

**ЎСИМЛИК ВА ҲАЙВОНОТ ОЛАМИ ГЕНОФОНДИ ИНСТИТУТИ,
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ, ГЕНЕТИКА ВА
ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ
16.07.2013.В.15.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

ЭГАМБЕРДИЕВ ШАРОФ ШУҲРАТОВИЧ

**ЎЗБЕКИСТОНДА ҒЎЗАНИ ЗАРАРЛАНТИРУВЧИ
FUSARIUM ТУРКУМИДАГИ ПАТОГЕНЛАРНИНГ МОЛЕКУЛЯР
ИДЕНТИФИКАЦИЯСИ ВА ТАВСИФИ**

**03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Эгамбердиев Шароф Шухратович

Ўзбекистонда ғўзани зарарлантирувчи *Fusarium* туркумидаги
патогенларнинг молекуляр идентификацияси ва тавсифи..... 3

Эгамбердиев Шароф Шухратович

Молекулярная идентификация и характеристика патогенов рода
Fusarium, поражающих хлопчатник в Узбекистане..... 27

Sharof Shuhratovich Egamberdiev

Molecular identification and characterization of pathogens genus *Fusarium*
affecting cotton in Uzbekistan..... 51

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works..... 73

**ЎСИМЛИК ВА ҲАЙВОНОТ ОЛАМИ ГЕНОФОНДИ ИНСТИТУТИ,
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ, ГЕНЕТИКА ВА
ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ
16.07.2013.В.15.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

ЭГАМБЕРДИЕВ ШАРОФ ШУҲРАТОВИЧ

**ЎЗБЕКИСТОНДА ҒЎЗАНИ ЗАРАРЛАНТИРУВЧИ
FUSARIUM ТУРКУМИДАГИ ПАТОГЕНЛАРНИНГ МОЛЕКУЛЯР
ИДЕНТИФИКАЦИЯСИ ВА ТАВСИФИ**

**03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий Аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.3–4.В49 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Геномика ва биоинформатика марказида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифасининг www.flora-fauna.uz ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали www.ziyounet.uz манзилларига жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:

Абдурахмонов Иброҳим Юлчиевич,
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар:

Марупов Аббосхон,
қишлоқ хўжалиги фанлари доктори, профессор

Давронов Қаҳрамон,
биология фанлари доктори, профессор

Кадырова Дильбар Абдуллаевна,
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот:

Микробиология институти

Диссертация ҳимояси Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти, Ўзбекистон Миллий университети, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ҳузуридаги 16.07.2013.В.15.01 рақамли Илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашнинг 2016 йил «___» _____куни, соат ____даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100053 Тошкент шаҳри, Боғишамол кўчаси, 232-уй. Тел.: (+99871) 289-04-65, факс (+99871) 262-79-38, e-mail: botany@uzsci.net, Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти мажлислар зали).

Докторлик диссертацияси билан Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (03 рақам билан рўйхатга олинган). Манзил: 100053, Тошкент шаҳри, Боғишамол кўчаси, 232-уй, Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти. Тел.: (+99871) 289-04-65.

Диссертация автореферати 2016 йил «___» _____куни тарқатилди.
(2016 йил «___» _____даги ___ рақамли реестр баённомаси)

К.Ш. Тожибаев,
Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш раиси, б.ф.д.

У.Т. Мирзаев,
Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Ш. Юнусхонов,
Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш ҳузуридаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда пахта ишлаб чиқариш саноати ривожланиши билан бу соҳада ўзига хос муаммолар ҳам юзага келмоқда. Шундай энг йирик муаммолардан бири бу фитопатоген замбуруғлардир. Пахта фонди маълумотларига кўра патогенлар келтириб чиқарувчи пахта касалликлари туфайли 12% ҳосил зарар кўрмоқда. Бундан иқтисоди ривожланган давлатлар ҳам мустасно эмас. Жумладан, фақатгина АҚШнинг ўзидаги йўқотишлар 11,7%, Бразилия ва Африка давлатларида 50%, Ҳиндистонда эса бу кўрсаткич 20% ни ташкил этмоқда.¹

Fusarium авлодидаги замбуруғлар табиатда кенг тарқалган бўлиб, улар бу туркум замбуруғларнинг катта ва биологик хилма-хил гуруҳини ташкил этади. Шу турдаги замбуруғларнинг аксарияти фитотрофлар бўлиб, улар 120 дан зиёд ўсимлик турларини зарарлаб, кўпгина мамлакатлар, жумладан, Ўзбекистон қишлоқ хўжалигига ҳам катта иқтисодий зиён етказмоқда. *Fusarium* авлодидаги патоген замбуруғлар индивидуал ўсимликни зарарлантириш қобилиятига асосланган *formae specialis* (f.sp.) ихтисослашган шаклларида бўлинади. Ҳозирги вақтда ихтисослашган замбуруғ шаклларининг 80 дан зиёд тури мавжуд.

Илгари *Verticillium* турдаги замбуруғ гўза касаллигининг асосий кўзгатувчиси ҳисобланганлиги сабабли гўза селекцияси, асосан, *Verticillium* вилтига чидамли навларни яратишга қаратилган эди. Бироқ кейинги йилларда турли биотик омиллар (иқлим ва сув режимининг ўзгариши кабилар) таъсири туфайли мамлакатимизнинг патоген фониди ҳам ўзгаришлар рўй бермоқда. Шу сабабли бугунги кунда *Fusarium* авлоди патогенларининг махсус формаларини идентификациялаш долзарб муаммолардан бири ҳисобланади.

Гўзанинг нафақат ингичка толали (*Gossypium barbadense*), балки ўрта толали навларида ҳам фузариоз вилти кенг тарқалиб бораётганлиги ва Бухоро вилоятида шу вақтга қадар гўзада кузатилмаган илдиз чиришига олиб келадиган *Fusarium solani* патоген тури аниқланган.

Муаммонинг долзарблиги яна шундан иборатки, республикамизда нафақат гўзанинг вилтга чидамли навларини яратиш, балки мамлакатимизнинг фитопатоген фонини идентификациялаш, хавфли изолятларни аниқлаш, уларнинг патогенлигини аниқ баҳолаш, патоген хариталар яратиш ҳамда тавсиялар ишлаб чиқиш ўта муҳимдир.

Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2004 йил 29 мартдаги 148-сон «Ўсимликларни ҳимоя қилиш хизмати тузилмасини такомиллаштириш ва самарадорлигини ошириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

¹ Amanda N. Cianchetta et al. Survey of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the United States. The Journal of Cotton Science 19:328–336. The Cotton Foundation 2015.

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

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.

Fusarium авлоди вакиллариининг молекуляр-генетик тадқиқотларига йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Texas A&M University, Mississippi University, Washington State University (АҚШ), Nanjing Agriculture University (Хитой), CIRAD (Франция) ҳамда CSIRO (Австралия)да олиб борилмоқда.

Ўза патогенларини идентификациялаш ва ўта хавфли формаларини аниқлашга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: патогенлар геноми учун RFLP, RAPD, SCAR ДНК маркерлар коллекцияси яратилган (UC Davis University of California, Broad Institute, АҚШ); *Fusarium* авлоди вакиллариининг маълумотлар базаси яратилган (CBS KNAW *Fusarium* MLST Database, Голландия); патоген геномларининг ДНК кетма-кетликлари аниқланган (секвенс) ва олинган натижалар асосида турлар ҳақидаги маълумотлар базаси яратилган (Mips Helmholtz Zentrum München, Германия).

Дунёда ўза патогенлари геномини молекуляр-генетик усуллар билан комплекс тадқиқ қилиш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: *F.circinatum*, *F.graminearum*, *F.proliferatum*, *F.verticillioides* геномининг тўлиқ нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш; фузариоз вилт расаларига чидамлилиқ генларини ассоциатив хариталаш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Хорижлик олимлар *Fusarium* авлоди патогенларини молекуляр идентификациялаш усуллари: оксиллар хилма-хиллиги (изозим), рестриксион фрагментлар полиморфизми узунлиги (RFLP), тасодифий амплификацияланган полиморф ДНК (RAPD), амплификацияланган қисм узунлиги полиморфизми (AFLP) билан Abd-Elsalam, Elias ва Wang шуғулланишган. АҚШ (O'Donnell K., K.Skovgaard), Миср (Abd-Elsalam K.), Хитой (X.Chen, Y.Kim, B.Wang), Мексика (O.S.Garsia), Германияда (F.Schnider) *Fusarium* авлоди изолятларини нуқтали мутацияларга асосланган маркерлар (SNP), бир нусхали генлар ёрдамида секвенс қилиш каби ишлари амалга оширилган. МДХ мамлакатларида патогенларни ўрганиш ва улар билан курашиш муаммоларига бағишланган тадқиқотларни Г.Я.Курбанов, С.Ф.Сидорова, И.Акмурадов, М.Я.Менликеевларнинг илмий асарларида кузатиш мумкин.

Мамлакатимизда олиб борилган тадқиқотларда Н.Н.Назирова, А.И.Гусева, Н.Г.Запрометова, Л.В.Полякова, Г.С.Караева, А.Марупов, Б.О.Ҳасанов ва Л.А.Глуховаларнинг илмий ишлари *Fusarium* авлодига оид патогенларни анъанавий усуллар ёрдамида ўрганиш ва идентификациялашга бағишланган.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасаси илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация

тадқиқоти Геномика ва биоинформатика марказида UZB2-31016-ТА-09 «*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV) фузариоз вилт касаллигининг микдорий белгилари (QTL) ген/локусларининг молекуляр тавсифи ва ассоциацияси» халқаро лойиҳаси (2010–2012) ва И5-ФК-0-30702 «Ўзбекистон ҳудудида тарқалган *Fusarium spp.* тур ва расаларини мониторинг қилиш ва аниқлашнинг экспресс усули» (2014–2015) лойиҳаларига мувофиқ олиб борилган.

Тадқиқотнинг мақсади *Fusarium* авлоди патогенларининг геномини молекуляр-генетик усуллар билан комплекс идентификациялаш, маҳаллий ғўза навларига нисбатан кўп учровчи патоген тур ва расаларнинг патогенлик хусусиятларини баҳолашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

генетик идентификация қилиш учун бир нусхали генлар (TEF-1 α , VT, rDNA, NIR) бўйича *Fusarium* авлодидаги патогенлар ДНКсини ре-секвенслаш;

патогенларни жадал идентификациялаш учун биргина нуклеотид полиморфизми (SNP) ва специфик аллель (ASPCR) замонавий геном инструментларига асосланган маркерлар ишлаб чиқиш. *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* патогени расасини жадал аниқлаш учун праймерлар тузиш;

Ўзбекистон Республикаси ғўза генофонди коллекциясидан фузариоз вилтга барқарорлик белгиси бўйича сегрегацияланувчи генетик популяцияларни яратиш;

молекуляр ДНК маркерларидан фойдаланган ҳолда ғўзанинг фузариоз вилтга чидамлилиқ локусини генетик хариталаш;

патоген-ўсимлик ўртасидаги ўзаро таъсирни ўрганиш, *Fusarium* авлодидаги энг вирулент изолятларни аниқлаш ва республика бўйича патогенлар тарқалишининг патоген хариталарини ишлаб чиқиш;

ғўза навларининг патогенларга чидамлилигини ошириш учун номзод генларни биоинформатик (*in silico*) идентификациялаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтининг ғўза фитопатогенлари ва генофонди коллекциясидан олинган *Fusarium* авлодидаги патоген замбуруғлар ва ғўза генотипларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг предмети *Fusarium* авлоди вакилларининг ғўза ўсимлигига нисбатан вирулентлик ва «хавфлилиқ» даражасини баҳолаш, фитопатогенларни идентификациялашда самарали усуллар ишлаб чиқиш орқали фузариоз патогенларини ва қисман ғўза вилти касалликлари тарқалишини назорат қилиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертация юзасидан олиб борилган изланишларда ғўза генетикаси ва селекциясининг классик услублари, молекуляр фитопатология, шунингдек, молекуляр генетика, геномика, статистика ва биоинформатиканинг замонавий усулларидан фойдаланилган. Патогенлик индекси бўйича кластер таҳлил STATISTICA 8,0 (StatSoft, Inc., www.statsoft.com) дастури, маркер локуслар таҳлили, бирлашган гуруҳлар ташкил этиш, QTL хариталаш JoinMap 3.0, MapQTL 4.0, QGene 4.3.2 ва Windows QTL Cartographer (v. 2.5_011) дастурлари ҳамда

фитопатогенларнинг ғўза ўсимликлари орасидаги ўзаро таъсирини баҳолаш NCSS – 2003 ва PASS – 2002 статистик анализлар дастурлари пакетларидан фойдаланилиб бажарилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор *Fusarium* авлодидаги патогенлар геноми таҳлил қилинган, патогенларнинг муҳим бир нусхали генларини (TEF-1 α , VT, rDNA, NIR, PHO) ре-секвенслаган амалга оширилган, бета тубулин (VT) гени нуклеотид кетма-кетлигига асосланиб *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* турининг 2-, 3-, 8-расалари ва А ва В патогенлар гуруҳини идентификациялашга қодир универсал SNP праймерлари ишлаб чиқилган;

аллель-специфик ПЗР (ASPCR) методи асосида *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* турининг 3- ва 8-расаларини идентификациялашга қодир праймер жуфтликлар ишлаб чиқилган;

Ўзбекистонда *Fusarium* авлоди вакилларининг 6 та тури (*Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*) молекуляр таксономик жиҳатдан идентификацияланган;

Fusarium oxysporum f.sp *vasinfectum* нинг Ўзбекистонда тарқалган 3-, 4- ва 6-расалари аниқланган;

ғўзанинг кенг кўламда экиладиган навларига нисбатан *Fusarium* авлоди патогенларининг вирулентлик даражаси баҳоланган;

патогенлилик батафсил баён этилиб, илк бор молекуляр-генетик усуллар билан ғўзанинг энг хавфли патогенлари: *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* нинг 3 та расаси ҳамда Ўзбекистон учун янги патоген тур ҳисобланган *Fusarium solani* аниқланган;

фузариоз вилтга чидамлигига кўра 3:1 нисбатда сегрегацияланувчи «Mebane B1» х «11970» генетик популяцияси яратилган ва 237 та полиморф локуслар аниқланган;

ғўзанинг вилтга нисбатан чидамлилигига жавоб берувчи потенциал генлар аниқланган;

генетик хариталаштириш ўтказилиб, вилтга чидамлилик билан ассоциацияланувчи BNL1145_259, BNL3442_112 локуслари аниқланган ҳамда *in silico* ПЗР ўтказилиб, ушбу маркерларга яқин жойлашган номзод генлар биоинформатик усуллар ёрдамида аниқланган;

патоген хариталар ишлаб чиқилган ва турларнинг тарқалиши ҳақида географик координаталарга белги қўйилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

бир нусхали генлар ёрдамида секвенс қилиш, бир нуклеотид полиморфизми ва аллель специфик ПЗР усуллари ёрдамида Ўзбекистон ҳудудида тарқалган патогенларнинг форма, раса ва турлари тезкор идентификациялаш орқали ген специфик SNP маркерлар ишлаб чиқилган;

ғўзанинг экспериментал популяциялари билан олиб борилган QTL таҳлиллар натижасида FOVга нисбатан чидамли белгилар билан бириккан кўплаб маркерлар ва муҳим номзод генлар аниқланган;

Ўз вақтида хавфли патоген турларига нисбатан эътиборни қаратиб, уларни аниқлаш имконини берувчи тезкор, самарали диагностикаумлар ва усуллар ишлаб чиқилган;

зарарланган ҳудудларда у ёки бу патоген турларига чидамли навларни экиш орқали ғўза ҳосилдорлигига ижобий таъсир этишга кўмаклашувчи патогенлар харитаси ишлаб чиқилган;

ғўза чатиштириш комбинациялари асосида «Mebane B1» х «11970» вилтга чидамли популяциялар яратилган.

Тадқиқот натижаларнинг ишончлилиги. Ишда қўлланилган замонавий, бир-бирини тўлдириб турувчи молекуляр-генетик усуллар ва ёндашувлар ёрдамида асосланганлиги; олинган натижалар анъанавий статистик усуллар (UPGMA ва NJ) ёрдамида текширилганлиги ҳамда патогенлик индекси кластер таҳлил қилинганлиги ва фитопатогенларнинг ғўза ўсимликлари орасидаги ўзаро таъсирини баҳолаш учун ANOVA (вариантлар таҳлили) тести қўлланилганлиги, шунингдек, маркер локуслар таҳлили ва бирлашган гуруҳлар ташкил этиш ҳамда QTL хариталаш замонавий статистик анализ дастурлари (JoinMap 3.0, MapQTL 4.0, QGene 4.3.2, Windows QTL Cartographer) ёрдамида амалга оширилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Fusarium* туркумидаги патогенларни аниқлаш учун молекуляр-генетик усуллардан фойдаланиш патогеннинг тур ва расаларини жуда аниқ ва ишончли идентификациялаш имконини беради. Селекционер олимлар юқоридаги усулдан фойдаланиб айнан қайси касалликка қарши курашиш кераклигини билиб олишлари ва патогеннинг аниқ типига анча чидамли навларни яратишлари ҳамда уларни республика экин майдонларига самарали жойлаштиришлари мумкин.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ишлаб чиқилган патогенлар диагностикасининг янги методлари ҳам дала, ҳам лаборатория шароитларида асбоб-ускуна ва реактивларнинг минимал базаси мавжудлигида патогенларни жуда тез ва иқтисодий манфаатли идентификациялаш имконини беради. Бунинг натижасида маълум патогенга ёки унинг расасига чидамли навларни экиш орқали қишлоқ хўжалик экинларининг зарарланиш хавфини камайтириш ёки бартараф этиш мумкин. Патогенлар харитасининг қўшимча маълумотлар билан тўлдириб борилиши натижасида келажақда қишлоқ хўжалиги патогенларининг ҳудудлар билан боғланган биоинформатик ахборотлар тизимини яратиш имкони пайдо бўлади. Ушбу тизимда ҳудуд, патоген ҳамда навларнинг чидамлилиги каби маълумотлар жамланиб, бу ўз навбатида қишлоқ хўжалиги экинларининг зарарланиш хавфини камайтириши ёки бартараф этиши, натижада Республикамиз иқтисодий фаровонлиги даражасининг ошишига эришиш мумкин.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Диссертация тадқиқоти жараёнида олинган куйидаги натижалар амалиётга жорий қилинган:

яратилган *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*нинг 5 та расасини идентификацияловчи SNP праймерлар АҚШ Қишлоқ хўжалиги департаментининг Crop Science Research Laboratory, Genetics and Precision

Agriculture Research Unit лабораториялари томонидан патогенларни идентификациялаш жараёнига оид илмий-тадқиқотларда фойдаланилмоқда (United States Department of Agricultureнинг 2012 йил 30 январдаги маълумотомаси);

ишлаб чиқилган ASPCR праймерлар АКШ Қишлоқ хўжалик департаменти томонидан «Абиотик ва биотик омилларнинг дала ва иссиқхона шароитлари негизида ғўзанинг фузариоз вилтга (FOV) нисбатан чидамлилигини баҳолаш» лойиҳасида (3096–21000–019–02-сон) фойдаланилган (USDA–Agricultural Research Service, Лаббок, Техас, 2015 йил 12 октябрь). FOV_BT_AS_R3 аллель специфик праймеридан фойдаланган ҳолда FOVA генотипининг 3- ва 8-расаси тезкор аниқланган ҳамда молиявий ва вақт билан боғлиқ харажатларни сезиларли даражада камайтириш имконияти яратилган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Диссертация ишининг натижалари кўплаб илмий-амалий анжуманларда, жумладан, 2013 йил 25 ноябрда Тошкент шаҳрида бўлиб ўтган «Достижения и перспективы экспериментальной биологии растений» илмий конференциясида, 2013 йил 15–16 ноябрь кунлари Тошкент шаҳрида бўлиб ўтган «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» халқаро илмий-амалий конференциясида, 2014 йил Тошкент шаҳрида бўлиб ўтган «ЎЗР ФА ёш олимлар конференцияси»да, 2015 йил 7–8 май кунлари Тошкент вилоятида бўлиб ўтган «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истиқболлари» илмий-амалий конференциясида, шунингдек, ғўза химояси ва биотехнологиясига бағишланган бир қатор илмий анжуманларда маъруза кўринишида баён этилган ҳамда апробациядан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 28 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий Аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 10 та мақола, жумладан, 8 таси республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, етита боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 191 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 «*Fusarium* авлодининг молекуляр-генетик таҳлили» деб номланган биринчи бобида *Fusarium* авлоди вакиллари идентификациялаш тарихи, молекуляр-генетик усулларнинг қўлланилиши ва микотоксин продуцентлари ҳақидаги маълумотлар ёритилган. Ушбу йўналишдаги асосий муаммолар ва уларни ҳал этишдаги имкониятлар санаб ўтилган.

Диссертациянинг «*Fusarium* авлоди вакиллари ашёси, ўрганиш услублари ва шароити» деб номланган иккинчи бобида *Fusarium* авлоди патоген турлари ва расаларини идентификациялаш учун генотиплаш ҳамда патоген геномларини секвенс қилиш батафсил тавсифланган. Патоген турлари ва расаларини идентификациялаш учун *Fusarium spp.*нинг Ўзбекистон коллекциясидан фойдаланилган.

Диссертациянинг «Филогенетик анализ ва генетик хилма-хиллик даражаси» деб номланган учинчи бобида қуйидаги натижалар келтирилган: фитопатогенларнинг ўзбек коллекциясидаги *Fusarium spp.* изолятларини идентификациялаш учун бутун жаҳон бўйича йиғилган муайян расавий мансубликка эга FOV изолятлари ДНКсидан фойдаланилган. Генга хос бўлган праймерлардан фойдаланиб TEF-1 α , VT, NIR ва rDNA каби тўртта бир нусхали генларнинг нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқланган;

FOV намуналарининг турга мансублигини аниқлаш учун бир нусхали генларнинг секвенсланган нуклеотидлари кетма-кетликлари дунё генлар банки (NCBI)даги маълумотларга биоинформатик усул BLAST ёрдамида солиштирилган;

солиштириш натижалари бўйича 4 та ген асосида филогенетик натижалар таҳлили ўтказилган;

филогенетик шажара дарахтлари ўлчанмаган ўртача арифметик жуфтлаш (UPGMA) ва қўшниларнинг яқинлиги (NJ) биоинформатик алгоритмлар асосида тузилган.

Қуйида барча тўртала генлар бўйича филогенетик анализ натижалари келтирилган:

VT гени бўйича идентификация. Умуман олганда, *Fusarium spp.*нинг қирқ тўртта изоляти VT гени қисман кетма-кетлиги бўйича анализ қилинди. Кўплаб кетма-кетликларни таққослаш ва UPGMA методи билан шажара тузиш тадқиқ этилаётган намуналарнинг бешта кластерга бўлинишини кўрсатди. 1-кластер *Fusarium solani* ни ифодаловчи иккита изолятдан иборат.

2-кластер *Fusarium sporotrichioides* (532 изолят)ни ифода этувчи 11 та изолятни ўз ичига олади. Қолганлари *Fusarium equiseti* бўлиб, улар *Gibberella zeae* комплексига мансуб. 3-кластер «VCG1112» гуруҳига мансуб бўлган *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum (FOV)ни, 4-кластер *G. fujikuroi* комплексига мансуб *Fusarium proliferatum*ни ифодаловчи 10 та изолятни, 5-кластер *F.oxysporum* f.sp.vasinfectedumга мансуб 20 та изолятни ўз ичига олади.

Кейин NJ методи бўйича ўтказилган анализ ҳам филогенетик шажаранинг ўхшаш топологиясини кўрсатди. Бунда фақат истисно сифатида учинчи кластер Fov19_VCG1112 изолят ўрнига FOV га мансуб Fov112_GrC изолят ажралди. Ташқи гуруҳ сифатида *Fusarium*нинг қолган намуналаридан генетик узоқлашган *F. solani* (319 ва 520) намуналаридан фойдаланилди. Бунда ҳам 5 та кластер кузатилади. Кластерлараро масофа намуналараро фарқларнинг фоизларида келтирилиб, улар 2–12% гачани ташкил этди. Ваҳоланки, кластерлар ичида генетик тафовутлар ўртача 0–2% ни ташкил этади. 3–5-кластерларнинг изолятлари анча яқин. Шуниси эътиборга лойикки, Fov19_VCG1112 ва Fov112_GrC намуналари FOV изолятларидан иборат бўлиб, бу намуналар илгари америкалик олимлар томонидан тавсифланган. Бундан ташқари 4-кластер *Fusarium proliferatum* вакиллари ўз ичига олади ва бу ҳол мазкур турнинг FOV билан анчагина генетик яқинлигини кўрсатади. 5-кластер катта қизиқиш уйғотди, зеро, унда ўзбек коллекциясидаги FOV намуна, шунингдек, маълум расавий мансубликдаги изолятлар гуруҳлашган. Гарчи FOV изолятлари оралиғидаги генетик тафовутлар унчалик аҳамиятли бўлмаса-да, VT ген кетма-кетлиги анализи учинчи расага мансуб намуналарни аниқ идентификациялаш имконини берди. 316, 491, 527 ва 534 изолятлар оралиқ генетик масофа 0–1% дан иборат бўлган 3-расага (Fov16612_Race3, Fov3_Race3) мансуб изолятлар билан мақбул гуруҳланди. Намуналарнинг таксономик мансублиги анализ қилинаётган кетма-кетликларнинг BLAST алгоритмига кўмаклашувчи NCBI халқаро генетик банки билан қиёслаш воситасида аниқланди.

TEF-1α гени бўйича идентификациялаш. *Fusarium spp.*нинг ўттиз саккизта изолятлари *TEF-1α* генининг қисман кетма-кетлиги бўйича анализ қилинди. Кетма-кетликларни кўплаб қиёслаш ва UPGMA усулида шажара тузиш тадқиқ этаётган намуналар 3 та кластерга бўлинишини кўрсатди. 1-кластер *Fusarium solani* ни ифодаловчи иккита изолятдан иборат. 2-кластер *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* (*Fusarium proliferatum*)дан иборат 13 та изолятни, 3-кластер *F. oxysporum* f.sp.vasinfectedum (FOV)нинг 23 та изолятини ўз ичига олади.

NJ методида ўтказилган анализ ҳам филогенетик шажаранинг ўхшаш топологияга эга эканини кўрсатди. Ташқи гуруҳ сифатида *Fusarium*нинг қолган намуналаридан генетик узоқлашган *F. solani* (319 ва 520) намуналаридан фойдаланилди. Кластерлараро масофа намуналараро фарқларнинг фоизларида келтирилиб, улар 7% дан 20% гачани ташкил этди. Ваҳоланки, кластерлар ичида генетик тафовутлар ўртача 0,1–1% ни ташкил этди. Шунингдек, VT гени мисолида шу нарса аниқландики, *F. proliferatum* турининг вакиллари *F. solani* намуналарига қараганда FOVга генетик яқин.

Қолаверса, учинчи кластерда ҳам ўзбек коллекциясидан FOV намуналари, ҳам маълум расалардаги референт изолятлар гуруҳлашган. 316, 327, 347, 460, 527 ва 534-изолятлар Fov3_Race3 (AY714102.1) изолятлар билан бир хил гуруҳлашган ва улар ўртасидаги генетик масофа $\leq 1\%$ ни ташкил этади. Бундан ташқари 328 ва 496-изолятларнинг тўртинчи расага мансуб Fov66_Race4 (AY714101.1) референт намуна билан яқин филогенетик алоқада эканлиги кузатилди.

NIR ген бўйича идентификация. NIR геннинг қисман кетма-кетлиги бўйича *Fusarium spp.* нинг қирқ битта изоляти анализ қилинди. UPGMA методидан фойдаланиб ўтказилган филогенетик анализ тадқиқ этилаётган намуналар 3 та кластерга бўлинишини кўрсатди. 1-кластер 532-изолят бўйича ифодаланиб, унинг BLAST алгоритмидан фойдаланиб ўтказилган анализи NIR гени кетма-кетлиги бўйича *Fusarium graminearum* билан ўхшашлигини кўрсатди. 2-кластер *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*)дан иборат 13 та изолятни ўз ичига олади. TEF-1 α гени анализида мазкур намуналар *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* (*Fusarium proliferatum*) сифатида намоён бўлдики, улар *G. fujikuroi* патоген комплексига мансуб. 3-кластер *F. oxysporum f.sp. vasinfectum* (FOV)га мансуб 27 та изолятни ўз ичига олади.

NJ методида ўтказилган анализ ҳам филогенетик шажара ўхшаш топологияни кўрсатди. Ташқи гуруҳ сифатида генетик жиҳатдан *Fusarium* нинг қолган намуналаридан генетик энг узок бўлган 532-изолятдан фойдаланилди. Кластерлар оралиғидаги масофа намуналараро тафовутлар фоизида ифодаланиб, 5% дан 22% гачани ташкил этган. Кластерлар ичидаги генетик тафовутлар 0–7% доирасида бўлиб, ўртача қиймат 2% ни ташкил этган. Учунчи кластерда ҳам ўзбек коллекциясидан, ҳам маълум расаларнинг референт изолятларидан иборат FOV намуналари гуруҳлашган. Таъкидлаш жоизки, *F. solani* намуналари ҳам учунчи кластерда гуруҳлашган. Бу ҳол NIR гени даражасида ана шу икки турни амалда фарқлаб бўлмайди, деган тахмин учун асос бўлади. Биз NIR гени қисман кетма-кетлиги бўйича намуналарни қиёслаш билан учунчи раса ҳамда «С» гуруҳига мансуб намуналарни идентификацияладик. Шуниси диққатга сазоворки, UPGMA методидан фойдаланиб анализ ўтказилганда 316, 347, 491 ва 527-изолятлар бир хилда Fov16612_Race3 (3-раса) изоляти билан, 496 ва 526-намуналар эса Fov112_GroupC (С гуруҳ) изоляти билан гуруҳлашди. Худди шу вақтда NJ анализидан сўнг ушбу изолятлар биргаликда гуруҳлашди ва FOV учунчи расага мансуб Fov16612_Race3 ва Fov3_Race3 изолятлари билан филогенетик боғланишлар ҳосил қилди. Буни С гуруҳига 3- ва 5-расалар ҳам мансуб бўлиши мумкинлиги билан изохлаш мумкин.

Шундан сўнг кетма-кетликлар BLAST алгоритми ёрдамида NCBI халқаро генетик банки билан қиёсланди.

rDNA генини ITS региони бўйича идентификациялаш. Умуман, *Fusarium spp.*нинг қирқ олти изоляти rDNA гени ITS регионининг қисман кетма-кетлиги бўйича анализ қилинди. Кўплаб кетма-кетликларни қиёслаш ҳамда UPGMA методи билан шажара тузиш тадқиқ этилаётган намуналар бешта кластерга бўлинишини кўрсатди. 1-кластер *Fusarium solani*ни ифодаловчи

иккита изолятдан иборат. 2-кластерда *Fusarium fujikuroi* туридан иборат 12 та изолят гуруҳлашган. Учинчи кластерга 404-изолят (*Fusarium sporotrichioides*) мансуб. 4-кластерда *Fusarium equiseti* туркумидаги 11 та намуна гуруҳлашган. 5-кластер *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* (FOV)нинг 20 та изолятини ўз ичига олади.

NJ методида ўтказилган анализ ҳам ўхшаш филогенетик шажара топологияни кўрсатди. Бироқ бунда 532-изолят алоҳида ажралиб, *Fusarium acuminatum* билан гомологияни кўрсатди. Ташқи гуруҳ сифатида *Fusarium*нинг қолган намуналаридан генетик узоқлашган *F. solani* (319 ва 520) намуналаридан фойдаланилди. Айти ҳолда ҳам биз бешта кластерни кузатамиз. Кластерлараро масофа намуналараро фарқларнинг фоизида ифодаланиб, 4–13% ни ташкил этди, айти вақтда кластерлар ичида генетик тафовутлар ўртача 0–2% доирасида бўлди. 5-кластер катта қизиқиш уйғотди, чунки унда ҳам ўзбек коллекциясидаги FOV намуналари, ҳам маълум расавий мансубликка эга изолятлар гуруҳлашган.

Бешинчи кластердаги изолятларнинг қиёсий анализи ўзбек намуналарининг *Fusarium oxysporum* тури билан ўхшашлигини кўрсатди, лекин тўлиқроқ таксономия кузатилмади. Бу ҳолат *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum* ВТ, TEF-1 α ва NIR генларнинг кетма-кетликларидан фарқли равишда ушбу геннинг кетма-кетлиги бўйича муфассал характерланмади.

UPGMA ва NJ методлари ёрдамида ўтказилган филогенетик анализ 489-изолят биринчи расага мансуб Fov2_Race1 изоляти билан кластерланишини, 526-изолят эса 2-расадан иборат Fov16611_Race2 изоляти билан кластерланишини кўрсатди.

Намуналарнинг таксономик мансублиги BLAST алгоритми ёрдамида NCBI халқаро генетик банки билан анализ қилинаётган кетма-кетликларни қиёслаш асосида аниқланди.

Диссертациянинг «**Патогенларни тезкор идентификациялаш ва улар устидан мониторинг олиб бориш мақсадида замонавий геном ёндашувлар ва ген специфик SNP маркерлар ишлаб чиқиш**» деб номланган тўртинчи бобида қуйидагилар тавсифланган: бир нусхали генлар β тубулин (ВТ), рибосомал ДНК (rDNA), элонгациянинг трансляцион омили (TEF-1 α), нитрат редуктаза (NIR) ва фосфат пермаза (PHO) учун праймерларнинг жуфтликларидан фойдаланиб *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum*нинг 15 та намунаси учун олинган маҳсулотларнинг нуклеотид кетма-кетликлари аниқланиб, амплификация ўтказилди. Нуклеотид кетма-кетликларни қиёслаш нуклеотид алмашувлар (SNP), жумладан, ноёб бир нусхали генлар кетма-кетликлари ичидаги ўзгаришларни аниқлаш имконини берди. Ана шу алмашувларнинг баъзилари FOVнинг у ёки бу гуруҳига хос бўлган ихтисослашган шакли ҳисобланади.

Олинган натижалар асосида бир қатор праймерлар ишлаб чиқилди ва ушбу праймерлар фитопатогеннинг аниқ тур ёки расавий идентификациясини амалга ошириш имконини беради. Ишлаб чиқилган праймерларни тестлаш натижасида тадқиқ этилаётган патогенларни идентификациялашда юқори спецификликни кўрсатувчи тўртта праймер

олишга муваффақ бўлинди. Жумладан, SNP FOV2 A 33 me _G_ ATCGATACCCTTGGA CGAA праймери муқаддам 1- ва 6-расаларда фарқланмаган FOV 2-раса, шунингдек, В гуруҳини аниқлаш имконини берди.

Бошқа SNP праймер FOV3 Univ SNP TGTGAGCTTGGGAATTCTTG 3 FOV расасини муваффақиятли идентификациялади. Ушбу праймердан фойдаланиш бизга иккита Америка изоляти: FOV3_AY714088 ва FOV16612_AY 714092 ни, шунингдек, 3-расага мансуб бўлган иккита ўзбек изолятини бир гуруҳга бириктириш имконини берди. FOV8 C 30 mer _C_ CTCTTCATTGTAAGTTG ҳамда FOVSNP11 A 30 mer _A_ ACGACTCGAAACGTGCCCGC праймерлари 8-раса ва А гуруҳни тегишлича идентификациялаш имконини берди. Натижада FOV 2-, 3-, 8-расалар ҳамда А ва В (FOV_112) гуруҳларни идентификациялаш имконини берувчи праймерлар ишлаб чиқилди (1-жадвал).

1-жадвал

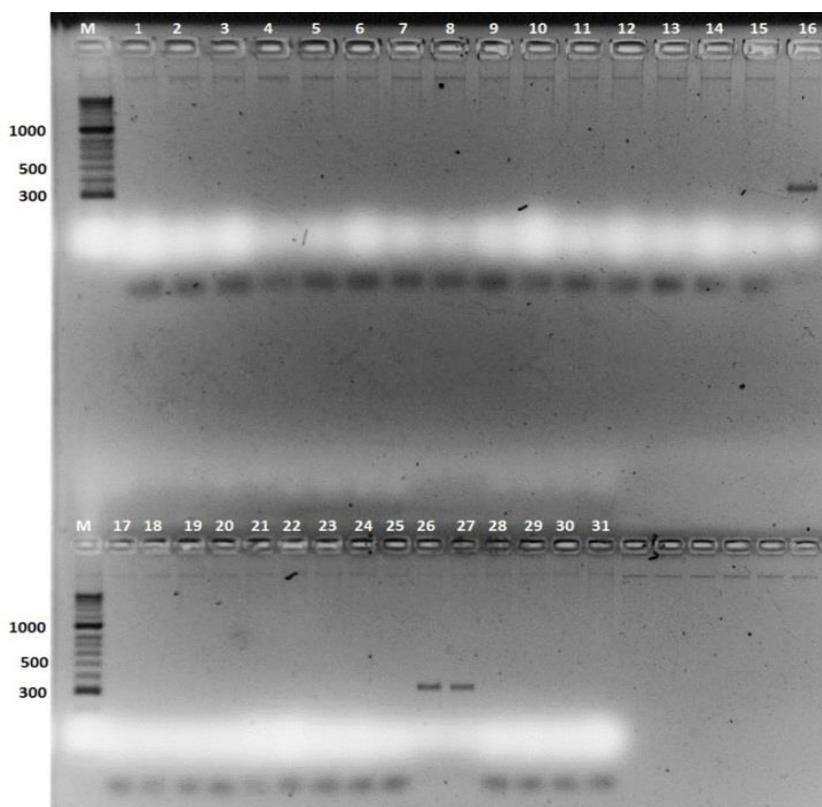
Расаларни идентификациялаш имконини берадиган фитопатогенлар геномидаги ноёб нуклеотидлар

Праймерлар номи	SNP_FOV 3 A_32mer	SNP_FOV 3 A_35mer	SNP_FOV2_A_30mer_G	SNP_FOV2_A_33mer_G	SNP_FOV8_C_30mer_C	SNP_FOV8_C_34mer_C	SNP_FOV_8(2)_34mer_C	SNP_FOV3US_35mer_T	SNP_FOV3US_36mer_T	SNP_FOV_GroupC_30mer_A	SNP_FOV_GroupC_33mer_A
316_R1		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R2		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
347		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV36198_R6	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_Aus2	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV2_R1	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV3_R3		A	G	-	-	-	T	-	T	-	T
ATCC_RACE_8_1_10	G		G	-	C	-	C	C	-	-	T
FOV_1661_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_112	G	-	G	-	-	T	T	C	-	A	-
FOV_113	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	-
FOV_124	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
R4_66	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_16611_R2	G	-		A	-	T	T	C	-	-	T

Биргина нуклеотид алмашинуви аниқланадиган аввалги метод принципига асосланиб флуоресцент – белгиланган нуклеотидлар ёрдамида FOVнинг у ёки бу генотипини аниқловчи, ўзида мақсадли нуклеотидга эга

бўлмаган, кетма-кетликни дискриминатловчи праймерларни ишлаб чиқиш тавсия этилди.

Бошқача айтганда, ушбу методда, одатда, тадқиқ этилаётган матрик ДНКга тўла мос келадиган битта олигонуклеотид праймер ва 3'-ниҳоявий нуклеотид мутант аллели ДНКнинг тегишли нуклеотидига мувофиқ келувчи муқобил праймер, яъни ёввойи тип аллеляси учун ҳар доим мақбул бўлган праймер қўлланилади. Праймерларнинг бундай уйғунлигида яхши танланган шароитда ПЗР маҳсулот реакция аралашмасида ёввойи типли ДНК эмас, балки мутант ДНК матрица сифатида мавжудлигидагина вужудга келади. Жуфтлашган барча бирикмалар ҳам ПЗРни брокирлашда бир хил самара бермайди. Шунинг учун бу метод синчиклаб ўрганилгачгина оптималлаштиришни талаб этади. Шундай қилиб, тўғри праймер ВТ-3 ген фрагменти учун специфик бўлган праймерлар ишлаб чиқилди, тескари праймер ўзининг 3'-ниҳоясида «А» информатив (мақсадли) нуклеотиди мавжудлиги туфайли фақат FOVнинг 3-расаси учун аллель-специфик бўладиган қилиб тузилди. Праймерлар куйдириб юмшатишда, агар бета тубулин генининг 3'-ниҳоясида нуклеотид кетма-кетлиги «А» нуклеотид кетма-кетлигига мос келмаса, амплификация терминирланади. Ва, аксинча, амплификация маҳсулотларининг мавжудлиги мазкур намунада *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* тури 3-расасининг патогени борлигидан далолат беради (1-расм).



1-расм. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 3-расаси учун специфик FOV_BT_AS_R3 праймеридан фойдаланиб ўтказилган AC_ПЗР электрофореграммаси.

Праймерларнинг спецификлиги турли расаларга мансуб FOV изолятлари геном ДНКсида, шунингдек, *Fusarium spp.* бошқа вакилларининг изолятларида текширилди. Бундан ташқари куйдиришнинг оптимал ҳарорати ва ПЗРни ўтказиш шароитлари танланди. Шунингдек, замбуруғли ДНКнинг оптимал ДНК концентрацияси 5 нг/мкл ни ташкил этиши аниқланди. Олдинги ишларда FOV мицелийсидан ажратиб олинган ДНК концентрациялари ҳақида хабар берилган бўлиб, миқдори 50 нг дан 100 нг ораликда, бинобарин, ПЗРни муваффақиятли ўтказиш учун етарли миқдорда бўлган.

Электрофорез натижаларидан кўриниб турибдики, 8 та тестланган намуналардан FOV 3-расаси вакиллари бўлган 4 тасидагина амплификация ўтди. Булар FOV 316 (3-расанинг ўзбек экотипи), FOV 347 (3-расанинг ўзбек экотипи), FOV 3 (3-расанинг Америка экотипи) ва FOV 16612 (3-расанинг Америка экотипи). Қолган намуналар (4-, 8-расанинг вакиллари) «А» мақсадли нуклеотид йўқлиги боис ПЗР маҳсулот кузатилмади.

Бундан ташқари FOVни бевосита зарарланган ўсимликларда (илдизлар, япроқлар ва уруғлар) идентификациялашга уриниб кўрилди. Ўтказилган анализ зарарланган ўсимликларнинг тўқималарида FOVни аниқ белгилаш имконини берди. Наманган–77 навида зарарланган ва зарарланмаган ўсимликларда анализ ўтказилди. VT ген кетма-кетлиги асосида ишлаб чиқилган праймер жуфтлик VT–5 (5'–CTCTAGACTGCTTTCTGGCAGACC–3' ва FOV_VT_AS_R3 (5'–GTGTAGTGACCCTTGGCCCAA–3') ҳам учинчи расада FOV мавжудлигини аниқ белгилади.

Шундай қилиб, бундай ёндашув далада ҳамда асбоб-ускуналар ва реактивларнинг минимал базаси мавжуд бўлган лаборатория шароитида патогенларни тез ва тежамли идентификациялаш имконини беради.

Диссертациянинг «**Тадқиқ этилаётган намуналарнинг патогенлик даражаларини ўрганиш**» деб номланган бешинчи бобида қуйидагилар батафсил ёритилган: Ўзбекистон коллекциясидаги *Fusarium spp.* изолятларнинг тур ва раса бўйича мансублиги ва уларнинг айримлари патогенлигини аниқлаш ишлари ҳам олиб борилди. Умуман, *Fusarium* ҳар хил турларининг 13 та изоляти 3 хил параметрлар: изолятларининг унувчанликка, уруғнинг унишига, новдаларнинг узунлигига, илдизлар ўсишининг зарарланишига таъсири бўйича Ўзбекистонда экилаётган ғўзанинг (*G. hirsutum* L.) тўртта тижорат навида майсаликкача ва майсаликдан кейинги босқичларда анализ ўтказилди.

Чигитнинг униб чиқишида назорат ўсимликларига нисбатан вирулент изолятлар қуйидагилардан иборат:

С–6524 навга нисбатан 316- (*F. oxysporum* f.sp.*vasinfectum*), шунингдек, 319, 503, 519 ва 520- (*F. solani*) изолятлар кучли (84–100%) салбий таъсир кўрсатди, 328, 460- (*F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*), 379, 473- (*F. solani*), 404- (*F. sporotrichioides*) ҳамда 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) изолятлар ўртача (57–75%), 422 ва 502-изолятлар мўътадил (<51%) таъсир кўрсатди;

С–4727 навга нисбатан 316 ва 460- (Fov), шунингдек, 319, 503 ва 520- изолятлар (*F. solani*) энг агрессив (81–100%), 328 (FOV), 379, 422, 473 ва 519-

(*F. solani*), 502 ва 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) ҳамда 404- (*F. sporotrichioides*) изолятлар ўртача (55%–75%) таъсир кўрсатди;

Наманган–77 навиға нисбатан *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* – 316, 328, *F. solani* – 319, 379, 503, 519 ва 520-намуналар энг кучли (77%–100%) таъсир кўрсатди. Қолган изолятлар чигит униб ўсишиға ўртача (57–70% унган чигитлар) таъсир кўрсатди;

Омад навиға нисбатан 316- (FOV) ва 319, 503, 519, 520-изолятлар (*F. solani*) энг кучли (77–100%) таъсир этди. 460 (FOV), 473 (*F. solani*) ва 502-изолятлар (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) анча суст (<61%) натижа берди. Омад нави чигитларининг ўсишиға 328 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) ва 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) суст (<38%) таъсир кўрсатди. 404-изолят (*F. sporotrichioides*) мазкур нав чигитларининг униб чиқишиға умуман таъсир кўрсатмади.

Юқорида келтирилган маълумотлардан кўриниб турибдики, ҳар бир нав учун 316, 319, 503, 519 ва 520-изолятлар энг агрессив ҳисобланади. Хусусан, 520-изолят экспериментда қўлланилган тўртта навнинг барчасида ниш уриш босқичи арафасида чигитларни ҳалокатга учратди. Бироқ чигитларнинг унувчанлиғиға кучли таъсир кўрсатиши бўйича энг вирулент изолятларни аниқлаш учун биз ўртача кўрсаткичлар юзасидан умумлаштирилган анализ ўтказдик. Мазкур анализ натижаларига кўра 316 (FOV), 319, 503, 519 ва 520-изолятлари (*F. solani*) энг агрессив бўлиб, тестдан ўтказилаётган навларда унишдан олдинги босқичда чигитларнинг 82–100% ини ҳалок этишини кўрсатди. 328, 460 (FOV) и 379, 473- (*F. solani*) ва 502-изолятлар (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) ўрта вирулентликка (чигитларнинг 51% дан зиёди ҳалок бўлди) эға 422- (*F. solani*), 404- (*F. sporotrichioides*) ва 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) изолятларни кучсиз вирулентлар (омон қолган чигитлар ≤51%) гуруҳиға киритиш мумкин.

Шунингдек, чигит унганидан кейинги босқичда ҳам тўртта ғўза навида изолятлар таъсири ўрганилди. Уларнинг патогенлиги назорат параметрлари сифатида изолятларнинг ўсимталар ва илдизлар узунлиғиға таъсири кузатилди.

Ўсимта узунликлари бўйича қуйидағича натижалар олинди:

С–6524 нав ўсимталарининг ривожланишиға кучли таъсир кўрсатувчи изолятлар жумласиға 316, 328 (FOV), 319, 503, 519 ва 520- (*F. solani*)ни киритиш мумкин, зеро, мазкур изолятлар чигитларнинг катта қисмини ҳалок этди, 520-изоляти мисолида унишдан олдинги босқичда мазкур навнинг барча чигитлари ҳалокатга учради. 460-изолят (FOV) назоратдағиға нисбатан ўсимликларнинг ўсиш қобилиятини йўқотишиға ўртача таъсир кўрсатиши (48%) аниқланди. *F. solani* вакиллари бўлмиш 379, 422, 473-изолятларни 404- (*F. sporotrichioides*) ҳамда 502- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) изолятларни С–6524 нав ўсимталарнинг ўсишиға кучсиз таъсир кўрсатувчи (назоратдағиға нисбатан ≤30%) изолятлар тоифасиға киритиш мумкин;

316 ва 460- (FOV), шунингдек, 319, 520- (*F. solani*) изолятларни С–4727 нави ўсимталарининг ўсишиға жиддий таъсир кўрсатувчи (назоратдағиға нисбатан 53–100%) изолятлар қаториға киритиш мумкин. *F. solani*ға мансуб

473-изолят гўза майсаларининг ўсишини назоратдагига қараганда қарийб 2 марта (48%) пасайтиради. Тўртта изолят: 328 (FOV), 503- (*F. solani*), 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) ва 404- (*F. sporotrichioides*) майсаларнинг ўсишига сушт таъсир кўрсатган ($\geq 33\%$). 379, 422- (*F. solani*), 502- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) нав майсаларининг ўсишига жиддий зарар кўрсатмаган ($\leq 17\%$ назоратдагига нисбатан). 519-изолят (*F. solani*) эса ушбу нав майсаларининг ўсишига деярли (3%) таъсир этмаган;

Наманган–77 навига 520-изоляти (*F. solani*) энг агрессив таъсир кўрсатиб, мазкур навнинг ўсиш даврида майсаларнинг 100% ҳалок бўлишига олиб келди, шунингдек, 316, 328 (FOV) 319, 503 ва 519-изолятлари (*F. solani*) ҳам назоратдагига нисбатан майсаларнинг ўсишига жиддий ($\leq 88\%$) зарар етказган. 460 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) ва 404- (*F. sporotrichioides*) изолятлар майсалар бўйининг ўсишига мўътадил таъсир кўрсатган (назоратдагига нисбатан 36–42%). Майсалар бўйининг узунлигига 509-изолят (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) сушт таъсир кўрсатган (17%). Наманган–77 навида қолган изолятлар жиддий самара бермади ($\geq 6\%$).

Омад навида майсалар бўйининг ўсишига изолятларнинг таъсир белгиси бўйича қизиқарли самара кузатилди. Новдаларнинг ўсишига жиддий таъсир кўрстадиган изолятларга (назоратдагига нисбатан 76–100%) таъсир кўрсатадиган 316 (FOV), 319, 503, 519 ва 520- (*F. solani*) изолятлар мансуб бўлиб, у ўтган ҳолатлардагидан чигитлар унгунига қадар чигитларни 100% ҳалок этди. Қолган 328, 460 (FOV), 473 (*F. solani*) ва 404-изолятлар (*F. sporotrichioides*) Омад нави учун бу параметрга жиддий таъсир кўрсатмаган, зеро, назоратга нисбатан тафовут 3% дан 10% гачани ташкил этган. 422 (*F. solani*) 502 ва 509-изолятлари (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) мазкур нав майсаларига умуман зарар етказмади ($\leq 1\%$). Бироқ таъкидлаш жоизки, 379 (*F. solani*) ва 509-изолятлар (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) бутунлай тескари самара берди. Бу изолятлар, аксинча, назоратдаги зарарланмаган ўсимликларга нисбатан майсаларнинг бўй чўзишига, масалан, 379 ва 502-изолятлар назоратдагига қараганда майсаларнинг 3% ва 14% бўй чўзишига олиб келган.

Олинган натижаларга кўра шохчаларнинг ўсиш даражасини назоратдагига нисбатан 70–99% пасайтиришга олиб келувчи 316 (FOV), 319, 503 ва 520- (*F. solani*) изолятлар энг патоген ҳисобланади. 328 (FOV) ва 519-изолятлар (*F. solani*) ўртача вирулент бўлиб, новдаларнинг ўсиш даражасини 50% дан зиёд пасайтириб юборади. Сушт вирулентлар (ўсишни $< 50\%$ камайтиради) туркумига 460-изолят (FOV)ни киритиш мумкин. Қолган изолятлар майсалар ўсишини ўртача 18% га пасайтириб, айтарли жиддий таъсир кўрсатмаган.

*Fusarium spp.*га мансуб фитопатогенларнинг патогенлик даражасини аниқлашнинг асосий мезони уларнинг зарарланмаган назоратдаги ўсимликларга нисбатан зарарланган ўсимликларда илдизларнинг ўсишини ингибирлаш қобилятидир. Шу сабабли тадқиқ этилаётган намуналар ана шу мезон бўйича кўриб чиқилди. Бу юқорида кўриб ўтилган параметрлар чигитларнинг унувчанлик ва ўсимталарнинг узунлигини англаувчи

параметрлар эмас, бироқ изолятларнинг ғўза илдизлари ривожланишини ингибирлаш қобилятининг анализи ҳамда патогенлар индексини аниқлаш тадқиқот ана шу босқичининг натижалари мезони бўла олади.

Шундай қилиб, изолятлар учун мазкур мезонни аниқлаш ҳам тўртта ғўза навининг ҳар бирида алоҳида-алоҳида ҳамда биргаликда ўтказилди. Патогенлик индекси тўрт балли шкала бўйича баҳоланди.

Зарарланган ўсимликлар ва назоратдаги зарарланмаган ўсимликлар илдизларнинг узунликларини ўлчаш қуйидагиларни аниқлаш имконини берди:

С–6524 нави учун 316, 328 (FOV), 319, 503, 519 ва 520- (*F. solani*) изолятлари илдизларнинг ўсишига энг катта салбий таъсир кўрсатди. *F. solani* га мансуб 473-изолят мазкур белги бўйича ўртача натижани кўрсатди, илдизлар 53,5% зарарланди. Қолган изолятлар илдизларнинг ўсишига суств таъсир кўрсатиб, С–6524 нав ўсимликлар илдизлари ўсишини 37,7% ингибирлади. Бироқ тадқиқ этилган барча изолятлар мазкур нав учун у ёки бу даражада патоген ҳисобланади;

С–4727 навга нисбатан 316, 460 (FOV) ва 520- (*F. solani*) изолятлари ўсимталарнинг илдиз ривожланишини энг кучли (82–100%) ингибирлаган. Қолган изолятлар 319, 379, 473, 503 (*F. solani*) ва 404-изолятлар (*F. sporotrichioides*) ушбу нав учун суств ҳисобланган (илдизлар ривожининг сусайиши 33–47%). 328 (FOV), 422, 519 (*F. solani*), 502 ҳамда 509- (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) изолятлар мазкур кўрсаткич бўйича жиддий натижа кўрсатмади (14–28%), шунинг учун уларни С–4727 навга татбиқан нопатоген изолятлар қаторига киритиш мумкин;

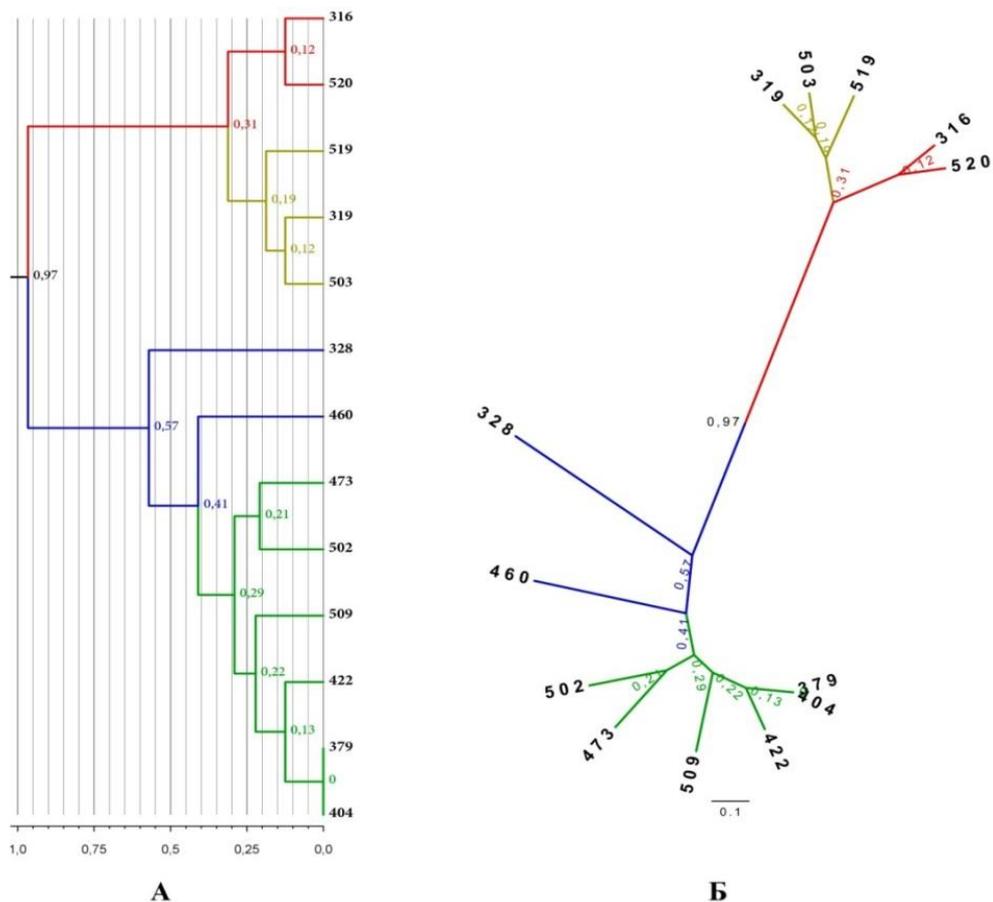
Наманган–77 навида 316, 328- (FOV) ва *F. solani* – 319, 503, 519, 520-изолятлар илдиз ривожини ишга энг кўп – 70–100% йўл қўймади. *F. fujikuroi* var. *intermedia*га мансуб 509-изолят ушбу нав учун ўртача ($\leq 60\%$) кўрсаткич берди. Мазкур анализда икки изолят: *F. solani* 379, 422- ҳамда 404- (*F. sporotrichioides*) изолятларнинг суств патогенлиги аниқланди. Қолган 460, 473, 502-изолятлар Наманган–77 нав учун нопатоген ($< 24\%$) ҳисобланади.

Омад нави ўсимталарининг илдиз ривожланишини ингибирлаш анализи қуйидаги натижаларни берди: ушбу навга нисбатан FOV 316-изолят ва *F. solani* – 319, 503, 519, 520-изолятлар юқори (88–100%) патогенликни кўрсатди. 328 (FOV), 379, 422, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*), 460- (FOV) изолятлар мазкур нав учун нопатоген бўлди. Қолган ҳар хил турдаги изолятлар нопатоген бўлишдан ташқари Омад нави ўсимталари илдизларининг жадал ривожланишига олиб келди: *F. fujikuroi* var. *intermedia* 502 ва 509-изолятлари илдизларнинг тегишлича 2% ва 5,6% узайишига олиб келди. Ўтган анализда бўлганидек, бу ҳол мазкур замбуруғларнинг ўсимлик гормонлари ҳосил қилиши ёки улар ишлаб чиқарилиши ўсимликнинг ўзи томонидан рағбатланиши билан боғлиқ.

Текширилаётган ўсимлик илдизларининг ўсишини ингибирлашнинг шу тарзда олинган маълумотлари фоиз ифодасида 4 балли шкала бўйича тегишли категорияларга конвертирланди. Бунда 1 – патоген (0–30% ингибирланган); 2 – суств патоген (31–50%); 3 – ўртача патоген (51–70%) ва 4

– кучли патоген ($\leq 70\%$). Ушбу маълумотлар тўртала нав учун ўртачалаштирилган ва патогенликнинг умумий индекси чиқарилган.

Патогенлик индекси бўйича қўшимча кластер анализи ҳам намуналарни патоген ва нопатогенларга ажратишнинг аниқ манзарасини берди. Олинган филогенетик шажара иккита асосий кластерга бўлинган бўлиб, генетик масофа патогенлик индекси бўйича изолятлар тафовути фоизларда ифодаланиб, 0 дан то 100 фоизгачани ташкил этади. Биринчи кластер 4 патогенлик индексига эга бўлган изолятларни ва 3 та кучли патоген 316 (FOV), 520- (*F. solani*) ҳамда ўртача патоген 319, 503, 519- (*F. solani*) изолятларни ўз ичига олади. Иккинчи кластер суств патоген Fov 328 ва 460-изолятларни, шунингдек, *F. fujikuroi* var. *Intermedia* га мансуб 379, 422, 473- (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*), 502, 509-патоген изолятларни ўз ичига олади. Таъкидлаш жоизки, патогенлик индекси бўйича патоген изолятлар суств патоген ва нопатоген изолятлардан 97% фарқ қилган (2-расм).



2-расм. *Fusarium spp.* га мансуб 13 та изолятнинг UPGMA анализи.

А – ғўзанинг тестланаётган навлари ва линияларига нисбатан изолятларнинг патогенлик индекси бўйича тақсимланишини кўрсатувчи дендрограмма; Б – фитопатогенларнинг ўзбек коллекциясига мансуб суств ва нопатоген намуналардан патоген изолятларнинг узоқлигини кўрсатувчи томир отмаган шажара. Юқори вирулентлилар – қизил, ўрта вирулентлилар – сарик, суств вирулентлилар – кўк ва нопатогенлар – яшил.

Шундай қилиб, 316 (FOV) ва 520- (*F. solani*) изолятлар ўрта толали ғўзага нисбатан кучли патогенли ҳисобланади. Айниқса, 520-изолят барча

тўртала навда чигит унишидан олдин чигитни ҳалок этди. *F. solani* – 319, 503, 519-изолятлар патогенлик индексининг ўрта қийматини кўрсатди. FOVнинг икки намунаси – 328 ва 460-изолятлар патогенлиги суств. Қолган изолятлар анализ натижасига кўра ўрта толали ғўзага нисбатан нопатогендир.

Диссертациянинг «Генетик популяциялар ишлаб чиқиш ва чидамлилиқ локусларини генетик хариталаштириш» деб номланган олтинчи бобида қуйидагилар баён этилган: вилтга чидамлилиги бўйича бири-биридан фарқланувчи экспериментал популяциялар олиш учун ўзбек ғўза гермплазмаси коллекциясидан 18 та ўсимлик (коллекцияси каталогига биноан 10 та чидамли ва 8 та таъсирчан) танлаб олинди. 21 та чатиштириш комбинациялари ўтказилиб, шулардан кейинчалиқ «Mebane B1» х «11970» комбинацияси ажратиб олинди, чунки барча бошқа комбинацияларда вилтга чидамлилиқ белгиси бўйича яққол сегрегация йўқлигини кўрсатди. Бу фактнинг моҳияти шундаки, ҳам чидамли, ҳам таъсирчан 18 та ўсимлик «вилтга чидамли» ва «вилтга таъсирчан» мезонлари бўйича каталог ёзувлари асосида саралаб олинган. Зеро, коллекциянинг кўпгина намуналари бўйича маълумотлар бундан 10–20 йиллар муқаддам киритилган, шунинг учун вилтнинг табиати ҳақидаги аниқ маълумот (фузариоз, вертициллез ва хоказо) мазкур қайдларда йўқ.

Фузариоз инфекциявий ҳалокатдан фойдаланиб реал шароитларда ўтказилган эксперимент 21 та комбинациядан кейинги тадқиқотларда фойдаланиш учун яроқли фақат 1 та популяцияни аниқлаш имконини берди. Танлаб олинган популяция кейинчалиқ F₂₋₄ авлод олишда фойдаланилди.

Экспериментал популяция ва назорат ўсимликларнинг икки хилма-хил шароитда яшовчанлигининг анализи қуйидаги натижани берди: табиий вилт шароитида чигитларнинг униши жуда суств кечди. F₃ популяцияда шартли тоза «Тажр.дала–1» ва «Тажр.дала–2» табиий вилт шароитида «Mebane B1» х «11970» популяцияда чигитлар қўшимча равишда FOV316 изолят билан сунъий зарарлантирилганда унмаган чигитлар миқдори тегишлича 3% ва 21% ни ташкил этди. Олинган маълумотлардан кўриниб турибдики, экспериментал популяция ва назорат ўсимликларида тенг даражада чигитларнинг униши ва инфекциявий фонга боғлиқ равишда унмай ҳалокатга учрашида кучли тафовут кузатилади. «Тажр.дала–2»да табиий фонда *G.hirsutum* турининг нав намуналари орасида ҳалок бўлган ўсимликларнинг ўртача миқдори 43,5% ни ташкил этди.

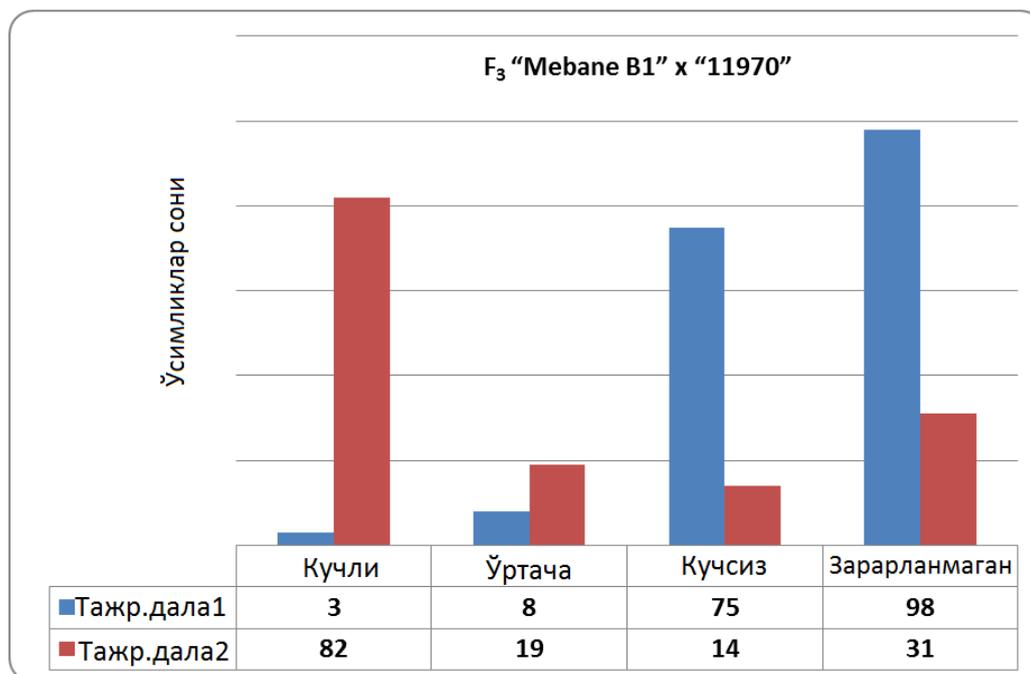
«Mebane B1» х «11970» популяциясида вилтдан таъсирланишига кўра кенг миқёсдаги фенотипик вариациялар кузатилди. Навбатдаги анализ учун «Mebane B1» х «11970» популяцияси танланди.

F₃ «Mebane B1» х «11970» популяция ўсимликларида вегетация даврининг охирида, кўсақлар пишиб очила бошлаган даврда FOV касалликлари кучли равишда ситдан намоён бўлади.

F₃ популяциясида чатишишдан ҳосил бўлган аломат ажратиш анализи инфекциявий фонга боғлиқ равишда белгилар ҳар хил тарзда намоён бўлади. Чунончи, «Тажр.дала–1» шароитида 45% ўсимликда вилтнинг турли даражада

намоён бўлиши кузатилди. «Тажр.дала–2» табиий вилт фонда 79% ўсимликда вилтнинг турли даражада намоён бўлиши кузатилди (3-расм).

«Тажр.дала–1» ва «Тажр.дала–2»да табиий ва назорат ўсимликларида вилт намоён бўлиш даражасини ўртача баҳолаш «Mebane–1» тегишлича 1 ва 3,3 даражага (5 баллик шкала бўйича. Бунда 1 – соғлом ўсимлик, 2 – суст намоён бўлиш, 3 – ўртача намоён бўлиш, 4 – кучли намоён бўлиш, 5 – ўсимликнинг ҳалок бўлиши); «11970» тегишлича – 2 ва 4; 3–79 – 1 ва 2; ТМ–1 – 1 ва 1,3; С–4727 – 3 ва 2,7 эканлигини кўрсатди.



3-расм. F₃ («Mebane B1» x «11970») популяцияси ўсимликларининг инфекциявий фонга боғлиқ равишда зарарланиш даражаси бўйича тақсимланиши.

«Тажр.дала–1» – сунъий касаллантириш қўлланилган соф фон; «Тажр.дала–2» – сунъий касаллантириш қўлланилган табиий вилтли фон.

Тест ўтказилаётган популяцияда ўсимликларнинг икки гуруҳга (турғун ва нотурғун) шартли тақсимланиши, бунда суст, ўрта ва кучли зарарланган ўсимликлар нотурғун гуруҳга, зарарланмаган ўсимликлар иккинчи – турғун гуруҳга бирлаштирилган. «Тажр.дала–2» табиий вилтли фондаги гуруҳлар ўсимликларининг сони тегишлича 115 ва 31 ни ташкил этди. Бундай ҳолатда анализ қилинаётган популяцияда вилт билан зарарланиш бўйича фенотипик парчаланиш табиий вилтли фон шароитида 3:1 ($\chi^2=1,11$; $p\leq 0,05$)га яқин нисбатда рўй беради. Ваҳоланки, соф фон «Тажр.дала–1» ва сунъий зарарланиш шароитларида ўсимликлар тақсимланиши 86 ва 98 ни ташкил этган. Бу 1:1 ($\chi^2=0,78$; $p\leq 0,05$) парчаланишга мос келади.

«Тажр.дала–1» ва «Тажр.дала–2» 1-экспериментал популяцияда χ^2 қиймати:

$$\chi^2 = \sum (E_{н} - E_{ож})^2 / E_{ож} \quad (1)$$

формуласи бўйича ҳисобланади.

G. hirsutum нинг фузариоз вилтга чидамлилиги билан ўзаро боғланган генетик минтақаларни аниқлаш учун вилтга чидамлилик белгиси бўйича сегрегирловчи экспериментал F_3 популяция «Mebane B1» x «11970» GH, CIR, CM, BNL, TMB, NAU ва JESPR коллекцияларнинг микросателлитларидан фойдаланган ҳолда генотипланди. Ҳозиргача 775 та жуфт микросателлитли праймерлардан фойдаланилдики, улардан 105 таси қариндош ўсимликлар ўртасида полиморфизмни кўрсатди.

Аниқланган 105 та праймерлик жуфтлардан вилтга чидамлилик белгиси билан ўзаро боғланган маркерларни аниқлаш учун экспериментал популяцияни QTL хариталаштириш ҳамда маташиш гуруҳлар анализидан фойдаланилди. Аниқланган маркерлардан 105 та микросателлитли праймер жуфтлар популяцияларни хариталашга яраб, 237 та полиморф локуслар топилди. Маташиш анализи ва генетик харита тузиш JoinMap 3,0 дастури ёрдамида амалга оширилди.

Маташиш анализи ўтказиш учун полиморф локуслар уч гуруҳга бўлинди:

1. Фақат «Mebane B1»да амплифицирланадиган локуслар (1:1 тақсимланишда) ҳамда (3:1 ёки 1:3) тақсимланувчи гетерозигот локуслар.
2. Фақат «11970» да (1:1 тақсимланувчи) амплифицирланадиган ҳамда (3:1 ёки 1:3) гетерозигот локуслар.
3. Барча олинган полиморф локуслар.

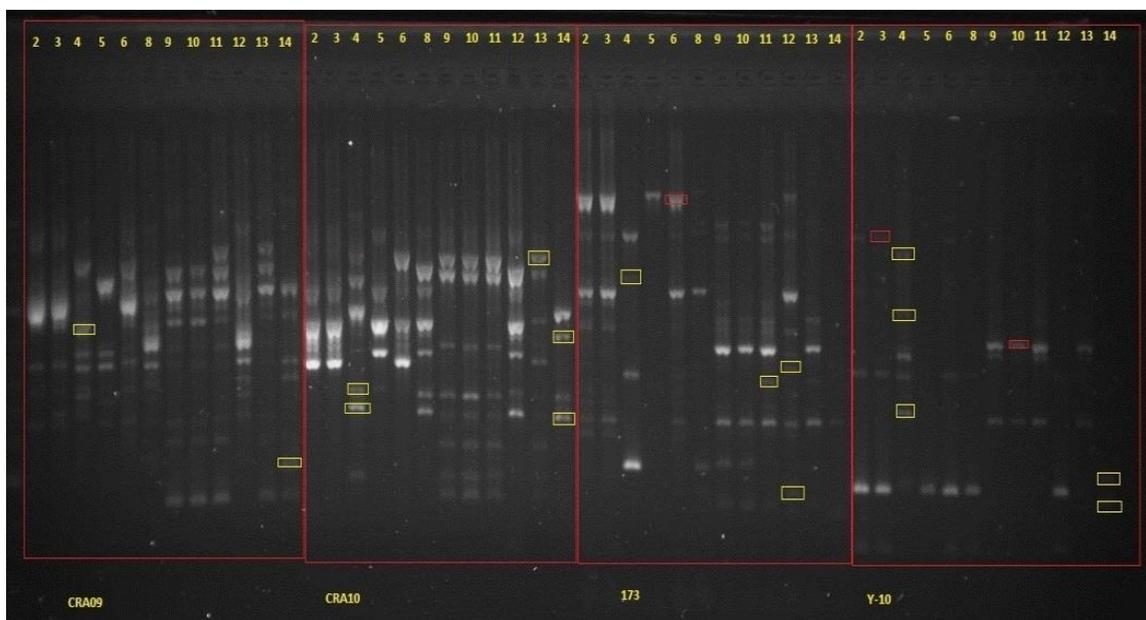
Мазкур маълумотлар асосида 45 та полиморф маркерларга асосланган маташишнинг генетик харитаси олинди (5-расм).

Кейинги QTL хариталаш вилтга чидамлилик белгиси билан ўзаро боғланган локусларни аниқлаш имконини берди. QTL анализ Windows QTL Cartographer v. 2.5_011 дастурида интервалларни (CIM) аралаш хариталаш методи ёрдамида ўтказилди. CIM хариталаш натижасида 3 та маташиш гуруҳларида вилтга чидамлилик белгиси билан ўзаро боғланган 6 та номзод маркерлар аниқланди. Бироқ GS1 маташиш гуруҳи энг ишончли натижа берди. Унда ($LOD = 5,3$) вилтга чидамлилик билан маташган асосий QTL минтақа BNL 3442_129 ва BNL1145_259 маркерлари орасида бўлди.

Диссертациянинг «**Ўза нав намуналарининг вилтга чидамлилигини яхшилаш учун номзод генларни биоинформатик идентификациялаш ишлари**» деб номланган еттинчи бобида қуйидагилар баён этилган: мазкур диссертация иши доирасида бир нусхали генлардан фойдаланиш билан боғлиқ айрим чекланишларни бартараф этиш учун тадқиқот этилаётган *Fusarium* изолятларининг намуналари ҳар турли таксономик гуруҳларни идентификациялаш икониятларини кенгайтириш учун универсал ДНК маркерлар, хусусан, RAPD ёрдамида генотипланди. Умуман, генотиплаш учун *Fusarium spp.* фитопатоген замбуруғларининг 12 та изоляти ўртасидаги фарқларни шарт қилиб қўядиган амплификация маҳсулотларини идентификациялаш мақсадида 73 та RAPD праймерларидан фойдаланилди (4-расм).

Келгуси ишлари учун ҳам турлар (расалар)аро, ҳам видоспецифик (турлар *forma specialis*) ноёб маҳсулотларни амплифицияловчи праймерлар танлаб

олинди. Бу фрагментлар гелдан элюрланиб нуклеотид кетма-кетликни аниқлаш бўйича анализ қилиш учун векторда клонланди. Натижада 13 та ноёб фрагментлар ажратиб олинди. Мазкур фрагментларнинг нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш халқаро маълумотлар генетик базаси билан қиёсий анализ ўташиш, шунингдек, кейинги SCAR анализ олиб бориш учун 13 та праймер жуфтликларини ишлаб чиқиш имконини берди.



4-расм. *Fusarium spp.* 12 изолятининг RAPD анализи.

Ана шу нуклеотид кетма-кетликларни BLAST анализ воситасида халқаро генетик банк билан қиёслаш учун нуклеотид кетма-кетликларни аннотацияланган оқсил кетма-кетликларига қарши қиёслаш имконини берувчи BLAST X алгоритмидан фойдаланилди. Натижада айрим RAPD ампликонларнинг функционал мансублигини аниқлашга муваффақ бўлинди.

Фитопатогенларга чидамлилиқ бахш этувчи хўжайин ўсимликлар генларининг идентификацияси патогенларни назорат қилиш учун номзод генларнинг ўзга ёндашуви ҳисобланади. Ана шундай ёндашувлардан бири QTL натижасида идентификацияланган маркер участкаларнинг *in silico* анализи ҳамда хўжайин ўсимликлар белгиларини ассоциатив хариталаштиришдир.

Маркерланган участкаларда жойлашган ўсимликларнинг патогенларга чидамлилиги ҳамда генетик хаританинг информативлигини оширишга масъул бўлган потенциал генларни аниқлаш учун *Gossypium raimondii* тўлиқ геномининг нуклеотид кетма-кетлигидан ва номзод маркерларни амплифицирлашда 6 та праймер жуфтликлардан фойдаланилди. Натижада вилтга чидамлилиги билан энг муҳим боғланган икки локус BNL1145_259 ва BNL3442_112 бўйича маркерланган минтақаларгина аннотацияланди. Маркер минтақаси оқсилни алкогольдегидрогеназга, фосфатазага, кальций боғловчи ва осмотин ўхшаш оқсилга кодловчи генларга эга.

ХУЛОСАЛАР

«Ўзбекистонда ғўзани зарарлантирувчи *Fusarium* туркумидаги патогенларнинг молекуляр идентификацияси ва тавсифи» мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Патогенларнинг тур идентификацияси ўтказилган. Ўзбекистоннинг фитопатоген фонида 6 та тур (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Fusarium equisity*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium fujikuroi* ва *Fusarium sporotrichioides*) мавжудлиги аниқланган.

2. Илк бор бир нусхали генлар бўйича секвенслаш методидан фойдаланиб Ўзбекистонда тарқалган FOV 3-, 4- ва 6-расалар идентификацияланган.

3. Вирулент изолятлар аниқланди. Маҳаллий навлар учун *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*нинг учинчи расаси (316-изолят) ва *F. solani* тури вакиллари (503, 519 ва, айниқса, 520-изолятлар) энг катта хавф туғдириши исботланган.

4. Тўртта бир нусхали генлар асосида нуклеотид кетма-кетликлар аниқланган. Уларнинг нуклеотид кетма-кетликлари асосида SNP ва ASPCR методлари ёрдамида специфик праймерлар тури ва расаси ишлаб чиқилган.

5. Ғўза чатиштириш комбинациялари асосида «Mebane B1» x «11970» вилтга чидамли популяция яратилган.

6. Ғўзанинг қатор бошқа белгиларини (биринчи шох чиқиши баландлиги, ўсимлик баландлиги, симподиялар сони, шохларнинг узунлиги) детерминловчи локуслар аниқланган.

7. Хариталанган маркерларнинг ғўзанинг вилтга чидамлилиги билан боғланиш даражасини аниқлаш учун QTL анализ ўтказилган. *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*га чидамли локусларга эга бўлган боғланишнинг учта гуруҳи аниқланган.

8. Олинган генетик хариталар ва QTL анализ асосида ғўзанинг маркерларга асосланган селекцияда, шунингдек, номзод генларни ажратиш ва батафсил ўрганиш учун потенциал фойдаланиш мумкин бўлган маркерлари аниқланган.

9. *in silico* анализ ўтказилган, иккиламчи метаболитлар, микотоксинлар синтези ҳамда ғўзанинг ташқи таъсирларга (патоген билан зарарланиши) чидамлилиги учун жавобгар *Fusarium*нинг 11 та гени, *Gossypium*нинг 4 та гени аниқланган.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ 16.07.2013.В.15.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК ПРИ ИНСТИТУТЕ ГЕНОФОНДА
РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО МИРА, НАЦИОНАЛЬНОМ
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА, ИНСТИТУТЕ ГЕНЕТИКИ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

ЦЕНТР ГЕНОМИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ

ЭГАМБЕРДИЕВ ШАРОФ ШУХРАТОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ПАТОГЕНОВ РОДА *FUSARIUM*,
ПОРАЖАЮЩИХ ХЛОПЧАТНИК В УЗБЕКИСТАНЕ**

**03.00.14 – Геномика, протеомика и биоинформатика
(биологические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за №30.09.2014/В2014.3–4.В49.

Докторская диссертация выполнена в Центре геномики и биоинформатики.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском) размещен на веб-странице по адресу www.flora-fauna.uz и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу www.ziyounet.uz.

Научный консультант: **Абдурахмонов Иброхим Юлчиевич,**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Марупов Аббосхон,**
доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Давронов Кахрамон,
доктор биологических наук, профессор

Кадырова Дильбар Абдуллаевна,
доктор биологических наук

Ведущая организация: **Институт микробиологии**

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 года в ___ часов на заседании Научного совета 16.07.2013.В.15.01 при Институте генофонда растительного и животного мира, Национальном университете Узбекистана, Институте генетики и экспериментальной биологии растений (Адрес: 100053, г.Ташкент, ул. Богишамол, 232, в зале совещаний Института генофонда растительного и животного мира. Тел.: (+99871) 289-04-65; факс: (+99871) 262-79-38; e-mail: botany@uzsci.net)

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института генофонда растительного и животного мира (зарегистрировано за № 03). Адрес: 100053, г.Ташкент, ул. Богишамол, 232, Институт генофонда растительного и животного мира. Тел.: (+99871) 289-04-65; факс:(+99871) 262-79-38.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2016 года
(протокол рассылки № _____ от «___» _____ 2016 года)

К.Ш. Тожибаев,
председатель Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.б.н.;

У.Т. Мирзаев,
ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученой степени доктора наук, к.б.н.,
старший научный сотрудник;

Ш. Юнусонов,
председатель научного семинара при Научном
совете по присуждению ученой степени доктора наук,
д.б.н., профессор.

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. На сегодняшний день развитие хлопководства играет важную роль в экономике государств. Одной из больших проблем хлопководства являются фитопатогенные грибы. «Согласно данным Хлопкового фонда из-за болезней хлопчатника, вызываемых патогенами, страдает приблизительно 12% всего урожая». Только в США ежегодные потери составляют 11,7%, в Бразилии и Африканских странах потери могут достигать 50%, а в Индии 20%¹.

Грибы рода *Fusarium* широко распространены в природе и представляют обширную, биологически неоднородную группу грибов. Большинство из них являются фитотрофами, поражают свыше 120 видов растений и наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству многих стран, включая и Узбекистан. Патогенные грибы рода *Fusarium* сгруппированы в специализированные формы *formae specialis* (f.sp.), основанные на их способности вызывать поражение конкретного растения. В настоящее время насчитывается более 80 типов специализированных форм.

До недавнего времени основным возбудителем заболевания хлопчатника считался гриб вида *Verticilium*, в связи с этим вся селекция хлопчатника ориентировалась в сторону создания сортов, устойчивых к *Verticilium*. Но в последние годы в связи с воздействием различных биотических факторов (изменение климатического режима, нарушение водного режима и др.) произошли изменения и в патогенном фоне нашей страны. В связи с этим задача по идентификации специализированных форм патогенов рода *Fusarium* остаётся весьма актуальной для нашей страны.

Всё чаще сообщается о нарастании и распространении фузариозного вилта не только на тонковолокнистые (*Gossypium barbadense*), но и на средневолокнистые сорта хлопчатника. В Бухарской области были обнаружены новые, не виданные до сих пор на хлопчатнике виды патогенов, такие как *Fusarium solani*, вызывающие корневую гниль.

В свете сказанного выше актуальной проблемой хлопководства становится не только создание устойчивых к вилту сортов хлопчатника, но и одновременно с этим идентификация фитопатогенного фона нашей страны, выявление опасных изолятов и грамотная оценка их патогенности, создание патогенных карт и рекомендаций.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Постановлением Кабинета Министров Республики Узбекистан от 29 марта 2004 г. № 148 «О мерах по совершенствованию структуры и повышению эффективности службы защиты растений», а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

¹ Amanda N. Cianchetta et al. Survey of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the United States. The Journal of Cotton Science 19:328–336. The Cotton Foundation 2015.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики – V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и защита окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации. Молекулярно-генетические исследования представителей рода *Fusarium* осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в Texas A&M University, Mississippi University, Washington State University (США), Nanjing Agriculture University (Китай), CIRAD (Франция) а также CSIRO (Австралия) ведутся обширные научные работы.

В результате исследований, проведенных в мире по идентификации и выявлению наиболее вирулентных форм патогенов хлопчатника, получен ряд научных результатов, в том числе создана коллекция ДНК маркеров–RFLP, RAPD, SCAR для идентификации патогенов (UC Davis University of California, Broad Institute, США), генетическая база данных рода *Fusarium* (CBS KNAW *Fusarium* MLST Database, Голландия), а также база данных полных секвенированных последовательностей геномов фитопатогенов (Mips Helmholtz Zentrum München, Германия).

В мире по комплексному изучению генома патогенов хлопчатника с помощью молекулярно-генетических методов по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе определение полных нуклеотидных последовательностей геномов *F.circinatum*, *F.graminearum*, *F.proliferatum*, *F.verticillioides*; ассоциативное картирование генов устойчивости к расам фузариозного вилта.

Степень изученности проблемы. В научных работах зарубежных учёных Abd-Elsalam, Elias и Wang изучена молекулярная идентификация патогенов рода *Fusarium* при помощи методов: белкового (изозимный), полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизма длин амплифицированного фрагмента (AFLP). Исследования с использованием SNP-маркеров, секвенирования по различным однокопийным генам на изолятах рода *Fusarium* проводили в США (O'Donnell K, Skovgaard K.), Египте (Abd-Elsalam K.), Китае (Chen X., Kim Y., Wang B.), Мексике (Garsia O.S.), Германии (Schnider F.).

Исследования, посвященные некоторым аспектам изучения патогенов и борьбы с ними в странах СНГ, наблюдаются в научных произведениях Г.Я. Курбанова, С.Ф. Сидоровой, И. Акмурадова, М.Я. Менликеева.

Исследования, проведенные в нашей стране по идентификации и изучению патогенов рода *Fusarium* при помощи классических микробиологических методов, посвящены работы Н.Н. Назирова, А.И. Гусевой, Н.Г. Запрометовой, Л.В. Поляковой, Г.С. Караевой, А. Марупова, Б.О. Хасанова, Л.А Глуховой.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами научно-исследовательского учреждения, где выполнена работа.

Диссертационная работа выполнена в Центре геномики и биоинформатики в рамках международного проекта UZB2–31016–ТА–09 «Молекулярная характеристика и ассоциация генов/локусов количественных признаков (QTL) для заболевания фузариозным вилтом *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV), в сотрудничестве с Департаментом сельского хозяйства США (2010–2012 гг.) и инновационного проекта И5–ФК–0–30702 «Экспресс-метод мониторинга и определения видовой и расовой принадлежности *Fusarium* spp. в регионах Узбекистана» (2014–2015 гг.).

Целью исследования является комплексное молекулярно-генетическое исследование генома патогенов рода *Fusarium* и оценка патогенности часто встречаемых рас и видов по отношению к широко районированным сортам хлопчатника.

Задачи исследования:

Ре-секвенирование ДНК патогенов рода *Fusarium* по однокопийным генам (TEF-1 α , VT, rDNA, NIR) для проведения генетической идентификации;

разработка современных геномных инструментов на основе SNP (полиморфизм единичного нуклеотида) и ASPCR (аллель специфичных) маркеров для быстрой идентификации патогенов. Разработка праймеров для быстрой детекции рас патогенна *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*;

создание генетической популяции, сегрегирующей по признаку устойчивости к фузариозному вилту, из коллекции генофонда хлопчатника Республики Узбекистан;

генетическое картирование локусов устойчивости хлопчатника к фузариозному вилту с использованием молекулярных ДНК-маркеров;

изучение взаимодействия между патогеном и растением, выявление наиболее вирулентных изолятов рода *Fusarium*, создание карт патогенности и распространения патогенов по республике;

биоинформатическая (*in silico*) идентификация кандидатных генов для улучшения устойчивости сортов хлопчатника к патогенам.

Объектом исследования являются патогенные грибы рода *Fusarium* и генотипы хлопчатника, взятые из коллекции фитопатогенов и генофонда хлопчатника из Института генетики и экспериментальной биологии растений.

Предметом исследования является оценка вирулентности и степени «опасности» фитопатогенов рода *Fusarium* по отношению к хлопчатнику, разработка эффективного метода идентификации фитопатогенов (вид, *formae specialis*, расы) для контроля распространения фузариозных патогенов в целом и вилта хлопчатника в частности.

Методы исследования. В исследовании были использованы классические методы генетики и селекции хлопчатника, молекулярной фитопатологии, а также современные подходы молекулярной генетики и геномики, статистики и биоинформатики. Для кластерного анализа по индексу патогенности была использована программа STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., www.statsoft.com), для анализа маркерных локусов и групп сцепления, а также для QTL

картирования были использованы программы JoinMap 3.0, MapQTL 4.0, QGene 4.3.2 и Windows QTL Cartographer (v. 2.5_011), для оценки влияния фитопатогенов на растения был использован пакет статистических программ NCSS 2003 и PASS 2002.

Научная новизна исследования заключается в том, что:

впервые проведен анализ генома патогенов рода *Fusarium*, ре-секвенированы важные однокопийные гены патогенов (TEF-1 α , VT, rDNA, NIR, PNO). Опираясь на нуклеотидные последовательности гена бета-тубулина (VT) разработаны универсальные SNP-праймеры, способные идентифицировать расы 2, 3, 8 и группы A и B патогена вида *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*;

разработаны праймерные пары, способные идентифицировать 3 и 8 расы вида *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, на основе метода аллель-специфического ПЦР (ASPCR);

молекулярно таксономически идентифицирован род *Fusarium*, представленный в Узбекистане 6 видами (*Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*);

определены 3, 4 и 6 расы *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, распространённые в Узбекистане;

проведена оценка вирулентности видов рода *Fusarium* по отношению к широко культивируемым сортам хлопчатника;

описана патогенность и выявлены наиболее опасные патогены хлопчатника: 3 расы *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* и новый вид патогена для Узбекистана *Fusarium solani*;

создана генетическая популяция «Mebane B1» x «11970», сегрегирующая по устойчивости к фузариозному вилту в соотношении 3:1, и обнаружены 237 полиморфных локусов;

определены потенциальные гены, отвечающие за устойчивость хлопчатника к вилту;

проведено генетическое картирование, выявлены два локуса BNL1145_259 и BNL3442_112, ассоциированные с устойчивостью к вилту, при помощи *in silico* ПЦР и биоинформатических методов были выявлены гены, расположенные в маркированных регионах;

разработаны патогенные карты с нанесением меток о распространении видов на географические координаты.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

идентифицированы специализированные формы, расы и виды патогенов, распространенных на территории Узбекистана, при помощи методов секвенирования по однокопийным генам, полиморфизму единичного нуклеотида и аллель-специфическому ПЦР;

QTL анализом, проведенным с экспериментальной популяцией хлопчатника, выявлены новые кандидатные гены и маркеры, сцепленные с признаком устойчивости к FOV;

разработаны праймеры и методы, позволяющие своевременно реагировать и детектировать наиболее опасные патогены на ранних стадиях;

разработана карта патогенности, позволяющая размещать сорта на зараженных территориях, согласно устойчивости к тому или иному патогену, тем самым повышая урожайность;

на основе комбинаций скрещивания хлопчатника «Mebane B1» x «11970» была создана популяция, устойчивая к вилту.

Достоверность результатов исследования. Результаты исследования были подтверждены с помощью современных, взаимодополняющих молекулярно-генетических методов и подходов;

данные были обработаны при помощи классических статистических методов (UPGMA и NJ), кластерный анализ индекса патогенности был рассчитан согласно ANOVA (анализ вариантов) тесту, учитывая степень влияния фитопатогенов на растения, анализ маркерных локусов, создание групп сцепления и последующее QTL картирование проводили при помощи программ (JoinMap 3.0, MapQTL 4.0, QGene 4.3.2 и Windows QTL Cartographer v. 2.5_011), что подтверждает достоверность полученных результатов.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования определяется использованием молекулярно-генетических методов для выявления патогенов рода *Fusarium*, что позволит точно и верно идентифицировать виды и расы патогена, позволит селекционерам знать с какой болезнью им предстоит иметь дело и разрабатывать или размещать сорта, более устойчивые к конкретному типу патогена.

Практическая значимость работы заключается в новых методах диагностики патогенов, которые позволят проводить быструю и экономически выгодную идентификацию патогенов как в полевых, так и в лабораторных условиях при наличии минимальной базы оборудования и реактивов, снизить и предотвратить угрозу заражения сельскохозяйственных культур размещением устойчивых сортов в зависимости от патогенного фона. Результаты дополнения патогенных карт новыми данными позволят создать в будущем информационную биоинформатическую систему сельскохозяйственных патогенов, связанных с регионами, в которой будут представлены все данные о местности, патогене и устойчивости сортов, тем самым снизив и предотвратив угрозу заражения сельскохозяйственных культур, повысив экономическое благосостояние нашей республики.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы, внедренные в практику:

разработанные SNP-праймеры, идентифицирующие 5 рас *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, используются в лаборатории Crop Science Research Laboratory, Genetics and Precision Agriculture Research Unit (Миссисипи, США), в научно-исследовательских работах по идентификации патогенов (справка от United States Department of Agriculture, 30.01.2012 г.);

разработанные ASPCR-праймеры были использованы в проекте (№3096–21000–019–02) «Оценка абиотических и биотических факторов в тепличных и полевых условиях для оценки устойчивости хлопчатника к фузариозному вилту (FOV)» (USDA Службы сельскохозяйственных исследований, Лаббок, Техас, 12 октября 2015 года). Аллель-специфический праймер FOV_BT_AS_R3 позволил быстро и точно определить американский генотип 3 и 8 рас патогена *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, что позволило существенно сократить и сэкономить временные и финансовые ресурсы.

Апробация результатов исследования. Основные результаты исследования изложены в виде лекции и прошли апробацию на конференциях: «Достижения и перспективы экспериментальной биологии растений», Ташкент, 21 ноября 2013 г., «Актуальные проблемы развития биоорганической химии». Ташкент, 15–16 ноября 2013 г., «Конференции молодых ученых АН РУз», Ташкент 2014 г., «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истиқболлари». Ташкент, 7–8 мая, 2015 г.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликованы всего 28 научных работ. Из них 10 научных статей, в том числе 8 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, семи глав, заключения, списка литературы, приложений. Объем диссертации составляет 191 страницу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Молекулярно-генетические исследования рода *Fusarium***» раскрываются вопросы истории их идентификации, применения молекулярно-генетических методов и продуцентах микотоксинов. Перечислены основные проблемы данного направления, обсуждены возможные пути их решения.

Во второй главе диссертации «**Материал, условия и методы исследования представителей рода *Fusarium***» детально описано генотипирование и ДНК секвенирование геномов грибных патогенов для видовой и расовой идентификации. Для определения видовой и расовой принадлежности были использованы изоляты *Fusarium* spp. из узбекской коллекции фитопатогенов.

В третьей главе диссертации «**Филогенетический анализ и степень генетического разнообразия**» приведены следующие результаты.

Для идентификации изолятов *Fusarium* spp. из узбекской коллекции фитопатогенов мы использовали ДНК изолятов FOV с известной расовой принадлежностью, собранных по всему миру. Мы просеквенировали последовательности четырех однокопийных генов – TEF-1 α , VT, NIR и rDNA – с использованием генспецифичных праймеров. Полученные нуклеотидные последовательности были сравнены с опубликованными последовательностями вышеуказанных генов при помощи BLAST международного генетического банка NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov) для определения их видовой принадлежности. Ниже приведены результаты филогенетического анализа по всем четырем генам.

Идентификация по VT гену. В общей сложности сорок четыре изолята *Fusarium* spp. были проанализированы по частичной последовательности гена VT. Множественное сравнение последовательностей и построение дерева методом UPGMA показало, что исследуемые нами образцы разделяются на пять кластеров. Кластер 1 представлен двумя изолятами *Fusarium solani*. Кластер 2 включает в себя 11 изолятов *Fusarium sporotrichioides* (изолят 532), а остальные *Fusarium equiseti*, которые относятся к комплексу *Gibberella zeae*. Кластер 3 включает в себя изолят *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum (FOV), относящийся к группе «VCG1112». Кластер 4 включает в себя 10 изолятов *Fusarium proliferatum*, относящихся к комплексу *G. fujikuroi*. Кластер 5 включает в себя 20 изолятов, относящихся к *F.oxysporum* f.sp.vasinfectum.

Проведенный далее анализ методом NJ также показал схожую топологию филогенетического дерева, за исключением того, что в третий кластер вместо изолята Fov19_VCG1112 выделился изолят Fov112_GrC, также относящийся к FOV. В качестве внешней группы использовались образцы *F. solani* (319 и 520), генетически отдаленные от остальных образцов *Fusarium*. В данном случае мы также наблюдаем пять кластеров. Расстояние между кластерами представлено в процентах отличия между образцами и составляло 2–12%, в то время как внутри кластеров генетические различия в среднем находились в пределах 0–2%. Более близкими были изоляты из 3–5 кластеров. Примечательно то, что образцы Fov19_VCG1112 и Fov112_GrC являются изолятами FOV, так они были охарактеризованы ранее американскими учеными. Кроме того кластер 4 включает в себя представителей вида *Fusarium proliferatum*, что также указывает на более близкое генетическое родство данного вида с FOV. Наибольший интерес представлял кластер 5, так как в нем сгруппировались образцы FOV как из узбекской коллекции, так и изоляты с известной расовой принадлежностью. И хотя генетические отличия между изолятами FOV были не столь значительны, анализ последовательности ВТ гена позволил четко идентифицировать образцы, относящиеся к третьей расе. Таксономическая принадлежность образцов произведена путем сравнения анализируемых последовательностей с международным генетическим банком NCBI помощи алгоритма BLAST.

Идентификация по TEF-1α гену. Тридцать восемь изолятов *Fusarium* spp. были проанализированы по частичной последовательности гена TEF-1α. Множественное сравнение последовательностей и построение дерева методом UPGMA показало, что исследуемые образцы разделяются на 3 кластера. Кластер 1 представлен двумя изолятами, представляющими собой *Fusarium solani*. Кластер 2 включает 13 изолятов, представляющих собой *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* (*Fusarium proliferatum*). Кластер 3 состоял из 23 изолятов, представляющих *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (FOV).

Проведенный далее анализ методом NJ также показал схожую топологию филогенетического дерева. В качестве внешней группы использовались образцы *F. solani* (319 и 520), генетически отдаленные от остальных образцов *Fusarium*. Расстояние между кластерами представлено в процентах отличия между образцами и составляло 7–20%, в то время как внутри кластеров генетические различия в среднем находились в пределах 1%. Как в случае с ВТ геном, видно, что представители вида *F. proliferatum* генетически ближе к FOV, чем образцы, представляющие *F. solani*. Также в третьем кластере сгруппировались образцы FOV как из узбекской коллекции, так и референтные изоляты известных рас. Изоляты 316, 327, 347, 460, 527 и 534 однозначно группировались с изолятом Fov3_Race3 (AY714102.1), генетическое расстояние (ГР) между которыми составило $\leq 1\%$. Кроме этого наблюдались тесные филогенетические связи изолятов 328 и 496 с референтным образцом Fov66_Race4 (AY714101.1), относящимся к четвертой расе.

Идентификация по NIR гену. Сорок один изолят *Fusarium* spp. проанализирован по частичной последовательности гена NIR. Филогенетический анализ с использованием метода UPGMA показал, что исследуемые нами образцы разделяются на 3 кластера. Кластер 1 представлен изолятом 532, анализ которого с использованием алгоритма BLAST показал, что по последовательности гена NIR он схож с *Fusarium graminearum*. Кластер 2 включает 13 изолятов, представляющих собой *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*). В случае анализа гена TEF-1 α эти же образцы представляли собой *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* (*Fusarium proliferatum*), которые относились к патогенному комплексу *G. fujikuroi*. Кластер 3 включает 27 изолятов, относящихся к *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (FOV).

Проведенный далее анализ методом NJ также показал схожую топологию филогенетического дерева. В качестве внешней группы использовался изолят 532, генетически наиболее отдаленный от остальных образцов *Fusarium*. Расстояние между кластерами представлено в процентах отличия между образцами и составляло от 5 до 22%. Генетические различия внутри кластеров находились в пределах 7%, а среднее значение составляло 2%. В третьем кластере сгруппировались образцы FOV как из узбекской коллекции, так и референтные изоляты известных рас. Следует также отметить, что образцы *F. solani* также группировались в третьем кластере. Сравнением образцов по частичной последовательности гена NIR мы идентифицировали образцы, относящиеся к третьей расе и группе «С». Далее последовательности были сравнены с международным генетическим банком NCBI при помощи алгоритма BLAST.

Идентификация по ITS региону rDNA гена. В общей сложности сорок шесть изолятов *Fusarium* spp. были проанализированы по частичной последовательности ITS региона гена rDNA. Множественное сравнение последовательностей и построение дерева методом UPGMA показало, что исследуемые нами образцы разделяются на пять кластеров. Кластер 1 представлен двумя изолятами, представляющими *Fusarium solani*. В кластер 2 сгруппировались 12 изолятов, представляющих вид *Fusarium fujikuroi*. В третий кластер выделился изолят 404 (*Fusarium sporotrichioides*). В четвертом кластере сгруппировались 11 образцов, относящихся к *Fusarium equiseti*. Кластер 5 включает в себя 20 изолятов *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (FOV).

Проведенный далее анализ методом NJ также показал схожую топологию филогенетического дерева. Однако здесь в отдельный клад выделился изолят 532, который показал гомологию с *Fusarium acuminatum*. В качестве внешней группы использовались образцы *F. solani* (319 и 520), генетически отдаленные от остальных образцов *Fusarium*. В данном случае мы также наблюдаем пять кластеров. Расстояние между кластерами представлено в процентах отличия между образцами и составляло 4–13%, в то время как внутри кластеров генетические различия в среднем находились в пределах 2%. Наибольший интерес представлял кластер 5, так как в нем

сгруппировались образы FOV как из узбекской коллекции, так и изоляты с известной расовой принадлежностью.

Сравнительный анализ изолятов из пятого кластера показал, что узбекские образцы имели аналогию с видом *Fusarium oxysporum*, но более подробная таксономия не наблюдалась, это, очевидно, связано с тем, что *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectum подробно не характеризовался по последовательности данного гена в отличие от последовательностей генов BT, TEF-1 α и NIR.

Таксономическую принадлежность образцов определяли сравнением анализируемых последовательностей с международным генетическим банком NCBI при помощи алгоритма BLAST.

В четвертой главе диссертации представлена **«Разработка современных геномных подходов и ген-специфических SNP-маркеров для быстрой идентификации и мониторинга вилтовых патогенов».**

Используя коммерческие пары праймеров для однокопийных генов β -тубулина (BT), рибосомальной ДНК (rDNA), трансляционного фактора элонгации (TEF-1 α), нитрат редуктазы (NIR) и фосфат пермазы (PHO), мы произвели амплификацию и определение нуклеотидных последовательностей полученных продуктов для 15 образцов *Fusarium oxysporum* f.sp. vasinfectum. Сравнение нуклеотидных последовательностей позволило обнаружить наличие нуклеотидных замен (SNP), в том числе и уникальных, внутри последовательностей этих однокопийных генов. Некоторые из этих замен были присущи конкретно той или иной группе FOV (виду, специализированной форме, расе).

На основе полученных данных был разработан ряд праймеров, который позволил бы осуществить точную видовую или расовую идентификацию фитопатогена. В результате тестирования разработанных праймеров мы получили четыре праймера, показавших высокую специфичность при идентификации исследуемых патогенов.

Так, например, праймер SNP FOV2 A 33mer G ATCGATACCCTTGGACGAA позволял точно детектировать расу FOV 2, ранее не отличимую от рас 1 и 6, а также и группу В.

Другой SNP праймер FOV3 Univ SNP TGTGAGCTTGGGAATTCTTG успешно идентифицировал расу 3 FOV. Использование данного праймера позволило нам сгруппировать в одну группу два американских FOV3_AY714088 и FOV16612_AY 714092, а также два узбекских изолята, которые относились к расе 3. Праймеры FOV8 C 30mer C CTCTTCATTGTAAGTTG и FOVSNP11 A 30mer A ACGACTCGAAACGTGCCCGC позволили идентифицировать соответственно расу 8 и группу А.

В результате были разработаны праймеры, позволяющие идентифицировать расы FOV 2, 3, 8 и группы А и В (FOV_112) (табл. 1).

Данные праймеры были разработаны для анализа с набором SNaPshot Multiplex с использованием капиллярного электрофореза. Одним из очевидных преимуществ данного метода с использованием созданных

праймеров является быстрая визуальная детекция (оценка) полученных результатов. Появление на месте целевого нуклеотида, например, «А» любого другого нуклеотида –«G», «Т» или «С» – будет сразу проявляться изменением цвета на картине разделения нуклеотидов при электрофорезе, что в свою очередь является однозначным показателем отрицательного результата по данному праймеру.

Для упрощения идентификации патогенов и преодоления проблем, связанных с необходимостью закупки дорогого оборудования и не менее дорогих расходных материалов и реактивов, мы провели работы по разработке не менее эффективного, но менее затратного метода для идентификации видовой и расовой принадлежности *Fusarium* spp.

Таблица 1.

Уникальные нуклеотиды в геноме фитопатогенов, позволяющие идентифицировать расы.

Изоляты \ Название праймеров	SNP_FOV 3 A_32mer	SNP_FOV 3 A_35mer	SNP_FOV2_A_30mer_G	SNP_FOV2_A_33mer_G	SNP_FOV8_C_30mer_C	SNP_FOV8_C_34mer_C	SNP_FOV_8(2)_34mer_C	SNP_FOV3US_35mer_T	SNP_FOV3US_36mer_T	SNP_FOV_GroupC_30mer_A	SNP_FOV_GroupC_33mer_A
316_R1		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R2		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
347		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV36198_R6	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_Aus2	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV2_R1	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV3_R3		A	G	-	-	-	T	-	T	-	T
ATCC_RACE_8_1_10	G		G	-	C	-	C	C	-	-	T
FOV_1661_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_112	G	-	G	-	-	T	T	C	-	A	-
FOV_113	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	-
FOV_124	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
R4_66	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_16611_R2	G	-		A	-	T	T	C	-	-	T

Основываясь на принципе предыдущего метода, где детектируются единичные нуклеотидные замены, при помощи флуоресцентно-меченых нуклеотидов, была предложена разработка праймеров, которые бы дискриминировали последовательности, не несущие целевой нуклеотид, определяющий тот или иной генотип FOV.

Мы разработали праймеры, где прямой праймер является специфическим для фрагмента гена ВТ-3, а обратный праймер сконструирован так, что является аллель-специфичным только для 3 расы FOV благодаря содержанию информативного (целевого) нуклеотида «А» на своем 3' конце. При отжиге праймеров, если на 3' конце гена β-тубулина

последовательность нуклеотида не соответствует заявленной «А», амплификация терминируется. И, наоборот, наличие продуктов амплификации свидетельствует о том, что в данной пробе находится патоген 3 расы вида *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (рис. 1).

Была также определена оптимальная концентрация ДНК грибной ДНК, которая составила 5 нг/мкл.

Как видно из результатов электрофореза, из 8 тестированных образцов амплификация прошла только у 4, которые были представителями 3 расы FOV. Это FOV316 (узбекский экотип расы 3), FOV347 (узбекский экотип расы 3), FOV3 (американский экотип расы 3) и FOV16612 (американский экотип расы 3). У остальных образцов (представителей рас 4–8) из-за отсутствия целевого нуклеотида «А», ПЦР-продукта не было.

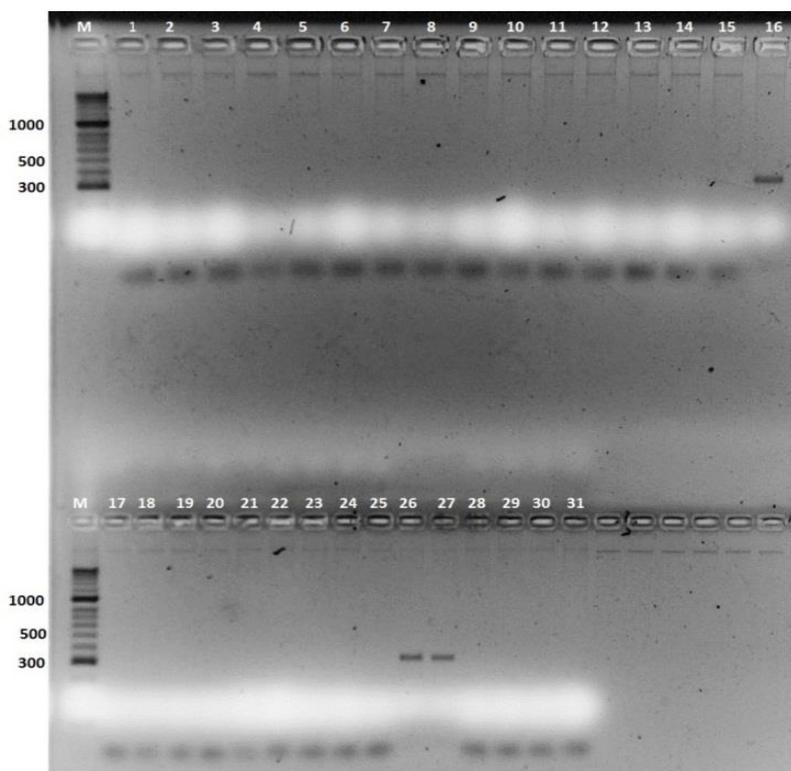


Рис. 1. Электрофореграмма АС_ПЦР, проведенного с использованием праймера FOV_BT_AS_R3, специфичного расе 3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Кроме того мы попытались идентифицировать FOV непосредственно в зараженных растениях (корнях, листьях и семенах). Проведенный анализ также позволил четко определить FOV в тканях зараженных растений. Анализ проводили с зараженными и не зараженными растениями сорта Наманган–77. Праймерная пара BT–5 (5'–GCTCTAGACTGCTTTCTGGCAGACC–3' и FOV_BT_AS_R3 (5'–GTGTAGTGACCCTTGGCCCAA–3'), разработанная нами на основе последовательности BT гена, также ясно определяла наличие FOV третьей расы.

Данный метод и разработанные нами праймеры рекомендуются для быстрой идентификации 3 расы FOV.

В пятой главе диссертации **«Патогенность исследуемых образцов и рас патогенов»** подробно описано следующее.

Помимо определения видовой и расовой принадлежности изолятов *Fusarium* spp. из узбекской коллекции фитопатогенов, мы также провели работы по определению патогенности некоторых из них. В общей сложности 13 изолятов различных видов *Fusarium* были проанализированы по трем различным параметрам, таким как влияние изолятов на всхожесть и прорастание семян, длина побега и угнетение роста корней у четырех коммерческих сортов хлопчатника (*G. hirsutum* L.), возделываемых в Узбекистане на довсходовой и послевсходовой стадиях.

Изолятами, наиболее влияющими на прорастание семян по сравнению с контролем, другими словами, наиболее вирулентными были следующие.

По отношению к сорту С-6524 наибольшее (84–100%) угнетение прорастания семян вызывали изоляты 316 (*F. oxysporum* f.sp.*vasinfectum*), а также 319, 503, 519 и 520 (*F. solani*). Среднее влияние (57–75%) на прорастание семян оказывали изоляты 328, 460 (*F. oxysporum* f.sp.*vasinfectum*), 379, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) и 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Умеренное (<51%) влияние оказывали изоляты 422 и 502.

Относительно сорта С-4727 наиболее агрессивными (81–100%) оказались изоляты 316 и 460 (FOV), а также 319, 503 и 520 (*F. solani*). Среднее (55%–75%) влияние показали 328 (FOV), 379, 422, 473 и 519 (*F. solani*), 502 и 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) и 404 (*F. sporotrichioides*).

На прорастание семян сорта Наманган-77 наибольшее (77%–100%) влияние показали образцы *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* – 316, 328, *F. solani* – 319, 379, 503, 519 и 520. Остальные изоляты показали среднее (57–70% проросших семян) влияние на способность прорастания семян.

Для сорта Омад наибольшее (77–100%) влияние показали изоляты 316 (FOV) и 319, 503, 519, 520 (*F. solani*). Более слабый (<61%) эффект показали изоляты 460 (FOV), 473 (*F. solani*) и 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Слабое (<38%) влияние на прорастание семян сорта Омад оказывали изоляты 328 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) и 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Изолят 404 (*F. sporotrichioides*) не оказывал никакого влияния на всхожесть семян данного сорта.

Как видно из приведенных выше данных, для каждого сорта наиболее агрессивными были преимущественно изоляты 316, 319, 503, 519 и 52, особенно изолят 520, который вызывал гибель семян на предвсходовой стадии всех четырех сортов, использованных в эксперименте. Однако для определения и уточнения наиболее вирулентных изолятов по признаку угнетения всхожести семян мы провели обобщенный анализ по усредненным показателям.

Мы также наблюдали за влиянием наших изолятов на четыре сорта хлопчатника и на послевсходовой стадии. В качестве параметров за

контролем их патогенности мы рассматривали их воздействие на длину проростков.

По параметру длины проростка наблюдалось следующее.

Обладающими наибольшей способностью к угнетению роста проростков сорта С–6524 можно считать изоляты 316, 328 (FOV), 319, 503, 519 и 520 (*F. solani*), так как эти изоляты привели к гибели большинства, а в случае изолята 520 всех семян данного сорта на довсходовой стадии. Среднюю способность к подавлению роста растения по отношению к контролю (48%) показал изолят 460 (FOV). Изоляты 379, 422, 473, являющиеся представителями *F. solani*, 404 (*F. sporotrichioides*) и 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*), можно отнести к категории слабо влияющих ($\leq 30\%$ по отношению к контролю) на рост проростков сорта С–6524.

К изолятам, существенно (53–100% по отношению к контролю) влияющим на рост проростков сорта С–4727, можно отнести изоляты 316 и 460 (FOV), а также 319, 520 (*F. solani*). Угнетение роста проростков почти в 2 раза по отношению к контролю (48%) вызывает изолят 473, относящийся к *F. solani*. Слабый эффект на рост проростков ($\geq 33\%$) оказывают четыре изолята – 328 (FOV), 503 (*F. solani*), 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) и 404 (*F. sporotrichioides*). Изоляты 379, 422 (*F. solani*), 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) существенно не угнетали роста ($\leq 17\%$ по отношению к контролю) проростков сорта С–4727, а изолят 519 (*F. solani*) практически (3%) не угнетал рост проростков данного сорта.

По отношению к сорту Наманган–77 наиболее агрессивными являются изоляты 520 (*F. solani*), вызвавший 100% смерть проростков данного сорта на стадии прорастания, а также 316 и 328 (FOV) и 319, 503 и 519 (*F. solani*), также существенно ($\leq 88\%$) угнетавшие рост проростков по отношению к контролю. Изоляты 460 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) и 404 (*F. sporotrichioides*) умеренно (36–42% к контролю) влияли на длину проростков. Слабое (17%) влияние на длину проростков показал изолят 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Остальные изоляты не показали существенного эффекта ($\geq 6\%$) на сорте Наманган–77.

По признаку влияния изолятов на длину проростка у сорта Омад наблюдался интересный эффект. К изолятам, существенно влияющим на рост побега (76–100% к контролю), относятся 316 (FOV), 319, 503, 519 и 520 (*F. solani*), который, как и в предыдущих случаях, вызвал 100%-ную гибель семян до их прорастания. Остальные изоляты – 328, 460 (FOV), 473 (*F. solani*) и 404 (*F. sporotrichioides*) – не оказывали столь существенного влияния на этот параметр для сорта Омад, так как разница по отношению к контролю составляла от 3% до 10%, а изоляты 422 (*F. solani*), 502 и 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) вообще не угнетали проростки этого сорта ($\leq 1\%$). Однако следует отметить, что изоляты 379 (*F. solani*) и 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) показали прямо противоположный эффект. Эти изоляты, напротив, вызывали удлинение проростков по сравнению с контрольными незараженными растениями. Например, изоляты 379 и 502 вызывали удлинение проростков на 3% и 14% по отношению к контролю.

По нашим данным, наиболее патогенными являются изоляты – 316 (FOV), 319, 503 и 520 (*F. solani*), подавляющих рост побегов на 70–99% по отношению к контролю. Средневирулентными (подавление роста побегов более 50%) являются изоляты 328 (FOV) и 519 (*F. solani*). К слабовирулентным (подавление роста <50%) можно отнести изолят 460 (Fov). Оставшиеся изоляты не оказывали существенного влияния, подавляя рост проростков в среднем на 18 %.

Полученные таким образом данные в процентном выражении ингибирования роста корней у тестируемых растений были конвертированы в соответствующие категории по 4-бальной шкале, где 1 – непатогенные (ингибирование на 0–30%); 2 – слабопатогенные (31–50%); 3 – среднепатогенные (51–70%) и 4 – сильно патогенные ($\leq 70\%$). Эти данные были усреднены для всех четырех сортов, и был выведен общий индекс патогенности.

Дополнительный кластерный анализ по индексу патогенности также показал четкую картину распределения образцов на патогенные и непатогенные. Полученное филогенетическое дерево подразделялось на два основных кластера, генетическое расстояние, выраженное в процентах различия изолятов по индексу патогенности, составляло от 0 до 100%. Первый кластер включал в себя изоляты с индексом патогенности 4 и 3 сильнопатогенные – изоляты 316 (FOV) и 520 (*F. solani*) и среднепатогенные – изоляты 319, 503 и 519 (*F. solani*). Второй кластер включал в себя слабопатогенные – изоляты Fov 328 и 460, а также непатогенные изоляты – 379, 422, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) и 502, 509, относящиеся к *F. fujikuroi* var. *intermedia*. Следует отметить, что по индексу патогенности патогенные изоляты отличались от слабо патогенных и непатогенных на 97% (рис. 2).

Таким образом, сильнопатогенными по отношению к средневолокнистому хлопчатнику являются изолят 316 (FOV) и изолят *F. solani* 520, особенно изолят 520, вызвавший гибель семян всех четырех сортов еще на предвсходовой стадии. Изоляты *F. solani* 319, 503, 519 показывают среднее значение индекса патогенности. Слабопатогенными являются два образца FOV – изоляты 328 и 460. Остальные изоляты в результате являются непатогенными по отношению к средневолокнистому хлопчатнику.

В шестой главе диссертации «Создание генетических популяций и генетическое картирование локусов устойчивости» описано следующее. Для получения экспериментальных популяций, сегрегирующих по признаку устойчивости к вилту из узбекской коллекции гермоплазмы хлопчатника были выбраны 18 растений (10 устойчивых и 8 чувствительных к вилту согласно каталогу коллекции). Провели 21 комбинацию скрещиваний, из которых в дальнейшем отобрали комбинацию «Mebane B1» x «11970», так как во всех остальных комбинациях отсутствовала выраженная сегрегация по признаку устойчивости к вилту. Этот факт объясняется тем, что отбор 18 как устойчивых, так и чувствительных растений производился на основании

каталожных записей по критериям «устойчивые к вилту» и «чувствительные к вилту». Так как внесение информации по многим образцам коллекции осуществлялось более 10–20 лет назад, то конкретная информация о природе вилта (фузариозный или вертициллезный и т.п.) в этих записях отсутствовала.

Проведение эксперимента в реальных условиях с использованием фузариозного инфекционного фона позволило выявить из 21 комбинации только 1 популяцию, подходящую для дальнейших исследований. Выбранная популяция далее использовалась для получения F₂₋₄ поколения.

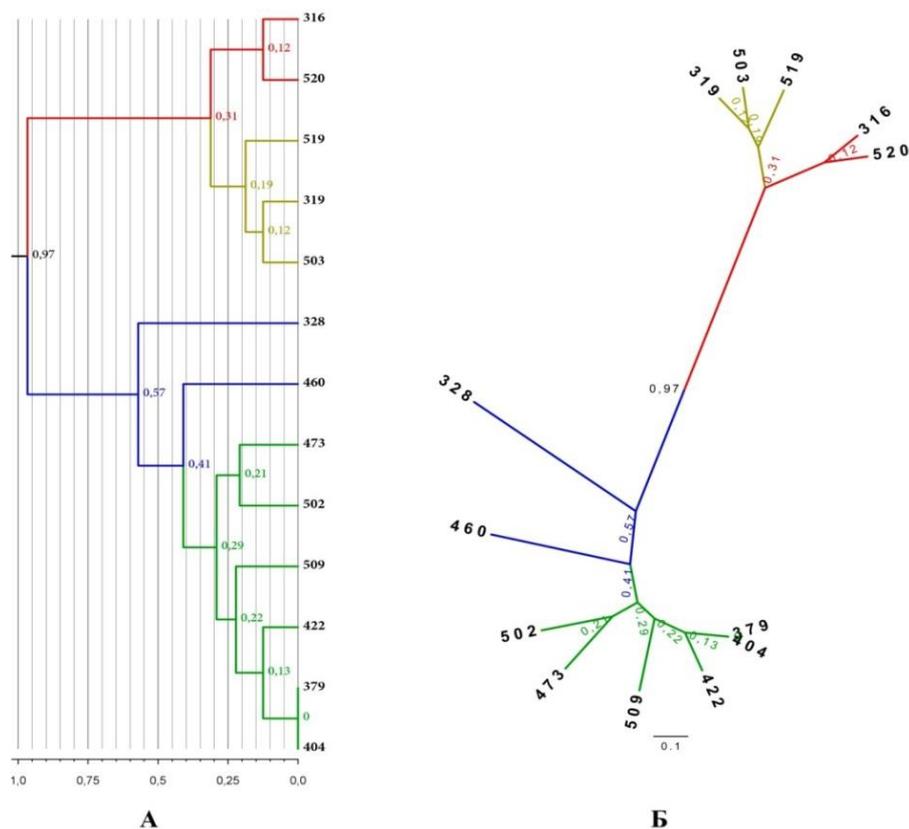


Рис. 2. UPGMA анализ 13 изолятов, относящихся к *Fusarium* spp.

(А) – Дендрограмма, показывающая распределение изолятов по индексу их патогенности в отношении тестируемых сортов и линий хлопчатника; (Б) – неукорененное дерево, показывающее удаленность патогенных изолятов от слабо- и непатогенных образцов из узбекской коллекции фитопатогенов. Высоковирулентные – красный, средневирулентные – желтый, слабовирулентные – синий и непатогенные – зеленый.

Анализ выживаемости экспериментальной популяции и контрольных растений в двух различных условиях показал следующие результаты. В условиях естественного вилтового фона прорастание семян было очень слабым. В F₃ популяциях на условно чистом фоне «Эксп.поле–1» и в условиях естественного вилтового фона «Эксп.поле–2» с дополнительным искусственным заражением семян изолятом FOV №316 в популяции «Мебане В1» x «11970» количество непроросших семян составило соответственно 3% и 21%. Из полученных данных видно, что у экспериментальных популяций и контрольных растений в равной степени наблюдаются сильные различия в

прорастании семян и угнетении проростков вплоть до их гибели в зависимости от инфекционного фона. Так, среднее значение погибших растений среди сортообразцов вида *G. hirsutum* на естественном фоне «Эксп.поле–2» составило 43,5%.

В популяции «Mebane В1» х «11970» наблюдалась широкая фенотипическая вариация по восприимчивости к вилту. Для дальнейшего анализа нами была выбрана популяция «Mebane В1» х «11970».

Наиболее выраженные внешние проявления заболевания FOV у растений популяции F₃ «Mebane В1» х «11970» наблюдались в конце вегетационного периода, во время созревания и раскрытия коробочек.

Анализ расщепления признака в популяции F₃ от скрещивания показал различную картину проявления признака в зависимости от инфекционного фона. Так, в условиях «Эксп.поле–1» проявление вилта в различной степени отмечено у 45% растений. На естественном вилтовом фоне в «Эксп.поле–2» проявление вилта в различной степени наблюдалось у 79% (рис. 3).

Средняя оценка степени проявления вилта у родительских и контрольных растений в «Эксп.поле–1» и «Эксп.поле–2» показала, что сорт Mebane–1 имел степень соответственно 1 и 3,3 (согласно 5-бальной шкале, где 1 – здоровое растение, 2 – слабое проявление, 3 – среднее, 4 – сильное, 5 – растение погибло); 11970 – соответственно 2 и 4; 3–79 – 1 и 2; ТМ–1 – 1 и 1,3; С–4727 – соответственно 3 и 2,7.

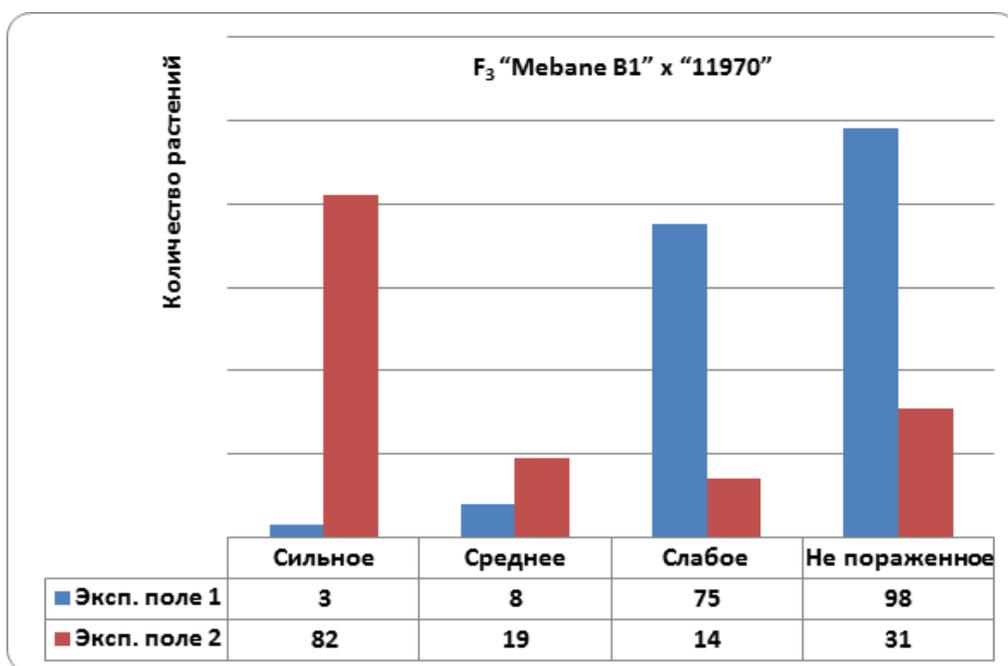


Рис. 3. Распределение растений популяции F₃ (Mebane B1 X 11970) по степени заражения в зависимости от инфекционного фона.

«Эксп.поле–1» – чистый фон с применением искусственного заражения;

«Эксп.поле–2» – естественный вилтовый фон с применением искусственного заражения.

Условное распределение растений в тестируемой популяции на 2 группы (устойчивые и неустойчивые), где слабо, средне и сильнопораженные растения объединены в группу неустойчивые, а непораженные растения во вторую группу – устойчивые, то количество растений в группах на естественном вилтовом фоне «Эксп. поле–2» составляет соответственно 115 и 31. В таком случае фенотипическое расщепление по степени поражения вилтом в анализируемой популяции в условиях естественного вилтового фона происходит в соотношении близком к 3:1 ($\chi^2=1,11$; $p \leq 0,05$), в то время как в условиях чистого фона («Эксп. поле–1») и искусственного заражения распределение растений составило 86 и 98, что соответствует расщеплению 1:1 ($\chi^2=0,78$; $p \leq 0,05$).

Вычисление значения χ^2 в экспериментальной популяции 1 (Эксп. поле–1) и (Эксп. поле–2) осуществляли по формуле

$$\chi^2 = \sum (E_n - E_{ож})^2 / E_{ож} \quad (1)$$

Для выявления генетических регионов, ассоциированных с устойчивостью *G. hirsutum* к фузариозному вилту, экспериментальная F_3 популяция «MebaneV1» x «11970», сегрегирующая по признаку вилтоустойчивости, была генотипирована с использованием микросателлитов из коллекций GH, CIR, CM, BNL, TMB, NAU и JESPR. На настоящий момент было использовано 775 пар микросателлитных праймеров, из которых 105 показали полиморфизм между родительскими растениями.

Выявленные нами 105 праймерных пар были использованы для анализа групп сцепления и QTL картирования экспериментальной популяции для выявления маркеров, ассоциированных с признаком устойчивости к вилту. Из выявленных маркеров 105 микросателлитных праймерных пар были пригодны для картирования популяции и обнаруживали 237 полиморфных локусов. Анализ сцепления и построение генетической карты проводили при помощи программы JoinMap 3.0.

Для проведения анализа сцепления полиморфные локусы были разделены на три группы:

1. Локусы, амплифицируемые только в «MebaneV1» (с распределением 1:1), и гетерозиготные локусы с распределением (3:1 или 1:3);
2. Локусы, амплифицируемые только в «11970» (с распределением 1:1), и гетерозиготные локусы с распределением (3:1 или 1:3);
3. Все полученные полиморфные локусы.

На основании этих данных была получена генетическая карта сцепления, включающая 10 групп сцепления, основанных на 45 полиморфных маркерах.

Последующее QTL картирование позволило определить локусы, ассоциированные с признаком вилтоустойчивости. QTL анализ был проведен при помощи метода смешанного картирования интервалов (CIM) в программе Windows QTL Cartographer v. 2.5_011. В результате CIM картирования были выявлены 6 кандидатных маркеров, ассоциированных с признаком вилтоустойчивости в трех группах сцепления. Однако наиболее достоверный

результат показала группа сцепления ГС1, в которой основной QTL регион, сцепленный с вилтоустойчивостью (LOD = 5.3). находился между маркерами BNL 3442_129 и BNL1145_259.

В седьмой главе диссертации «Биоинформатическая идентификация кандидатных генов для улучшения вилтоустойчивости сортов хлопчатника» представлено следующее.

В рамках данной диссертационной работы для преодоления некоторых ограничений, связанных с использованием однокопийных генов, образцы исследуемых изолятов *Fusarium* были генотипированы при помощи универсальных ДНК-маркеров, а именно RAPD, для расширения возможности идентификации различных таксономических групп. В общей сложности для генотипирования нами были использованы 73 RAPD праймеров для идентификации продуктов амплификации, обуславливающие различия между 12 изолятами фитопатогенных грибов *Fusarium* spp. (рис. 4).

Для дальнейшей работы мы выбрали праймеры, которые амплифицировали уникальные продукты как внутри видов (расы), так и видоспецифические (виды, *forma specialis*). Эти фрагменты были элюированы из геля и проклонированы в векторе для анализа по определению нуклеотидной последовательности.

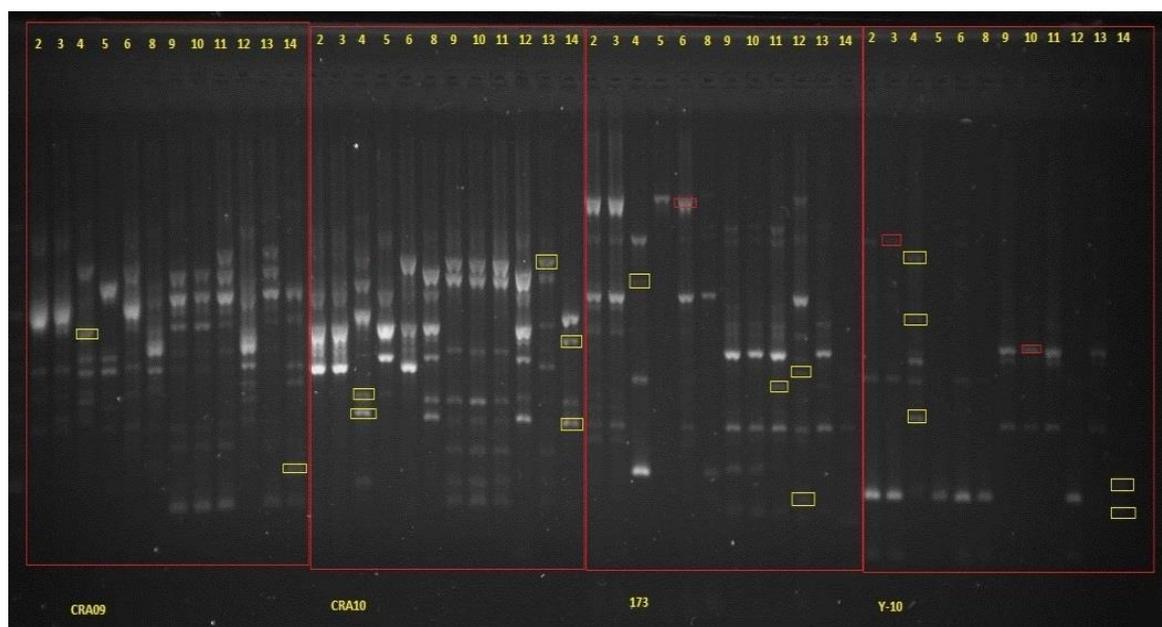


Рис. 4. RAPD анализ 12 изолятов *Fusarium* spp.

В результате нами были отобраны 13 уникальных фрагментов. Последующее определение нуклеотидных последовательностей этих фрагментов позволило нам провести сравнительный анализ с международными генетическими базами данных, а также разработать 13 праймерных пар для проведения дальнейшего SCAR-анализа.

Для сравнения этих нуклеотидных последовательностей с международными генетическими банками посредством BLAST-анализа мы

использовали алгоритм BLAST X, позволяющий сравнивать нуклеотидные последовательности против аннотированных белковых последовательностей. В результате нам удалось определить функциональную принадлежность некоторых RAPD ампликонов.

Другим подходом для поиска кандидатных генов для контроля за патогенами является идентификация генов растений-хозяев, обуславливающих устойчивость к фитопатогенам. Один из таких подходов – *in silico* анализ маркерных участков, идентифицированных в результате QTL, и ассоциативное картирование признаков устойчивости растений-хозяев.

Для определения потенциальных генов, расположенных в маркированных участках, ответственных за устойчивость растения к патогену, и повышения информативности генетической карты были использованы нуклеотидная последовательность полного генома *Gossypium raimondii* и 6 праймерных пар, амплифицирующих кандидатные маркеры.

В результате были аннотированы только регионы, маркированные по двум локусам BNL1145_259 и BNL3442_112, наиболее значимо ассоциированных с устойчивостью к вилту. Маркерный регион содержал гены, кодирующие белки алкогольдегидрогеназу, дисульфидизомеразу, метилтрансферазу кофейной кислоты, фосфатазу, кальцийсвязывающий и осмотинподобный белок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований по докторской диссертации на тему «Молекулярная идентификация и характеристика патогенов рода *Fusarium*, поражающих хлопчатник в Узбекистане» представлены следующие выводы.

1. Проведена видовая идентификация патогенов. Выявлено, что в фитопатогенном фоне Узбекистане присутствуют 6 видов *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Fusarium equisity*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium fujikuroi* и *Fusarium sporotrichioides*.

2. Впервые, используя методы секвенирования по однокопийным генам, были идентифицированы расы FOV 3, 4 и 6, распространенные в Узбекистане.

3. Выявлены вирулентные изоляты. Установлено, что наибольшую опасность для местных сортов представляют фитопатогенные грибы *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* третьей расы (изолят 316) и представители вида *F. solani* (изоляты 503, 519 и особенно 520).

4. Определены нуклеотидные последовательности по четырем однокопийным генам, на основе нуклеотидных последовательностей которых разработаны вид и раса специфичные праймеры с помощью методов SNP и ASPCR.

5. На основе комбинаций скрещивания хлопчатника создана вильтостойчивая популяция Mebane B1 x 11970.

6. Определены локусы, детерминирующие ряд других признаков хлопчатника (высота закладки первой ветви, высота растения, количество симподий, длина ветвей).

7. Проведен QTL-анализ для определения степени сцепления картированных маркеров с устойчивостью хлопчатника к вилту. Определены три группы сцепления, содержащие локусы устойчивости к *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

8. На основании полученных генетических карт и QTL-анализа выявлены маркеры, которые потенциально могут быть использованы в маркерассоциированной селекции хлопчатника, а также для выделения и детального изучения кандидатных генов.

9. Проведен *in silico* анализ. Определено 11 генов *Fusarium* и 4 гена *Gossypiu*, отвечающие за синтез вторичных метаболитов, микотоксинов и устойчивость хлопчатника к внешним раздражителям (поражение патогенами).

**SCIENTIFIC COUNCIL № 16.07.2013.B.15.01 ON AWARD OF SCIENTIFIC
DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES AT THE INSTITUTE OF GENE
POOL OF PLANTS AND ANIMALS, NATIONAL UNIVERSITY OF
UZBEKISTAN AND THE INSTITUTE OF GENETICS AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY OF PLANTS**

CENTRE OF GENOMICS AND BIOINFORMATICS

EGAMBERDIEV SHAROF SHUHRATOVICH

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
PATHOGENS GENUS FUSARIUM AFFECTING COTTON IN
UZBEKISTAN**

**03.00.14 – Genomics, proteomics and bioinformatics
(biological sciences)**

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

The theme of the doctoral dissertation is registered by the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with number 30.09.2014/B2014.3-4.B49

The doctoral dissertation has been carried out at the Centre of Genomics and Bioinformatics.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English) languages on the website of the Scientific Council www.flora-fauna.uz and on the website of “ZiyoNet” information and educational portal www.ziynet.uz.

Scientific consultant: **Abdurakhmonov Ibrokhim Yulchievich,**
Doctor of Biological Sciences, Professor

Official opponents: **Marupov Abboskhan,**
Doctor of Agricultural sciences, Professor

Davronov Kakhramon,
Doctor of Biological Sciences, Professor

Kadirova Dilbar Abdullaevna,
Doctor of Biological Sciences

Leading organization: **Institute of Microbiology**

The defence of the dissertation will take place on “___” _____ 2016 at ___ at the meeting of the Scientific Council No16.07.2013. B.15.01 at the Institute of Gene Pool of Plants and Animals, the National University of Uzbekistan, the Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants. (Address: 232 Bogishamol str., Tashkent, 100053, Uzbekistan. Tel.: (+99871)289-04-65; Fax: (+99871)262-79-38; e-mail: botany@uzsci.net. Conference hall of the Palace of the Institute of Gene Pool of Plants and Animals)

The doctoral dissertation can be looked through in Information Resource Centre of the Institute of Gene Pool of Plants and Animals (registered with No 03). Address: 232 Bogishamol str., Tashkent city. Tel.: (+99871)289-04-65; Fax (+99871)262-79-38

The abstract of the dissertation is distributed on “___” _____ 2016
(Registry record No _____ dated “___” _____ 2016)

K. Tajibaev,
Chairman of the Scientific Council on Award of
Scientific Degree of Doctor of Sciences D.B.S.

U. Mirzaev,
Scientific Secretary of the Scientific Council on
Award of Scientific Degree of Doctor of Sciences,
Ph.D.

S. Yunuskhonov,
Chairman of the Scientific Seminar under the
Scientific Council on Award of Scientific Degree
of Doctor of Sciences, D.B.S., Professor

INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

Topicality and relevance of the theme of the dissertation. Today, cotton industry plays an important role in the economy of many developed countries. One of the main enemies of cotton are harmful fungi. According to the information of Cotton Foundation, “cotton diseases caused by pathogens are affecting 12% of the crop.” In the USA alone the annual loss can reach 11.7%, in Brazil and African countries – 50%, and in India – 20%.¹

The fungi of *Fusarium* species are widely spread in the nature, which make the biggest and different biologic group of such fungi. Most of the fungi of the following genus are phytotrophs which can affect more than 120 species of plants and cause significant economic damage to agriculture in many countries, including Uzbekistan. Pathogenic *Fusarium* species are grouped into specialized forms *formae specialis* (f. sp.), based on their ability to cause damage to a particular plant. Currently, there are more than 80 types of specialized forms.

Before, *Verticilium* mushroom species was considered to be the major causative agent of the cotton disease, in view of this all selections of cotton have been oriented towards the creation of varieties resistant to *Verticilium*. But in recent years, due to the impact of different biotic factors (climate change regime, violation of the water regime, etc.), there have been changes in the pathogenic background of our country. Therefore, the issue of identifying the special forms of pathogenic *Fusarium* species in our country is still very critical.

Mostly, the growth and spread of *Fusarium* wilt is reported not only on fine-fibre (*Gossypium barbadense*), but also on the average-fibre cotton varieties. The new unknown kinds of pathogens like *Fusarium solani* were found on the cotton plant in Bukhara region, which can cause root decay.

As was mentioned above, the actual problem of cotton is not only creating wilt resistant varieties of cotton, but, at the same time, are also identifying plant pathogenic background of our country, revealing dangerous isolates and assessing their pathogenicity exactly, making pathogenic maps and working out recommendations.

This dissertation research to some extent serves to carry out the tasks provided in the Resolution of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan No148 “On measures of improving the structure and increasing the efficiency of plant protection service” of March 29, 2004, 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 research was carried out according to the priority directions of science and technology development of the republic V. “Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection”.

Review of international researches on the topic of the dissertation. Molecular genetic studies of the genus *Fusarium* are carried out in the leading

¹Amanda N. Cianchetta et al. Survey of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the United States. The Journal of Cotton Science 19:328–336. The Cotton Foundation 2015.

research centres and higher educational institutions of the world, including, Texas A & M University, Mississippi University, Washington State University (USA), Nanjing Agriculture University (China), CIRAD (France) and CSIRO (Australia).

As a result of the researches carried out in the world on the identification of cotton pathogens and detection of their most virulent forms, a series of research results were obtained, for example, a collection of DNA markers-RFLP, RAPD, SCAR was set up to identify pathogen genomes (UC Davis University of California, Broad Institute, USA), a database of the types of *Fusarium* species (CBS KNAW *Fusarium* MLST database, the Netherlands), as well as a database of complete sequenced genome sequence of plant pathogens (Mips Helmholtz Zentrum München, Germany) were created.

A comprehensive study of the genome of cotton pathogens using molecular genetic techniques is being carried in the world out in a number of priority areas, including: the definition of complete nucleotide sequences of the genomes *F.circinatum*, *F.graminearum*, *F.proliferatum*, *F.verticillioides* and associative mapping of genes resistant to *Fusarium* wilt races.

The degree of study of the problem. Such foreign scientists as Abd-Elsalam, Elias and Wang studied the molecular identification of *Fusarium* pathogens by the following methods: protein (isozyme) varieties, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (of RAPD) and amplified fragment length polymorphism (the AFLP). The studies using SNP markers by sequencing single-copy genes of various isolates of genus *Fusarium* were performed in the United States (O'Donnell K, Skovgaard K.), Egypt (Abd-Elsalam K.), China (Chen X, Kim Y, Wang B), Mexico (Garsia OS) and Germany (Schnider F). The studies on some aspects of pathogens and their control in the CIS countries are observed in the scientific works of G. Kurbanov, S. Sidorova, I. Akmuradov and M. Menlikeeva.

In the studies carried out in our country in the works of N. Nazirov, A. Guseva, N. Zaprometova, L. Polyakova, G. Karaeva, A. Marupov, B. Hasanov and L. Glukhova are devoted to the identification and study of *Fusarium* pathogens using traditional microbiological methods.

Connection of the theme of dissertation with the scientific-research works of the higher educational institution, where the dissertation is conducted: The dissertational research has been done in the Centre of Genomics and Bioinformatics in accordance with the international project UZB2-31016-TA-09 “Molecular characterization and association of genes / quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* wilt disease [*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV)]” and the project I5-FK-0-30702 “Express method of monitoring and identifying the types and races of *Fusarium* spp spread in the territory of Uzbekistan (for 2014-2015)”.

The aims of the research are comprehensive molecular genetic identification of the genome of *Fusarium* pathogens and evaluation of the pathogenicity of frequently encountered races and species in relation to the local varieties of cotton.

The tasks of the research:

re-sequencing the DNA of *Fusarium* pathogens of single-copy genes (TEF-1 α , BT, rDNA, NIR) for genetic identification;

developing modern genomic tools based on the SNP (single nucleotide polymorphism) and ASPCR (allele-specific) markers for the rapid identification of pathogens. Developing the primers for the rapid detection of pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*;

creating the genetic populations segregating for the resistance to *Fusarium* wilt of cotton from the collection of the gene pool of the Republic of Uzbekistan;

genetic mapping of loci sustainability of cotton to *Fusarium* wilt using molecular DNA markers;

studying the reaction of pathogen-plant, identifying the most virulent isolates of *Fusarium* pathogens and creating the maps of the distribution of pathogens in the republic;

bioinformatical identification (*in silico*) of candidate genes for improving the sustainability of cotton varieties to pathogens.

The objects of the research were pathogenic fungi of *Fusarium* species and genotypes of cotton taken from the collection of plant pathogens and gene pool of the Institute of Genetics and Experimental Biology of Plants.

The subject of the research is assessing the virulence and “danger” degree of plant pathogen genus *Fusarium* in regard to cotton and developing effective methods of identifying plant pathogens to control the spread of pathogens of *Fusarium* and, partially, the diseases of cotton wilt.

The methods of the research work. In the study the classical methods of genetics and breeding of cotton, molecular plant pathology, as well as modern approaches of molecular genetics and genomics, bioinformatics and statistics were used. For the cluster analysis of pathogenicity index the software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., www.statsoft.com), for the analysis of marker loci and linkage groups and for QTL mapping the programs JoinMap 3.0, 4.0 MapQTL, QGene 4.3.2 and Windows QTL Cartographer (v. 2.5_011) and for evaluating the effect of plant pathogens on cotton plants the statistical analysis program packages NCSS 2003 and PASS 2002 were used.

Scientific novelty of the research is as follows:

For the first time the analysis of the genome of *Fusarium* pathogens was done, and re-sequencing of important single-copy genes of pathogens (TEF-1 α , BT, rDNA, NIR, PHO) was carried out. Based on the nucleotide sequence of a beta tubulin gene (BT), SNP universal primers were designed that are capable of identifying the races 2, 3, 8, and group A and B forms of the pathogens of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

Primer pairs with the ability to identify 3 and 8 race species *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* were developed on the basis of the method of allele-specific PCR (ASPCR).

In Uzbekistan 6 species of genus *Fusarium* (*Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*) were identified molecular taxonomically.

The races 3, 4 and 6 of *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* were determined common in Uzbekistan.

The virulence degree of the pathogens of *Fusarium* species in relation to the widely cultivated varieties of cotton was shown.

For the first time the detailed pathogenicity and the most dangerous pathogens of cotton as follows were identified through molecular genetic methods: 3 race *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* and new pathogen species for Uzbekistan *Fusarium solani*.

Genetic population of “Mebane B1” x “11970” was created segregating for resistance to *Fusarium* wilt in the ratio of 3:1, and 237 polymorphic locuses were found.

Potential genes resistant to cotton wilt were identified.

Genetic mapping was conducted, and we identified two locuses BNL1145_259 and BNL3442_112 associated with the resistance to wilt. Using *in silico* PCR we identified the candidate genes located near these markers through bioinformatical methods.

Pathogenic maps were designed with the application of labels on the distribution of species in geographic coordinates.

Practical results of the research are as follows:

Specific gene SNP markers were developed with the help of the methods of sequencing single-copy genes, single nucleotide polymorphism and allele specific PCR and through rapid identification of the specialized forms, races and types of pathogens common in Uzbekistan.

QTL analysis conducted with the experimental populations of cotton allowed to identify new important candidate genes and markers coupled with samples resistance to FOV.

The primers and methods were developed that allow responding promptly and detecting the most dangerous pathogens in the early stages.

The map of pathogenicity was developed that allows putting varieties in contaminated areas according to their resistance to a particular pathogen, thereby increasing the productivity.

On the basis of cotton cross-breeding combinations “Mebane B1” x “11970” a population resistant to wilt was created.

The reliability of the obtained results is confirmed by the fact that the research results have been proved through modern, complementary molecular genetic methods and approaches, the data have been processed using classical statistical methods (UPGMA and NJ), the cluster analysis of pathogenicity index has been done according to ANOVA (analysis of options) test considering the degree of influence of plant pathogens on plants, and the marker loci analysis, establishment of linkage groups and subsequent QTL mapping were performed using the programmes JoinMap 3.0, MapQTL 4.0, QGene 4.3.2 and Windows QTL Cartographer v. 2.5_011.

Theoretical and practical significance of the research results. The scientific significance of the research results is determined by the use of molecular genetic techniques to identify the pathogens of *Fusarium* wilt that will allow identifying the species and races of the pathogen accurately and correctly. That will give

breeders an opportunity to know what kind of disease they have to deal with and develop or plant varieties which are more resistant to a particular type of pathogens.

The practical significance of the research results is in the new pathogen diagnostic methods that allow for fast and cost-effective identification of pathogens in both field and laboratory conditions in the presence of a minimum base of equipment and reagents. As a result, by planting the varieties resistant to a particular pathogen and its race, it is possible to reduce and prevent the threat of contamination of crops. Making additions to pathogenic maps with new data will give an opportunity to create an informational bioinformatics system in the future that is associated with the agricultural pathogens of regions. In this system, there will be collected all the data on the areas, pathogens and the resistance of varieties, thereby reducing and preventing the threat of contamination of crops and increasing the economic well-being of our Republic.

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

The developed SNP primers that identify the 5 races of *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* are being used in the laboratories of Crop Science Research Laboratory, Genetics and Precision Agriculture Research Unit (Mississippi, USA) in the process of doing researches on the identification of pathogens (reference from the United States Department of Agriculture, 30.01 .2012);

The developed ASPCR primers were used in the project (No3096-21000-019-02) “Evaluation of abiotic and biotic factors in the greenhouse and field conditions to assess the sustainability of cotton to Fusarium wilt (FOV)”, (USDA – Agricultural Research Service, Lubbock, TX October 12, 2015). The allele specific primer FOV_BT_AS_R3 allowed to quickly and accurately determine the American genotype 3 and 8 races of the pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, which made it possible to significantly reduce and save time and financial resources.

Approbation of the research results. Basic results of the research were presented in the form of lectures and were tested in such conferences as “Achievements and Prospects of Plant Experimental Biology” (Tashkent, 21 November 2013), “Actual problems of Development of Bioorganic Chemistry” (Tashkent, 15-16 November 2013), “Conference of Young Scientists of the Academy of Sciences of Uzbekistan” (Tashkent, 2014), “The Problems and Prospects of Increasing the Efficiency of Biologic Methods in Protecting the Plants from Harmful Organisms” (Tashkent region, 7-8 May 2015), as well as in a number of scientific conferences devoted to cotton protection and biotechnology.

Publication of the research results. On the theme of the dissertation a total of 28 scientific papers were published, of these, 10 scientific articles were published in the journals recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publishing basic scientific results of doctoral dissertations, including 8 national and 2 international journals.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of the introduction, seven chapters, conclusion and a list of references and appendices. The size of the dissertation is 191 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 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 **“Molecular genetic analysis of *Fusarium* species”** reveals the history of identification, characteristics and genetic diversity of *Fusarium* species, the use of molecular genetic methods, and lists the main problems in this area and discussed possible solutions.

In the second chapter of the dissertation entitled **“The material conditions and methods of research of the genus *Fusarium*”** genotyping and DNA sequencing of the genomes of pathogenic fungi is described in detail to identify the pathogenic types and races of *Fusarium* species. In order to determine the pathogenic types and races, the isolates of *Fusarium spp.* from the collection of Uzbekistan were used.

In the third chapter of the dissertation entitled **“Phylogenetic analysis and the degree of genetic diversity”** the following results are presented:

To identify the plant pathogens of the isolates of *Fusarium spp.* from the collection of Uzbekistan, we used DNA isolates with known FOV race collected worldwide. We determined the four single copy gene sequences as the TEF-1 α , BT, NIR and rDNA using gene-specific primers.

In order to determine the types of FOV samples, the nucleotide sequences of the sequenced single copy genes were compared with the information of the international genebank (NCBI) using the bioinformatical BLAST method.

According to the results of the comparison, the analysis of phylogenetic results was carried out on the basis of the 4 genes.

Phylogenetic trees were constructed on the basis of the bioinformatical algorithms of UPGMA and NJ.

Below are the results of the phylogenetic analysis for all four genes:

Identification of BT gene. A total of forty-four isolates of *Fusarium spp.* were analyzed by partial sequence of the gene BT. Multiple sequence comparisons and tree construction method UPGMA showed that the studied samples are divided into five clusters. Cluster 1 is represented by two isolates representing *Fusarium solani*. Cluster 2 includes 11 isolates representing *Fusarium sporotrichioides* (532 isolate), and other *Fusarium equiseti*, which refer to a complex of *Gibberella zeae*. Cluster 3 includes *Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum* isolate (FOV) belonging to the group “VCG1112”. Cluster 4 includes 10 isolates representing *Fusarium proliferatum*, relating to complex *G. fujikuroi*. Cluster 5 includes 20 isolates belonging to *F.oxysporum* f.sp.*vasinfectum*.

Further analysis conducted by NJ also showed similar topology of the phylogenetic tree, except that instead of the third cluster Fov19_VCG1112 isolate another Fov112_GrC isolate was extracted, also related to as FOV. As an external

group *F. solani* samples (319 and 520) were used, which are genetically distant from the rest of the samples *Fusarium*. In this case, we can also see five clusters. The distance between the clusters represented the difference between the samples by the percentage, and was between 2% – 12%, while within clusters the genetic differences on average ranged from 0% – 2%. The isolates from clusters 3–5 are closer. Fov112_GrC and Fov19_VCG1112 samples are FOV isolates, according to American scientists. Besides that, cluster 4 includes the representatives of the species *Fusarium proliferatum*, which also demonstrates closer genetic relationship with this type of FOV. Cluster 5 was one of the most interesting, as FOV images, both collections and isolates from Uzbekistan were grouped with known races. Although the genetic differences between FOV isolates were not so significant, the analysis of gene sequences of BT allowed clearly identifying the samples relating to the third race. The isolates 316, 491, 527 and 534 clearly clustered with the isolates belonging to race 3 (Fov16612_Race3, Fov3_Race3), whose genetic distance (GR) was 0%–1%. The taxonomic affiliation of samples was produced by the relatively stable analyzed sequences with international NCBI genebank using BLAST algorithm.

Identification with TEF-1 α gene. Thirty-eight *Fusarium spp.* isolates were analyzed by partial sequence of the gene TEF-1 α . Multiple sequence alignment and tree construction, according to UPGMA method, showed that the studied samples are divided into three clusters. Cluster 1 is represented by two isolates representing *Fusarium solani*. Cluster 2 includes 13 isolates representing *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* (*Fusarium proliferatum*). Cluster 3 includes 23 isolates of *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (FOV).

Further analysis conducted by NJ method also showed similar topology of the phylogenetic tree. As an external group, *F. solani* samples (319 and 520) were used, which are genetically distant from the rest of *Fusarium* samples. The distance between the clusters represented the difference between the samples by the percentage, and was between 7% – 20%, while inside the clusters the genetic differences on average were between 0% and 1%. Also, on the example of the BT gene it was found that the members of the species *F. proliferatum* were genetically close to the FOV in comparison with the samples representing *F. solani*. Both the FOV samples from the Uzbek collection and referent isolates of known races were grouped in the third cluster. Isolates 316, 327, 347, 460, 527 and 534 are clearly clustered with isolates Fov3_Race3 (AY714102.1), the genetic distance (GD) between which was $\leq 1\%$. In addition, there was a close phylogenetic connection between isolates 328 and 496 with a reference sample Fov66_Race4 (AY714101.1) relating to the fourth race.

Identification with NIR gene. Forty-one *Fusarium spp.* isolates were analyzed by partial sequence of NIR gene. Phylogenetic analysis using UPGMA method showed that the studied samples are divided into three clusters. Cluster 1 is isolate 532. With the analysis using the BLAST algorithm it was revealed that the gene sequence is similar to the NIR *Fusarium graminearum*. Cluster 2 includes 13 isolates representing *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*). In the case of the analysis of TEF-1 α gene, the same samples were presenting *Gibberella fujikuroi*

var. intermedia (*Fusarium proliferatum*), which belong to the pathogenic complex *G. fujikuroi*. Cluster 3 includes 27 isolates belonging to *F. oxysporum* f.sp.*vasinfectum* (FOV).

Further analysis conducted by NJ method also showed similar topology of the phylogenetic tree. As an external group, isolate 532 was used, which is genetically distant from the rest of *Fusarium* samples. The distance between the clusters represented the difference between the samples by the percentage, and ranged from 5% – 22%. The genetic variation within the cluster was in the range of 0% to 7%, and the mean value was 2%. Both the FOV samples from the Uzbek collection and referent isolates of known races were grouped in the third cluster. It should also be noted that *F. solani* samples were also grouped in the third cluster, which suggests that distinguishing these two kinds at the level of NIR gene is practically impossible. By comparing the samples of partial NIR gene sequences, other samples belonging to the third race and group “C” were identified. It is specific that when doing analysis using UPGMA method, isolates 316, 347, 491 and 527 were grouped with Fov16612_Race3 isolates (race 3), and samples 496 and 526 were grouped with Fov112_GroupC isolates (group C). After NJ analysis these isolates were grouped together and formed phylogenetic relationships with Fov16612_Race3 and Fov3_Race3 isolates belonging to the third race FOV. This is because C group can be related to races 3 and 5.

Further sequences were compared with international NCBI genebank using BLAST algorithm.

Identification of rDNA gene with ITS region. Forty-six isolates of *Fusarium* spp. in total were analyzed by partial sequence of ITS region rDNA gene. Multiple sequence comparisons and tree construction using UPGMA method showed that the studied samples were divided into five clusters. Cluster 1 is represented by two isolates representing *Fusarium solani*. 12 isolates representing *Fusarium fujikuroi* species are grouped into cluster 2. Isolate 404 (*Fusarium sporotrichioides*) was extracted in the third cluster. 11 samples relating to *Fusarium equiseti* were grouped in the fourth cluster. Cluster 5 includes 20 isolates *Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum* (FOV).

Further analysis conducted using NJ method also showed similar topology of the phylogenetic tree. However, there was a separate isolate 532, which showed homology with *Fusarium acuminatum*. As an external group, *F. solani* samples (319 and 520) were used, which are genetically distant from the rest of *Fusarium* samples. In this case, we also observed five clusters. The distance between the clusters represented the difference between the samples by the percentage, and ranged from 4% – 13%, while within the clusters the genetic differences on average were between 0% – 2%. Cluster 5 was one of the most interesting, as both the FOV samples from the Uzbek collection and isolates with known races were grouped there.

The comparative analysis of isolates from the fifth cluster revealed that the samples had Uzbek analogy with *Fusarium oxysporum* species, but more detailed taxonomy was not observed. It is obviously due to the fact that *Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum* was not characterized by the sequence of the gene, unlike BT, TEF-1 α and NIR gene sequences.

Phylogenetic analysis using UPGMA and NJ methods showed that isolate 489 clustered with Fov2_Race1 isolate, referring to the first race, and isolate 526 is connected with Fov16611_Race2 isolate, representing the 2nd race.

The taxonomy of samples was done by comparing the analyzed sequences with international NCBI genebank using BLAST algorithm.

In the forth chapter of the dissertation titled **“Development of modern genomic approaches and gene-specific SNP markers for the rapid identification and monitoring of wilt pathogens”**, the following are presented:

The amplification and determination of nucleotide sequences of the products for 15 samples of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* were made using primer pairs for the β -tubulin (BT) single copy gene, ribosomal DNA (rDNA), translational elongation factor (TEF-1 α), nitrate reductase (NIR) and phosphate permaza (PHO). The comparison of the nucleotide sequences helped to detect nucleotide substitutions (SNP), including the unique sequences of this single copy gene sequences. Some of these changes were inherent specifically to a particular group of FOV (type, specialized form, race).

Based on the following results, we developed a series of primers that would help to make accurate identification of species or racial plant pathogens. As a result of testing the designed primers, we obtained four primers which showed high specificity in identifying the studied pathogens.

For example, the primer SNP FOV2 A 33mer G ATCGATACCCTTGGACGAA could accurately detect the FOV race 2, as well as group B, which were previously indistinguishable in races 1 and 6.

Another SNP primer FOV3 Univ SNP TGTGAGCTTGGGAATTCTTG successfully identified race 3 FOV. The use of this primer allowed us to group together two American isolates – FOV3_AY714088 and FOV16612_AY 714,092 – and two Uzbek isolates that belonged to race 3. Primers FOV8 C 30mer C CTCTTCATTGTAAGTTG and FOVSNP11 A 30mer A ACGACTCGAAACGTGCCCGC helped to identify the race of group A and 8, respectively.

As a result, the primers were designed that allowed for the identification of FOV races 2, 3, 8, and A and B (FOV_112) (Table 1).

Based on the principle of the previous method, where single nucleotide substitutions were detected, we proposed the development of primers that define a particular FOV genotype, discriminate the sequences and do not carry a target nucleotide, using fluorescently labelled nucleotides.

As a rule, oligo nucleotide primer is normally used in this method, which is fully complementary to the template DNA under investigation and the counter primer whose 3'-terminal nucleotide is complementary to the corresponding nucleotide of the DNA mutant allele, which is not always complementary to the wild type of allele. With this combination of primers in well-chosen conditions, the PCR product is produced only in the presence of the reaction mixture as a template, the DNA of mutant, but not wild-type DNA. Therefore, the formation of the product of allele specific PCR indicates a mutation in the target DNA at the target locus. However, the use of allele-specific primers for detecting the

mutations should be taken into consideration that not all combinations of mismatched matrix 3'-terminal nucleotides are equally effective in blocking the PCR. Therefore, this method requires careful optimization. Thus, we designed the primers wherein the forward primer is specific for the gene fragment BT-3, and the reverse primer is designed so that allele-specific is only for 3 race FOV due to the informative content (target) nucleotide "A" at its 3' end. Upon annealing the primers, if the nucleotide sequence does not correspond to the sequence of nucleotide "A" at the end of the 3' end of the gene beta tubulin, the amplification is terminated. And vice versa, the presence of amplification products indicates that there is a pathogen of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* race 3 in this sample (Fig. 1).

Table 1

The unique nucleotides in the genome of plant pathogens, enabling the identification of race.

Name of primers Isolates	SNP_FOV 3 A_32mer	SNP_FOV 3 A_35mer	SNP_FOV2_A_30mer_G	SNP_FOV2_A_33mer_G	SNP_FOV8_C_30mer_C	SNP_FOV8_C_34mer_C	SNP_FOV_8(2)_34mer_C	SNP_FOV3US_35mer_T	SNP_FOV3US_36mer_T	SNP_FOV_GroupC_30mer_A	SNP_FOV_GroupC_33mer_A
316_R1		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R2		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
316_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
347		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV36198_R6	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_Aus2	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV2_R1	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV3_R3		A	G	-	-	-	T	-	T	-	T
ATCC_RACE_8_1_10	G		G	-	C	-	C	C	-	-	T
FOV_1661_R3		A	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_112	G	-	G	-	-	T	T	C	-	A	-
FOV_113	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	-
FOV_124	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
R4_66	G	-	G	-	-	T	T	C	-	-	T
FOV_16611_R2	G	-		A	-	T	T	C	-	-	T

Specificity of the primers was verified at the genomic DNA of FOV isolates, which belong to different races, as well as other representatives of the isolates *Fusarium spp.* Moreover, the optimal annealing temperature and PCR conditions were selected. The optimal DNA concentration of fungal DNA was 5 ng/ml. Previous studies reported about the concentrations of DNA extracted from the mycelium FOV that they ranged from 50 ng to 100 ng and were enough for a successful PCR procedure.

As we can see from the results of electrophoresis of 8 tested samples, only 4 of them got amplification, which are the representatives of the FOV race 3. They

are FOV316 (Uzbek ecotype of race 3), FOV347 (Uzbek ecotype of race 3), FOV3 (American ecotype of race 3) and FOV16612 (American ecotype of race 3). The remaining samples (representatives of races 4–8) had no PCR product as “A” target nucleotide had not been found.

In addition, we attempted to identify FOV directly in the infected plants (roots, leaves and seeds). The analysis also allowed defining FOV in the tissues of the infected plants. The analysis was conducted with the infected and non-infected plants using Namangan–77 species. The primer pair of BT–5 (5'–GCTCTAGACTGCTTTCTGGCAGACC –3') and FOV_BT_AS_R3 (5'–GTGTAGTGACCCTTGGCCCAA–3') developed on the basis of BT gene sequence also clearly defined that there is FOV in race 3.

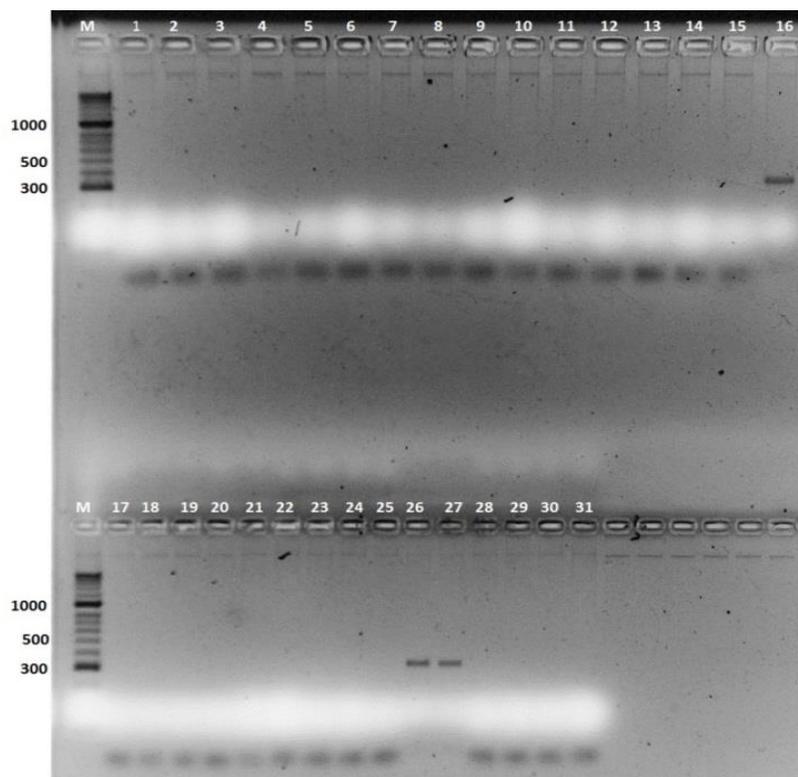


Figure 1. Electrophoregram AS_PCR conducted using FOV_BT_AS_R 3 primer, specific race 3 *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*

Thus, this approach helps to make very fast and safe identification of pathogens in both field and laboratory conditions with a minimum base of equipment and reagents.

In the fifth chapter of the dissertation titled “**Studying the pathogenicity of the samples being researched**”, the following are presented in detail:

In addition to identifying the species and race isolates of *Fusarium spp.* from the Uzbek collection, we also conducted research to determine the pathogenicity of some of them. 13 different types of *Fusarium* isolates in total were analyzed by three different parameters, such as the effect of isolates on germination and seed germination, length of shoot, and root growth inhibition in four commercial

varieties of cotton (*G. hirsutum* L.) cultivated in Uzbekistan before and after germination stages.

The isolates which have the strongest effect on seed germination as compared to controls, in other words the most virulent are as follows:

In relation to C-6524 variety, induced isolate 316 (*F. oxysporum* f.sp.*vasinfectum*), as well as isolates 319, 503, 519 and 520 (*F. solani*) were the largest inhibition of germination (84%–100%). Average impact (57%–75%) on the germination of seeds was provided by isolates 328, 460 (*F.oxysporum* f.sp.*vasinfectum*), 379, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) and 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Moderate impact (<51%) was provided by isolates 422 and 502.

In relation to C-4727 variety, the most aggressive (81%–100%) were isolates 316 and 460 (Fov), as well as isolates 319, 503 and 520 (*F. solani*). Isolates 328 (FOV), 379, 422, 473 and 519 (*F. solani*), 502 and 509 (*F. fujikuroi* var. *Intermedia*) and 404 (*F. sporotrichioides*) showed the average impact (55% –75%).

F. oxysporum f. sp. *vasinfectum* – 316, 328, *F. solani* – 319, 379, 503, 519 and 520 samples showed the greatest impact on the germination of seeds of Namangan-77 varieties (77% –100%). The remaining isolates showed an average impact on the ability of seed germination (57%–70% of germinated seeds).

On Omad varieties the greatest impact (77%–100%) had isolates 316 (FOV) and 319, 503, 519, 520 (*F. solani*). The weaker effect (<61%) showed isolates 460 (FOV), 473 (*F. solani*) and 502 (*F. fujikuroi* var. *Intermedia*). Little effect on seed germination (<38%) of Omad varieties provided isolates 328 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) and 509 (*F. fujikuroi* var. *Intermedia*). Isolate 404 (*F. sporotrichioides*) had no effect on the germination of seeds of the variety.

According to this, isolates 316, 319, 503, 519 and 520 are considered the most aggressive for each class. Especially, isolate 520 caused the death of the seed in pre-emergence stage of all the four varieties used in the experiment. However, in order to define and clarify the most virulent isolates of oppression on the basis of seed germination, we conducted a generalized analysis of averages.

The result of this analysis confirmed that the most aggressive are isolates 316 (FOV), 319, 503, 519 and 520 (*F. solani*), causing death of 82%–100% of the seeds in the pre-emergence stage of the tested varieties. High virulence (more than 51% of the seeds died) had isolates 328, 460 (FOV) and 379, 473 (*F. solani*) and 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*). Weak virulent ($\leq 51\%$ survival seeds) are isolates 422 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) and 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*).

We also observed the influence of our isolates on four varieties of cotton after the germination stage. We considered the impact on the length of sprouts and length of roots as parameters for the control of their pathogenicity.

According to the length parameter of seedlings, we observed the following: isolates 316, 328 (FOV), 319, 503, 519 and 520 (*F. solani*) had the greatest ability to inhibit the growth of seedling varieties C-6524, since these isolates led to the death of the majority seeds. In the case of isolate 520, it led to the death of all the seeds of the class in the pre-emergence stage. Isolate 460 (FOV) showed average ability to inhibit the growth of plants in relation to the control (48%). Isolates 379,

422, 473 which are the representatives of *F. solani*, isolates 404 (*F. sporotrichioides*) and 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) can be categorized as having weak effect ($\leq 30\%$ relative to control) on the growth of C-6524 variety seedlings.

Isolates 316 and 460 (FOV) and 319, 520 (*F. solani*) had significant impact (53–100%, relative to the control) on the growth of seedling varieties. Isolate 473 *F. solani* had the ability to inhibit the growth of the seedlings almost 2 times compared to the control (48%). Four isolates 328 (FOV), 503 (*F. solani*), 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) and 404 (*F. sporotrichioides*) had slight effect on seedling growth ($\geq 33\%$). Isolates 379, 422 (*F. solani*), 502 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) did not significantly inhibit the growth ($\leq 17\%$ in relation to the control) of seedling varieties C-4727. Isolate 519 (*F. solani*) almost (3%) did not inhibit the growth of seedlings of the variety.

In regard to the variety of Namangan-77, isolate 520 (*F. solani*) was the most aggressive, which caused the death of 100% of the class seedlings at the stage of germination, as well as isolates 316 and 328 (FOV) and 319, 503 and 519 (*F. solani*) significantly inhibited the growth of the seedlings in relation to the control ($\leq 88\%$). Isolates 460 (FOV), 379, 422 (*F. solani*) and 404 (*F. sporotrichioides*) had moderate impact on the length of seedlings (36%–42% of the control). Isolate 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) had a slight impact (17%) on the length of the seedlings. The rest of the isolates showed no significant effect ($\geq 6\%$) on Namangan-77 variety.

An interesting effect was observed on the length of the isolates at Omad seedling varieties. Isolates 316 (FOV), 319, 503, 519 and 520 (*F. solani*) had significant effect on the shoot growth (76%–100% of the control), which, as in previous cases, caused 100% mortality of seeds before the germination. The remaining 328, 460 (FOV), 473 (*F. solani*) and 404 isolates (*F. sporotrichioides*) do not have such a significant impact on this parameter of Omad variety, as the difference in relation to the control ranged from 3% to 10%. But isolates 422 (*F. solani*), 502 and 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) did not oppress the sprouts in this class ($\leq 1\%$). However, it should be noted that isolates 379 (*F. solani*) and 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) showed the opposite effect. The following isolates oppositely caused the elongation of seedlings as compared to non-infected control plants. For example, isolates 379 and 502 caused the elongation of the seedlings for 3% and 14% in relation to the control.

Based on the abovementioned, it can be assumed that these isolates can also produce plant growth hormones or other useful products or cause the formation of stress hormones in plants (e.g. ethylene) that cause increased synthesis of growth hormone by the host plant. Several studies have reported that a growth hormone gibberellins produced a plant pathogenic fungus *F. moniliforme*. They also reported that *F. solani* is also a producer of GA3 (gibberellin) at a high level (Alix Jacklin et al., 2000; Neena Mitter and others, 2002; Bhalla et al., 2009). Shahid Ahamad et al., (2006) also reported that the fungus *F. solani* produced gibberel acid. Since isolate 379 is related to *F. solani* group, this effect is due to these

observations. Isolate 509 is a representative of *F. fujikuroi* var. *intermedia*, which can produce similar substances like *F. solani*.

In regard to the above, we are observing a different manifestation of the effect on seedling length parameter of the samples we analyzed, depending on the infected varieties of cotton. In order to determine the most aggressive isolates on the basis of impact on the length of seedlings, we conducted a pooled analysis of the average length of the infected plants.

According to the results, the most pathogenic were isolates 316 (FOV), 319, 503 and 520 (*F. solani*), leading to the suppression of the growth of shoots by 70%–99% in relation to the control. Mesogenic (shoot growth inhibition more than 50%) are isolates 328 (FOV) and 519 (*F. solani*). Slight virulent (growth inhibition <50%) can be attributed to isolate 460 (Fov). The remaining isolates did not have significant effect by suppressing the growth of seedlings on average by 18%.

The main criterion for determining the level of pathogenicity of plant pathogens belonging to *Fusarium spp.* is their ability to inhibit the growth of roots in the infected plants as compared with the uninfected controls, that's why we examined the study samples according to this criterion. This does not mean that the following parameters such as seed germination and seedling length are not informative, but the analysis of the ability of isolates to inhibit the growth of roots of cotton plants and pathogenicity index is resultant criteria of this research phase.

Thus, the determination criterion of our isolates was conducted with each of the four varieties of cotton both individually and collectively. The pathogenicity index has been evaluated according to four-point scale.

Measuring the length of the roots of infected plants and their non-infected controls revealed the following:

For variety C–6524 the strongest inhibition of root growth ($\leq 95\%$) was caused by isolates 316, 328 (FOV), 319, 503, 519 and 520 (*F. solani*). Isolate 473 relating to *F. solani* showed the average value for the given trait, inhibition of roots by 53.5%. The remaining isolates had little effect on the root growth by inhibiting the growth of roots of seedling varieties C–6524 by 37.7%. However, all the tested isolates are pathogenic for the class in a varying degree.

In regard to C–4727 variety, isolates 316, 460 (FOV) and 520 (*F. solani*) inhibited the most significant growth of roots of seedlings (82% – 100%). The rest isolates 319, 379, 473, 503 (*F. solani*) and 404 (*F. sporotrichioides*) were weak pathogen of the class (inhibition of root growth by 33% – 47%). Isolates 328 (FOV), 422, 519 (*F. solani*), 502 and 509 (*F. fujikuroi* var. *intermedia*) showed no significant effect on this index (14% – 28%) and can be attributed to non-pathogenic isolates in regard to C 4727 class.

In Namangan–77 variety, the largest inhibition of root growth 70%–100% were caused by isolates 316, 328 (FOV) and isolates of *F. solani* – 319, 503, 519 and 520. The average ($\leq 60\%$) of the class showed isolate 509 related to *F. fujikuroi* var. *intermedia*. Weak pathogenic in this analysis were two isolates of *F. solani* 379, 422 and isolate 404 (*F. sporotrichioides*). The remaining isolates 460, 473 and 502 were non-pathogenic (<24%) for the variety of Namangan–77.

The analysis of inhibition of root growth in the seedlings of Omad variety showed the following results: isolate FOV 316 and isolates *F. solani* 319, 503, 519 and 520 were the most pathogenic (88%–100%) to this class. Isolates 328 (FOV), 379, 422, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) and 460 (FOV) were non-pathogenic to the variety. The remaining isolates of different types of fungus were not only non-pathogenic, but also caused the intensive growth of roots of the seedlings of Omad variety. Isolates of *F. fujikuroi* var. *Intermedia* 502 and 509 caused the root elongation by 2% and 5.6%. As in the previous case, it was due to the ability of these fungi to produce plant hormones, or stimulate the development of the plant itself.

The data received on the percentage of growth inhibition of the roots of the test plants were converted into the corresponding category of 4 point scale, where 1 is pathogenic (0%–30% inhibition), 2 – low pathogenic (31%–50%), 3 – medium pathogenic (51%–70%), and 4 – strongly pathogenic ($\leq 70\%$). These data were averaged for all the four varieties, and the general index of pathogenicity was determined.

Additional cluster analysis of the pathogenicity index also showed a clear picture of the distribution of samples for pathogenic and non-pathogenic. The resulting phylogenetic tree is divided into two main clusters, where the difference of the isolates is expressed as percentage in relation to the genetic distance pathogenicity index and ranged from 0% to 100%. The first cluster includes 4 isolates with pathogenicity index and 3 high-pathogenic isolates 316 (FOV) and 520 (*F. solani*), and medium-pathogenic isolates 319, 503 and 519 (*F. solani*). The second cluster includes low pathogenic FOV isolates 328 and 460, as well as non-pathogenic isolates 379, 422, 473 (*F. solani*), 404 (*F. sporotrichioides*) and 502, 509 related to *F. fujikuroi* var. *intermedia*. Note that the pathogenicity index of pathogenic isolates differed slightly from pathogenic and non-pathogenic by 97% (Fig. 2).

Thus, highly pathogenic were isolate 316 (FOV) and isolate *F. solani* 520. Especially, isolate 520 caused the death of all the four varieties of seeds at the pre-emergence stage. Isolates *F. solani* 319, 503 and 519 demonstrated the average value of the pathogenicity index. Low pathogenic were the two samples of FOV – isolates 328 and 460. The rest were non-pathogenic according to the obtained results.

In the sixth chapter of the dissertation titled “**Creating the genetic populations and genetic mapping of loci sustainability**”, the following are described:

In order to obtain experimental populations differing from each other in terms of the resistance to wilt, 18 plants were selected from the Uzbek cotton germplasm collection (10 resistant and 8 susceptible to wilt according to the catalogue of the collection). We carried out 21 cross-breeding combinations; of these “Mebane B1” x “11970” combination was selected later, as in all the other combinations there was no evident segregation of resistance to wilt. This fact can be explained that the selection of 18 stable and sensitive plants was made on the basis of the catalogue entries on the criteria of “wilt-resistant” and “susceptible to wilt”. Since the information on many

sample collections were entered more than 10–20 years ago, specific information about the nature of wilt (*Verticillium* or *Fusarium*, etc.) in these records was missing.

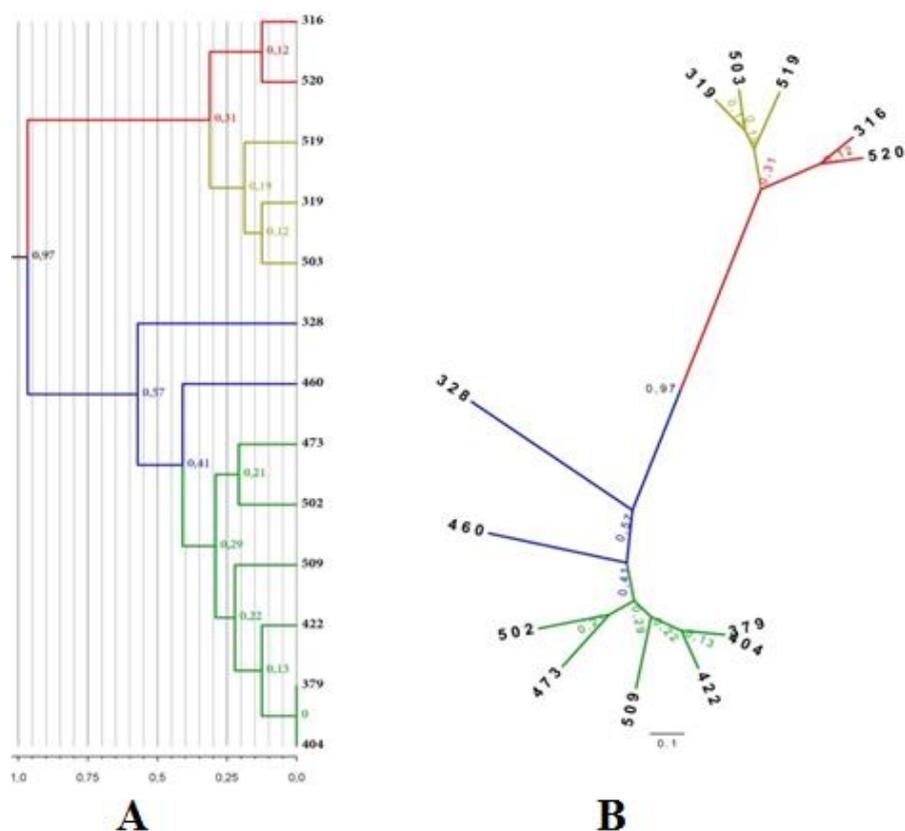


Figure 2. UPGMA analysis of 13 isolates belonging to *Fusarium* spp.

(A) The dendrogram showing the distribution of isolates by their pathogenicity index test in relation to the cotton varieties and lines. (B) Unrooted tree shows the removal of pathogenic isolates of low- and non-pathogenic samples from the Uzbek collection of plant pathogens. Highly virulent – red, medium virulent – yellow, low virulent – blue and non-pathogenic – green

The experiment carried out in real conditions with *Fusarium* infection background revealed only 1 population, which was suitable for further research, out of 21 combinations. The selected population was used for the generation of F2–4.

A survival analysis of the experimental populations and control plants under two different conditions showed the following results. In terms of natural wilt background the germination was very weak. When the seeds of F3 “Mebane B1” x “11970” populations with a relatively clean background “Exp.field 1” and with a natural wilt background “Exp.field 2” were additionally and artificially contaminated with isolate FOV – 316, the amount of the inhibited seeds was about 3% and 21%, respectively. From the obtained data a strong difference can be observed in the experimental populations and control plants in terms of the level of germination and inhibition of the seedlings until their death depending on the infectious background. In “Exp.field 2”, the average amount of the dead plants among the species of *G. hirsutum* with the natural background was 43.5%.

In “Mebane B1” x “11970” population, wide phenotypic variations were observed in relation to the susceptibility to wilt. For further analysis, we selected “Mebane B1” x “11970” population.

The most expressed symptoms of the diseases FOV were observed in the plants of F3 “Mebane B1” x “11970” population at the end of the growing season, during the maturation and opening phases of cotton bolls.

An analysis of the cleavage trait in F3 population, which appeared after cross-breeding, showed a different picture of characteristics, depending on the infectious background. So, in the case of “Exp.field 1”, the symptoms of wilt in varying degrees were observed in 45% of the plants. In “Exp.field 2” with the natural wilt background, wilt symptoms were observed in different degrees in 79% of the plants (Fig. 3).

In “Exp.field 1” and “Exp.field 2”, the average assessment of wilt symptoms in the experimental and control plants showed that Mebane-1 had grades 1 and 3.3, respectively (according to 5-point scale, where 1 – healthy plant; 2 – with weak symptoms; 3 – average; 4 – strong; 5 – plant died) and 11970 had 2 and 4, respectively; 3-79 – 1 and 2; TM-1 – 1, and 1,3; C-4727 – 3 and 2.7, respectively.

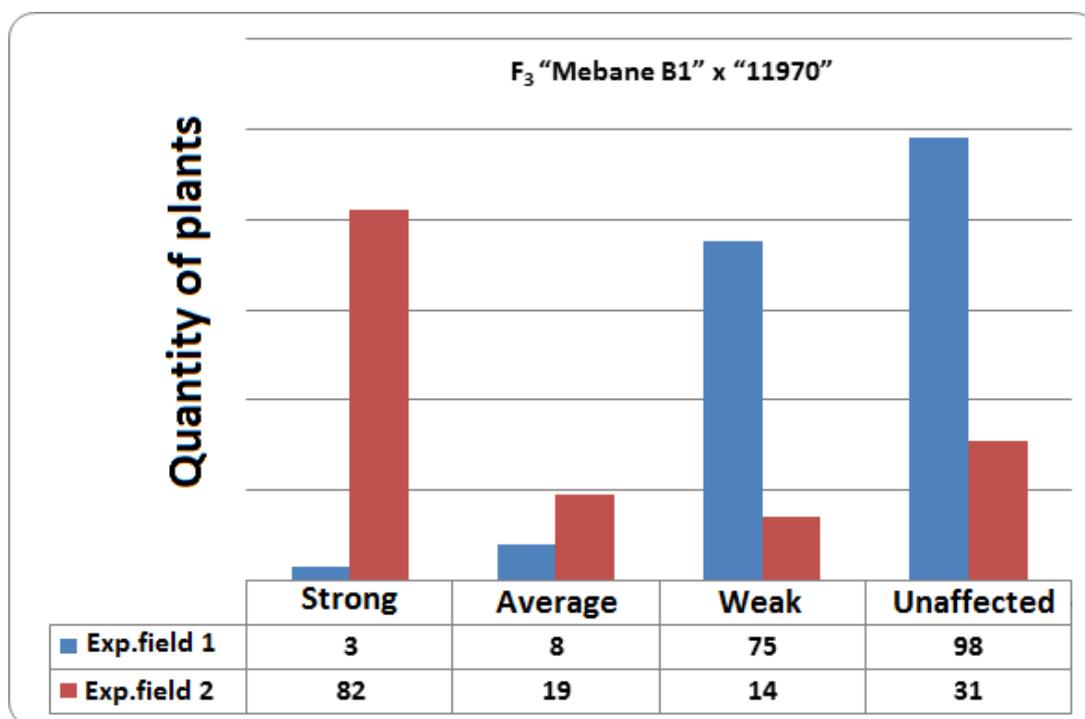


Figure 3. Distribution of F3 plant populations (Mebane 1–BX 11970) according to the degree of infection in regard to the infectious background

“Exp.field 1” – clean background with the use of artificial infection; “Exp.field 2” – natural wilt background with the use of artificial infection.

The plants in the tested population were divided into 2 groups (stable and unstable), where weakly, moderately and severely affected plants were combined in an unstable group, and unaffected plants in a stable group. So the number of plants in the groups of “Exp.field 2” with the natural wilt background was 115 and 31, respectively. In this case, phenotypic fission by the degree of wilt contamination in the analyzed populations, the ratio is close to 3:1 ($\chi^2 = 1,11$; $p \leq 0.05$) in the natural wilt background, whereas in the clean background of “Exp.field 1” and under

artificial infection conditions, the distribution of plants was 86 and 98 corresponding to the fission of 1:1 ($\chi^2 = 0,78$; $p \leq 0.05$).

The calculation of the values in the experimental populations χ^2 (1) “Exp.field 1” and “Exp.field 2” was performed according to the following formula:

$$\chi^2 = \sum (E_n - E_{oj})^2 / E_{oj} \quad (1)$$

In order to identify the genetic regions associated with the resistance of *G. hirsutum* to *Fusarium* wilt, F3 experimental population “MebaneB1” x “11970” segregated on the basis of wilt was genotyped using the microsatellites from the collections of: GH, CIR, CM, BNL, TMB, NAU and JESPR. At the moment, 775 pairs of microsatellite primers have been used, 105 of which showed polymorphism between the parent plants.

We identified 105 primer pairs used for the analysis of linkage groups and QTL mapping of the experimental population to identify the markers associated with a sign of resistance to wilt. 105 microsatellite marker primer pairs out of the identified markers were found suitable for mapping the populations, and 237 polymorphic loci were found. Linkage analysis and construction of the genetic map were performed using Join Map 3.0 program.

To conduct the analysis of coupling, the polymorphic loci were divided into three groups as follows:

1. Loci amplifiable only with “MebaneB1” (distribution 1:1) and heterozygous loci distribution (3:1 or 1:3);
2. Loci amplifiable only with “11970” (with a distribution of 1:1) and heterozygous loci distribution (3:1 or 1:3);
3. All the received polymorphic loci.

Based on these data, a genetic linkage map was received, including 45 polymorphic markers.

Subsequent QTL–mapping helped to determine the loci associated with the sign of wilt. QTL analysis was conducted using the method of mixed interval mapping (CIM) with the help of the program Windows QTL Cartographer v. 2.5_011. As a result of CIM mapping, we revealed six candidate markers associated with a resistance feature to wilt in 3 groups of coupling. However, GS1 linkage group showed the most reliable results, where the main QTL region coupled with wilt resistance (LOD = 5.3) was between the markers BNL 3442_129 and BNL1145_259.

In the seventh chapter of the dissertation titled “**Bioinformatical identification of candidate genes for the improvement of wilt-resistant varieties of cotton**”, the following are presented:

As part of this dissertation, in order to overcome some of the limitations associated with the use of single copy genes, the studied samples of *Fusarium* isolates were genotyped using universal DNA markers, namely RAPD, to enhance the ability to identify different taxonomic groups. In total we used 73 RAPD primers for genotyping to identify the amplification products causing differences between the 12 isolates of pathogenic fungi *Fusarium spp* (Fig. 4).

For further work we chose the primers that amplified unique products within species (race) and species-specific (species, *forma specialis*). The following

fragments were eluted from the gel and cloned in vector analysis to determine the nucleotide sequence.

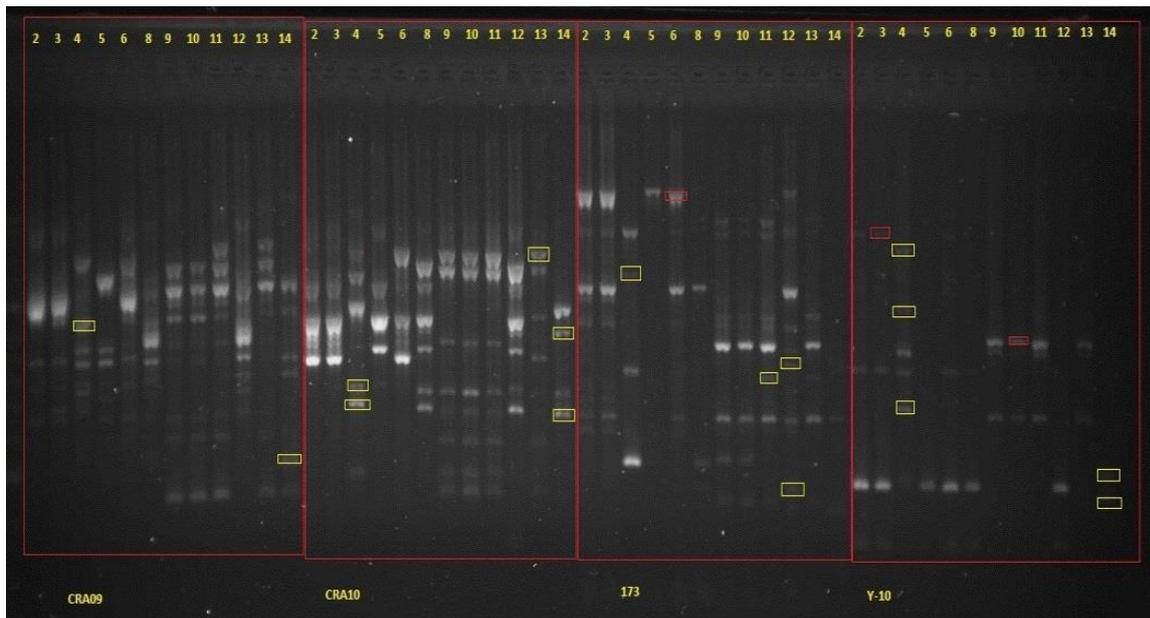


Figure 4. RAPD analysis of 12 *Fusarium* spp. isolates

As a result, we selected 13 unique pieces. Subsequent determination of the nucleotide sequences of these fragments enabled us to make a comparative analysis with the international genetic database, and develop 13 primer pairs for further SCAR analysis.

In order to compare these nucleotide sequences with the international genebanks through BLAST analysis, we used BLAST algorithm X, which allowed us to compare the nucleotide sequences against the annotated protein sequences. As a result, we were able to determine the functional affiliation of some RAPD amplicons.

Another approach to search for candidate genes for the control of pathogens is the identification of genes causing the host plant resistance to pathogens. One of them – *in silico* areas marker analysis identified as a result of QTL– associative mapping of the signs of host plants.

To identify the potential genes located in the marked areas which are responsible for increasing the resistance of plants to pathogens and high-informativity of genetic maps, the nucleotide sequence of the complete genome *Gossipium raimondii* and 6 primer pairs amplifying candidate markers were used. As a result, only the regions marked by two loci BNL1145_259 and BNL3442_112 which were most significantly associated with the resistance to wilt were annotated. The marker region contained the genes coding the proteins for alcohol dehydrogenase, phosphatase, calcium-binding and osmotin-like protein.

CONCLUSION

As a result of the researches carried out on the theme of the doctoral dissertation “Molecular identification and characterization of pathogens genus *Fusarium* affecting cotton in Uzbekistan”, the following conclusions were presented:

1. The identification of species of pathogens was carried out. In the phytopathogenic background of Uzbekistan, 6 species were revealed (*Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, *Fusarium equisity*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium sporotrichioides*).

2. For the first time, using the method of sequencing by single copy genes FOV races 3, 4 and 6 have been identified, which are common in Uzbekistan,.

3. Virulent isolates were revealed. It was found that the most pathogenic fungi are *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 3 (isolate 316) and *F. solani* (isolates 503, 519 and 520, in particular).

4. Nucleotide sequences were identified on the basis of four single-copy genes. On the basis of their nucleotide sequences specific primer types and races were designed using SNP and ASPCR methods.

5. On the basis of cotton cross-breeding combinations wilt resistant populations of “Mebane B1” x “11970” were created.

6. The locuses determining a number of cotton signs (first branch height, plant height, number of sympodium, branch length) were identified.

7. QTL-analysis was conducted to determine the degree of coupling of the mapped markers with cotton resistant to wilt. Three linkage groups containing the locuses resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* were identified.

8. Based on the obtained genetic maps and QTL-analysis the markers were identified that can be potentially used in marker-associated cotton breeding, as well as for the isolation and detailed study of candidate genes.

9. *in silico* analysis was carried out. 11 genes of *Fusarium* and 4 genes of *Gossypium* were determined, which are responsible for the synthesis of secondary metabolites and mycotoxins, and cotton resistance to external stimuli (contamination with pathogens).

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РУЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST of PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. A. Abdullaev, I. Salakhutdinov, Sh. Egamberdiev, Z. Kuryazov, L. Glukhova, O. Adilova, S. Rizaeva, Mauricio Ulloa, I. Abdurakhmonov. Analyses of Fusarium wilt race 3 resistance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetica*, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, 143(3) P. 385–392. (No 40. ResearchGate, IF=1.40).
2. Sh. Egamberdiev, I. Salahutdinov, A. Abdullaev, Mauricio Ulloa, Sukumar Saha, F. Rajapov, B. Mullaohunov, D. Mansurov, Johnie Jenkins and I. Abdurakhmonov. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 3 by single-base extension method and allele-specific polymerase chain reaction. *Can. J. of Plant pathol.*, 2014. vol. 36, No.216–223. (No 40. ResearchGate, IF=1.119).
3. А.А. Абдуллаев, И.Б. Салахутдинов, З.Б. Курязов, Ш.Ш. Эгамбердиев, Л.А. Глухова, О.Т. Адылова, Е.В. Броновицкий, С.М. Ризаева, И.Ю. Абдурахмонов, акад. АН РУз А.А. Абдуллаев. Изучение признака устойчивости средневолокнистого хлопчатника (*G. hirsutum*) к фузариозному увяданию (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*) при помощи ДНК маркеров. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. – Ташкент, 2011. – №1, С.89–92 (03.00.00, №2).
4. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Адылова О., Глухова Л., Закирова Д., Раджапов Ф., Муллаохунов Б., Абдурахманов И. Молекулярно–генетический анализ фитопатогенов *Fusarium* spp. Ферганской долины. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан, –Ташкент, 2013. №1. – С.79–8 (03.00.00, №2).
5. Эгамбердиев Ш.Ш., Абдуллаева А., Глухова Л., Адылова О., Закирова Д., Раджапов Ф., Муллаохунов Б., Абдурахманов И. Использование молекулярно–генетических методов в определении расовой принадлежности *F.oxysporum* f.sp *vasinfectum*. *Узбекский Биологический журнал*. –Ташкент, 2013. –№3. С.37–39 (03.00.00, №5).
6. Абдуллаев А., Эгамбердиев Ш., Салахутдинов И., Uolla M., Курязов З., Ризаева С., Абдурахманов И. Молекулярно–генетическая оценка гермплазмы культивируемого тонковолокнистого хлопчатника. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. –Ташкент, 2013. –№3. С.62–65 (03.00.00, №2).
7. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Раджабов Ф., Абдуллаев А., Абдурахмонов И.Ю. Использование аллель специфичной полимеразной цепной реакции для диагностики 3 расы *l oxysporum vasinfectum*. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. –Ташкент, 2014. –№1. С.84–87 (03.00.00, №2).

8. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Абдуллаев А., Адылова О., Глухова Л., Раджабов Ф., Муллаохунов Б., Абдурахмонов И.Ю. Молекулярная характеристика видового разнообразия коллекции фитопатогенных микроорганизмов. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. –Ташкент, 2014. –№3. С.79–82 (03.00.00, №2).
9. Раджапов Ф.С., Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И.Б., Муллаохунов Б.Т., Абдурахмонов И.Ю. Идентификация *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (РАСА 8) с использованием однокопийного гена фосфат пермеазы. Узбекский Биологический журнал. –Ташкент, 2014. –№4 С. 43–45 (03.00.00, №5).
10. Эгамбердиев Ш.Ш., Раджапов Ф.С., Салахутдинов И.Б., Абдурахмонов И.Ю. Изучение расового разнообразия изолятов *Fusarium oxysporum* *vasinfectum* при помощи метода полиморфизма единичного нуклеотида. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. –Ташкент, 2015. –№4. С.74–78 (03.00.00, №2).

II бўлим (II часть; Part II)

11. Абдуллаев А., Эгамбердиев Ш., Салахутдинов И, Раджабов Ф., Закирова Д., Хуршут Э, Ризаева С., Абдурахмонов И. Молекулрно–генетический анализ представителей коллекции тонковолокнистого хлопчатника. Доклады Академии Наук Республики Узбекистан. –Ташкент, 2014. –№1. С.80–85.
12. Egamberdiev Sharof, Ulloa Mauricio, Saha Sukumar, Salakhutdinov Ilkhom, Abdullaev Alisher, Glukhova Ludmila, Adylova Azoda, Scheffler Brain, Jenkins Johnie and Abdurakhmonov Ibrokhim. Molecular Characterization of Uzbekistan Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Journal of Plant Science Molecular Breeding, 2013, Vol.2, Issue 1, doi: 10.7243/2050–2389–2–3, <http://www.hoajonline.com/jpsmb/2050–2389/2/>
13. Эгамбердиев Ш.Ш., Абдурахманов И. Экспресс метод определения видовой и расовой принадлежности грибных фитопатогенов. Заявка на патент № IAP 20130140. (5 апреля 2013). Агенство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан.
14. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Раджапов Ф., Муллаохунов Б., Абдурахманов И. Аллель специфические праймеры для идентификации 3 и 8 рассы *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Заявка на патент № IAP 20130391. (18 сентября 2013). Агенство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан.
15. Эгамбердиев Ш.Ш., Раджапов Ф., Муллаохунов Б., Абдурахманов И. Экспресс метод выделения геномной ДНК из клеток фитопатогенов. Заявка на патент № IAP 20140215. Агенство по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан.
16. Абдуллаев А.А., Салахутдинов И.Б., Эгамбердиев Ш., Курязов З.Б., Адилова А.Т., Якубов М., Глухова Л.А., Абдурахманов И. Выявление генетических детерминант обуславливающих устойчивость средневолокнистого хлопчатника к фузариозному вилту.

- Республиканская научно–практическая конференция «Достижения генетики и селекции в области скороспелости и устойчивости сельскохозяйственных растений к биотическим и абиотическим факторам среды». 28 июля 2011, Ташкент, Узбекистан, сс. 106–108
17. Sukumar Saha, Sh. Egamberdiev, J. Wu, Johnie N. Jenkins, Jack C. McCarty, Dewayne Deng and I. Abdurakhmonov. Association of SSR Markers with important Fiber Traits in Upland Cotton.//Beltwide Cotton Conference, P 80, Orlando,Florida, Jan 3,2012.
 18. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Абдуллаев А., Раджапов Ф.С., Адылова А., Убайдуллава Х., Глухова Л., Муллаохунов Б., Закирова Д., Абдурахмонов И.Ю. Использование гена β -тубулина для видовой и расовой для идентификации рода *Fusarium*. «Достижения и перспективы экспериментальной биологии растений» 21 ноября 2013 г., ИГЭБР АН РУз, Ташкент, Узбекистан.
 19. Закирова Д.В., Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И.Б., Абдуллаев А.А. Использование SSR маркеров для молекулярно–генетической паспортизации хлопчатника. 18–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых (Пушино, 21 – 25 апреля 2014 г.). Сборник тезисов. С.–251.
 20. Раджапов Ф.С., Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И., Абдуллаев А., Адылова А., Убайдуллава Х., Глухова Л., Муллаохунов Б., Абдурахмонов И.Ю. Идентификация и определение вирулентности изолятов *Fusarium solani* из бухарской области. Конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (15–16 ноября 2013 года). АН РУз институт биоорганической химии им.академика А.С.Садыкова.
 21. Раджапов Ф., Эгамбердиев Ш., Салахутдинов И., Абдуллаев А., Глухова Л., Адылова О., Муллаохунов Б., Абдурахмонов И. Использование однокопийных генов для идентификации фитопатогенов рода *Fusarium* в Узбекистане. Материалы Республиканской научно–практической конференции «Селекция ва уруғчилик бўйича илмий тадқиқотларни ташкил этишнинг муҳим йўналишлари», Аграрный Университет, Ташкент 2013, С293–295.
 22. Закирова Д.В., Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И.Б., Абдуллаев А.А. QTL–картирование признака устойчивости хлопчатника к фузариозному вилту. Биология – Наука XXI века: 17–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых (Пушино, 21 – 26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. С196.
 23. Sukumar Saha and Sh. Egamberdiev. Association of the Cytoplasmic Specific SSR Markers with Important Fiber Traits in Improved Upland Cotton Lines. Beltwide cotton conference. January 7–10, 2013. San Antonia. Texas.#68.
 24. Акбаров М., Раджапов Ф., Салахутдинов И., Муллаохунов Б., Эгамбердиев Ш. Патогенные свойства изолятов *Fusarium solani*. «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истикболлари».

- ТошДАУ. 187–бет. 7–8 май, 2015й.
25. Зокиров Ж., Раджапов Ф., Салахутдинов И., Муллаохунов Б., Эгамбердиев Ш. Современные методы анализа фитопатогенов *Fusarium* spp. из Ферганской долины. «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истикболлари». ТошДАУ. 174–бет. 7–8 май, 2015й.
 26. Курбонов А.Ё., Раджапов Ф.С., Эгамбердиев Ш.Ш., Автономов В.А. Определение наиболее устойчивых генетических комбинаций хлопчатника к патогенам рода *Fusarium* и *Verticillium* на основе признака ингибирование всхожести семян. «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истикболлари». ТошДАУ. 220–бет. 7–8 май, 2015й.
 27. Муллахунов Б.Т., Раджапов Ф.С., Эгамбердиев Ш.Ш. Идентификация видов *Fusarium* spp. на основе TEF-1 α гена. «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истикболлари». ТошДАУ. 154–бет. 7–8 май, 2015й.
 28. Раджапов Ф.С., Муллахунов Б.Т., Эгамбердиев Ш.Ш. Методы комбинированного анализа для определения почвенных фитопатогенов. «Ўсимликларни зарарли организмлардан химоя қилишда биологик усулларнинг самарадорлигини ошириш муаммолари ва истикболлари». ТошДАУ. 116–бет. 7–8 май, 2015й.

Автореферат «Тил ва адабиёт таълими» журнали таҳририятида таҳрирдан ўтказилди (19.04.2016 йил).

Босишга рухсат этилди: 21.04.2016 йил
Бичими 60x84 ¹/₁₆, «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табоғи 5. Адади: 100. Буюртма: № 87.

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

«АКАДЕМИЯ НОШИРЛИК МАРКАЗИ» ДУК