.Ш. Рашидова, М.Х. Авазхўжаев) илмий асосланиб берилган.

Вза етиштиришда ўсимлик материалининг фитопатогенларга чидамлилигини баҳоловчи тезкор усулини ишлаб чиқиш, узок вақт унинг толерантлигини сақлаб турувчи иммуностимуляторларни яратиш долзарб ва илмий-амалий аҳамиятга эгадир. Лекин ҳозирги кунга қадар биоген индукторларнинг таъсир қилиш механизмларини аниқлашга доир илмий асосланган маълумотлар етарли эмас, шу билан бирга, ғўзани патогенлардан ҳимоя қилувчи янги воситаларнинг самарадорлигини баҳоловчи тезкор ва ишончли усуллар яратилмаган.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг ФА-А10-Т152 «Моноспецифик антитаначалардан фойдаланиш асосида ғўзанинг вилтга чидамли навлари селекциясида мониторинг тизимини яратиш» (2009-2011 йй.), ИК-2011-3-1 «Взанинг янги навларини яратишда вертицилли вилтга нисбатан

резистентликни аниқлашни инновацион технологиясини селекция ва уруғчилигига тадбиқ этиш» (2011-2012 йй.), А-9-Т-002 «Ўзанинг фитопатогенларга қарши чидамлик индуктори сифатида табиий асосга эга янги бирикмаларни яратиш ва ўзлаштириш» (2012-2014 йй), Мега лойиҳа А8-ФК-1-12504 «Геном - протеом технологияларни *G.hirsutum* L. ўза турининг сўрувчи зараркунадалар (шира, ўргимчаккана) ва касалликларга (вертициллез вилт, гоммоз) чидамлигини баҳолашда қўллаш, энг яхши тизмани молекуляр – генетик паспортларини яратиш, биотик омилларга чидамлик, тезпишарлик, пахта ҳосилдорлиги, тола сифати ва чиқими каби белгилар бўйича юқори кўрсаткичларни ўзида мужассамлаштирган янги навни ўрганиш учун ДНСга топшириш» (2012-2014 йй), ФА-А9-Т-048 «Табиий чидамлик индукторларининг таъсир механизмини ўрганиш асосида *Verticillium dahliae* ва *Fusarium oxysporum* фитопатогенига қарши ўза резистентлигини кўтариш биотехнологиясини яратиш» (2015-2017 йй.) илмий-тадқиқот ишлари режаси доирасида бажарилди.

Тадқиқотнинг максоди ўзада ҳимоя жараёнлари шаклланишининг биокимёвий механизмларини аниқлаш, селекция материалининг фитопатогенларга нисбатан чидамлигини баҳоловчи тест-тизимини яратиш, глицирризин кислотаси препаратлари асосида муҳитнинг биотик омилларига нисбатан ўзанинг чидамлигини оширишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

ўзанинг фитопатогенларга қарши ҳимоя жараёнларида фитоиммунитет ферментлари - пероксидаза, унинг хитин-махсус изоформалари, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиазанинг ўзига ҳос хусусиятларини, шунингдек, чидамликни белгиловчи молекуляр структураларни аниқлаш;

8

иммун-ферментли таҳлил ёрдамида ўзанинг замбуруғли зарарланишга нисбатан чидамлигини баҳоловчи тест-тизимини ишлаб чиқиш; ўза чидамлигини ошириш йўлларида бири сифатида глицирризин кислотаси препаратлари - рухли, магнийли, моноаммонийли тузлари ва глицирризин ва салицил кислоталарининг супрамолекулр комплексинининг фитоиммунитетга самарали таъсир этишини аниқлаш;

глицирризин кислотаси препаратлари орасида ўза фитоиммунитети ферментлари фаоллигига пролонгирловчи таъсир этувчи комплексларни танлаб олиш;

ўзанинг фитопатогенларга қарши индуцирланган чидамлигида салицил кислотанинг биокимёвий аҳамияти ҳамда унинг антиоксидант ферментлар билан ўзаро боғлиқлигини аниқлаш;

глицирризин кислотаси асосида олинган препаратларни мақбул сарфланиш меъёрини белгилаш асосида ўзанинг ҳўжалик жихатидан қимматли хусусиятларини яхшилаш мақсадида фитоиммунитетни стимуллаш технологиясини яратиш ва қишлоқ ҳўжалиги амалиётига тадбиқ этиш;

токсикологик-гигиеник хулоса олиш мақсадида ДАГ-1 (глицирризин ва салицил кислота супрамолекуляр комплекси) ва ДАГ-2 (глицирризин кислотанинг моноаммонийли тузи) препаратларининг синовларини ЎзР ССВ Санитария, гигиена ва касб каслликлари институтида ўтказиш;

ЎзР Давлат кимё комиссияси томонидан ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларини кенг экин майдонларида синаш ва «Ўзбекистон Республикаси қишлоқ хўжалигида қўллаш учун рухсат этилган пестицидлар ва агрохимикатлар рўйхати»дан ўтказиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида чидамлилиги турлича бўлган навлар (вилтга чидамли Наманган-77, ўртача чидамли С-6524, чидамсиз С-4727), ЎзР СҚХВ Пахта селекцияси, уруғчилиги ва етиштириш агротехнологиялари илмий-тадқиқот институти томонидан тақдим этилган ғўза навлари, турлари ва тизмалари, шунингдек, Биоорганик кимё институтида олинган глицирризин кислота препаратлари - глицирризин кислотанинг рухли, магнийли, моноаммонийли тузлари ҳамда глицирризин ва салицил кислоталарнинг супрамолекуляр комплекси танланган.

Тадқиқот предмети фитопатогенезда ғўзанинг чидамлилиги ва чидамсизликни биокимёвий хусусиятлари, вилтга чидамлилиги баҳолаш тезкор усулини яратиш ва ғўза фитоиммунитетини глицирризин кислота асосида яратилган препаратлар билан стимуллаш ҳисобланади.

Тадқиқот усуллари. Диссертация ишида биоорганик кимё, биокимё, микробиология, иммунология, гистокимё ва статистика услубларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

V. dahliae, *F. oxysporum* замбуруғлари таъсири остида чидамли ва чидамсиз ғўза навларининг фитопатогенлар билан зарарланган жойларида кислороднинг фаол шакллари ва оксидловчи стресснинг локал зонасини юзага келтирувчи анион пероксидаза, полифенолоксидаза ва фенилаланин

аммиак-лиаза иштирокидаги бирламчи ҳимоя реакцияларининг шаклланиш механизми асослаб берилган;

илк бор ғўзанинг резистентлик даражасини прогнозлашга имкон берувчи иммун-ферментли таҳлил асосида ғўзанинг замбуруғли касалликларга чидамлилигини баҳолаш тест-тизими ишлаб чиқилган;

ғўза етиштириш амалиётида муҳитнинг биотик ва абиотик омилларига чидамлилиги оширувчи ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларини қўллаш асосида табиий асосга эга препаратлардан носпецифик чидамlilik индукторлари сифатида фойдаланишнинг мутлақо янги концепцияси ишлаб чиқилган;

ДАГ-1 препарати таркибидаги салицил кислотанинг ғўзада фитопатогенларга нисбатан чидамлилигини бошқарувчи асосий хусусияти аниқланган, ғўзада индуцирланган системик чидамlilik шакилланишида салицил кислотанинг сигнал молекуласи сифатида иштирок этиши исботланган;

препаратларнинг табиий фитогормонлар таъсирига мос келувчи кичик 10^{-7} М концентрацияда экиш олдида чигитларга ишлов бериш ғўза ўсимлигини ўсиш ва ривожланишини стимулловчи ва ҳимояни пролонгирловчи таъсири аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат: ғўзанинг фитопатогенларга нисбатан чидамлилигини баҳолашнинг тезкор усули ишлаб чиқиши селекционерлар билан ҳамкорликда ғўза намуналарининг вилтга чидамлилигини йил бўйи таҳлил қилишга имкон беради, бу эса янги навлар яратилиш вақтини 10 йилдан 6-7 йилга қисқартиради;

ғўзанинг вилтга чидамли янги навларини яратилишида истиқболли шакиллари аниқлаш мақсадида ЎзР СҚХВ Пахта селекцияси, уруғчилиги ва етиштириш агротехнологиялари илмий-тадқиқот институти томонидан берилган элита ғўза навлари, турлари ва тизмалари синовдан ўтказилган; стимулловчи таъсир кўрсатувчи глицирризин кислотасиасосида олинган ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларининг ғўзани фитопатогенларга қарши чидамлилигини индуцирловчи ва ривожланишни стимулловчи таъсирга эгаллиги аниқланган;

глицирризин кислота препаратларининг токсикологик-гигиеник таҳлили ўтказилди ва препаратлар заҳарли моддаларнинг IV синфига кириши, кумулятивлик хусусиятига эга эмаслиги, атроф-муҳит ва инсон саломатлиги учун экологик хавфсиз эканлиги аниқланган;

ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларини ғўзанинг касалликка чидамлилиги индукторлари сифатида фитоиммунитет ферментлари фаоллигига пролонгирловчи таъсир (30 кунгача) кўрсатиш механизми аниқланган ҳамда ушбу препаратларнинг белгиланган сарфланиш меъёрлари билан чигитга ишлов бериш технологияси ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги уларнинг замонавий биокимёвий ва иммунологик тадқиқот усуллари қўллаш орқали, тадқиқот натижаларни назарий маълумотларга мос келиши билан тасдиқланади. Олинган маълумотларни статистик қайта ишлаш Стъудент мезони ёрдамида

10

ўртача қийматнинг ишончлилиги интервали қийматларини ҳисоблаган ҳолда олиб борилган. Олинган натижаларнинг исботи бўлиб мутахассисларнинг эксперт баҳолари ва тадқиқот натижаларининг амалий тадбиқи, тадқиқотлар натижаларининг республика ва халқаро конференциялардаги муҳокамаси, шунингдек, уларнинг рецензияланган илмий нашрларда чоп этилганлиги ва диссертациянинг асосий бўлимлари бўйича унга патент олинганлиги хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти фитопатогенезда чидамли ва чидамсиз ғўзанинг ферментатив тизимида аниқланган қайта қурилишларнинг фарқлари ва ўзига хос қонуниятлари ғўза чидамлилигини баҳолаш усуллари ишлаб чиқишда асос бўлади ҳамда молекуляр даражада касалликларга чидамлилиги механизмини бошқаришнинг самарадор воситаларини ва технологияларини

ишлаб чиқишга хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти яратилган ва селекцияга тадбиқ этилган ғўзанинг вилтга чидамлилигини аниқловчи тест-тизими вилтга чидамли элита ғўза навлари, турлари ва тизмаларини танлаш муддатини қисқартиради, шунингдек, маҳаллий, экологик ҳавфсиз ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларининг фитоиммунитет индукторлари сифатида қўлланилиши ўсимликларга кимёвий ишлов беришлар сонини камайтиради ва қишлоқ хўжалиги экинларининг ҳимоя қилишнинг интеграцияланган тизимида истиқболли йўналиш бўлади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Ғўзанинг турли навларида фитоиммунитет ферментларини физик-кимёвий, биологик хоссаларини ўрганиш ҳамда фитопатогенларга қарши чидамлиликни индуцирловчи глицирризинатларнинг таъсир механизмини аниқлаш асосида:

ғўзанинг хитин-махсус пероксидазалари гомоген ҳолда ажратиб олиш усулига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти (31.12.2012 й., №IAP 04619) олинган. Илмий тадқиқот натижасида иммунофеммент таҳлил усули билан ғўзанинг вилтга чидамлилигини баҳолаш тест-тизими яратилган;

ғўза навларининг вилтга чидамлилигини баҳолаш тест-тизимида Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти (27.02.2015., №IAP 05005) олинган. Илмий тадқиқот натижасида олинган тест-тизими апробациядан ўтказилган ва ғўзанинг турли навлари ва тизмаларини вилтга чидамлилигини аниқлаш имконини берган;

маҳаллий хомашёдан олинган глицирризин кислотанинг салицил кислотаси билан супрамолекуляр комплекси ва глицирризин кислотанинг моноаммонийли тузининг индукторлар сифатида қўлланилиш технологиясига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти (30.10.2015 й., №IAP 05090) олинган. Илмий тадқиқот натижасида ДАГ-1 и ДАГ-2 препаратларининг паст концентрацияси (10^{-7} М) ғўзани фитопатогенларга нисбатан чидамлилигини оширувчи ва фитоиммунитетнинг асосий ферментларига пролонгирловчи хусусиятининг таъсир механизмини исботлашга хизмат қилган;

11

Ўзбекистон Республикаси ўсимликларни муҳофаза қилиш ва кимёлаштириш воситалари бўйича Давлат комиссияси томонидан ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратлари рўйхатга олинган ва гувоҳномалар олинган (23.01.2015 й., №1А 946 ва 09.02.2016 й., №1А 1156). Илмий тадқиқот натижасида ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларини чигитларга экиш олдида ишлов беришда фойдаланилган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари маърузалар кўринишида баён этилган бўлиб, 12 та республика ва халқаро илмий-амалий конференцияларда апробациядан ўтган: «Биоорганик кимё ривожланишининг долзарб муаммолари» (Тошкент, 2010); «Biological plant protection, problems and contemporary achievements» (Tbilisi, 2012); «Вавилов

ўқишлари» (Саратов, 2012, 2014, 2015); «Табиий бирикмалардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари» (Гулистон, 2013); «Ўзбекистонда биоорганик кимёнинг замонавий ривожланиши ва муаммолари» (Тошкент, 2013); «XXI аср – интеллектуал авлод асри» Тошкент, 2014); «Қишлоқ хўжалик экинлари агробиологиясининг ютуқлари, муаммолари ва истиқболлари» (Тошкент, 2015); «Микроорганизмлар ва биосфера, MICROBIOS-2015» (Тошкент, 2015); «Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривожи ва келажаги» (Тошкент, 2016); «Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривожи ва келажаги» (Тошкент, 2016); «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» (Тошкент, 2016).

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 31 та илмий иш чоп этилган. Улардан 11 таси илмий мақолалар бўлиб, 9 таси Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссияси томонидан докторлик диссертацияларининг асосий илмий натижаларини нашр этиш учун тавсия этилган республика нашрларида ва 2 таси хорижий журналларда чоп этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати, иловалардан иборат. Диссертация ҳажми 200 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Ўсимликлар ва фитопатогенлар ўртасидаги ўзаро таъсирнинг молекуляр механизмлари ҳақидаги замонавий тасаввурлари, ўсимликлар чидамлилигини бошқарилиши**» деб номланган биринчи бобида ўсимликларнинг фитопатогенларга нисбатан

12

иммунитетининг молекуляр-генетик жиҳатларига тааллуқли илмий маълумотлар ёритилган. Ўсимликларнинг ҳаёт фаолиятдаги стресс ферментлари - пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак лиаза, салицил кислоталарнинг асосий функционал хоссалари; уларнинг патогенездеги сигнал тизимининг таркибий қисми сифатида хўжайин ўсимлик ва фитопатогеннинг ўзаро таъсирларидаги иштироки; ўсимликларни патогенлардан ҳимоялашнинг экологик хавфсиз воситаларини яратиш соҳасидаги янги йўналиш - чидамлилиكنинг табиий индукторлари ҳақида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «Ишда қўлланилган ашё ва биоорганик кимё, биотехнология усуллари» деб номланган иккинчи бобида тадқиқот изланишлари бажарилишида фойдаланилган ашёлар ва усуллар, хусусан биоорганик кимё (оксилни миқдорий ва сифат аниқлаш учун гелъ филтрация, капилляр электрофорез, юқори самарали суюқлик хроматографияси, спектрофотометрия усуллари), хужайравий биология (каллусларни олиш, ўсимлик тўқималарини бўяш ва микроскопия усуллари) ва иммунология (антитаначаларни олиш ва тозалаш, иммун ферментли таҳлил) услубларидан фойдаланилган.

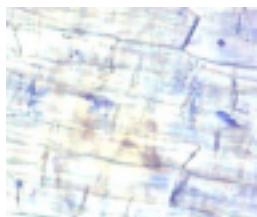
Диссертациянинг «Ѓўзанинг патогенларга нисбатан жавоб реакцияларида фитоиммунитет ферментларининг иштироки» деб номланган учинчи бобида *V. dahliae* замбуруғи таъсирига жавобан ғўзанинг химоя жараёнлари ривожланишида фитоиммунитетнинг асосий ферментлари - пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак лиазалар фаоллиги ўзгаришларини қиёсий таҳлил натижалари, ферментлар фаоллиги фитопатогенездаги химоя реакцияларининг интенсивлиги билан ўзаро боғлиқлиги, шунингдек, ғўзанинг гомоген анион хитин-махсус пероксидазасини ажратиб олишга таълуқли тадқиқотлар баён этилган.

Ўсимликларнинг чидамлилиги генетик детерминацияланган ва ирсийланган белги бўлиб, экстремал ҳолатларда амалга ошади. Вилтга чидамли ва чидамсиз ғўзаларнинг ферментатив тизимидаги қайта қурилишларнинг ўзига хосликлари ва фарқланишини, шунингдек, *V. dahliae* фитопатогенезида ғўзанинг хужайра тўқималари билан ўзаро таъсири бирламчи механизмларини ўрганиш мақсадида ғўзанинг чидамли Наманган-77 ва чидамсиз С-4727 навлари ниҳолларини ривожланиш динамикасида химоя ферментлари - пероксидаза, полифенолоксидаз ва фенилаланин аммиак-лиазаларнинг фаолликлари ўрганилди. Инфекцион жараённинг ривожланишини тадқиқ қилиш чидамли ва чидамсиз навлардаги биотик омилга таъсир этувчи ғўза чидамлилигини юзага келтирувчи жавоб реакциялари тезлиги билан боғлиқ иммун ферментлари фаолланишида фарқ борлигини кўрсатди.

V. dahliae замбуруғи билан зарарланишда пероксидаза фаоллиги ва вилтга чидамлилик даражаси бўйича фарқланувчи ғўза навларидаги супероксид анионнинг генерацияси ва некроз ҳосил бўлиш тезлиги ўртасида корреляцион боғлиқлик борлиги аниқланди.

13

Ўсимлик-хўжайин ва патогеннинг ўзаро таъсирида дастлабки жавоб реакцияларидан бири хужайра девори билан боғланган пероксидазалар иштирокида юзага келадиган кислороднинг фаол шакллари (КФШ)нинг локал генерацияси ҳисобланади. Гистокимёвий тадқиқотлар ёрдамида ғўза тўқималарини тетразол нитроқўкида витал бўяш усули орқали хужайралардаги КФШ генерациясини сифатли аниқлашда олинган натижалар бунинг исботи бўла олади (1-расмга қаранг.)



1-расм. Ғўзанинг *V. dahliae* билан зарарланган Наманган-77 (А) ва С-4727 (Б) навлари ниҳолларининг илдиз тўқималарида супероксид анион шаклланишини аниқлаш. Тетразол нитрокўкида витал бўйш, ок.×40.

А Б

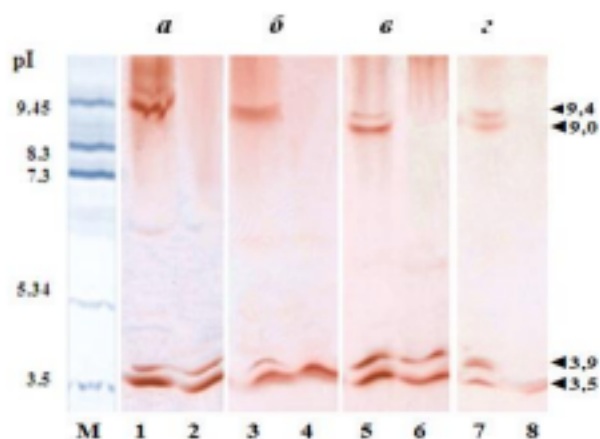
Ғўзанинг Наманган-77 нави цитоплазмасида супероксид-анион тўпланиши, чидамсиз С-4727 нави цитоплазмасининг алохида қисмларида тўпланган (1-расм., Б) супероксид-анионга нисбатан тарқоқ ва интенсив равишда борди (1-расм, А). Чидамсиз С-4727 навида КФШ нинг ҳосил бўлиш реакцияси кечикканлиги сабабли патоген замбуғи пероксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза ферментлари фаоллигини ингибирлаш йўли билан ҳимоя тўсиқларининг ҳосил бўлиш интенсивлигини пасайтирди. Чидамли Наманган-77 чидамли навида зарарланишнинг биринчи кунидеёқ ўз вақтида патоген локализацияси жараёнида иштирок этувчи пероксидаза ва полифенолоксидаза ферментлари фаоллашди.

Тахмин қилинишича, замбуруғнинг хитоолигосахаридлари ғўзанинг гидролитик ферментлари таъсирида ажралиб, пероксидаза, полифенолоксидаза ва фенилаланин аммиак-лиаза иштирокида ҳимоя реакциялари занжири кетма-кетлигини бошлаб беради. КФШ маҳсулотини катализловчи пероксидаза изоформаларидан бири бўлган чидамлилик реакциялари генлар резистентлиги экспрессиясига олиб келувчи, кейинчалик оксидловчилик чакнаши билан давом этувчи верулент патогенни аниқловчи патоген ассоцирланган молекуляр йўл орқали ишга тушади.

Маълумки, ўсимликнинг ионбоғланган ҳужайраолди пероксидазалари ўзаро патоген–ҳўжайин таъсирларида сигнал (хабар берувчи) ва бошқарувчилик вазифасини бажарувчи КФШ ҳосил бўлишида бевосита иштирок этади. Ғўзанинг патоген билан молекулялараро ўзаро таъсирининг бирламчи жараёнларини тушуниш учун замбуруғ ҳужайра деворлари компонентларининг ғўзанинг ионбоғлаган пероксидазаси фаоллигига таъсири *V.dahliae* замбуруғи конидияларида хроматография усули билан тадқиқ қилинди.

V.dahliae конидиялари билан боғланувчи ғўза чидамли нави ва айнан шундай чидамсиз навларнинг уруғпалла барглари ва гипокотиллари солиштирилганда ҳужайраолди пероксидазаси фракциялари чидамли навда

энг кўп фаолликка эга эканлиги аниқланди. Замбуруғ конидийлари билан элюирланган пероксидаза фракциялари изоспектори Наманган-77 чидамли навида иккита анионли изоформа $pI \sim 3,5 - 3,9$; С-4727 чидамсиз навида битта анионли изоформа $pI \sim 3,5$ мавжудлигини кўрсатди (2-расмга қаранг).



2-расм. *V.dahliae* конидия билан боғланган ғўза ниҳолларининг уруғпалла барглари ва гипокотиллардаги пероксидазанинг хужайраолди фракциси изоспектри. Пероксидаза фаоллиги гваяколда кўрилган: а -Наманган-77 нави гипокотилларининг хужайраолди пероксидазаси; **б** -С-4727 нави гипокотилларининг хужайраолди пероксидазаси; **в** -Наманган-77 нави уруғпалла баргларининг хужайраолди пероксидазаси; **г** - С-4727 нави уруғпалла баргларининг хужайраолди пероксидазаси; М -СВВ G-250 бўялган кумаси оксил-маркерларининг аралашмаси; *V.dahliae* замбуруғи конидияларга киритилишидан аввал 1, 3, 5, 7 -фракцияларнинг хужайраолди пероксидазаси; *конидиялар билан боғланган V.dahliae* замбуруғи 2, 4, 6, 8 -фракцияларининг хужайраолди пероксидазаси.

Шу тариқа, олинган натижалар ва адабиётлар асосида шуни таъкидлаш керакки, хужайраолди анион пероксидазалари патоген-хўжайин системасида хал қилувчи (“калит”) ўринлардан бирини эгаллайди ва уларни хитоолигосахаридларга махсус, яъни хитин махсус деб ҳисоблаш мумкин. Олинган натажаларга кўра, ғўзада химоя вазифасини амалга оширувчи хитин-специфик анион пероксидазалари хитин ёки унинг олигомерларини тутувчи микроорганизмларни “таниб олади”. Ўсимликларнинг бундай химоя механизми махсус йўналишга эга бўлади. Демак, патологик жараннинг тарқалиши зарарланган хужайралардаги хужайраолди анион пероксидазалари фаоллигининг тезлигига ва хитин тутувчи патоген мицелийсига бу ферментнинг интенсив сорбциясига боғлиқ бўлади.

Зарарланган сохага хитин-специфик пероксидазаларнинг локализацияланиши ва патоген замбуруғлар инфекцион структуралари билан ферментнинг боғланиш хусусияти, хужайраолди хитин-специфик пероксидазаларини замбуруғни ўсиши ва ривожланишига бевосита таъсир этиши мумкин деган хулосага келишга имкон беради.

Анион пероксидаза, шунингдек, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза иштирокидаги жавоб реакциялари сипецификлигини ўрганиш чидамлилиги бўйича фарқланувчи ғўза навларини мобилизациян

имкониятларини аниқлашга ёрдам берди. Чидамли ғўза навларида анион изопероксидазанинг фаоллиги патогенезда бир неча бор кўтарилиши ва унинг микдорий таркибини ортишини ҳисобга олиб ушбу изопероксидазалар ғўзанинг фитопатогенларга нисбатан чидамлилигини

белгиловчи маркер сифатида хизмат қилади дейиш мумкин. Ғўзанинг вилтга чидамли навларидан (Наманган-77) анионли пероксидазаларни ажратиш ва тозалаш, ўз навбатида улардан ғўзанинг вилтга чидамлилигини аниқловчи тест-тизимини яратиш мақсадида фойдаланиш имконини беради.

Иммунохимевий усулда анионли пероксидазаларни маркер сифатида қўлланилиши ғўза селекциясида қўлланиладиган усулларга нисбатан анча аниқ ва такрорий усуллардан ҳисобланади.

Илк бор ғўзанинг 7 кунлик ниҳоллари уруғпалла баргининг ҳужайраолди анион пероксидазасини ажратиб олиш усули ишлаб чиқилди ва ўзлаштирилди. Ажратиб олиш жараёнининг барча тозалаш босқичларида фермент фаоллиги сақланиб қолинди.

Юқори тозалikka эга хитин-специфик пероксидазалар препаратини олиш бизга ферментнинг физик – химевий хусусиятларини ўрганиш имконини берди.

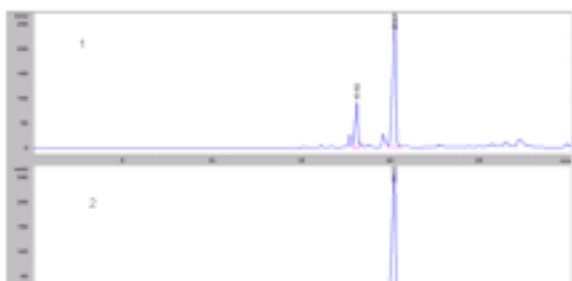
Ажратиб олинган пероксидаза изоформалари молекуляр массаси электрофорез усулида аниқланди. Электрофорез маълумотларига кўра уларнинг молекуляр массалари 93,5 ва 85,0 кДа, изоэлектрик нуқталари эса мувофиқ равишда pI 3,5 ва 3,9 ни ташкил этди. Ғўза ниҳолларининг хитин специфик изопероксидазалари учун гваяколнинг субстратга нисбати чизиқли боғлиқлигидан топилган K_m нинг сонли қиймати $2,9 \pm 0,6 \cdot 10^{-4}$ М ни ташкил килди.

Ғўзанинг чидамли ва чидамсиз навларининг тозаланган хитин специфик анионли пероксидазалари *V.dahliae* АН-3 вирулент штамми газонида фунгистатик фаолликка эга эканлиги аниқланди. Аниқланган ғўза анионли пероксидазасининг фунгистатик хусусиятлари бошқа изоформалар ичида айнан улар соғлом ҳужайраларда фитопатогеннинг тарқалишига тўсқинлик қилади ва замбуруғнинг ривожланишига қарши таъсир қилади деган тахминни беради.

Иммун-ферментли таҳлил (ИФТ) усулида фойдаланиш мақсадида юқори специфик антитаначаларни олиш учун хитин-махсус пероксидазалар ПААГ пластиналаридан гомоген холда препаратив ажратиш усулида ажратиб олинди. Ажратилган пероксидаза изоформларининг гомогенлиги Капилляр электрофорез усули ёрдамида тасдиқланган (3-расмга қаранг).

Расмдан кўриниб турибдики, ажратиб олинган ҳужайраолди пероксидазалар улар учун специфик бўлган субстрат гваякол билан бўялиши ёрдамида индивидуал изоформаларнинг тозалигига ишонч ҳосил қилинган.

Демак, бу услуб юқори даражада тозаланган пероксидазанинг индивидуал хитин-специфик изоформаларини ажратиб олиш ва улардан поликлонал антитаначаларни олишда қўллаш имконини беради. Ғўза анион pI 3,9 изоформасига антитело олинди.



А Б

3-расм. Ғўза пероксидазаси хитин-махсус изоформаларини изоэлектрофокуслаш (А) ва капилляр электрофорез (Б) усуллари билан таҳлил қилиш: А) 1 - маркерлар аралашмаси; 2 - бошланғич фракция; 3 - pI 3,9 ли изоформа; 4 - pI 3,5 ли изоформа (СВВ 250 кумаси билан бўйланган); 5 - бошланғич фракция; 6 - pI 3,9 ли изоформа; 7 - pI 3,5 ли изоформа (гваякол билан бўйланган). Б) 1 - хитин-махсус пероксидазанинг изоформлари ажратилишидан аввалги фракцияси; 2 - pI 3,9 изоформа; 3 - pI 3,5 изоформа.

Диссертациянинг «**Вилтга чидамли ғўза навини аниқлашнинг тест тизимини ишлаб чиқиш**» деб номланган тўртинчи бобида ғўзанинг анион хитин-махсус пероксидазаларига поликлонал антитаначалар олиниш, антитаначаларнинг чидамсизлигини ўрганиш, физик-кимёвий омилларини иммун-ферментли таҳлилнинг сезгирлигига таъсири, ишлаб чиқилган тест тизими бўйича селекция амалиётида вилтга чидамли ғўза навлари, турли дурагай тизмаларининг чидамлилигини синашга таълуқли иммунологик тадқиқотлар натижалари келтирилган.

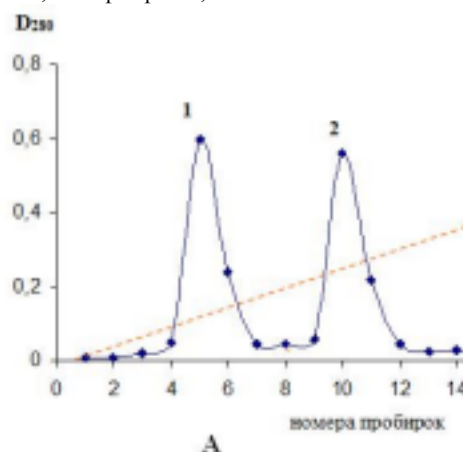
Ғўзанинг гомоген анионли (pI 3,9) изопероксидазасига қуёнларни эмлаш орқали уларнинг қон зардобидан поликлонал антитаначалар (ПкАТ) олинди. Қуён зардобидаги антитаначалар титри ИФТнинг бевосита усули ёрдамида аниқланиб, 1×10^6 ни ташкил этиши кўрсатилди. ажратиш ва тозалаш ишлари бир неча босқичда олиб борилди. Қуён зардобидан ПкАТ икки мартта аммоний сульфатнинг тўйинтирилган эритмасида чўктириш йўли билан ажратиб олинди. Кейинги босқичда тузсизлантириш ўтказилиб ва иммуноглобулин (IgG) фракцияси NaCl концентрациясининг 0,3 М гача бўлган Na-фосфатли буфер эритмасидаги градиентида Sartobind D15 анион алмашинув мембранаси (Германия) ёрдамида ажратиб олинди (4-расмга қarang).

Натижада, ғўза пероксидаза анион изоформасига юқори тозаликка эга IgG ажратиб олинди ва лиофил қурилди. Тозаланган IgG сезгирлиги 0,1 мл ўсимлик экстрактида 3-4 нг антиген аниқлаш имконини беради. Специфик бўлмаган (носпецифик) боғланиш 0,05-0,10 ОЕ₄₀₅ дан ошмади. Олинган натижалар асосида хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки, ПКАТ ғўзанинг

баҳолашда қаттиқ фаза ИФТ ини ишлаб чиқишда қўллаш учун мос келади.

pH 8,0 Na-фосфат 0,3 М

буфер эритмасни чизикли градиент^{II}



0,02 М

4-расм. Қуён қон зардобидан Sartobind D15 анион-алмашинув мембранасида иммуноглобулинларни ажратиш олиш: А -мембранада элюциялар профил; Б -10%ли ДСН-ПААГда олинган антизардоб фракцияларининг электрофореграммаси: 1 - тозаланган иммуноглобулин; 2 - иммуноглобулинларнинг қолган қисми, бошқа зардоб оқсиллари билан аралашган ҳолда; 3 -маркерлар.

ИФТни поликлонал вариантида олиб бориш услубига эътиборни қаратдик, сабаби ушбу услуб иқтисодий жиҳатдан қулай вариант бўлиб, антитаначаларни олиш учун ҳеч қандай махсус шарт-шароитларни талаб қилмайди. Баъзи муаллифларнинг маълумотларига кўра, поликлонал антитаначалардан «подложка», яъни пластик планшетнинг тубига биринчи қават сифатида ёки ферментли конъюгат ўрнида фойдаланилганида, аниқлаш сезгирлигини оширади ва шу билан бирга моноклонал антитаначаларга хос бўлган «тор» махсусликни бартараф этади.

ИФТнинг асосий таркибий қисми бўлган конъюгатни олиш учун антизардоб аммоний сульфатда фракцияланганидан сўнг олинган ПкАТдан фойдаланилди. Бу конъюгатли антитанача-антигенлар комплекси пайдо бўлиши эҳтимolini оширишга имкон беради.

Тажрибалар давомида тўғри бўлмаган иммун-ферментли таҳлил ўтказилишининг оптимал кўрсаткичлари аниқланди: сорбцияловчи антитаначаларнинг биринчи қатлами «подложка»да - антитаначалар миқдори 5 мкг/мл, инкубация вақти +4°C ҳароратда 18 соат; сорбцияловчи антитаначаларни суялтириш учун буферли эритмалар таркиби - 0.02 М, pH 9,6 карбонат-бикарбонат буферли эритма; бўш боғларни тўлдириш ва таҳлил чидамсизлигини оширувчи («фон»нинг пасайиши) ювиш босқичлари учун - 1% БСА 0,15 М NaCl 0,05% твин-20 pH 7,2 фосфатли буферли эритма; конъюгат эритилиши учун - таркибида 5% БСА, 0,05% твин-20, 0,01М MgCl₂ бўлган 0,05 М ТРИС-буферли эритма (pH 8,0); IgG-ишқорли фосфатаза

конъюгатининг ишчи эритмаси 1:2000ни ташкил этган.

18

Шу тарика, хитин-махсус изопероксидазанинг миқдорий аниқланиши асосида ғўзанинг вилтга чидамлилигини баҳоловчи тест-тизими ишлаб чиқилди. Тест-тизими қисқа вақт (10-12 кун) ичида чидамли ўсимликларни саралаб олишга имкон яратади, бу эса ўта қисқа муддатда салмоқли миқдордаги материалларни текшириб кўриб, якуний баҳолаш учун истиқболли шаклларни ажратиб олишга имкон беради.

Илк бор ғўза селекцияси амалиётида яратилган тест-тизими асосида ғўзанинг турли дурагай тизмалари, навларининг вилтга чидамлилиги аниқлаб берилди. Ғўзанинг вилтга чидамлилигини аниқлашда олиб борилган дала шароити натижалари лаборатория таҳлил натижалари тўғрилигини тасдиқлади. Чидамлилик маркерлари асосида биокимёвий баҳолаш технологияларини селекцион жараёнларга қўллаш, селекция вақтини сезиларли даражада қисқартиради, ва система унумдорлигини ошириб, натижаларни субъектив баҳолаш эҳтимоллигини камайтиради, чидамлилик белгилари бўйича селекциянинг эрта босқичларида генотипларни саралаш имконини беради. Селекция, уруғчилик ва пахта етиштириш агротехнологияси илмий тадқиқот институтида (ИТИ) апробацияси асосида ғўзанинг 200 дан ортиқ тизма ва навлари намуналари таҳлили олиб борилди.

Диссертациянинг «Ғўза фитопатогенлари *Verticillium dahliae* ва *Fusarium oxysporum* ларга чидамлилик индукторлари сифатида глицирризинатлар таъсири» деб номланган бешинчи бобида ғўзанинг фитопатогенларга чидамлилигини бошқариш мақсадида глицирризин кислота препаратлари: рухли, магнийли, моноаммонийли тузи ва унинг салицил кислота билан супромолекуляр комплексининг фитоиммунитет ферментларига таъсир кўрсатиш механизмини аниқлаш, глицирризин кислотаси препаратларининг кичик концентрацияларини ғўза ниҳолларидаги АБК, ИУК ва СК фитогормонларнинг таркибий миқдорига таъсирини ўрганиш, *V.dahliae* билан зарарланган ғўза ниҳоллари ва каллусларидаги цитофизиологик жараёнларга салицил кислотанинг, шунингдек чигитларни глицирризин кислотаси препаратлари (ДАГ-1, ДАГ-2) билан ишлов берилганда ғўза фитоиммунитети ферментларининг фаоллигига пролонгирланган таъсирини аниқлаш юзасидан тадқиқотлар баён қилинган.

Ўсимликлар метаболизмига чидамлилик индукторларининг таъсири биологияда энг кам ўрганилган муаммолардан биридир. Шу билан бирга бундай бирикмаларни қўллаш назарий ва амалий аҳамиятга эга бўлиб, ушбу таъсир механизми қонуниятлари аниқланган ҳолдагина ўсимликларни касалликларга чидамлилигини молекуляр даражада бошқариш усуллари ва воситалари ишлаб чиқишга имконият яратилади.

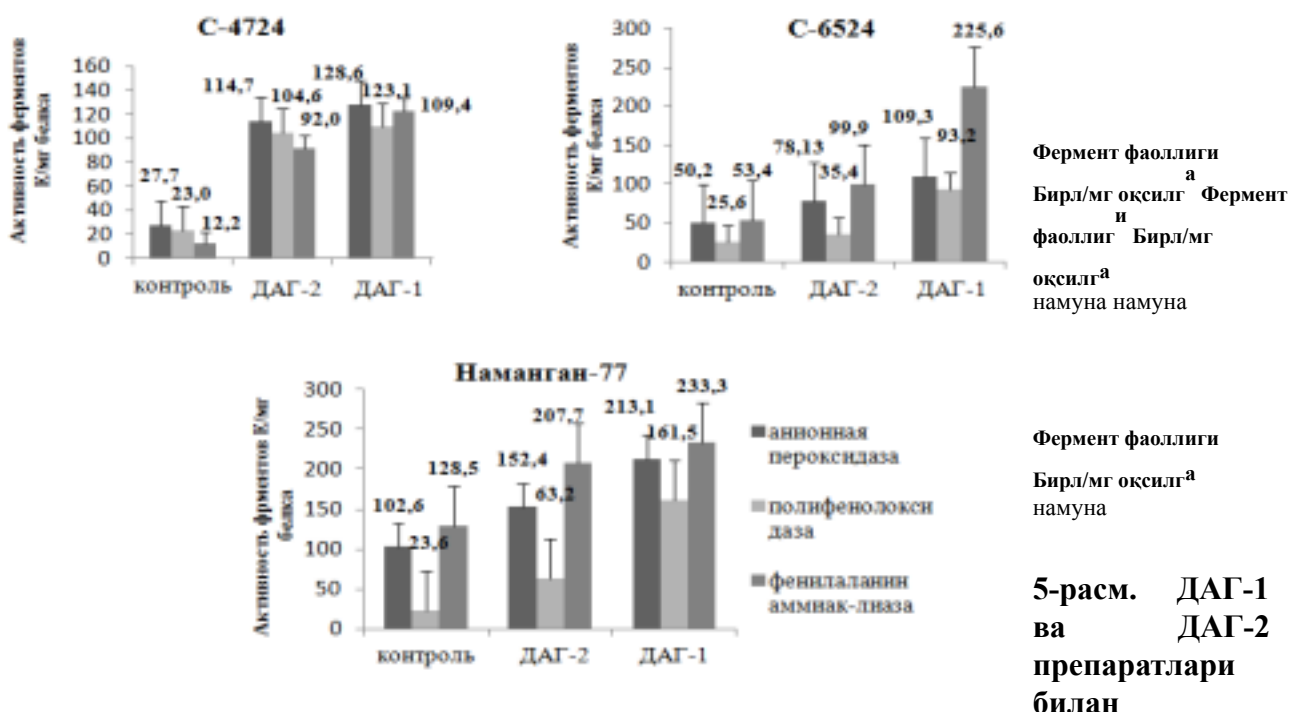
Ўсимликларнинг физиологик ҳолатини намоён қилувчи кўрсаткичлар про-/антиоксидант (пероксидаза) тизими ва фенол алмашинуви (полифенолоксидаза, фенилалани аммиак-лиаза) ферментлари ҳисобланади.

Улар ғўзани препаратлар билан ишлов беришдан олдинги ва ишлов берилгандан кейинги ҳолатлари, патогенлар таъсир қилганида қанчалик стрессга дучор қилинганлиги ва чидамлилигини қанчалик сақлаб қолинишини баҳолашга имкон беради.

19

Биоорганик кимё институтида қизилмия (*Glycyrrhiza glabra* L) илдизидан глицирризин кислотаси асосида глицирризин кислотасининг магнийли, рухли, моноаммонийли тузлари ва унинг салицил кислотаси билан супрамолекуляр комплекси олинди. Биринчи бор ушбу препаратлар *V. dahliae* ва *F. oxysporum* замбуруғларига чидамлилиги жиҳатидан фарқланувчи чидамли Наманган-77, ўртача чидамлиликка эга С-6524, чидамсиз С-4727 ғўза каллуслари ва ниҳолларидаги фитоиммунитет ферментлари (пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза) фаоллигига таъсири ўрганилди. Иммуно ферментлари фаоллигига таъсир этувчи самарали концентрация 10^{-7} М эканлиги тажриба йўли билан аниқланди.

Ўза каллуслари ва ниҳолларида олиб борилган тажрибалар глицирризин кислотасининг ўрганилган тўртта препаратларидан глицирризин ва салицил кислоталарининг супрамолекуляр комплекси (ДАГ 1) ва глицирризин кислотанинг моноаммонийли тузи (ДАГ-2) юқори индуцирловчи фаолликка эга эканлигини кўрсатди. Препаратлар *F. oxysporum* билан зарарланган ўзанинг чидамсиз С-4727 ва ўртача чидамли С-6524 навларида носпецифик системик чидамлиликини шакиллантириб, фитоиммунитет ферментлари



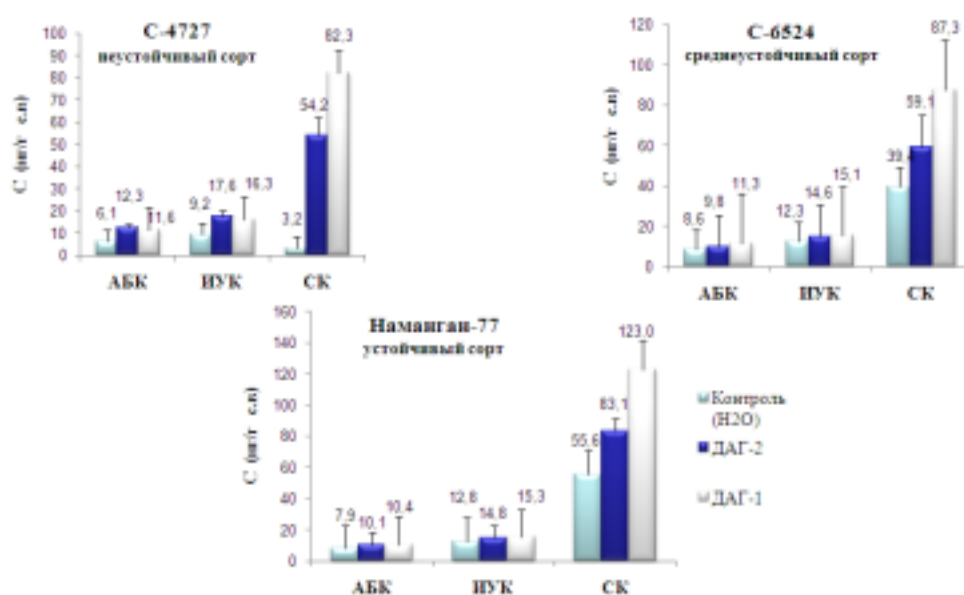
ишловланган ва *F. oxysporum* таъсир эттирилган ўзанинг турли навларида анион пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза ферментларининг фаоллиги.

Ўсимликлардаги ферментлар фаоллигини бошқарувчи дастлабки системалар қаторига стресс таъсирларга қарши адаптив жараёнлар

ривожланишини бошқарувчи фитогормонлар киради. Шунга мувофиқ фитопотогенларга резистентлиги жиҳатидан фарқланувчи ғўзанинг этиолирланган 7-кунлик ниҳоллари таркибидаги абсцис кислота (АБК),

20

индолилуксус кислота (ИУК) ва салицил кислотаси (СК) фитогормонлари миқдорида ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратлари таъсири ўрганилди. Олинган натижалар, ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратлари билан ишлов берилган ғўза ниҳолларидаги СК миқдори назоратга нисбатан бир неча мартта ошиб боришини кўрсатди (6-расм). Чидамсиз С-4727 ва ўртача чидамли С-6524 навларининг бу кўрсаткичлари Наманган-77 чидамли нави кўрсаткичларига мос равишда яқин келди.



6-расм. 10^{-7} М концентрациядаги ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратлар билан ишловланган ғўзанинг С-4727, С-6524, Наманган-77 навлари ниҳолларида АБК, ИУК ва СК фитогормонлар миқдори.

Шу билан бир қаторда ДАГ-2 препарати ғўзадаги фитогормонлар мувозанатини кўзғалиши, унга боғлиқ параллел АБК ва ИУК тўпланишига сабаб бўлди, бу эса ғўза учун қулай омил бўлиб хизмат қилди. ДАГ-2нинг ривожланишни стимуловчи таъсири унинг ИУК миқдорида таъсири билан боғлиқ бўлиб, каллус хужайраларининг ўлчамлари ва митотик фаоллиги назоратдагиларга нисбатан кучайишида намоён бўлган. Препаратлар таъсирида бу фитогормонлар миқдорининг ошиши, эхтимол, турли хил стресс таъсирларга ғўзанинг мослашиши ва уларни шикастловчи таъсир кучини пасайишига имкон бериши мумкин.

Ўсиш жараёнларининг кучайиши ва вилтга чидамлиликини индуцирланиши биокимёвий реакцияларнинг интенсивлигининг ўзгаришига боғлиқ. Олиб борилган тажрибалар давомида, экзоген СК нинг турли хил концентрациялари (0,001; 0,01; 0,1 мМ) таъсирида *F. oxysporum* иштирокидаги иммун ферментлари фаоллигининг ортиши кузатилди. Бунда

олинган тахлил натижалари 0,01 мМ концентрацияда энг кўп самарага эга эканлигини кўрсатди (1 – жадвалга қаранг).

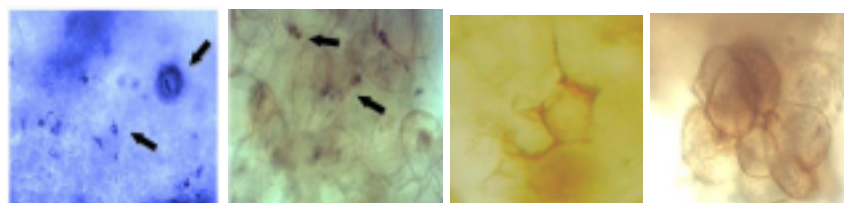
21

1-жадвал

Вўза ниҳолларига салицил кислота (СК) *F. oxysorum* билан бирга таъсир эттирилганида, хужайра ташқарисидаги анионли (хитин-махсус) пероксидаза фаоллиги ($M \pm m$, $n = 10$, $P < 0,05$)

7-сут. проростки хлопчатника	Удельная активность хитин-махсус пероксидазы Е/мг белка		
	Контроль, H ₂ O	Концентрация СК при обработке семян 0,01мМ	Обработанные СК и инфицирование <i>F.oxysorum</i> (3сут)
С-4727	18,5 ± 15,2	35,8 ± 17,5	48,3 ± 25,4
С-6524	26,7 ± 9,6	85,6 ± 21,6	92,7 ± 17,2
Наманган-77	26,2 ± 9,5	105,6 ± 8,3	135,2 ± 21,6

Ушбу ўзгаришлар СК билан апопластнинг анионли пероксидазалари ўзаро таъсирга киришгани туфайли юзага келган бўлиши мумкин (7-расмга қаранг).



а б в з

7-расм. Салицил кислота билан ишлов берилган ўзанинг ниҳоллари ва каллусларида хужайраолди пероксидазаси фаоллиги ҳамда КФШ тўпланишинининг гистокимёвий таҳлили. Катталаштириш: ок.×40. Вўза тўқималари о-дианизидин + H₂O₂ билан бўялган. а - ўзанинг гипокотили хужайраларидаги пероксидаза фаоллиги; б - ўза каллус хужайраларидаги пероксидаза фаоллиги; в - уруғпалла хужайраларида КФШ тўпланиши; з - каллус хужайраларида КФШ тўпланиши.

Хужайраолди пероксидазанинг тўпланганлиги ўза тўқималарини о дианизидин + H₂O₂ билан бўяш ёрдамида аниқланди. СК билан ишлов берилган барча ўрганилаётган навларнинг ниҳоллари ва каллусларидаги хужайраолди пероксидаза фаоллиги хужайра деворлари ва некроз ҳудуди кўнғир рангга киришига олиб келди. Кузатилаётган СК муҳотида ўсаётган зарарланган каллусларнинг ҳолатидаги ўзгаришлар СК таъсири остида ҳимоя реакциялари ривожланувчи, қисман хужайра деворлари лигнификациясига олиб борувчи жараёнлардир.

Кузатилаётган СК муҳотида ўсаётган зарарланган каллусларнинг

ҳолатидаги ўзгаришлар СК таъсири остида ҳимоя реакциялари ривожланувчи, қисман ҳужайра деворлари лигнификациясига олиб борувчи асоратлардир. СК апопласт пероксидазалар (ҳужайра ташқарисидаги пероксидаза) билан ўзаро таъсирга киришиб, уларнинг каталитик фаоллигини ўзгартиради, H_2O_2 ишлаб чиқарилишини кучайтиради, бу эса ҳужайра деворларининг лигнификацияси ёки замбуруғнинг инфекцион структураларига бевосита яқин бўлган ҳужайралар некрози ривожланиши ҳисобига қалинлашишига олиб келади.

22

2-жадвал

Чигитга экилишидан олдин $M 10^{-7}$ концентрацияда глицирризинатлар билан ишлов берилганда, 30 кунлик ғўза ниҳоллари илдизидаги фитоиммунитет ферментларининг пролонгирловчи фаоллиги ($M \pm m$, $n = 10$, $P < 0.05$)

Тажриба вариантлари	Хитин-махсус пероксидаза, Е/мг	полифенолоксидаза, Е/мг	Фенилаланин аммиак-лиаза, Е/мг
С-4727			
назорат	$171,59 \pm 5,4$	$237,44 \pm 0,16$	$52,95 \pm 2,7$
ГК/СК (ДАГ-1)	$318,44 \pm 6,2$	$623,85 \pm 0,25$	$714,17 \pm 0,5$
$Na_4Zn(ГК)$	$127,89 \pm 7,5$	$220,64 \pm 0,19$	0,00
$NH_4(ГК)_2$ (ДАГ-2)	$287,87 \pm 8,3$	$494,17 \pm 0,15$	$419,68 \pm 0,12$
ГК	$304,95 \pm 9,6$	$417,78 \pm 0,13$	0,00
$Mg(ГК)_2$	$129,80 \pm 7,1$	$214,45 \pm 0,12$	0,00
С-6524			
назорат	$182,7 \pm 7,3$	$569,08 \pm 0,32$	$29,8 \pm 1,32$
ГК/СК (ДАГ-1)	$185,11 \pm 7,5$	$760,76 \pm 0,56$	$125,0 \pm 7,9$
$Na_4Zn(ГК)$	$224,68 \pm 9,6$	$963,52 \pm 0,48$	$08,1 \pm 0,06$
$NH_4(ГК)_2$ (ДАГ-2)	$737,53 \pm 11,8$	$316,57 \pm 0,78$	$37,0 \pm 2,1$
ГК	$212,77 \pm 7,9$	$259,38 \pm 0,86$	0,00
$Mg(ГК)_2$	$53,45 \pm 4,3$	$626,24 \pm 1,12$	0,00
Наманган-77			
назорат	$349,82 \pm 3,2$	$356,07 \pm 1,25$	$20,68 \pm 0,96$
ГК/СК (ДАГ-1)	$238,55 \pm 8,4$	$556,70 \pm 7,6$	$101,2 \pm 6,2$
$Na_4Zn(ГК)$	$507,02 \pm 2,8$	$284,05 \pm 5,6$	0,00
$NH_4(ГК)_2$ (ДАГ-2)	$492,80 \pm 7,0$	$278,08 \pm 4,8$	$91,88 \pm 4,4$

ГК	320,48 ± 2,1	410,64 ± 3,7	0,00
Mg(ГК) ₂	309,46 ± 2,4	400,25 ± 5,1	0,00

Кейинги кузатишларда, яъни чигит экилганидан сўнг 30 кунгача ғўза ривожланиши динамикасида, глицирризин кислотанинг тўрт хил препаратлари фитоиммунитет ферментлар фаоллигига пролонгирловчи таъсири ўрганилди (2-жадвалга қаранг).

Бунда чигитлари ДАГ-1 (ГК/СК 2:1) ва ДАГ-2 (NH₄(ГК)₂) препаратлари билан ишловнган 30 кунлик ғўза ниҳоллари илдизларидаги пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза фаоллиги назорат ва глицирризин кислотаси, унинг рух ҳамда магнийли тузлари билан ишловланган ғўзанинг навларига нисбатан 30 кунгача юқори ҳолатда бўлди.

Ўзани ривожланиш динамикасида кузатилган ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларининг пролонгирловчи фаоллиги уларнинг фитоиммунитет ферментларига индуцирловчи таъсир кўрсатишини яна бир бор тасдиқлади.

ЎзР СҚХВ Ўза етиштириш селекцияси, уруғчилик ва агротехнология илмий-текшириш институти билан ҳамкорликда Тошкент вилояти Оққўрғон вилоятидаги «С. Сегизбаев» фермер хўжалигида олиб борилган амалий ишлар нафақат ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларини ҳимояловчи ва индуцирловчи таъсир этиши, балки ғўзанинг хўжалик жиҳатидан қимматли белгиларини яхшилашини кўрсатди (3-жадвалга қаранг).

23

3-жадвал

Глицирризин кислота препаратларининг ғўзани хўжалик жиҳатидан қимматли белгиларига таъсири (M±m, n=10)

Тажриба вариант-лари	Биринчи чаноклар-нинг очилиш санаси, (сан/ой)	Ўсимликнинг баландлиги (см)	Ўсимлик даг и жами чанок-лар, 08да	Жами очилган чанок-лар, 15.08да	<i>V.dahliae</i> билан зарарланиш, 15.09да балл*
С-4727					
Намуна	10.08.2015	98±1,90	17 ± 0,80	10 ±0,58	4,14 ± 0,53
ДАГ-1	09.08.2015	101±1,75	19 ± 0,70	14 ±0,59	1,8 ± 0,29
ДАГ-2	10.08.2015	102±1,35	20 ± 5,17	15 ± 0,46	1,3 ± 0,23
С-6524					
Намуна	08.08.2015	80 ± 5,06	19 ± 1,41	15 ± 0,62	3,2 ± 0,11
ДАГ-1	08.08.2015	101,3 ± 2,91	21 ± 0,70	16 ± 0,60	0,6 ± 0,22
ДАГ-2	08.08.2015	107 ± 2,03	24 ± 0,51	17 ± 0,37	1,1 ± 0,16

Наманган-77					
Намуна	09.08.2015	103,6± 2,23	22 ± 0,78	15 ± 0,82	1,1 ± 0,16
ДАГ-1	09.08.2015	104,1±13,98	22 ± 1,36	15 ± 0,55	0,5± 0,44
ДАГ-2	09.08.2015	110,1±11,04	25 ± 0,47	19 ± 0,37	1,0 ± 1,94

Изоҳ: тажрибанинг барча вариантларида 10 ўсимликдан иборат(n=10), камида уч маротаба қайтариқларда бажарилган, назоратдан ишонарли фарқи $P<0.01$; *- вилт индекс дала шароитида ўсимликларни вилт билан зарарланиш меъзони.

Вўза навларининг хўжалик жихатидан қимматли белгиларини кучайтириши ва чидамлилигини ҳосил қилиши бўйича олинган натижалар таҳлили чигитларни экиш олдидан глицирризин кислота препаратлари - ДАГ-1 ва ДАГ-2 билан ишлов берилиши иммунитетни индукцияловчи ва ўсиш ва ривожланишни стимулловчи таъсир кўрсатиши, бу эса пировардида ўза ҳосилдорлиги ортишига олиб келиши аниқланди.

ЎЗР Давлат кимёкомиссия томонидан ваколат берилган ташкилотлар томонидан (ЎЗР СҚХВ Вўза етиштириш селекцияси, уруғчилик ва агротехнология илмий-текшириш институти ва Ўсимликларни ҳимоя қилиш институти) ўтказилган мустақил синовлар ва чигитни экишга тайёрлаш олдидан ишлов беришда ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларининг қўлланилиши мақсадга мувофиқлиги ҳақидаги хулоса асосида тегишли гувоҳномалар (23.01.2015., №1 А 946; 09.02.2016., №1 А 1156) берилди ва Ўзбекистон Республикасида рўйхатга олинди.

ХУЛОСАЛАР

1. *V. dahliae* патогенезида ўзанинг иммун ферментлари - пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза фаол иштирокида ўза жавоб реакцияларининг ўзига хос фарқлари аниқланиб, ўзанинг замбуруғли

24

зарарланишга жавобан ҳимоя жараёнларни шаклланишининг бошланғич босқичлари анион пероксидазалар фаоллашуви ва кислороднинг фаол шакллари генерациясига боғлиги исботланиб, олинган маълумотлар асосида келажакда касалликларга қарши чидамлилик механизмини молекуляр даражада бошқаришнинг самарадор восита ва технологияларини ишлаб чиқишга имконият яратади.

2. Патоген замбуруғлар хитинига нисбатан спецификлик намоён қилувчи хусусиятга эга хужайраолди анион пероксидазалари ўзада биотик омиллар таъсирида ҳимоя реакцияларини белгиловчи маркер-фермент эканлиги тасдиқланиб, изонукталари $pI \sim 3,5$ ва $pI \sim 3,9$ ва молекуляр массаси 93,5 кДа ва 85 кДа бўлган иккита гомоген хитин-махсус пероксидазалар ажратиб олинган, уларнинг K_m ва субстратга спецификлиги аниқланиб

ғўзанинг вилтга чидамлилигини баҳоловчи самарали усулни ишлаб чиқишда муҳим аҳамият касб этади.

3. Ғўзанинг $PI \sim 3,9$ гомоген хитин-махсус пероксидазасига поликлонал антитаначалар олиниб, уларнинг спецификлиги ҳамда сезувчанлиги аниқланган. Натижада ишқорий фосфатаза билан антитаначалар конъюгати тайёрланган, иммун-ферментли таҳлил ўтказишнинг оптимал шароитлари танланиб, ғўзанинг чидамли шакиллари тизкор танлаш имкониятини янада такомиллаштиришга хизмат қилади.

4. Илк бор ғўза селекциясида ишлаб чиқилган тест-тизими орқали 200 дан ортиқ элита навлари ва тизма намуналарининг вилтга нисбатан чидамлилиги баҳоланган. Бунда олинган натижалар дала тажриба усули ёрдамида олинган натижалар билан ўзаро мос келиши кўрсатилди, бу эса ғўзанинг янги навлар яратилишини илмий асосда олиб бориш имкониятини яратади ҳамда дала синовларини ўтказиш учун сарфланадиган вақт ва маблағларни иқтисод қилишга хизмат қилади.

5. Ғўза фитоиммунитет ферментлари фаоллигига ДАГ-1 (глицирризин ва салицил кислоталарнинг супрамолекулр комплекси) ва ДАГ-2 (глицирризин кислота моноаммоний тузи) препаратларининг индуцирловчи таъсир кўрсатиши исботланган. Ғўзанинг фитогенларга нисбатан системик чидамлилигини индуцирловчи препаратларнинг мақбул концентрацияси (10^{-7} М) аниқланди, бу эса қишлоқ хўжалиги амалиётида муҳим аҳамиятга эга бўлган нобиоцид табиатли бирикмаларни самарали паст концентрацияларда кенг қўламда қўлланиш истиқболларини очиб беради.

6. ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратларининг паст концентрацияларини ғўза ниҳоллари фитогормонлар - СК, АБК ва ИУК балансига таъсири аниқланган. Препаратларни ғўзани биотик стрессларга адаптацияловчи ва уларни кучини юмшатовчи хусусиятга эга бўлган СК миқдорини ортишига таъсир этиши аниқланиб, иммуномодуляторлик хоссаларни намоён қилувчи препаратларнинг янги авлодини яратишни янада такомиллаштиришга хизмат қилади.

7. СК хужайра жавоб реакцияларида қатнашувчи анион пероксидазанинг ҳамда СК янги молекулаларини синтезланишида иштирок этувчи фенилаланин аммиак-лиаза ферментларининг фаоллашувини стимуллани

25

аниқланиб, ғўзадаги иммун ферментларининг фаоллашувига ДАГ-1 препарати таркибига кирувчи СК жавобгар эканлиги исботланган. 8. Экиш олдида чигитга ДАГ-1 и ДАГ-2 препаратлари билан ишлов берилиши фитоиммунитет ферментлари - пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза фаолликларига юқори пролонгирловчи таъсир кўрсатиши (30 кунгача) аниқланиб, глицирризинатларнинг индуцирловчи ва ҳимоя хусусиятларини белгилайди. Олинган натижалар табиий асосга эга препаратлардан ғўзанинг носпецифик чидамлилик индукторлари сифатида фойдаланишнинг янги концепциясини ривожлантиришга хизмат қилади. 9. ДАГ-1 ва ДАГ-2 препаратлари ғўзанинг ҳосилдорлигига, хўжалик жиҳатидан

қимматли белгиларига, унинг фитоиммунитетини ҳимоясини кучайтирувчи таъсир этган, препаратлар ўртача чидамли ва чидамсиз навларини вилт билан зарарланишини камайтириб, қишлоқ хўжалиги экинларини муҳитнинг ноқулай таъсиротларидан ҳимоялашдаги комплекс тадбирларнинг бирига айланишига имконият яратади.

ХАШИМОВА НИГОРА РУСТАМОВНА

**МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ
ХЛОПЧАТНИКА К ФИТОПАТОГЕНАМ И ПУТИ ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ
НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

**02.00.10 – Биоорганическая химия
(биологические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

27

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за 30.09.2014/В2014.3-4.В3.

Докторская диссертация выполнена в Институте биоорганической химии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещен на веб-странице Научного совета по адресу (<http://ss.biochem.uz>) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу (www.ziyo.net).

Научный консультант: Ахунов Али Ахунович

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Тилябаев Заитжон

доктор биологических наук, профессор

Турдикулова Шахлохон Уткуровна

доктор биологических наук, доцент

Цеомашко Наталья Евгеньевна

доктор биологических наук

Ведущая организация: Институт микробиологии

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в __ часов на заседании разового Научного совета 14.07.2016.К/В/Т.13.01 при Институте Биоорганической химии и Национальном университете Узбекистана. (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии. Адрес: 100125, г.Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан: «__» _____ 2016 года
(реестр протокола рассылки №__ от «__» _____ 2016 года).

А.С. Тураев

Председатель разового Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.х.н., профессор

М.И. Асраров

Учёный секретарь разового Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.б.н., профессор

Д.А. Кадырова

Председатель разового научного семинара при разовом
Научном совете по присуждению ученой степени
доктора наук, д.б.н.

Актуальность и востребованность темы диссертации. Во всех хлопкосеющих странах мира одной из основных проблем при возделывании хлопчатника на сегодняшний день является его поражаемость фитопатогенами, которые наносят значительный ущерб сельскому хозяйству. Разработка эффективных технологий ускорения селекционного процесса за счет использования маркер ассоциированных биохимических, молекулярно генетических методов, позволяющих возделывать новые сорта с признаком резистентности к фитопатогенам, а также повышение общей неспецифической устойчивости хлопчатника к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам путем индукции природных защитных механизмов являются одним из экологических и эффективных методов защиты хлопчатника.

С приобретением независимости республики успехи в повышении урожайности хлопчатника, внедрение в хлопководство научных достижений современных наук - молекулярной биологии, биотехнологии и биоорганической химии привели к определенным результатам. При этом особенно важно отметить выявление роли различных биохимических систем в регуляции защитных реакций, усовершенствование экологизированных методов (маркер ассоциированных тест-систем и др.) и средств (применение агропрепаратов на основе природных биологически активных соединений), стабилизирующих продуктивность хлопчатника.

На сегодняшний день, биохимические основы иммунитета растений, повышение устойчивости хлопчатника к патогенам за счет стимулирования и управления иммунной системы с помощью биологически активных соединений являются актуальными задачами современной биологии во всем мире. Оценка состояния ферментной системы хлопчатника, участвующей в защитных реакциях при инфицировании растений грибными патогенами, выявление молекулярных маркерных структур, разработка иммуноферментного метода, выявление механизмов индуцированной устойчивости, активирование генетического потенциала защитных средств хлопчатника, разработка технологии повышения устойчивости хлопчатника на основе применения препаратов глицирризиновой кислоты являются актуальными задачами.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Законе Республики Узбекистан «О защите сельскохозяйственных растений от вредителей, болезней и сорняков» (2000), постановлением Кабинета Министров Республики Узбекистан от 29 марта 2004 г. №148 «О мерах по совершенствованию структуры и повышению эффективности службы защиты растений», «Дорожной карте реализуемых программ мероприятий по модернизации и развитию сельского хозяйства на 2016-2020 года» от 07.02.2016 г, утвержденный Кабинетом Министров, а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии приоритетного направления развития науки и технологий республики V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и защита окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации.

¹Научные исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов индуцированной устойчивости осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, Institute of Cotton Research (Китай), Agricultural Research Centre, Гиза (Египет), The University of Burdwan (Индия), Auburn University (США), Tottori University (Япония), Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра (Россия), Институт клеточной биологии и генетической инженерии (Украина).

В результате исследований, проведенных в мире по определению физиолого-биохимических механизмов индуцированной устойчивости сельскохозяйственных культур против фитопатогенов, получены ряд научных результатов, в том числе: выявлены молекулярные основы регуляторной сети, возникающей в процессе взаимодействия *Gossypium thurberi* - *V. dahliae* в гипокотилиях хлопчатника, в биосинтезе и накоплении лигнина при участии пероксидаз, которые обеспечивают болезнеустойчивость растений (Institute of Cotton Research, Китай); выявлены степени проявления признаков устойчивости в гибридах нута и закономерности их сохранения в последующем поколении при обработке индукторами устойчивости (Agricultural Research Centre, Египет); научно обоснованы биохимические изменения под воздействием *F. oxysporum* в инокулированных растениях, где в устойчивых видах возрастает пероксидазная, полифенолоксидазная и фенилаланин аммиак-лиазная активность (The University of Burdwan, Индия); доказано существование у растений сложной каскадной системы защитных механизмов, которых возможно регулировать химическими соединениями, стимулирующих иммунную систему растений (Auburn University, США); получены нановолокна хитина, обладающие хорошей растворимостью в воде, индуцирующие формирование активных форм кислорода и экспрессию хитин-индуцируемых генов в ростках *Arabidopsis thaliana* (Tottori University, Япония); созданы биохимические способы индуцирования болезнеустойчивости сельскохозяйственных культур на основе не биоцидных природных соединений (Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра, Россия); разработаны новые препараты, основанные на индуцировании устойчивости с помощью определенных

—¹ Литературный обзор зарубежных научных исследований проведен на основе <http://search.ebscohost.com/>,

классов соединений биогенного происхождения (Институт клеточной биологии и генетической инженерии, Украина).

В мире по комплексному изучению биохимических механизмов индуцированной устойчивости и возможных путей ее регуляции по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: создание новых линий и сортов хлопчатника с ценными хозяйственными характеристиками устойчивости к неблагоприятным факторам среды; выявление болезнеустойчивых генотипов на основе селекционных и нетрадиционных биохимических маркер ассоциированных методов; разработка методов повышения устойчивости растений на основе применения биологически активных веществ и микроэлементов, повышающих иммунный потенциал; разработке научно обоснованных рекомендации по возделыванию их в различных почвенно-климатических регионах, где наблюдается повышенный инфекционный фон и дефицит влаги.

Степень изученности проблемы. Зарубежными учёными S.Carpin, M. Crevecœur, M. de Meyer, P. Simon, H. Greppin, C. Penel, E. Delannoy, C.M. Alba, L.M. Lagrimini, Y.F. Cai, J.H. Christensen, G.Bauw, K.G. Welinder, M.van Montagu, W. Boerjan выявлены свойства изопероксидаз в защитных механизмах растений к фитопатогенам, где активность фермента прямо коррелирует с уровнем индуцированной устойчивости и может служить маркером резистентности растений. Согласно исследованиям олигомеры хитина (компонент клеточной структуры грибов) активируют транскрипцию множества генов, среди которых наиболее чувствительны гены, кодирующие стрессовые белки – хитиназы, участвующие в деградации клеточных стенок патогена; пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиаза – непосредственно участвующие в формировании лигнина, фитоалексинов, флаваноидов и синтезе салициловой кислоты. Выявлены соединения, индуцирующие начальные этапы сигнальных путей при действии на растения элиситоров без инфицирования патогенами. Такие растения отвечают на последующее заражение патогенами быстрее и эффективнее.

В странах СНГ проводятся исследования, посвященные выяснению механизмов функционирования защитных белков растений при контакте с патогенами и путей включения ответных реакций растений на появление сигнальных молекул, способствующих эффективному управлению фитоиммунитетом; концепции индуцированной устойчивости, результаты которых наблюдаются в научных публикациях И.В. Максимова, Е.А. Черепановой, Р.М. Хайруллина, В.А. Андреевой, Л.Г. Яруллиной, С.Л. Тютерева, Л.И. Ильинской, И.А. Тарчевского, Л.Ф. Горового. Среди них активно изучается физиологическая роль биогенных элиситоров (хитин, глюкан и их олигомеры), фитогормонов и салициловой кислоты.

Исследования, проведенные в нашей республике в научных

учреждениях по изучению молекулярных маркеров, основанных на полиморфизме фрагментов ДНК (И.Й. Абдурахмонов), использованию спектра белков и изоэнзимов оксидоредуктаз, как диагностический признак

31

проявления иммунитета (Р.К. Шадманов, Ш. Юнусханов), разработке препаратов на основе хитозана в качестве иммуностимуляторов на посевах хлопчатника, зерновых, картофеля (С.Ш. Рашидова, М.Х. Авазходжаев) научно обоснованы.

Актуальны и имеют научно-практическое значение в хлопководстве разработка экспресс-метода оценки растительного материала к фитопатогенам, создание иммуностимуляторов для поддержания толерантности хлопчатника на длительное время, однако на данный момент практически отсутствуют сведения касающиеся выяснения механизмов их действия и методов достоверной оценки эффективности новых средств для защиты хлопчатника.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами научно-исследовательского учреждения, где выполнена работа. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ Института биоорганической химии ФА-А10-Т152 «Создание системы мониторинга в селекции вилтоустойчивых сортов хлопчатника на основе использования моноспецифических антител» (2009–2011 гг), ИК-2011-3-1 «Внедрение в селекцию и семеноводство инновационной технологии определения резистентности хлопчатника к вертициллезному вилту, направленного на ускоренное создание новых сортов» (2011-2012 гг), А-9-Т-002 «Создание и освоение индукторов устойчивости хлопчатника к фитопатогенам на основе новых соединений природного происхождения» (2012-2014 гг), А8-ФК-1-12504 «Использование геномно-протеомной технологии при оценке на устойчивость к основным сосущим вредителям (трипс, тля, паутинный клещ) и грибным заболеваниям (вертициллезный вилт и гоммоз), создание, паспортизация лучшего линейного материала, сочетающего устойчивость биотических факторов с высокими показателями таких признаков, как скороспелость, продуктивность хлопка-сырца, качество и количество волокна хлопчатника вида *G.hirsutum* L.» (2012-2014 гг), ФА-А9-Т-048 «Разработка биотехнологии повышения резистентности хлопчатника к фитопатогенам *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum* на основе исследования механизма действия индукторов устойчивости природного происхождения» (2015-2017 гг).

Целью исследований является выявление биохимических механизмов формирования защитных реакций хлопчатника, разработка тест-системы определения устойчивости селекционного материала к фитопатогенам, повышение устойчивости хлопчатника к биотическим факторам среды на основе препаратов глицирризиновой кислоты.

Задачи исследования:

определить участие ферментов фитоиммунитета - пероксидазы, ее

хитин-специфичных изоформ, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак лиазы в механизмах развития защитных реакций хлопчатника против фитопатогенов и выявление молекулярных структур, обуславливающих признак устойчивости;

32

разработка тест-системы оценки устойчивости хлопчатника к грибным поражениям на основе иммуноферментного анализа;

определить эффективность действия препаратов на основе глицирризиновой кислоты - ее цинковой, магниевой, моноаммониевой солей и супрамолекулярного комплекса глицирризиновой и салициловой кислот на фитоиммунитет, как один из путей повышения устойчивости хлопчатника;

выявить среди исследованных препаратов глицирризиновой кислоты комплексы обладающие свойством пролонгирующего действия на активность ферментов фитоиммунитета хлопчатника;

определить биохимическую роль салициловой кислоты и ее взаимосвязь с антиоксидантными ферментами в индуцированной устойчивости хлопчатника к фитопатогенам;

разработать и применить в сельскохозяйственной практике технологию стимуляции фитоиммунитета хлопчатника для улучшения хозяйственно ценных признаков на основе препаратов глицирризиновой кислоты с установлением оптимальных норм расхода;

провести испытания препаратов ДАГ-1 (супрамолекулярного комплекса глицирризиновой и салициловой кислот) и ДАГ-2 (моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты) в Институте санитарии, гигиены и профзаболеваний Минздрава РУз с целью получения токсикологического гигиенического заключения;

провести испытания и регистрацию в Госхимкомиссии РУз препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 с целью внесения их в список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения в сельском хозяйстве Республики Узбекистан.

Объектом исследований являются различающиеся по устойчивости сорта (устойчивый Наманган-77, среднеустойчивый С-6524, восприимчивый С-4727), виды, разновидности и линии хлопчатника, предоставленные НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка, а также препараты - цинковая, магниевая, моноаммониевая соли глицирризиновой кислоты и супрамолекулярный комплекс глицирризиновой и салициловой кислот, полученные в Институте биоорганической химии.

Предметом исследования является биохимические особенности устойчивости и восприимчивости хлопчатника при фитопатогенезе, разработка ускоренного метода оценки устойчивости к вилту и стимулирование фитоиммунитета хлопчатника препаратами на основе глицирризиновой кислоты.

Методы исследования. В диссертации были использованы методы биоорганической химии, биохимии, микробиологии, иммунологии,

гистохимии и статистики.

Научная новизна исследования заключается в следующем: обоснован механизм формирования первичных защитных реакций устойчивого и восприимчивого хлопчатника под воздействием гриба *V. dahliae*, *F.oxysporum* с участием анионной пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы создающих локальную зону окислительного

33

стресса и образование активных форм кислорода в местах проникновения фитопатогенов;

впервые разработана тест-система оценки устойчивости хлопчатника к грибной инфекции, позволяющая прогнозировать степень резистентности хлопчатника на основе иммуноферментного анализа;

разработана принципиально новая концепция применения препаратов природного происхождения как индукторов неспецифической устойчивости при возделывании хлопчатника, повышающие устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды на основе препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2;

доказана основная роль салициловой кислоты в препарате ДАГ-1, регулирующая устойчивость хлопчатника к фитопатогенам, доказано участие салициловой кислоты как сигнальной молекулы формирования системной индуцированной устойчивости хлопчатника;

выявлен пролонгированный защитный и рост стимулирующий эффект препаратов в предпосевной обработке семян хлопчатника в концентрации 10^{-7} М, сопоставимой с действием природных фитогормонов.

Практические результаты исследований заключаются в следующем: разработан ускоренный метод оценки устойчивости хлопчатника к фитопатогенам, позволяющий проводить совместно с селекционерами круглогодичный анализ образцов хлопчатника на устойчивость к вилту, который сокращает время выведения новых сортов с 10 до 6-7 лет; проведены тестирования на устойчивость к вилту элитных сортов, видов, разновидностей и линий хлопчатника, предоставленных НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка МСВХ РУз с целью выявления наиболее перспективных форм хлопчатника для выведения новых сортов;

выявлены стимулирующее действие на хлопчатник препаратов глицирризиновой кислоты, из которых ДАГ-1 и ДАГ-2 обладают свойством индуцировать устойчивость хлопчатника к фитопатогенам с ростостимулирующим эффектом;

проведен токсиколого-гигиенический анализ препаратов глицирризиновой кислоты и выявлено, что препараты относятся к токсичным веществам IV класса, не обладающие кумулятивными свойствами, экологически безопасны для окружающей среды и человека;

установлен механизм действия препаратов глицирризиновой кислоты ДАГ-1 и ДАГ-2 как индукторов болезнеустойчивости хлопчатника с

продолжительным действием (до 30 дней) на активность ферментов фитоиммунитета и разработана технология предпосевной обработки семян хлопчатника с нормами расхода для этих препаратов.

Достоверность результатов исследования. Достоверность результатов подтверждается применением современных биохимических и иммунологических методов исследований, соответствием теоретических данных с полученными результатами опытов. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась при помощи критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала средних

34

значений. Подтверждением научных результатов и практической реализации исследований служат экспертные оценки специалистов, а также публикации результатов исследований в рецензируемых зарубежных научных изданиях и получение трех патентов по основным разделам диссертации.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследований состоит в том, что выявленные закономерности и различия перестроек в ферментативной системе устойчивого и восприимчивого хлопчатника при фитопатогенезе являются основой для разработки метода оценки устойчивости хлопчатника и создания эффективных средств и технологий управления механизмами болезнеустойчивости на молекулярном уровне.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанная и внедренная в хлопководство тест-система определения устойчивости хлопчатника к вилту сокращает сроки отбора его устойчивых видов, разновидностей и линий. Применение отечественных, экологически безопасных препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 в качестве индукторов фитоиммунитета хлопчатника снижает кратность обработки растений химическими препаратами и является перспективным направлением в интегрированной системе защиты сельскохозяйственных растений.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных данных по изучению физико-химических, биологических свойств иммунных ферментов и изучения механизма действия глицирризинатов, индуцирующих устойчивость хлопчатника к фитопатогенам:

получен патент на изобретения Агенства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (31.12.2012., №IAP 04619) по способу получения гомогенной хитин-специфичной пероксидазы хлопчатника. В результате создана тест-система оценки устойчивости хлопчатника методом иммуноферментного анализа;

получен патент на изобретения Агенства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (27.02.2015., №IAP 05005) на тест систему оценки устойчивости сортов хлопчатника к вилту. В результате тест система апробирована и дала возможность определить вилтоустойчивость элитных сортов, видов, разновидностей и линий хлопчатника;

получен патент на изобретения Агенства по интеллектуальной

собственности Республики Узбекистан (30.10.2015., №IAP 05090) на технологию применения супрамолекулярного комплекса глицирризиновой и салициловой кислот, моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты в качестве индукторов устойчивости хлопчатника из местного сырья. В результате, применение низкой концентрации (10^{-7} М) препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 послужило доказательством наличия механизма, влияющего на эффективность повышения устойчивости хлопчатника к фитопатогенам и пролонгации активности основных ферментов фитоиммунитета; на препараты ДАГ-1 и ДАГ-2 получено «Свидетельство» Государственной комиссии по средствам химизации и защиты растений Республики Узбекистан (23.01.2015., №1А 946 и 09.02.2016., №1А 1156) и

35

включены в «Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения в республике Узбекистан». В результате препараты глицирризиновой кислоты - ДАГ-1 и ДАГ-2 использованы в качестве протравителей для предпосевной обработки семян хлопчатника.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования изложены в виде докладов и прошли апробацию на 12 международных, и республиканских научно-практических конференциях, в том числе, на «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2010); «Biological plant protection, problems and contemporary achievements» (Tbilisi, 2012); «Вавиловские чтения» (Саратов, 2012, 2014, 2015); «Табиий бирикмалардан кишлок хужалигида фойдаланиш истикболлари» (Гулистон, 2013); «Современное развитие и проблемы биоорганической химии» (Ташкент, 2013); «XXI аср – интеллектуал авлод асри» илмий амалий анжуман (Тошкент, 2014); «Достижения, проблемы и перспективы агробиологии сельскохозяйственных культур» (Ташкент, 2015); «Микроорганизмы и биосфера, MICROBIOS-2015» (Ташкент, 2015); «Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривож ва келажаги» (Ташкент, 2016); «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» (Ташкент, 2016).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 31 научных работ. Из них 11 научных статей, в том числе 9 в республиканских и 2 в зарубежных журналах рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 200 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенных исследований, показано соответствие проведенных исследований с приоритетными направлениями развития науки и технологий

республики, цель и задачи исследования, характеризуется объект и предмет исследований, излагается научная новизна и практические результаты исследований, раскрывается научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Современные представления о молекулярных механизмах взаимоотношений между растениями и фитопатогенами, регуляции устойчивости растений»** приведен подробный обзор научных исследований, касающихся молекулярно-генетических аспектов иммунитета растений к фитопатогенам. Дан анализ о функциональных свойствах основных стрессовых ферментов пероксидаз,

36

полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы, салициловой кислоты в процессах жизнедеятельности растений; участии их во взаимоотношениях растение-хозяина и фитопатогена, как компонента сигнальной системы при патогенезе; приведены данные о новом направлении в создании экологически безопасных средств защиты растений от патогенов – природных индукторов устойчивости растений.

Во второй главе диссертации **«Материалы, методы биоорганической химии и биотехнологии, использованные в работе»** приведены материалы, использованные в работе, в частности, методы биоорганической химии (гель-фильтрация, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ, спектрофотометрия, методы качественного и количественного определения белка), методы клеточной биологии (методы получения каллусов, окрашивания растительной ткани и микроскопии) и иммунологии (получение и очистка антител, иммуноферментный анализ).

В третьей главе диссертации **«Участие ферментов фитоиммунитета в ответных реакциях хлопчатника к патогенам»** изложены результаты сравнительного анализа изменения активности основных ферментов фитоиммунитета - пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы в развитии защитного ответа хлопчатника при воздействии гриба *Verticillium dahliae*, корреляции активности ферментов с интенсивностью формирования защитных реакций при фитопатогенезе, а также исследования по выделению гомогенной анионной хитин специфичной пероксидазы хлопчатника.

Устойчивость растений является генетически детерминированным признаком, который наследуется и реализуется в полной мере в экстремальных ситуациях. Для выявления особенностей и различий перестроек в ферментативной системе устойчивого и восприимчивого хлопчатника, а так же первичных механизмов взаимодействия гриба *V. dahliae* с клеточной тканью хлопчатника при фитопатогенезе были исследованы активности защитных ферментов - пероксидазы, полифенолоксидазы и фенилаланин аммиак-лиазы в динамике развития

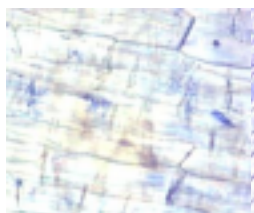
проростков устойчивого Наманган-77 и восприимчивого С-4727 сортов хлопчатника. Изучение развития инфекционного процесса показало различия в активации иммунных ферментов устойчивого и восприимчивого сорта, которые связаны со скоростью ответных реакций, обуславливающих устойчивость хлопчатника к действующему биотическому фактору.

Установлена корреляционная зависимость между активностью пероксидазы при инфицировании грибом *V.dahliae* и скоростью образования некрозов, генерацией супероксид аниона в сортах хлопчатника, различающихся по степени устойчивости к вилту.

При взаимодействии растения-хозяина и патогена одной из ранних ответных реакций растительного организма является локальная генерация активных форм кислорода (АФК) с участием пероксидаз, связанных с клеточной стенкой. Подтверждением тому служили результаты,

37

полученные при проведении гистохимических исследований по выявлению АФК методом витального окрашивания тканей хлопчатника нитросиний тетразолием (см. рис.1).



А Б

Рис. 1. Формирование супероксид аниона в тканях корней проростков хлопчатника сортов Наманган-77 (А) и С-4727 (Б) инфицированных *V. dahliae*. Витальное окрашивание тканей хлопчатника нитросиний тетразолием, ок.×40.

Накопление супероксид-аниона в сорте Наманган-77 было интенсивнее (см. рис.1., А) чем восприимчивом С-4727, у которого супероксид-анион концентрировался в отдельных участках цитоплазмы (рис.1., Б). У восприимчивого сорта С-4727 реакция образования АФК запаздывала, так как патогенный грибок снижал интенсивность формирования защитных барьеров посредством ингибирования активности ферментов пероксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы. В устойчивом сорте Наманган-77 своевременно активировались ферменты пероксидаза и полифенолоксидаза, участвующие в процессах локализации патогена уже в первые сутки после инфицирования.

Предполагается, что хитоолигосахариды гриба высвобождаются под действием гидролитических ферментов хлопчатника, включают цепь последовательных защитных реакций с участием пероксидаз, полифенолоксидазы и фенилаланин аммиак-лиазы. Реакции устойчивости, в которых одна из изоформ пероксидазы катализирует продукцию АФК, запускаются через патоген-ассоциированный молекулярный путь распознавания вирулентного патогена с последующей окислительной вспышкой, приводящей к экспрессии генов резистентности.

Известно, что ионносвязанные пероксидазы растений принимают непосредственное участие в образовании АФК, выполняющих регулируемую и сигнальную роль во взаимодействиях патоген-хозяин. Для понимания первичных процессов межмолекулярного взаимодействия хлопчатника с патогеном было исследовано влияние компонентов клеточных стенок гриба на активность ионносвязанной пероксидазы хлопчатника методом хроматографии на конидиях гриба *V.dahliae*.

Установлено, что наибольшую активность проявляли внеклеточные фракции пероксидазы гипокотилей и семядольных листьев устойчивого сорта хлопчатника, связывающиеся с конидиями *V.dahliae*, по сравнению с таковыми в восприимчивом сорте. Изоспектр фракции пероксидазы, элюируемой из конидий гриба, показал наличие у устойчивого сорта Наманган-77 двух анионных изоформ $pI \sim 3,5 - 3,9$; в восприимчивом сорте С-4727 одной анионной изоформы $pI \sim 3,5$ (см. рис. 2).

38

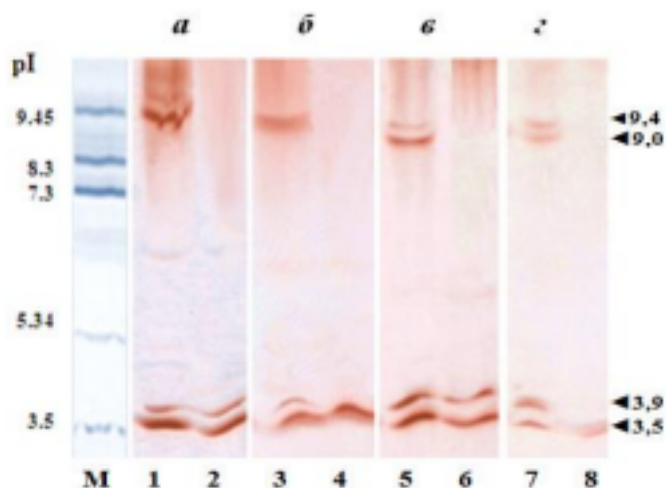


Рис. 2. Изоспектр внеклеточной фракции пероксидаз из гипокотилей и семядольных листьев проростков хлопчатника, связанных с конидиями *V.dahliae*. Пероксидазная активность проявлена гваяколом: а – внеклеточные пероксидазы гипокотилей сорта Наманган-77; б - внеклеточные пероксидазы гипокотилей сорта С 4727; в – внеклеточные пероксидазы семядольных листьев сорта Наманган-77; г – внеклеточные пероксидазы семядольных листьев сорта С-4727; М – смесь белков маркеров, окрашенных кумасси СВВ G-250; 1, 3, 5, 7 - фракции внеклеточных пероксидаз до нанесения на конидии гриба *V.dahliae*; 2, 4, 6, 8 – фракции внеклеточных пероксидаз, связанных с конидиями гриба *V.dahliae*.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных следует утверждать, что внеклеточные анионные пероксидазы занимают одну из ключевых позиций в системе патоген хозяин, и их следует считать специфичными к хитоолигосахаридам, т.е. хитин-специфичными. Согласно нашим данным, хитин-специфичные анионные пероксидазы хлопчатника, осуществляющие защитную функцию, “распознают” микроорганизмы, содержащие хитин или его олигомеры. Этот механизм

защиты растений обретаёт специфическую направленность. Следовательно, от скорости активации внеклеточной анионной пероксидазы в инфицированных клетках и от интенсивности сорбции данного фермента на мицелий хитинсодержащего патогена зависит распространение патологического процесса.

Локализация хитин-специфичных пероксидаз в зоне инфицирования и способность фермента связываться со структурами патогенных грибов позволяют заключить, что внеклеточные хитин-специфичные пероксидазы могут непосредственно воздействовать на их рост и развитие.

Изучение специфичности ответных реакций с участием анионных пероксидаз, а также полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы дало возможность определить мобилизационный потенциал сортов хлопчатника, различающихся по устойчивости. Учитывая тот факт, что у устойчивых сортов хлопчатника активность анионных изопероксидаз при патогенезе в несколько раз возрастает, и количественное содержание

39

увеличивается, то данные изопероксидазы вполне могут служить маркерами устойчивости хлопчатника к фитопатогенам.

В связи с этим, выделение и очистка анионной пероксидазы из вилтоустойчивого сорта хлопчатника (Наманган-77) имело важное значение в создании тест-системы для определения вилтоустойчивости хлопчатника. Использование анионной пероксидазы в качестве маркера с применением иммунохимического метода является более точным и воспроизводимым методом по сравнению с имеющимися в селекции хлопчатника.

Нами впервые разработан и освоен метод выделения анионной хитин специфичной пероксидазы из семядольных листьев 7-суточных проростков хлопчатника. В процессе выделения на всех этапах очистки сохранялась ее активность.

Получение высокоочищенного препарата хитин-специфичной пероксидазы позволило нам изучить физико-химические свойства фермента.

Молекулярную массу выделенных изоформ пероксидазы определяли методом электрофореза. Она составила 93,5 и 85,0 кДа, которые соответствуют изоточкам pI 3,5 и 3,9. Числовые значения K_m для хитин специфичных изопероксидаз проростков хлопчатника, найденные из линейной зависимости по отношению к субстрату гваяколу, составило $2,9 \pm 0,6 \cdot 10^{-4} M$.

Очищенные хитин-специфичные анионные пероксидазы устойчивого и восприимчивого сортов хлопчатника обладали фунгистатической активностью на газоне вирулентного штамма *V.dahliae* АН-3. Выявленное нами фунгистатическое свойство анионных пероксидаз хлопчатника позволяет предположить, что именно они, среди других изоформ, препятствуют распространению фитопатогена в здоровые ткани и

отрицательно влияют на развитие гриба.

Для выделения специфичных антител, применяемых в иммуноферментном анализе (ИФА), хитин-специфичные пероксидазы были получены в гомогенном виде путем препаративного извлечения из пластин ПААГ-электрофореза в нативных условиях. Методом изоэлектрофокусирования и капиллярного электрофореза была подтверждена гомогенность выделенных изоформ (см. рис. 3).

Как видно из рисунка 3 (А), полученные анионные пероксидазы были идентифицированы окрашиванием субстратом гваяколом. Таким образом, данный способ дал возможность выделить индивидуальные хитин-специфичные изоформы пероксидазы высокой степени очистки и использовать их для получения поликлональных антител. Антитела получали к изоформе pI 3,9.

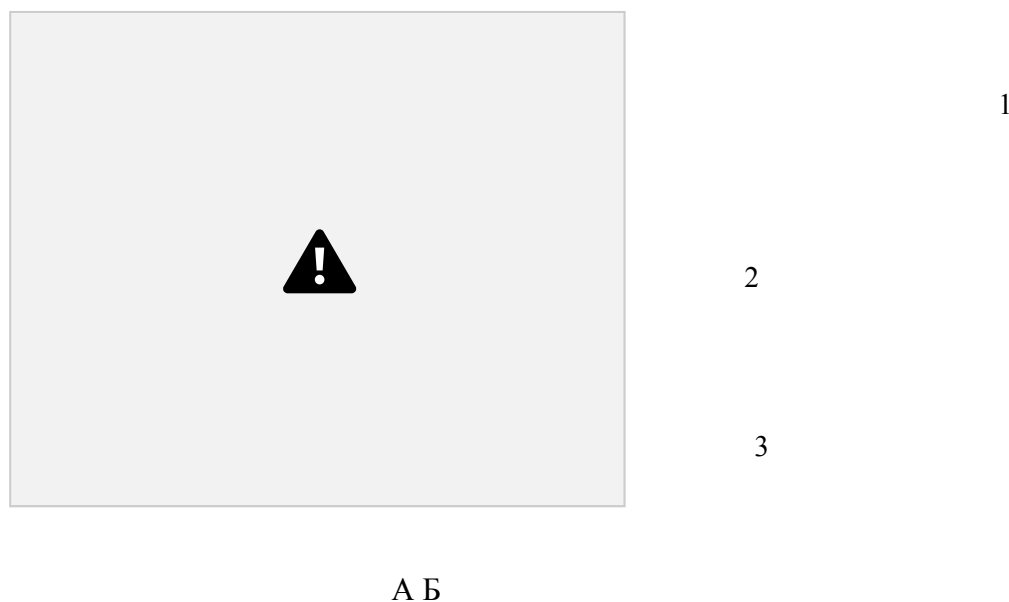


Рис. 3. Анализ хитин-специфичных изоформ пероксидазы хлопчатника методом изоэлектрофокусирования (А) и капиллярного электрофореза (Б): А) 1 – смесь маркеров; 2 – исходная фракция; 3 – изоформа с pI 3,9; 4 - изоформа с pI 3,5 (окраска кумасси СВВ 250); 5 - исходная фракция; 6 - изоформа с pI 3.9; 7 - изоформа с pI 3,5 (окраска гваяколом). Б) 1 – фракция хитин-специфичной пероксидазы до разделения изоформ; 2 – изоформа с pI 3,9; 3 – изоформа с pI 3,5.

В четвертой главе диссертации «Разработка тест-системы определения устойчивости хлопчатника к вилту» приводятся результаты иммунологических исследований по получению поликлональных антител к анионным хитин-специфичным пероксидазам хлопчатника, изучению чувствительности антител, влиянию физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа, применению в селекционной практике тестирования устойчивости

различных гибридных линий, сортов хлопчатника к вилту на основе разработанной тест-системы.

Были получены поликлональные антитела (ПкАТ) кролика к гомогенной анионной пероксидазе хлопчатника.

Титр антител в полученной сыворотке составил 1×10^6 , который был определен методом прямого ИФА. Выделение и очистку антител проводили в несколько этапов. ПкАТ из сыворотки кролика выделяли путем двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Далее проводили обессоливание, и фракцию иммуноглобулинов (IgG) выделяли на анионообменной мембране Sartobind D15 (Германия), в градиенте до 0,3 М NaCl в Na-фосфатном буферном растворе (см. рис.4).

В результате были получены и лиофильно высушены высокоочищенные IgG к анионным изоформам пероксидазы хлопчатника. Чувствительность очищенных IgG позволяет определять 3-4 нг антигена в 0,1 мл растительного экстракта. Неспецифическое связывание не превышало 0,05-0,10 ОЕ₄₀₅. На основе полученных результатов следует заключить, что ПкАТ к анионным пероксидазам хлопчатника подходят для использования в разработке твердофазного ИФА.

41

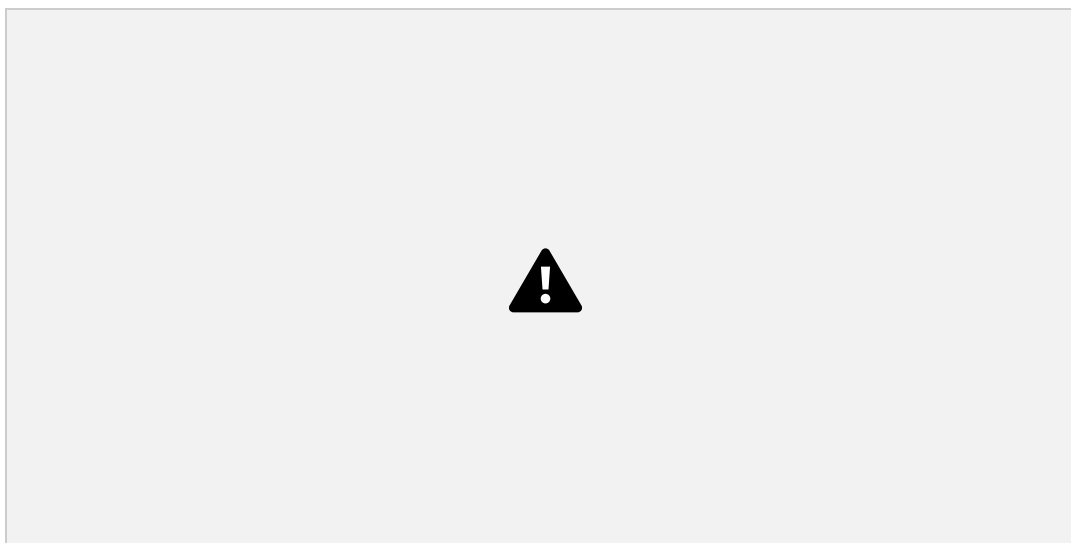


Рис.4.

Выделение иммуноглобулинов из сыворотки кролика с использованием анионообменной мембраны Sartobind D15: А – профиль элюции с анионообменной мембраны; Б – электрофореграмма полученных фракций антисыворотки в 10% ДСН ПААГ. 1 - очищенный иммуноглобулин; 2 – оставшаяся часть иммуноглобулина с примесью других сывороточных белков; 3 – маркеры.

Мы остановили выбор на поликлональном варианте непрямого ИФА, так как это экономически выгодный вариант, не требующий специальных условий для получения антител по сравнению с моноклональными антителами. По данным некоторых авторов, использование ПкАТ в качестве «подложки» или в виде конъюгата с ферментом может повысить чувствительность определения и помочь устранить «узкую» специфичность, свойственную моноклональным антителам.

ПкАТ, полученные в процессе фракционирования антисыворотки сульфатом аммония, были использованы для получения конъюгата с щелочной фосфатазой. Рабочее разведение конъюгата ПкАТ-щелочная фосфатаза составило 1:2000.

В ходе исследований выявлены оптимальные параметры проведения непрямого ИФА: рабочие разведения сорбирующих антител составили 5 мкг/мл, время инкубации «подложки» (первого слоя антител) - 18 ч при +4⁰С; составы буферных растворов – 0,02 М, рН 9,6 карбонат-бикарбонатный буферный раствор для разведения антител; для этапа блокирования и промывки использован 0,15 М NaCl 0,05% твин-20, 1% бычий сывороточный альбумин (БСА) в фосфатном буферном растворе (рН 7,2), увеличивающий чувствительность анализа (снижение фона); для разведения конъюгата – 0,05 М ТРИС-буферный раствор (рН 8,0) содержащий 5 % БСА, 0,05% твин-20, 0,01 М MgCl₂.

Таким образом, впервые была разработана тест-система оценки устойчивости хлопчатника к вилту на основе количественного определения содержания хитин-специфичных изопероксидаз. Тест-система дает возможность проводить отбор устойчивых растений в течение 10-12 дней, что позволяет в короткие сроки исследовать значительное количество

42

растительного материала, отбирая наиболее перспективные формы хлопчатника.

На основе разработанной тест-системы впервые в селекционной практике проведены тестирования устойчивости различных гибридных линий, сортов хлопчатника к вилту. Результаты полевых опытов определения устойчивости к вилту хлопчатника подтвердили достоверность лабораторных исследований. Использование технологии биохимической оценки на основе маркеров устойчивости существенно сокращает сроки выведения новых сортов хлопчатника и позволяет на ранних этапах селекции отбирать генотипы по признаку устойчивости, уменьшая вероятность субъективной оценки результатов, тем самым повышая производительность тест-системы. Основываясь на данных апробации метода в НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка, проведен анализ более 200 образцов сортов и линий хлопчатника.

В пятой главе диссертации **«Влияние глицирризинатов как индукторов устойчивости хлопчатника к фитопатогенам *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum*»** изложены исследования по изучению механизма влияния препаратов глицирризиновой кислоты: цинковой, магниевой, моноаммониевой соли и ее супрамолекулярного комплекса с салициловой кислотой на ферменты фитоиммунитета, влиянию малых концентраций препаратов глицирризиновой кислоты на содержание фитогормонов абсцизовой кислоты (АБК), индолилуксусной кислоты (ИУК) и салициловой кислоты (СК) в проростках хлопчатника, действию СК на

цитофизиологические реакции в тканях проростков и каллусов хлопчатника при заражении *V.dahliae*, влиянию предпосевной обработки семян препаратами глицирризиновой кислоты (ДАГ-1, ДАГ-2) на пролонгирование активности ферментов фитоиммунитета хлопчатника.

Влияние индукторов устойчивости на метаболизм растений является одной из наименее изученных проблем в биологии. Вместе с тем, применение таких соединений имеет теоретическое и практическое значение, так как выявление закономерностей воздействия индукторов позволяет управлять механизмами болезнеустойчивости растений на молекулярном уровне.

Показателями, отражающими физиологический статус растения, являются ферменты антиоксидантной системы (пероксидаза) и фенольного обмена (полифенолоксидаза, фенилалани аммиак-лиаза). Изменение уровня их содержания до и после обработки биологически активными природными соединениями позволяет оценить стрессоустойчивость хлопчатника и резистентность к патогенам.

В Институте биоорганической химии АН РУз на основе глицирризиновой кислоты из корней солодки (*Glycyrrhiza glabra L*) были получены магниевая, цинковая, моноаммониевая соли глицирризиновой кислоты и ее супрамолекулярный комплекс с салициловой кислотой. Впервые было изучено влияние данных препаратов на активность ферментов фитоиммунитета (пероксидаза полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-

43

лиаза) в проростках и каллусах хлопчатника, различающихся по устойчивости к *V. dahliae* и *F. oxysporum* (устойчивого Наманган-77, среднеустойчивого С-6524, восприимчивого С-4727). Экспериментальным путем была установлена эффективная концентрация 10^{-7} М, влияющая на активность иммунных ферментов.

Проведенные опыты на культуре каллусов и проростках хлопчатника показали, что из четырех изученных препаратов глицирризиновой кислоты высокой индуцирующей активностью обладали супрамолекулярный комплекс с салициловой кислотой (ДАГ-1) и моноаммониевая соль глицирризиновой кислоты (ДАГ-2). Препараты непосредственно воздействовали на активность ферментов фитоиммунитета, формируя неспецифическую системную устойчивость хлопчатника при инфицировании *F. oxysporum* (см. рис. 5).



Рис. 5. Влияние обработки различных сортов хлопчатника препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2 на активность анионной пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы в проростках инфицированных *F. oxysporum*.

Влияние индукторов на возрастание активности анионной пероксидазы, полифенолоксидазы при инфицировании грибом *F. oxysporum* свидетельствует о процессах лигнификации клеточных стенок хлопчатника для механической изоляции патогена, а также в образовании активных форм кислорода. Стимуляция глицирризинатами активности фенилаланин аммиак лиазы, ключевого фермента фенилпропаноидного пути, вероятно, приводит к усилению синтеза фитоалексинов, салициловой кислоты - эндогенного элиситера системной неспецифической устойчивости хлопчатника.

44

К числу первоочередных систем регуляции активности ферментов в растениях относятся фитогормоны, соотношение которых регулирует развитие адаптивных процессов против стрессовых воздействий. В этой связи было изучено влияние препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 на уровень фитогормонов АБК, ИУК и СК в 7-суточных этиолированных проростках хлопчатника, различающихся по резистентности к фитопатогенам.

Полученные результаты показали (см. рис. 6), что содержание СК в исследуемых проростках хлопчатника, обработанных препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2 многократно повышается по сравнению с контролем. У восприимчивого С-4727 и среднеустойчивого С-6524 эти показатели приблизились к соответствующим показателям устойчивого сорта Наманган 77.



Рис.6. Содержание фитогормонов АБК, ИУК и СК в проростках различных сортов хлопчатника, обработанных препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2 в концентрации 10^{-7} М.

Вместе с тем, препарат ДАГ-2 вызывает сдвиги в балансе фитогормонов в хлопчатнике, связанные с параллельным накоплением АБК и ИУК. Ростостимулирующее влияние ДАГ-2 на уровень содержания ИУК, проявлялось также и в усилении митотической активности клеток каллусов по сравнению с контрольными образцами. Увеличение уровня данных фитогормонов под влиянием препаратов, вероятно, может способствовать преадаптации хлопчатника к стрессовым воздействиям.

Стимуляция ростовых процессов и индуцирование устойчивости к вилту в предобработанных препаратами сортах хлопчатника связаны с изменениями интенсивности биохимических реакций. В ходе проведенных

45

экспериментов было установлено, что под влиянием различных концентраций экзогенной СК (0,001; 0,01; 0,1 мМ) наблюдалось увеличение активности иммунных ферментов в присутствии *F. oxysporum*. Анализ полученных результатов показал, что в наибольшей степени данный эффект был выражен в концентрации 0,01 мМ при совместном воздействии *F. oxysporum* в проростках хлопчатника (см. табл. 1).

Таблица 1.

Влияние салициловой кислоты (СК) на активность хитин-специфичной пероксидазы, в проростках хлопчатника при совместном воздействии *F. oxysporum* выраженной в % соотношении ($M \pm m$, $n=10$, $P<0,05$)

7-сут. проростки хлопчатника	Удельная активность хитин-специфичной пероксидазы Е/мг белка		
	Контроль, H ₂ O	Концентрация СК при обработке семян 0,01мМ	Обработанные СК и инфицирование <i>F.oxysporum</i> (3сут)
С-4727	18,5 ± 15,2	35,8 ± 17,5	48,3 ± 25,4
С-6524	26,7 ± 9,6	85,6 ± 21,6	92,7 ± 17,2
Наманган-77	26,2 ± 9,5	105,6 ± 8,3	135,2 ± 21,6

Как видно из таблицы 1, активность внеклеточных пероксидаз многократно возрастала во всех изучаемых сортах хлопчатника при обработке СК, и особенно при совместном воздействии фузариозного гриба.

Пусковым процессом, определяющим последующие клеточные изменения в хлопчатнике, вызванные СК, является усиление генерации АФК, которое было выявлено методом гистохимического окрашивания тканей гипокотилей проростков и клеток каллусов хлопчатника (см. рис. 7).



а б в г

Рис.7. Гистохимический анализ активности внеклеточных пероксидаз в проростках и каллусах хлопчатника, обработанных салициловой кислотой. Увеличение ок.×40. а - клетки гипокотилия хлопчатника окрашенные *o*-дианизидином + H₂O₂; **б** – клетки каллусов окрашенные *o*-дианизидином + H₂O₂; **в** – образование АФК в семядольных листьях хлопчатника; **г**- АФК в клетках каллусов хлопчатника.

Данные изменения, возможно, обусловлены взаимодействием СК с анионными пероксидазами апопласта. Локализация внеклеточных пероксидаз была установлена при помощи окрашивания тканей хлопчатника *o*-дианизидином + H₂O₂. Наблюдаемые нами изменения в инфицированных каллусах, растущих в среде культивирования с добавлением 0,01 мМ СК, являются следствием развития защитных реакций под влиянием СК и, в

частности, ведущих к утолщению клеточной стенки. СК способствует усилению защитного эффекта, увеличивая выход изопероксидаз во внеклеточную фазу. Вероятно, лигнификация происходит специфически концентрированно в местах внедрения гриба, что приводит к изоляции соседних растительных тканей от инфицированной зоны. Эффективность

лигнификации, опосредованной активацией синтеза фенольных соединений и АФК, а также их окислением пероксидазой, может многократно возрастать в связи с появлением в зоне инфицирования патогенных структур гриба.

Таким образом, СК может быть посредником в цепях передачи сигналов и модулятором синтеза АФК в проростках и каллусах хлопчатника.

Исследован эффект предпосевной обработки семян препаратами Zn, Mg, моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты и супрамолекулярного комплекса с салициловой кислотой в низкой концентрации (10^{-7} М) на пролонгирование активности ферментов фитоиммунитета хлопчатника в динамике развития проростков в условиях открытого грунта (см. табл. 2).

Таблица 2.

Пролонгированная активность ферментов фитоиммунитета из корней проростков хлопчатника на 30й день после посева семян, обработанных глицирризинатами в концентрации 10^{-7} М ($M \pm m$, $n=10$, $P<0,05$)

Варианты опыта	Хитин-специфичная пероксидаза, Е/мг	полифенолоксидаза, Е/мг	Фенилаланин аммиак лиаза, Е/мг
С-4727			
контроль	171,59 ± 5,4	237,44 ± 0,16	52,95 ± 2,7
ГК/СК (ДАГ-1)	318,44 ± 6,2	623,85 ± 0,25	714,17 ± 0,5
Na ₄ Zn(ГК)	127,89 ± 7,5	220,64 ± 0,19	0,00
NH ₄ (ГК) ₂ (ДАГ-2)	287,87 ± 8,3	494,17 ± 0,15	419,68 ± 0,12
ГК	304,95 ± 9,6	417,78 ± 0,13	0,00
Mg(ГК) ₂	129,80 ± 7,1	214,45 ± 0,12	0,00
С-6524			
контроль	182,7 ± 7,3	569,08 ± 0,32	29,8 ± 1,32
ГК/СК (ДАГ-1)	185,11 ± 7,5	760,76 ± 0,56	125,0 ± 7,9
Na ₄ Zn(ГК)	224,68 ± 9,6	963,52 ± 0,48	08,1 ± 0,06
NH ₄ (ГК) ₂ (ДАГ-2)	737,53 ± 11,8	316,57 ± 0,78	37,0 ± 2,1
ГК	212,77 ± 7,9	259,38 ± 0,86	0,00
Mg(ГК) ₂	53,45 ± 4,3	626,24 ± 1,12	0,00
Наманган-77			
контроль	349,82 ± 3,2	356,07 ± 1,25	20,68 ± 0,96
ГК/СК (ДАГ-1)	238,55 ± 8,4	556,70 ± 7,6	101,2 ± 6,2
Na ₄ Zn(ГК)	507,02 ± 2,8	284,05 ± 5,6	0,00
NH ₄ (ГК) ₂ (ДАГ-2)	492,80 ± 7,0	278,08 ± 4,8	91,88 ± 4,4

ГК	320,48 ± 2,1	410,64 ± 3,7	0,00
Mg(ГК) ₂	309,46 ± 2,4	400,25 ± 5,1	0,00

Анализ полученных результатов показал, что в наибольшей степени данный эффект был выражен в корневой системе. Согласно таблице 3, ферменты (пероксидаза, полифенолоксидаза, фенилаланин аммиак-лиаза) в корнях 30-дневных проростков хлопчатника предобработанных препаратами

47

ДАГ-1 (ГК/СК 2:1) и ДАГ-2 (NH₄(ГК)₂) находились в активном состоянии в течение 30 дней во всех сортах по отношению к контрольным и остальным образцам. Наблюдаемая пролонгирующая активность исследованных препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 еще раз подчеркивает их индуцирующее действие на ферменты фитоиммунитета хлопчатника, особенно у восприимчивого сорта.

Проведение практических работ совместно с НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания хлопка МСВХ РУз в фермерском хозяйстве «С. Сегизбаева» Аккурганского района Ташкентской области показало положительный эффект на хозяйственно ценные характеристики хлопчатника и защитно-стимулирующее действие препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 (см. табл. 3).

Таблица 3.

Влияние препаратов глицирризиновой кислоты на хозяйственно ценные характеристики хлопчатника (M±m, n=10)

Варианты опыта	Дата раскрытия первых коробочек (чис/мес)	Высота растения (см)	Всего коробочек на растении на 15.08	Всего открытых коробочек на 15.08	Поражение <i>V.dahliae</i> на 15.09. (балл)*
С-4727					
Контроль	10.08.2015	98±1,90	17 ± 0,80	10 ±0,58	4,14 ± 0,53
ДАГ-1	09.08.2015	101±1,75	19 ± 0,70	14 ±0,59	1,8 ± 0,29
ДАГ-2	10.08.2015	102±1,35	20 ± 5,17	15 ± 0,46	1,3 ± 0,23
С-6524					
Контроль	08.08.2015	80 ± 5,06	19 ± 1,41	15 ± 0,62	3,2 ± 0,11
ДАГ-1	08.08.2015	101,3 ± 2,91	21 ± 0,70	16 ± 0,60	0,6 ± 0,22
ДАГ-2	08.08.2015	107 ± 2,03	24 ± 0,51	17 ± 0,37	1,1 ± 0,16
Наманган-77					
Контроль	09.08.2015	103,6± 2,23	22 ± 0,78	15 ± 0,82	1,1 ± 0,16

ДАГ-1	09.08.2015	104,1±13,98	22 ± 1,36	15 ± 0,55	0,5± 0,44
ДАГ-2	09.08.2015	110,1±11,04	25 ± 0,47	19 ± 0,37	1,0 ± 1,94

Примечание: все варианты опыта проводились в трехкратной повторности, по 10 растений в каждом варианте (n=10), достоверное отличие от контроля $P<0,05$; *- вилт индекс оценивался по степени поражения вилтом в полевых условиях.

Об этом свидетельствуют данные таблицы 3, показывающие снижение «вилт-индекса» восприимчивого и среднеустойчивого сортов хлопчатника в полевых условиях.

Таким образом, предпосевная обработка семян препаратами глицирризиновой кислоты - ДАГ-1 и ДАГ-2 оказывала защитно индуцирующее и ростостимулирующее действие, что в конечном итоге способствовало повышению урожайности хлопчатника.

На основании проведенных независимых испытаний со стороны организаций, уполномоченных Госхимкомиссией РУз (НИИ защиты растений и НИИ селекции, семеноводства и агротехнологии выращивания

48

хлопка МВСХ РУз), и положительного заключения о целесообразности применении препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 при предпосевной обработке семян хлопчатника, были выданы соответствующие свидетельства – 06.02.20., №1 А 1156 и 23.01.201., №1А 946 о регистрации препаратов в Республике Узбекистан.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены особенности ответных реакций хлопчатника при активном участии иммунных ферментов пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы в патогенезе *V. dahliae*, где начальным этапом формирования защитного ответа хлопчатника на инфицирование грибами являлась генерация активных форм кислорода, сопряженная с активацией анионных пероксидаз. Полученные результаты открывают возможности для создания эффективных средств и технологий управления механизмами болезнеустойчивости на молекулярном уровне.

2. Маркерным ферментом, определяющим развитие защитных реакций в хлопчатнике, является связанная с клеточной стенкой анионная пероксидаза, проявляющая специфичность по отношению к хитину гриба. Выделены две гомогенные анионные хитин-специфичные пероксидазы хлопчатника с изоточками $pI \sim 3,5$ и $pI \sim 3,9$ и молекулярной массой 93,5 кДа и 85 кДа, определены K_m и их субстратная специфичность, имеющие важное значение при разработке эффективного метода оценки устойчивости хлопчатника к вилту.

3. Получены поликлональные антитела к гомогенной хитин специфичной

пероксидазе хлопчатника $pI \sim 3,9$. Установлена специфичность и чувствительность поликлональных антител, а также получен конъюгат антител с щелочной фосфатазой. Оптимизированы условия проведения иммуноферментного анализа, который служит для усовершенствования методов ускоренного отбора устойчивых форм хлопчатника.

4. Впервые в селекционной практике хлопчатника при помощи разработанной тест-системы проведены тестирования на устойчивость к вилту более 200 образцов элитных сортов, видов, разновидностей и линий хлопчатника. Полученные данные показали идентичность с результатами полевых опытов, что, в свою очередь, позволяет экономить время и средства для проведения полевых испытаний.

5. Доказано индуцирующее действие препаратов ДАГ-1 (супрамолекулярного комплекса глицирризиновой и салициловой кислот) и ДАГ-2 (моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты) на активность ферментов фитоиммунитета хлопчатника. Установлена эффективно действующая концентрация препаратов 10^{-7} М, стимулирующая системную устойчивость хлопчатника к фитопатогенам, которая раскрывает перспективы использования соединений небιοцидной природы в эффективных низких концентрациях, имеющие важное значение в сельскохозяйственной практике.

49

6. Низкие концентрации препаратов ДАГ-1 и ДАГ-2 оказывают влияние на баланс фитогормонов - ИУК, АБК и СК в проростках хлопчатника. Выявлено, что препараты влияют на возрастание содержания СК, способствующей преадаптации хлопчатника к биотическим стрессам и снижению силы их повреждающего действия. Полученные результаты в будущем послужат для создания и совершенствования препаратов нового поколения, обладающих иммуномодулирующими свойствами.

7. Доказано, что СК усиливала активность анионной пероксидазы, свидетельствующей о вовлечении фермента в защитные реакции; стимулировала активность фенилаланин аммиак-лиазы, синтезирующей новые молекулы СК. Достоверно установлено, что за повышение активности иммунных ферментов в хлопчатнике ответственна СК, входящая в состав препарата ДАГ-1.

8. Предпосевная обработка семян хлопчатника препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2 оказывала пролонгирующее влияние (до 30 дней) на активность ферментов фитоиммунитета – пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланин аммиак-лиазы в полевых условиях, которое обуславливает защитно-индуцирующее свойство глицирризинатов. Полученные данные послужат основой для развития новой концепции применения препаратов природного происхождения как индукторов неспецифической устойчивости.

9. Предобработка хлопчатника препаратами ДАГ-1 и ДАГ-2 оказывает ростостимулирующее действие, положительно влияет на хозяйственно ценные признаки хлопчатника; препараты снижают поражаемость вилтом

неустойчивого и среднеустойчивого сортов хлопчатника, и в будущем их применение будет способствовать расширению комплексных мер по защите сельскохозяйственных культур от неблагоприятных воздействий окружающей среды.

50

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC
DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES 14.07.2016.K/B/T.13.01 AT THE
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY AND THE NATIONAL
UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

KHASHIMOVA NIGORA RUSTAMOVNA

**THE FORMING MECHANISM OF COTTON RESISTANCE TO
PHYTOPATHOGENS AND METHODS OF THEIR REGULATION BASED
ON COMPOUNDS OF THE NATURAL ORIGIN**

**02.00.10 – Bioorganic chemistry
(biological sciences)**

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

51

This Post Doctorate thesis has been registered with the number 30.09.2014/B2014.3-4.B3 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The doctoral dissertation has been prepared at Institute of Bioorganic Chemistry.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English) languages on the website of the Scientific Council (<http://ss.biochem.uz>) and the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyo.net).

Scientific consultant: Akhunov Ali Akhunovich

doctor of sciences in biology, professor

Official opponents: Turdikulova Shakhlo Utkurovna doctor of sciences in
biology, docent

Tilyabaev Zaitjon

doctor of sciences in biology, professor

Tseomashko Natalya Yevgenevna
doctor of sciences in biology

Leading organization: Institute of microbiology

Defense will take place on «___»_____2016 year ___ at the once-only meeting of the Scientific council 14.07.2016.K/B/T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan at the following address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phon: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63; e-mail: asrarov54@mail.ru

Doctoral dissertation is registered in library at the Institute of Bioorganic Chemistry, it is possible to review it in library (100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63)

Abstract of dissertation sent out on «___»_____2016 year
(Protocol at the register _____on «___»_____2016 year)

A.S. Turaev

Chairman of once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D. ch. Sc., Professor

M.I. Asrarov

Scientific secretary of once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.b.Sc.

D.A. Kadirova,

Chairman of once-only Scientific seminar under once-only Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.b.Sc.

INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

Topicality and relevance of the theme of the dissertation. One of the major problems in the cultivation of cotton today among the cotton cultivating countries in the world is susceptibility of cotton with phytopathogens, which cause considerable damage to agriculture. Development of effective technologies for acceleration of the breeding process through the use of a marker associated biochemical, molecular and genetic techniques which enable to cultivate new varieties with a sign of resistance to pathogens, as well as improving the overall non-specific resistance of cotton to adverse biotic and abiotic factors by inducing natural defense mechanisms are ones of environmentally friendly methods for cotton protection.

After the independence, increase in the cotton profitability and application of the modern scientific achievements – molecular biology, biotechnology and bioorganic chemistry in cotton farming led the certain results. It is important to note the identification of the role of various biochemical systems in regulation of protective reactions, advancing the ecologically sound methods (marker associated test systems and others) and the means (application of agro drugs based on natural

biologically active compounds) which stabilize the cotton productivity.

To date, the biochemical principles of plant immunity, improvement in cotton resistance to the phytopathogens through biologically active compounds are the crucial tasks of the modern biology in the world. Evaluation of cotton enzyme system involved in the protective reaction upon infection of plants by fungal pathogens, detection of molecular structures, development of enzyme immunoassay method, determination of induced resistance mechanisms, activation of the plant genetic protective potential, development of methods to increase the resistance of plants using the glycyrrhizin acid drugs are the crucial tasks.

This dissertation research to some extent serves to carry out the tasks provided in Law of the Republic of Uzbekistan «On protection of agricultural plants against pests, diseases and weeds» (2000), Resolution of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan No148 dated 29.03.2004 «On measures of improving the structure and increasing the efficiency of plant protection service, «Roadmap for realized activities programs on modernization and development of agriculture for 2016-2020» dated 07.02.2016 approved by the Cabinet of Ministers, as well as in other legal documents adopted in this area.

Relevance of the research to the priority areas of science and technology development of the republic. This work was performed in accordance with the priority areas of science and technology of the Republic of Uzbekistan V. «Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection».

Review of international researches on the topic of the dissertation The scientific research works¹ directed to the study of molecular mechanisms of

¹The literature review for international scientific research conducted based on <http://search.ebscohost.com/>, www.proquest.com/, www.intechopen.com, C. Y. He, T. Hsiang and D. J. Wolyn. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* // Plant Pathology – 2002. – V.51. – C.225–230. and other sources.

induced resistance are carried out at the leading scientific centers and higher education institutions of the world, including Institute of Cotton Research (China), The University of Burdwan (India), Agricultural Research Centre in Giza (Egypt), Tottori University (Japan), Auburn University (USA), Biochemistry and Genetics Institute of the Scientific Center in Ufa (Russia), Cell Biology and Gene Engineering Institute (Ukraine).

As a result of the researches carried out in the world on the physiological biochemical mechanisms of induced crop resistance to phytopathogen, the number of scientific results were received, including: the set of figures were found on molecular foundation and regulatory network, which proceeds on *Gossypium thurberi* - *V. dahliae* reactions, and which provide a basis for cotton resistance to diseases with participation of peroxidase in biosynthesis and lignin forming in cotton hypocotyl (Institute of Cotton Research, China); the intensity of resistance sings in hybrids and consistency of conservation in succeeding generation were developed (Agricultural Research Centre in Giza, Egypt); biochemical alterations were scientifically proven, affected by *F. oxysporum* in inoculated plants, where

the peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia- lyase activity is increased in resistant species (The University of Burdwan, India); the chitin nanofibers were discovered, which have good permeability and water solubility, and also stimulate the formation of reactive oxygen species and expression of chitin induced genes in seedlings of *Arabidopsis thaliana* (Tottori University, Japan); existence of the plant complex cascade system of protective mechanisms was demonstrated, and which can be regulated with the chemical compounds, which stimulate the plant immune system and prepare it for protective response to biotic and abiotic stresses (Auburn University, USA); various biochemical methods for inducing the disease resistance and crop adaptation based on non biocide natural compounds (Biochemistry and Genetics Institute of the Scientific Center in Ufa, Russia); new drugs were developed based on resistance induction using certain class compounds of biogenous origin (Cell Biology and Gene Engineering Institute Ukraine).

There are number of prioritized research works in world on study of biochemical mechanisms for induced resistance and feasible methods of its regulation, including: creation of the new cotton lines and species with the valuable economic characteristics of resistance to adverse environmental factor; discovery of the disease resistant genotype based on selective and non-traditional biochemical marker associated methods; development of methods to enhance the plant resistance using biologically active agents and microelements; enhancing the cotton immune potential; development of scientifically proven recommendations for cultivation of above mentioned species in various soil-climatic regions of increased infection background and moisture deficit.

The degree of study of the problem. Foreign scientists S.Carpin, M. Crevecoeur, M. de Meyer, P. Simon, H. Greppin, C. Penel, E. Delannoy, C.M. Alba, L.M. Lagrimini, Y.F. Cai, J.H. Christensen, G.Bauw, K.G. Welinder, M.van Montagu, W. Boerjan have identified the peroxidase properties in plant protective mechanisms against phytopathogenes, where the ferment activity directly

54

correlated with the induced resistance level and can be used as the plant resistance marker. According to the research of the chitin oligomer (component of fungus cell structure) activates the transcription of gene sets, where the most responsive ones are stress protein-encoding genes – chitosan, which participates in pathogen cell wall degradation, peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase – directly involved in forming of lignin, phytoalexin, flavonoids and in synthesis of salicylic acid. There are ongoing studies of compounds, which induce the initial signaling pathways on impact of elicitors to the plant without pathogen infecting. Such plants reacts faster and more efficient on further pathogen infecting.

In CIS countries, there are ongoing research works regarding the determination of functioning mechanisms of protective proteins on contact with pathogens and regarding the interpretation of plant response processes to incubation of signaling molecule, which contributes to effective regulation of phytoimmunity, concept of induced resistance. These results are observed in

scientific publication of I.V. Maksimov, E.A. Cherepanova, R.M. Khayrullin, V.A. Andreeva, L.G. Yarullina, S.L. Tyutereva, L.I. Ilyinskaya, I.A. Tarchevsky, L.F. Gorovog. These scientists are extensively studying the physiological role of biogeous elicitors (chitin, glucan and their oligomers), phytohormones and salicylic acid.

In Uzbekistan, there are scientifically proven researches of molecular markers based on polymorphism of DNA fragments (I.Y. Abdurakhmanov), application of protein spectrum and isoenzymes of oxidoreductase as the diagnostic indicator of plant immunity (R.K. Shadmanov, Sh. Yunuskhonov), drug development as the cotton, cereal and potato immunoamplifier (S.Sh. Rashidov, M.Kh. Avazkhodjaev) are carried out at research institution of our country.

Development of the express evaluation methods of plant matter to phytopathogens, creation of immunoamplifiers for up-keeping the continuous cotton nonresponsiveness have practical and scientific importance and topicality, however, the findings regarding the action mechanisms and the proper efficiency evaluation methods of new agents for cotton protection are practically non-existent at the moment.

Connection of the theme of dissertation with the scientific-research works of higher educational institution, where the dissertation is conducted in. The dissertation research work has been carried out within the framework of academic research work of the Institute of Bioorganic chemistry FA-A10-T152 «Monitoring system for selection of wilt resistant cotton species based on application of monotypic antibody» (2009–2011 years), IK-2011-3-1 «Introduction of innovative technology for identification of cotton resistance against verticillium wilt in selection and seed breeding intended for enhancement of breeding new species» (2011-2012 years), A-9-T-002 «Creation and development of cotton resistance inducers against phytopathogen based on new compounds of natural origin» (2012-2014 years), A8-FK1-12504 «Application of genom-proteomic technology in assessment of resistance against the major sucking pests (thrips, aphids, spider mite) and fungal diseases (verticillium wilt and gummosis), creation, certification of the best linear material which combines the biological resistance

55

with high performance breeding characteristics such as early ripeness, yield capacity of raw cotton, fiber count and quality of *G.hirsutum* L cotton species» (2012-2014 years), FA-A9-T-048 «Development of biotechnology for enhancement of cotton resistance against *Verticillium dahliae* phytopathogen and *Fusarium oxysporum* based on the study of mechanisms of natural resistance inducer» (2015-2017 years).

The aims of the research are to detect biochemical mechanisms of cotton protective responses, to develop the test systems for evaluation of the resistance of breeding material to phytopathogen and to increase the resistance of the cotton to biotic factor of the environment through Glycyrrhizic acid based drugs.

The tasks of the research:

to determine the participation of phyto immunity ferments – peroxidase, its

chitin-specific isoforms, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the mechanisms of cotton's defense reaction to phytopathogen and identification of resistance indicating molecular structure;

to develop the test-systems for evaluation of cotton's resistance to fungal diseases based on enzyme linked immunoassay;

to study the efficacy of glycyrrhizic acid based drug – its zinc, magnesium, mono-ammonium salts and supramolecular complexes of glycyrrhizic and salicylic acids on formation of phyto immunity as one of the methods to enhance cotton resistance;

to identify among the recognized glycyrrhizic acid based drugs the complexes which offers the long lasting effect on ferment strength of cotton phyto immunity; to identify the function of the salicylic acid and its correlation with antioxidative enzymes in induced cotton resistance to phytopathogen; to develop and apply in agricultural practice the phyto immunostimulation technologies of the cotton towards improvement of agronomic characters, based on glycyrrhizic acid drugs and setting the optimal consumption rates; to carry out testing of DAG-1 (supramolecular complex of glycyrrhizic and salicylic acids) and DAG-2 (mono ammonium salt of glycyrrhizic acid) at the Institute of Sanitation, Hygiene and Occupational Diseases in order to receive toxicological-hygienic assessment;

to carry out the testing and registration of the DAG-1 and DAG-2 drugs at the State Chemical Committee of the Republic of Uzbekistan in order to add them into the list of pesticides and agrichemicals allowed for application in agriculture in the Republic of Uzbekistan.

The objects of research are the species of different resistance (resistant Namangan-77, semi resistant C-6524, susceptible C-4727), species, varieties and lines of cotton provided by the Uzbek Scientific Research Institute of Cotton Breeding and Seed Production, agro technologies of cotton production, and the drugs - zinc, magnesium, monoammonium salts of glycyrrhizic acid and complex of glycyrrhizic and salicylic acids, obtained at the Institute of Biochemistry.

The subject of the research is the biochemical features of resistance and susceptibility on phytopathogen, development of fast method for evaluation of

56

resistance to wilt and stimulation of cotton phyto immunity using the glycyrrhizic acid based drugs.

The methods of the research work. The classic methods of biochemistry, microbiology, immunology, histochemistry and statistics were used in this dissertation.

Scientific novelty of the research is as follows:

it is proven that mechanisms of primary protective reaction of the resistant and susceptible cotton when exposed to the *V. dahliae*, *F.oxysporum* with participation of the anionic peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase which creates local zone of oxidative stress and production of active forms of oxygen at the entry spots of the phytopathogen. It is proven that the

major role of the salicylic acid is acting as signaling molecule for the formation of systematic induces cotton resistance;

for the first time the test system for evaluation of cotton resistance to the fungal diseases was created, which enabled to forecast the cotton resistance level based on enzyme linked immunoassay;

the radically new concept is developed for application of natural drugs on cultivation of cotton, as inducers of unspecific resistance, based on DAG-1 and DAG-2 drugs in enhancement of resistance to biotic and abiotic environmental factors;

the major role of salicylic acid is identified in DAG-1, which regulates the cotton resistance to phytopathogen;

the prolonged and growth stimulating effect of the drugs is identified in pre seeding treatment of cotton seeds in concentration of 10^{-7} M, comparable with the natural phytohormones, which enables to decrease the application ratio of chemical fertilizers and increase in cotton productivity.

Practical results of the research are as follows:

the accelerated evaluation method of cotton resistance to the phytopathogen, enabling the all year resistance analysis of the cotton samples to pathogen together with breeders, which also enables reduce in breeding cycle of new species from 10 to 6-7 years;

the tests of elite cotton species, types and varieties presented by the Uzbek Scientific Research Institute of Cotton Breeding and Seed Production, agro technologies of cotton production under the MAWR RUz on resistance to wilt with the purpose to identify the most perspective forms for breeding of the new cotton species;

identification of the stimulation effect to the cotton by the four glycyrrhizic acid based drugs, whereof the DAG-1 and DAG-2 can highly induce the cotton resistance to phytopathogen;

the toxicological-hygienic assessment of the glycyrrhizic acid based drugs revealed that the drugs are refer to the IV class toxic agent, do not have cumulative property, and environmentally friendly;

the action mechanism of glycyrrhizic acid based DAG-1 and DAG-2 drugs is determined in the function of cotton disease-resistance inducers of the of prolonged

effect (up to 30 days) on activity of phyto immunity enzymes and the technology for cotton seed pretreatment is developed with the rates of drug application. **The reliability of the results** is confirmed by the fact that the application of modern biochemical and immunologic study methods and by the correspondence of the theoretical data to the obtained test findings. The statistical processing of experimental data was carried out using Student method calculating the borderline values of confidence interval of average values. The confirmation of the scientific results and practical application are the expert appraisals and the publication of the study results in peer-reviewed foreign scientific releases and receipt of three

patents for the main dissertation chapters.

Theoretical and practical significance of the research results. The scientific and practical significance of the research results is that detected features and differences of rearrangement in enzyme system of the resistant and susceptible cotton affected by the phytopathogen act as the basis for the development of cotton resistance evaluation method and creation of effective means and technologies for diseases resistance management mechanisms at the molecular level.

The practical significance of the work is that developed and implemented test system in breeding for determination of cotton resistance to wilt reduces the cycle for selection of resistant cotton species, types and lines provided by the Uzbek Scientific Research Institute of Cotton Breeding and Seed Production agro technologies of cotton production under the MAWR RUz, as well as application of DAG-1 and DAG-2 drugs as the inducers of phytoimmunity reduces the ratio of plant treatment with chemical drugs and represents itself as the promising direction for integrated cotton protection system.

Implementation of the research results. The following results obtained during the dissertational research are put into practice:

based on acquired data on study of physical-chemical, biological properties of immune enzymes and study of the mechanism of glycyrrizates, which induce the cotton resistance to phytopathogen:

the patent for invention was acquired from the Agency on Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (31.12.2012., №IAP 04619) for isolation method of homogenous chitin-specific cotton peroxidase. As the result the test system was created for evaluation of cotton resistance using the enzyme linked immunoassay method;

the patent for invention was acquired from the Agency on Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (27.02.2015., №IAP 05005) for evaluation test –system of cotton resistance to wilt. As the result the test system was approbated and implemented in the breeding practice for the evaluation of wilt resistance of the elite cotton species, types and lines;

the patent for invention was acquired from the Agency on Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (30.10.2015., №IAP 05090) for the technology on application of the supramolecular complexes of glycyrrhizic and salicylic acid, monoammonium salts of glycyrrhizic acid as the cotton resistance inducers from the local materials. As the result the influence mechanism of low

58

concentration drug (10^{-7} M) DAG-1 and DAG-2, which effectively increase the cotton resistance to resistance and prolongs the activity of main phyto immunity enzymes;

the toxicological-hygienic conclusion of the environmental safety the for the DAG-1 and DAG-2 drugs was received from the Institute of Sanitation, Hygiene and Occupational Diseases under the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan. As the result, the drugs underwent the registration tests by the State Chemistry Committee of the Republic of Uzbekistan;

DAG-1 and DAG-2 drugs received «Certificate» of the State Committee on Chemicalization Agents and Plant Protection of the Republic of Uzbekistan (23.01.2015., №1A 946 и 09.02.2016., №1A 1156) and went into the «List of pesticides and agrichemicals, allowed for application in the Republic of Uzbekistan». As the result, the glycyrrhizic acid based DAG-1 and DAG-2 drugs were applied as the dressers for the cottonseed pretreatment.

Approbation of the research results. The research results on the theme of the dissertation are presented in the form of reports and have been tested by 12 republican and international research-to-practice conferences: «Actual problems of bioorganic chemistry development» (Tashkent, 2010); «Biological plant protection, problems and contemporary achievements» (Tbilisi, 2012); «Vavilov readings» (Saratov, 2012, 2014, 2015); «Prospects for the use of natural compounds in agriculture» (Gulistan, 2013); «Modern development and problems of organic chemistry in Uzbekistan» (Tashkent, 2013); «21st century – age of intellectual generation » (Tashkent, 2016); «Achievements, Problems and Prospects of Agro phytohormones biology crops» (Tashkent, 2015); «Microorganisms and Biosphere, MICROBIOS-2015» (Tashkent, 2015); «Prospects for the use of natural compounds in agriculture» (Tashkent, 2016); «Modern Problems of Genetics, Genomics and Biotechnology» (Tashkent, 2016).

Publication of the research results. There were 31 scientific works published on the subject of this dissertation. Where 11 of them are the scientific articles and specifically nine articles were published in republican and two international journals, which had been recommended by the Higher Attestation Committee of the Republic of Uzbekistan for publication of the main scientific results in doctoral dissertation.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of the introduction, five chapters, conclusion, list of references and appendices, conclusion and a list of references and appendices. The size of the dissertation is 200 pages.

THE MAIN CONTENT OF THE DISSERTATION

In the introduction the topicality and relevance of the dissertation theme were justified, the aims and objectives, the objects and subject of the dissertation were formulated, its conformity to the priority directions of science and technology development of the republic was shown, the scientific novelty and the practical results of the study were set out, the reliability of the obtained results was proved

59

and their theoretical and practical significance were disclosed, a summary of the application of the research results and the structure of the dissertation were given.

The first chapter of the dissertation entitled «**Present concept of molecular relation mechanism between plants and phytopathogens and regulation of plant resistance**» reveals the detailed review of scientific research, related to the molecular genetic aspects of plant immunity to phytopathogens. The analysis is

given regarding the functional properties of the main stressed enzymes of the peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, salicylic acid over plant lifecycle; its participation in interactions of the host-plant and phytopathogen, as the signaling system component on pathogeny; the data is given regarding the new direction in creation of environmental friendly plant protection agents against phytopathogens – natural plant resistance inducers.

The second chapter of the dissertation entitled «**Biochemistry, biotechnology materials, conditions and methods used in dissertation**» contains the material used in this work, in particular the biochemical methods (gel filtration, capillary electrophoresis, HPLC, spectrophotometric analysis, methods for detection and determination single-strand binding protein), cell biology methods (methods for callus culture obtaining, coloring the plant tissues and microscopically investigation) and immunology (obtaining and purification of antibodies, enzyme linked immunoassay).

The third chapter of the dissertation entitled «**Participation of the phytoimmunity enzymes in response reactions of the cotton to phytopathogen**» describes the comparative analysis results of changes in activity of the main phytoimmunity enzymes – peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, in development of cotton protection reaction on exposure to *V. dahliae* fungus, enzyme activity correlation with the formation intensity of the protection reactions on phytopathogen, as well as the studies on extraction of homogenous anionic chitin-specific cotton peroxidase.

Plant resistance is the genetically determined characteristics, which is inherited and fully activated in extremal situations. To reveal the features and distinctions of rearrangement in enzymatic systems of resistant and susceptible cotton, as well as primal interaction mechanisms of *V. dahliae* fungus with cotton cell tissue on phytopathogen the activity of protective enzymes - peroxidase, polyphenol oxidase, and phenylalanine ammonia lyase were studied over the growing process of resistant Namangan-77 and susceptible C-4727 cotton species. Research of the infective process development demonstrated the distinctions in activation of immune enzymes of the resistant and susceptible cotton species, with is related to the response speed, which specifies the cotton resistance to the acting biologic factors.

The correlation dependence is determined between the peroxidase activity infected by the *V.dahliae* fungus and the necrosis formation rate, generation of superoxide anion in cotton species, distinguished by the resistance level to the wilt.

60

One of the early reaction of the plant organism on interaction of the host plant with the pathogen is the local generation of reactive oxygen species (ROS) with participation of peroxidase, binded with cell walls. The evidence thereof is the results, obtained from the histochemical investigations of revealing ROS in the cotton tissues using method intravital staining by nitro blue tetrazolium (Figure 1).

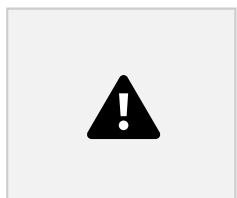


Figure 1. Formation of superoxide anion in root tissues of cotton seedlings of Namangan-77 (A) and C-4727 (B) cotton species, infected by *V. dahliae*. Intravital $\times 40$.

A B
staining by nitro blue tetrazolium,

There was greater accumulation of the superoxide anion in Namangan-77 variety (Figure 1, A) than in the susceptible C-4727 which accumulated superoxide anion in particular spots of cytoplasm (Figure 1, B). The ROS formation reaction of susceptible variety C-4727 was late, as the pathogen fungus reduced the intensity of resisting barrier formation through inhibiting the activity of enzymes of peroxidase, phenylalanine ammonia lyase. The peroxidase and polyphenol oxidase enzymes participating in pathogen localization processes were activated on time right in first 24 hours after the infection.

It is supposed that the fungus chitooligosaccharides releasing under the influence of cotton hydrolytic enzymes connect the circuits of protective reaction sequence with participation of peroxidase, polyphenol oxidase, and phenylalanine ammonia lyase ammonia lyase. Resistance reactions where one of the peroxidase isoforms catalyzes the ROS production are activated through pathogen associated molecular path of virulent pathogen recognition followed by oxidative outbreak, which leads to resistance gene expression.

It is known that ion-coupled plant peroxidase is directly involved in ROS formation, acting as the regulator and signalizator on interaction between the host and pathogen. To understand the primal intermolecular interaction processes of the cotton with the pathogen, the influence of fungus cell wall components on the activity of the ion-coupled cotton peroxidase was studied using chromatography method on *V.dahliae* fungus conidium.

It was found that the most active were the extracellular peroxidase fractions of hypocotyl and cotyledonous leafs of sustainable cotton varieties, binding with *V.dahliae* conidia, in comparison with thereof in susceptible varieties. Peroxidase fraction isospectrum eluted with conidia of the fungus showed that the resistant variety Namangan-77 has two anionic isoform pI $\sim 3,5 - 3,9$; the susceptible C-4727 variety has one anionic isoform pI $\sim 3,5$ (see. Figure 2).

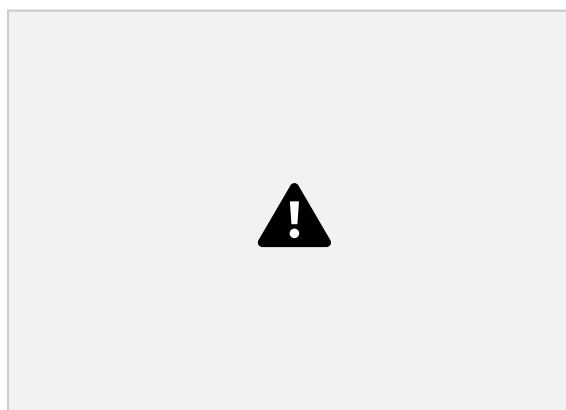


Figure 2. Peroxidase fraction isospectrum from the hypocotyl and cotyledons leaves of cotton seedlings bound with *V.dahliae* conidial suspense. The activity of peroxidase is stained by guaiacol: *a* – extracellular peroxidase of the Namangan -77 variety hypocotyles; *б* – extracellular peroxidase of the C-4727 variety hypocotyles; *в* – extracellular peroxidase of the Namangan -77 cotyledonous leaves; *г* – extracellular peroxidase of the C-4727 cotyledonous leaves; M – mixture of protein markers, colored by Coomassie CBB G-250; 1, 3, 5, 7 – extracellular peroxidase fractions before application to *V.dahliae* fungus conidia; 2, 4, 6, 8 – extracellular peroxidase fractions bound with *V.dahliae* conidias.

Thus, on the basis of the obtained results and literature data it should be argued that extracellular anionic peroxidase, holds one of the key positions in the pathogen-host system, and they should be regarded as specific to chitooligosaccharides, i.e. chitin-specific. According to our data, the chitin-specific anionic peroxidase cotton serving as a protective function «recognizes» the microorganisms containing chitin or oligomers. Such plant defense mechanism becomes a specific trend. Consequently, the spread of pathological process depends on activation speed of extracellular anionic peroxidase in infected cells and the sorption intensity of this enzyme on chitin-comprising mycelium of the pathogen.

The study of the specificity of responses involving anionic peroxidase and polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase enabled to determine the mobilization possibilities of cotton varieties, which differ in resistance. Taking into the consideration the fact that activity of anionic isoperoxidases of resistant cotton varieties in pathogenesis being increased and the quantitative content being increases several times, then these isoperoxidases may well serve as markers of cotton resistance to pathogens.

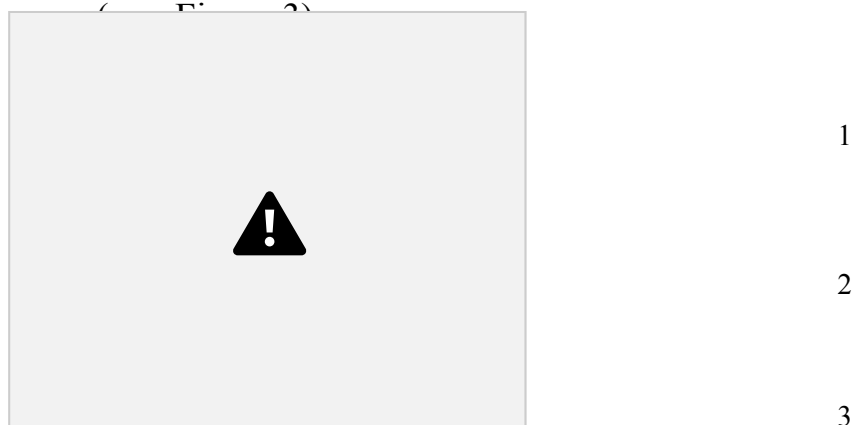
In this connection, the important matter was the isolation and purification of anionic peroxidase of wilt-resistant cotton varieties (Namangan-77) towards using thereof in creation of test systems to determine the wilt-resistance of cotton. Use of anionic peroxidase as a marker with application of the immunochemical method is more accurate and reproducible method in comparison with the existing methods for cotton breeding.

For the first time we developed and mastered the extraction method of chitin specific anionic peroxidase cotyledons of 7-day old cotton seedlings. Its activity was maintained at the all stages of purification during the separation process.

Extraction of highly purified chitin-specific peroxidase drug enabled us to study the physical and chemical properties of the enzyme. The molecular mass of extracted peroxidase isoforms was defined using the electrophoresis method. It was 93,5 и 85,0 kDa, which corresponds the isopoints of pI 3,5 and 3,9. Numerical value of K_m for chitin-specific cotton seedling isoperoxidase, calculated from the linear dependence related to guaiacol substrate equaled to $2,9 \pm 0,6 \cdot 10^{-4}$ M.

Purified chitin-specific peroxidase of resistant and susceptible cotton species has fungal activity on virulent *V.dahliae* AH-3strain lawn. Educued by our team the fungistatic property of extracellular cotton peroxidases suggest that they, among other isoforms, prevent the spread of phytopathogen in healthy tissue and negatively affect the development of the fungus.

To obtain specific antibodies for the application in an enzyme linked immunoassay method (ELISA) the specific chitin-peroxidase were obtained in homogeneous form by preparative separation of the polyacrylamide gel electrophoresis plates under denaturing conditions. The homogeneity of isolated isoforms was validated by the isoelectric focusing and capillary electrophoresis



A B

Figure 3. Analysis of chitin-specific isoforms of cotton peroxidase using the isoelectric focusing (A) and capillary electrophoresis (B): A) 1 – mixture of markers; 2 – initial fraction; 3 – isoform of pI 3,9; 4 - isoform of pI 3,5 (Coomassie stain CBB 250); 5 - initial fraction; 6 - isoform of pI 3,9; 7 - isoform of pI 3,5 (guaiacol stain). B) 1 – chitin-specific peroxidase fraction prior to separation of isoforms; 2 – isoform of pI 3,9; 3 – isoform of pI 3,5.

As shown in Figure 3 (A), obtained anionic peroxidase were identified by substrate guaiacol staining.

Thus, this method enabled to isolate individual chitin-specific highly purified peroxidase isoforms and use it to produce the polyclonal antibodies. Antibodies prepared to pI 3,9 peroxidase isoform.

The fourth chapter of the dissertation entitled «**Development of test systems for determination of cotton resistance to wilt**» lists the results of immunological studies on the production of polyclonal antibodies to anionic chitin-specific cotton

peroxidase, the study of antibody sensitivity, the influence of physical and chemical factors on the sensitivity and specificity of enzyme immunoassay,

63

application in breeding practice of the testing the stability of various hybrid cotton lines and species to wilt based on developed test system.

The polyclonal antibodies (PcAB) to the homogenous anionic cotton peroxidase were extracted.

The antibody titer in the obtained serum equaled to 1×10^6 , which was determined by direct ELISA. Isolation and purification of antibodies was carried out in several stages. PcAB from the rabbit serum was extracted by double precipitation with saturated ammonium sulfate. Hereupon, the desalting was conducted and the fraction of immunoglobulins (IgG) was extracted on anion exchange membrane Sartobind D15 (Germany) in gradient to 0,3 M NaCl in a Na phosphate buffer (see. Figure 4).

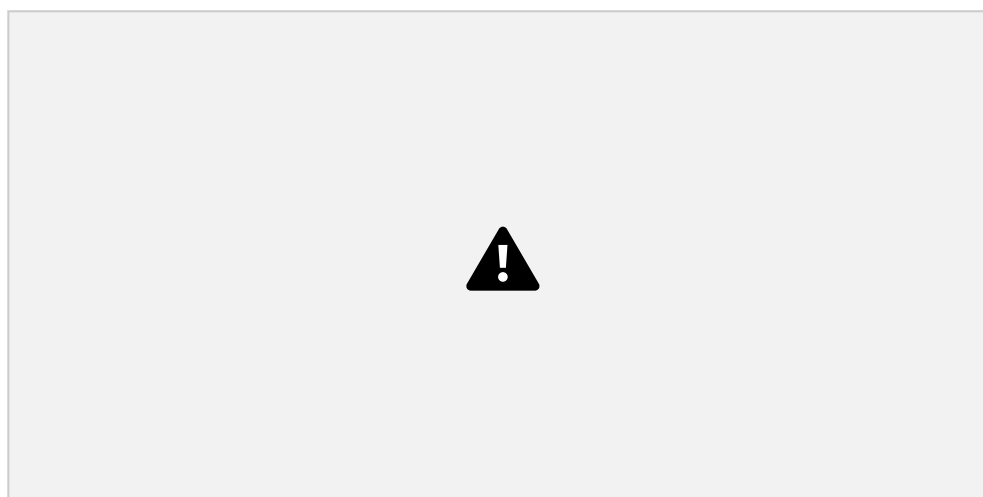


Figure 4. Extraction of immunoglobulin from the rabbit serum on anion exchange membrane Sartobind D15: A – elution profile from the membrane; B – electrophoregram of the obtained antiserum in 10% SDS - PAAG. 1 – purified immunoglobulin; 2 – remaining immunoglobulin admixed with other serum proteins; 3 – markers.

As the result the highly purified IgG to anionic isoforms of cotton peroxidase were obtained. The sensitivity of the purified IgG allows to determine the 3-4 ng of antigen in 0.1 ml of plant extract. Non-specific binding was not exceeded 0,05-0,10 OE₄₀₅. Based on these results it should be concluded that PcAB to anionic cotton peroxidase are suitable for application in the development of ELISA assessment of cotton resistance to pathogens.

We chose the polyclonal indirect ELISA embodiment, because of its economical advantage which does not require special conditions for production of antibodies compared with the monoclonal antibodies. According to some authors, application of polyclonal antibodies as the substrate or as a conjugate with enzyme can improve detection sensitivity and to eliminate «narrow» specificity which is common for monoclonal antibodies.

The PcAB, obtained after the fractionation process of antiserum with ammonia sulphate, were used for production of the conjugate with alkaline phosphatase. Operational dilution of PcAB conjugate the alkaline phosphatase equaled to 1:2000.

64

The studies identified the optimal parameters for indirect enzyme immunoassay: working dilution of sorbent antibodies was 5 ng/ml, incubation time of «substrate» - the first layer of antibodies was 18 hours at + 40° C; buffers compositions – 0,02 M of carbonate-bicarbonate buffer, pH 9,6 for dilution of sorbent antibodies; for blocking and washing step - 1% BSA, 0,15 M NaCl 0,05% Tween-20 in phosphate buffered saline pH 7,2, enhancing assay sensitivity (reduction of «background»); for conjugate dilution - 0.05 M TRIS buffer solution (pH 8,0) containing 5% of BSA, 0,05% Tween-20, 0,01 M $MgCl_2$. In such manner, the test system for evaluation of cotton resistance to wilt was firstly developed based on the quantitative determination of chitin-specific isoperoxidase. The test system allows selecting the resistant plants in a short period of time (10-12 days), which enables the quick study of a large number of plant material by selecting the most promising form of cotton

For the first time in cotton breeding practice the resistance of various cotton hybrid lines, species to wilt were conducted based on developed test systems. The results of field experiments on determination of the cotton resistance to wilt confirmed the accuracy of the laboratory data. Application in breeding process the biochemical assessment technology based on resistance markers significantly reduces the breeding time, and enables the early breeding stages to select genotypes according to the resistance, reducing the chance of subjective evaluation, improving the system performance. Based on the testing method of the Research Institute of breeding, seed production and agricultural technologies of cotton cultivation, more than 200 samples of cotton varieties and lines were analyzed.

The fifth chapter of the dissertation «**Influence of glycyrrhizinate as the inducer of cotton resistance to phytopathogen *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum***» presents the study of glycyrrhizic acid-based drug effect mechanism of zinc, magnesium, monoammonium salt and its supramolecular complexes with salicylic acid to phytoimmunity enzymes towards regulation of cotton resistance pathogens, effect of low concentrated glycyrrhizic acid-based drug on the concentration of ABA, IAA and SA in cotton seedlings, effect of salicylic acid on cytophysiologic reactions in tissues of cotton seedlings and tylosis on *V.dahliae* infection, effect of pre-sowing seed treatment with glycyrrhizic acid-based drug (DAG-1, DAG-2) towards regulation of cotton resistance pathogens.

Impact of resistance inductors on plant metabolism is one of the least studied matters in biology. However, the use of such compounds has both theoretical and

practical importance, since finding the principles of this impact enables to control plant disease resistance mechanisms at the molecular level. The indicators, which reflect the physiological status of the plant, are the enzymes of antioxidant systems (peroxidase) and phenolic metabolism (polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase). Changes in the level of their proportion before and after treatment with biologically active natural compounds enables to evaluate how cotton was subjected to stress during

65

processing, and whether it is able to maintain resistance on interaction with pathogens.

The magnesium, zinc, monoammonium salt of glycyrrhizic acid and its supramolecular complex with salicylic acid were obtained at the The Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, based on the glycyrrhizic acid from licorice root (*Glycyrrhiza glabra* L). For the first time the effect of these drugs was studied on the activity of enzymes phytoimmunity (peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia lyase) in cotton seedlings and calluses of the resistant Namangan-77, P-6524 moderately resistant C-4727 which differ in their resistance to *V. dahliae* and *F. oxysporum*. The effective concentration of 10^{-7} M, which affects the activity of immune enzymes has been established experimentally.

The experiments on the callus culture and cotton seedlings showed that the from the four studied glycyrrhizin acid based drugs the high inducing activity had a supramolecular complex with salicylic acid (DAG-1) and monoammonium glycyrrhizic acid salt (DAG-2). The drugs directly affected the activity of phytoimmunity enzymes, forming the nonspecific systemic cotton resistance

Figure 5).

Enzymes U/mg

Enzyme

DAG-2 Cont. DAG-1 DAG-2 Namangan-77

U/mg

Polyphenoloxidase

phenylalanine

Peroxidase

ammonia lyase

Cont. DAG-1 DAG-2

Figure. 5. Treatment effect of various cotton varieties using DAG 1 and DAG-2 drugs on the activity of anionic peroxidase,

polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase in seedlings infected with *F. oxysporum*.

The effect of inducers on the increase in activity of anionic peroxidase, polyphenoloxidase during the infection, indicates the processes of lignification of the cotton cell walls for mechanical isolation of the pathogen, as well as in

formation of reactive oxygen species. Activity stimulation of phenylalanine ammonia-lyase - the key enzyme of phenyl propanoid pathways, probably led to increased synthesis of phytoalexins, salicylic acid - endogenous eliciter of systematic nonspecific cotton resistance.

66

The priority regulation system of enzyme activity in the plants may include phytohormones, the ratio of which regulates the development of adaptive processes against the stress effects. In this regard, the effect of DAG-1 and DAG-2 drugs on phytohormone level of abscisic acid (ABA), indoleacetic acid (IAA) and salicylic acid (SA) were studied in the 7 day-old etiolated cotton seedlings, differing in resistance to pathogens.

The results showed (see. Figure 6) that the SA content in tested cotton seedlings treated with DAG-1 and DAG-2 drugs was significantly higher compared with C-65 resistant variety.

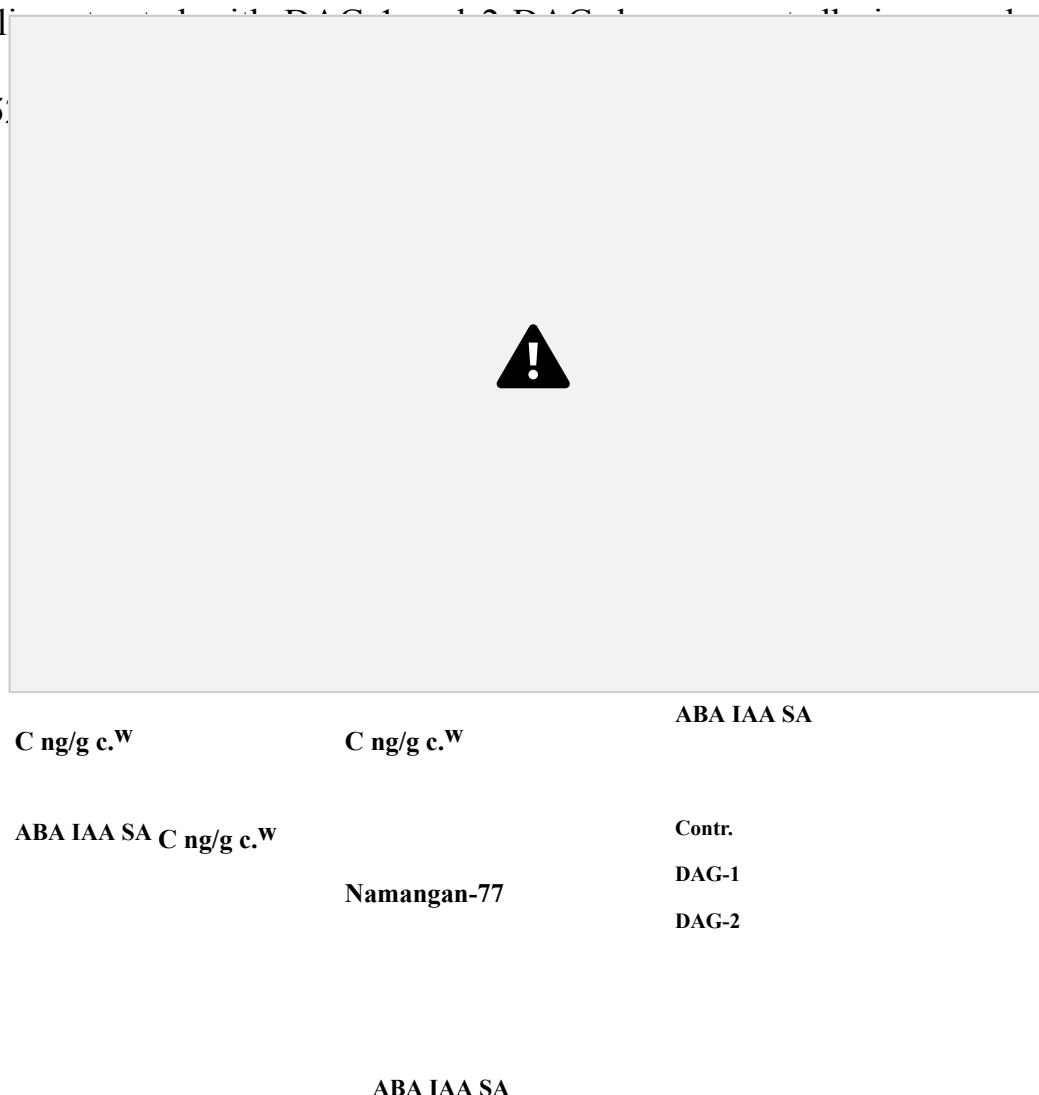


Figure 6. The content of ABA, IAA and SA phytohormones in various seedlings of cotton varieties, treated by DAG-1 and 2-DAG drugs in concentration of 10^{-7} M.

However, DAG 2 causes shifts in a cotton phytohormone balance associated with the parallel accumulation of ABA and IAA. Growth promoting effect of DAG-2 mediated by its effect on the level of IAA appeared also in increase in mitotic activity and in the size callus cells compared to controls. Increase in levels

of these phytohormones under the influence of drugs, could probably contribute to cotton preadaptation to various stress factors and reduce their damaging effect intensity.

Stimulation of the growth processes and the induction of resistance to wilt in pretreated cotton varieties by the drugs are associated with changes in the intensity of biochemical reactions. In the course of the experiments it was found that under the influence of different exogenous SA concentrations (0,001; 0,01; 0,1 mM) there was an increase in immune activity of enzymes in the presence of *F. oxysporum*. Analysis of the results showed that the greatest effect was expressed in concentration of 0.01 mM on combined effect of *F. oxysporum* in cotton seedlings (see. tab. 1).

67

Table 1.

Effect of salicylic acid (SA) on the activity of anionic chitin-specific peroxidase of cotton seedlings under the combined effect of *F. oxysporum* ($M \pm m$, $n=10$, $P<0,05$)

7-d.o. seedlings	Activity of anionic chitin-specific peroxidase		
	Control, H ₂ O	Treatment by SA 0,01 mM	SA + <i>F.oxysporum</i> (3 day)
C-4727	18,5 ± 15,2	35,8 ± 17,5	48,3 ± 25,4
C-6524	26,7 ± 9,6	85,6 ± 21,6	92,7 ± 17,2
Namangan-77	26,2 ± 9,5	105,6 ± 8,3	135,2 ± 21,6

As seen in Figure 7, the activity of extracellular peroxidases repeatedly increased in all studied varieties of cotton during processing SA, and especially on combined effect of fusarium fungus.

The triggering process, which determines the subsequent cellular changes in cotton caused by the SA, is the strengthening of ROS generation, which was detected by histochemical staining of hypocotyl tissue of seedlings (see. Figure 7).

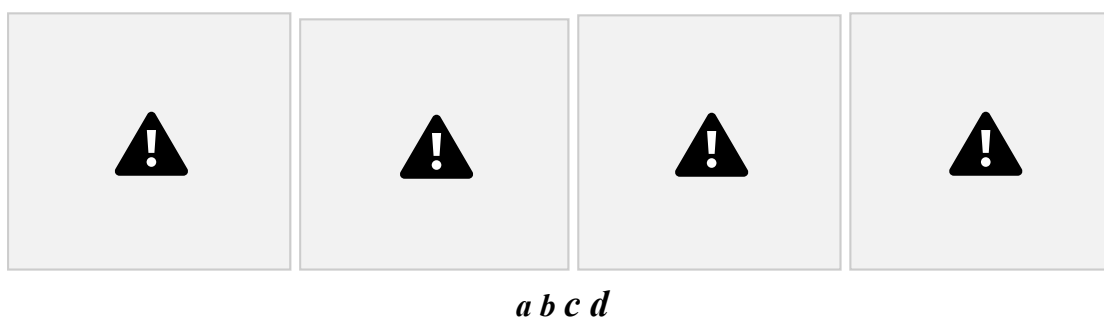


Figure 7. Histochemical analysis of extracellular peroxidase activity in cotton seedlings and calluses treated by salicylic acid. Cotton tissues. Amplification $\times 40$. *a* – cotton hypocotyl cells, stained with *o*-dianisidine + H₂O₂; *b* – callus cells stained with *o*-dianisidine +

H₂O₂; *c* – ROS formation in cotyledonous cotton leaves; *d*- ROS in cotton callus cells.

These changes can be caused by the interaction of SA with anionic peroxidase apoplasts. Localization of extracellular peroxidase was determined using the staining of cotton tissues with *o*-dianisidine + H₂O₂. Observed changes in condition of infected callus growing in a culture medium supplemented with 0,01 mM SA resulted from the defense reactions under the influence of SA and, in particular, leading to thickening of the cell wall. The SA contributes to increase in protective effect by increasing output of isoperoxidase into the extracellular phase. Probably, the lignification process may be specifically concentrated at the site of infection, resulting in isolation of surrounding plant tissues from the infected area. Efficiency of the lignification mediated by activation of phenolic compounds and ROS synthesis, and their oxidation peroxidase, can increase several times in connection with formation of pathogenic fungal structures in the infection area.

Thus, the SA can act as mediator in the signaling circuits and modulator of ROS cotton seedlings and calluses.

68

The effect of pre-sowing seed treatment by Zn, Mg, monoammonium salt of glycyrrhizic acid and supramolecular complexes with salicylic acid in low concentrations (10^{-7} M) on prolonging the activity of enzymes of cotton phytoimmunity over the dynamics of sprout development in open ground (see. Table. 2).

Table 2.

Prolonged activity of root phytoimmunity enzymes of cotton seedlings as per 30 days after sowing the seeds, treated by glycyrrhizinate in concentration of 10^{-7} M ($M \pm m$, $n=10$, $P < 0.05$.)

Test options	Chitin-specific peroxidase, E/mg	Polyphenoloxidase, E/mg	Phenylalanine ammonia lyase, E/mg
C-4727			
Control	171,59 ± 5,4	237,44 ± 0,16	52,95 ± 2,7
ГK/CK (DAG-1)	318,44 ± 6,2	623,85 ± 0,25	714,17 ± 0,5
Na ₄ Zn(GA)	127,89 ± 7,5	220,64 ± 0,19	0,00
NH ₄ (GA) ₂ (DAG-2)	287,87 ± 8,3	494,17 ± 0,15	419,68 ± 0,12
ГK	304,95 ± 9,6	417,78 ± 0,13	0,00
Mg(GA) ₂	129,80 ± 7,1	214,45 ± 0,12	0,00
C-6524			
Control	182,7 ± 7,3	569,08 ± 0,32	29,8 ± 1,32

GA/SA (DAG-1)	185,11 ± 7,5	760,76 ± 0,56	125,0 ± 7,9
Na ₄ Zn(PC)	224,68 ± 9,6	963,52 ± 0,48	08,1 ± 0,06
NH ₄ (GA) ₂ (DAG-2)	737,53 ± 11,8	316,57 ± 0,78	37,0 ± 2,1
GA	212,77 ± 7,9	259,38 ± 0,86	0,00
Mg(GA) ₂	53,45 ± 4,3	626,24 ± 1,12	0,00
Namangan-77			
Control	349,82 ± 3,2	356,07 ± 1,25	20,68 ± 0,96
GA/SA (DAG-1)	238,55 ± 8,4	556,70 ± 7,6	101,2 ± 6,2
Na ₄ Zn(FK)	507,02 ± 2,8	284,05 ± 5,6	0,00
NH ₄ (GA) ₂ (DAG-2)	492,80 ± 7,0	278,08 ± 4,8	91,88 ± 4,4
GA	320,48 ± 2,1	410,64 ± 3,7	0,00
Mg(GA) ₂	309,46 ± 2,4	400,25 ± 5,1	0,00

Analysis of the results showed that the greatest effect was expressed in the root system. According to Table 2, the activity of peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase in the roots of 30 day cotton seedlings pretreated by DAG-1 (GA / SA 2: 1) and DAG-2 (of NH₄ (GA) 2) drugs is active for 30 days in all varieties in relation to the control and the rest of glycyrrhizic acid complexes. The observed prolonging activity of the investigated DAG-1 and DAG-2 drugs once again underlines their inducing effect on the cotton phytoimmunity enzymes, especially in susceptible varieties.

69

Practical work in collaboration with the Research Institute of breeding, seed production and agricultural technology of cotton breeding MAWR RUz at the «S. Segizbayev» farm in Akkurgan district of Tashkent province demonstrated the positive effect on the economically valuable characteristics of cotton and protective-stimulating effect of DAG-1 and DAG-2 drugs (see. Table. 3).

Table 3

Effect of glycyrrhizin acid based drugs on economically valuable characteristics of cotton (M±m, n=10)

Test options	First cotton pod opening date (DD/MM)	Plant height (cm)	Total per plant cotton pods as of 15.08	Total cotton pod opened as	<i>V.dahliae</i> affect as of 15.09.2015 (wilt index)*
--------------	---------------------------------------	-------------------	---	----------------------------	--

				of 15.08	
C-4727					
Control	10.08.2015	98±1,90	17 ± 0,80	10 ±0,58	4,14 ± 0,53
DAG-1	09.08.2015	101±1,75	19 ± 0,70	14 ±0,59	1,8 ± 0,29
DAG-2	10.08.2015	102±1,35	20 ± 5,17	15 ± 0,46	1,3 ± 0,23
C-6524					
Control	08.08.2015	80 ± 5,06	19 ± 1,41	15 ± 0,62	3,2 ± 0,11
DAG-1	08.08.2015	101,3 ± 2,91	21 ± 0,70	16 ± 0,60	0,6 ± 0,22
DAG-2	08.08.2015	107 ± 2,03	24 ± 0,51	17 ± 0,37	1,1 ± 0,16
Namangan-77					
Control	09.08.2015	103,6± 2,23	22 ± 0,78	15 ± 0,82	1,1 ± 0,16
DAG-1	09.08.2015	104,1±13,98	22 ± 1,36	15 ± 0,55	0,5± 0,44
DAG-2	09.08.2015	110,1±11,04	25 ± 0,47	19 ± 0,37	1,0 ± 1,94

*Note:*all the test options were conducted in three replications, with 10 plants on each option (n = 10), a significant difference from control P <0.05; * - wilt index was evaluated by the degree of wilt affect in the field conditions.

This is evidenced by the data in Table 3, demonstrating the decrease in «Wilt index» of the susceptible and moderate resistant cotton varieties in the field. Thus, the seed pre-treatment of seeds with glycyrrhizic acid based DAG-1 and DAG-2 drugs demonstrated protective-inductive and growth promoting effect, which ultimately contributed to the increase in cotton yield.

Based on independent tests carried out by the organizations authorized by the State Chemical Commission of Uzbekistan (Institute of Plant Protection and Breeding Research Institute, seed and agro-technology of cotton breeding MAWR RUz), and based on positive conclusion of application feasibility of DAG-1 and DAG-2 drugs in pre-treatment of cotton seeds the correspondent certificates №1 A 1156 and №1 A 946 were received for registration of drugs in the Republic of Uzbekistan.

CONCLUSIONS

1. The features of cotton response reaction were studied with actively

involved peroxidase immune enzymes, polyphenol oxidase, and phenylalanine ammonia-lyase in cotton *V. dahliae* pathogenesis. It was found that the initial stage of cotton protective response to contamination by fungi is the generation of reactive oxygen species, coupled with the activation of anionic peroxidase. Obtained results open possibilities for creation of effective agents and technologies for managing the disease-resistance mechanisms on molecular level.

2. The marker enzymes, which determines the development of defense responses in cotton, are the anionic peroxidases associated with cell wall and exhibits the specificity for fungal chitin. Two homogeneous anionic chitin-specific cotton peroxidases are identified with isopoints pI ~ 3,5 and ~ pI 3,9 and molecular weight of 93,5 kDa and 85 kDa. Km and their substrate specificity were determined, which are important in development of the effective method for resistance assessment of the cotton to wilt.

3. Obtained polyclonal antibodies to cotton homogeneous chitin-specific peroxidase pI ~ 3,9. Specificity and sensitivity of the polyclonal antibodies was determined and the antibody conjugate was extracted with alkaline phosphatase. The conditions for enzyme immunoassay were optimized, which serve to improve the methods of rapid selection of cotton resistant forms.

4. For the first time in cotton breeding, more than 200 samples of elite cotton varieties, species, cultures and lines were tested for the resistance to wilt based on the developed test systems. Whereby the obtained data showed the identity of the field tests. This in turn enables to create new cotton species based on scientific validation, and saves the time and sources for the field tests

5. The inducing action of DAG-1 (supramolecular complex glycyrrhizin and salicylic acid) and DAG-2 (monoammonium salt of glycyrrhizic acid) was proved on the activity of cotton phytoimmunity enzymes. The effective drug concentrations of 10^{-7} M that stimulates the system of cotton resistant to pathogens was determined, which reveals the prospects to use the compounds of non-biocidal origin, and which is important in agricultural practice.

6. Low concentrations of DAG-1 and DAG-2 drugs affect the balance of plant hormones - IAA, ABA and SA in cotton seedlings. It was revealed that the drugs affect the increase in SA content, contributing to the cotton preadaptation to biotic stress factors and reduce in strength of its damaging effect. Obtained data in the future will serve for creation and improvement of new age drugs with immunomodulatory properties.

7. It is proved that the SA enhances the activity of anionic peroxidase, indicating the involvement of enzyme in the protective actions; it stimulates the activity of phenylalanine ammonia-lyase, synthesizing new SA molecules. It is conclusively established that the SA contained in DAG-1 is responsible for the increased activity of cotton immune enzymes.

8. Pretreatment of cottonseeds with DAG-1 and DAG-2 drugs has the highly prolonged effect (up to 30 days) on the activity of phytoimmunity enzymes -

causes the protective induced property of glycyrrhizates. Obtained data will serve as the basis for development of new concept to apply the drugs of natural origin as the inducers of non-specific resistance.

9. Pretreatment of the cotton using the DAG-1 and DAG-2 drugs has the growth stimulating effect, positive effect on economic valuable characters of cotton, reduces the susceptibility of the susceptible and moderate resistant cotton varieties to wilt, and also contributes to widening the complex measures for crop protection against environmental adverse impact.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST of PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Pshenichnov E., Khashimova N., Akhunov A., Golubenko Z., Stipanovic R.D. Participation of Chitin-Binding Peroxidase Isoforms in the Wilt Pathogenesis of Cotton // American Journal of Plant Sciences. 2011. -V.2. -P.43-49 (03.00.00; №2).

2. Khashimova N., Akhunov A., Pshenichnov E., Vshivkov S., Mustakimova E., Golubenko Z. Some Aspects of the Interaction between Cotton Anionic Peroxidases and *Verticillium dahliae* Kleb. // The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. 2013, - №7/2, -P. 24-30 (03.00.00; №19).

3. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Пшеничнов Е.А., Голубенко З., Хохлачева В.Е. Молекулярные особенности взаимодействия анионных изоформ пероксидазы хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с грибом *Verticillium dahliae* // Доклады Академии Наук РУз. Ташкент, 2011. - №5. - С.63-69. (03.00.00; №6).

4. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Далимов Д.Н., Автономов В.А. Мамасолиева М.А. Диглицирризинаты – препараты нового поколения, повышающие устойчивость хлопчатника к *Verticillium dahliae* // Доклады Академии Наук РУз. Ташкент, 2015. - № 5. - С.52-56. (03.00.00; №6).

5. Хашимова Н.Р., А.А. Ахунов, М.А. Мамасолиева, М.Б. Гафуров. Супрамолекулярный комплекс глицирризиновой кислоты с салициловой кислотой - экологически безопасный индуктор устойчивости хлопчатника // Узбекский химический журнал. Ташкент, 2016. - №4.- С.79-86. (02.00.00; 03.00.00; №6).

6. Абдурашидова Н.А., Ахунов А.А., Мустакимова И.Ч., Голубенко З., Хашимова Н.Р., Автономов Вик.А., Курбонов А.Е. Отбор перспективных форм хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. по биохимическим показателям // Вестник аграрной науки Узбекистана. Ташкент, 2016. - №1. – С.11-15. (03.00.00; №8).

7. Хашимова Н.Р., Мамасолиева М.А., Бабаева Д.Т. Биохимический анализ устойчивости линий хлопчатника *G .hirsutum* L. к вертициллезному вилту // Ўзбекистон Миллий университети хабарлари - 2016. - №2/3. – С.146-149. (03.00.00; №9).

8. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Мамасолиева М.А., Бабаева Д.Т. Влияние салициловой кислоты на цитофизиологические реакции хлопчатника, инфицированной *Verticillium dahliae* // Ўзбекистон Миллий университети хабарлари. Ташкент, 2016. - №2/3. – С.153-157. (03.00.00; №9).

9. Патент РУз № IAP 04619. Способ выделения гомогенной хитин специфичной пероксидазы из проростков хлопчатника для использования в тест-системе на устойчивость к вилту / Ахунов А.А., Хашимова Н.Р.,

Голубенко З., Пшеничников Э.Ч., Вшивков С.О. // Расмий ахборотнома. – 2012. - №2.

10. Патент РУз № IAP 05005. Способ определения устойчивости сортов хлопчатника к вилту / Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Пшеничников Е.А., Автономов В.А., Амантурдиев Ш.Б. // Расмий ахборотнома. – 2015. - №2.

11. Патент РУз № IAP 05090. Способ борьбы с вилтом хлопчатника / Ахунов А.А., Хашимова Н.Р., Пшеничников Е.А., Автономов В.А., Далимов Д.Н., Матчанов О.Д., Гафуров М.Б. // Расмий ахборотнома. – 2015. - №10.

II бўлим (II часть; Part II)

12. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Пшеничников Е.А., Вшивков С.О., Голубенко З. Исследование иммунологического полиморфизма изоформ пероксидазы хлопчатника // Актуальные проблемы развития биоорганической химии (сборник тезисов международной научной конференции) - Ташкент, 2010. - С.25.

13. Пшеничников Е.А., Хашимова Н.Р., Вшивков С.О., Мустакимова Э.Ч., Голубенко З., Ахунов А.А. Роль хитин-специфичных изоформ пероксидазы в патогенезе вилта хлопчатника // Актуальные проблемы развития биоорганической химии (сборник тезисов международной научной конференции) - Ташкент, 2010. - С.26.

14. Khashimova N., Pshenichnov E., Vshivkov S., Mustakimova E., Akhunov A. Perspectives of using ecologically safe compounds of glycyrrhizic acid for cotton protection against diseases // Biological plant protection, problems and contemporary achievements - Tbilisi, 2012. – P.27.

15. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Пшеничников Е.А., Хашимова З.С., Автономов В.А. Использование иммуноферментной тест-системы для оценки вилтоустойчивости линий и сортов хлопчатника // Вавиловские чтения (сборник статей научно-практической конференции) - Саратов, 2012.- С.153-157.

16. Матмуротов Б.Я., Гафуров М.Б., Далимов Д.Н., Хашимова Н.Р., Ахунов А.А. Табиий бирикмалардан қишлоқ хужалигида фойдаланиш истиқболлари // Республика илмий амалий анжумани материаллари тўплами - Гулистон, 2013. – Б.9.

17. Ахунов А.А., Голубенко З., Хашимова Н.Р., Пшеничников Е.А., Мустакимова Э.Ч., Абдурашидова Н.А. «Развитие биоорганической химии в Узбекистане» // Книга посвященная 100 летию академика А.С. Садыкова. (международная научная конференция) - Ташкент, 2013. - С.41-73.

18. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Пшеничников Е.А., Далимов Д.Н., Гафуров М.Б. Влияние диглицирризинатов на активность ферментов, участвующих в формировании устойчивости хлопчатника к вилту // Современное развитие и проблемы биоорганической химии (сборник тезисов международной научной конференции) - Ташкент, 2013. - С.42-43.

19. Мамасолиева М.А., Хашимова Н.Р., Ахунов А.А. Гафуров М.Б. Далимов Д.Н. Глицирризинатларни ғўза ўсимлигининг оксидловчи

74

ферментларига таъсирини ўрганиш // XXI аср – интеллектуал авлод асри (илмий амалий анжуман материаллари) - Тошкент, 2014. – Б.100-101. 20. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Автономов В.А., Ларина Л.А. Влияние солей глицирризиновой кислоты на активность ферментов каллусных культур хлопчатника при воздействии *Verticillium dahliae* // Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 127-й годовщине со дня рождения акад. Вавилова - Саратов, 2014.- С.156-160. 21. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Автономов В.А. Применение протеомной технологии при оценке устойчивости вертициллезному вилту линейного материала хлопчатника вида *G.hirsutum* L. // Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 127-й годовщине со дня рожд. акад. Вавилова - Саратов, 2014. - С.161-164. 22. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Мамасолиева М.А., Асадов Ф., Автономов В.А., Коххаров А.М. Влияние лазерного излучения на некоторые физиолого-биохимические процессы хлопчатника // Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 127-й годовщине со дня рождения акад. Вавилова - Саратов, 2014. - С.165-169. 23. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А. Автономов Вик.А, Мамасолиева М.А. Гафуров М.Б. Далимов Д.Н. Индуцирование системной устойчивости хлопчатника препаратами на основе глицирризиновой кислоты из корней солодки *Glycyrrhizia glabra*. L. // Достижения, проблемы и перспективы агробиологии сельскохозяйственных культур (республиканская научно практическая конференция) - Ташкент, 2015. - С.155-156.

24. Абдурашидова Н.А., Ахунов А.А., Голубенко З., Мустакимова Э.Ч., Хашимова Н.Р. Использование биохимических показателей при выведении новых сортов хлопчатника // Микроорганизмы и биосфера. MICROBIOS-2015 (международный симпозиум) - Ташкент, 2015. - С.21.

25. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А. Мамасолиева М.А. Убайдуллаева Х.А. Хохлачева В.Е. Влияние препаратов глицирризиновой кислоты на активность оксалаат оксидазы в каллусах хлопчатника // Микроорганизмы и биосфера. MICROBIOS-2015 (международный симпозиум) - Ташкент, 2015. - С.258-259.

26. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Мамасолиева М.А., Убайдуллаева Х.А., Хохлачева В.Е. Салициловая кислота как регулятор устойчивости хлопчатника к *Verticillium dahliae* // Микроорганизмы и биосфера. MICROBIOS-2015 (международный симпозиум) - Ташкент, 2015. - С.259-260.

27. Хашимова Н.Р., Автономов В.А., Мамасолиева М.А., Наврузов С.Б., Ахунов А.А., Узбеков В.В. Влияние комплекса глицирризиновой и салициловой кислот на активность фенилаланин аммоний-лиазы и содержание свободной салициловой кислоты в листьях хлопчатника при инфицировании грибом *F. oxysporum* // Сборник статей международной научно-практической

конференции, посвященной 128-й годовщине со дня рождения акад. Вавилова - Саратов, 2015. – С.171-174.

28. Абдурашидова Н.А., Ахунов А.А., Мустакимова Э.Ч., Голубенко З., Хашимова Н.Р. Автономов Вик.А.Курбонов А.Е. Отбор перспективных форм

75

хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. по биохимическим показателям // Сборник статей Международной научно-практической конференции, посвященной 128-й годовщине со дня рождения акад. Вавилова - Саратов, 2015.- С.81-83.

29. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Мамасолиева М.А., Кулдашева К.М., Далимов Д.Н. Влияние препаратов глицирризиновой кислоты на содержание свободного пролина в хлопчатнике // Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривожига келажак (илмий-амалий конференцияси материаллари тўплами) Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон миллий университети - Тошкент, 2016. – Б.18-19.

30. Хашимова Н.Р., Мамасолиева М.А. Ахунов А.А., Наврузов С.Б. Ёўзанинг каллус тўқималаридаги оксидловчи-қайтариловчи ферментлар фаоллигига табиий асосли бирикмаларнинг таъсири // Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривожига келажак (илмий-амалий конференцияси материаллари тўплами) Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон миллий университети - Тошкент, 2016. – Б.198-199.

31. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Мамасолиева М.А., Убайдуллаева Х.А., Хохлачева В.Е. Индуцирующий эффект супрамолекулярного комплекса глицирризиновой и салициловой кислот на ферменты каллусной культуры хлопчатника // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии (республиканская научно-практическая конференция) - Ташкент, 2016. - С.55-56.

Босишга рухсат этилди: _____ 2016 йил
Бичими 60x45 ¹/₁₆, «Times New Roman»
гарнитурада рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 5. Адади: 70. Буюртма: № _____.

Ўзбекистон Республикаси ИИВ Академияси,
100197, Тошкент, Интизор кўчаси, 68

«АКАДЕМИЯ НОШИРЛИК МАРКАЗИ» ДУК