

**ЎСИМЛИК ВА ҲАЙВОНОТ ОЛАМИ ГЕНОФОНДИ ИНСТИТУТИ,
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ, ГЕНЕТИКА ВА
ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ
14.07.2016.В.15.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР
МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ**

БУРИЕВ ЗАБАРДАСТ ТОЖИБАЕВИЧ

**ҒЎЗАДА (*GOSSYPIMUM* SPP.) ПАТОГЕНЛАРГА ЧИДАМЛИЛИКНИ
БЕЛГИЛОВЧИ *MIC-3* КЛАСТЕР ГЕНЛАР ОИЛАСИНИ КЛОНЛАШ,
ТАВСИФЛАШ ВА МОЛЕКУЛЯР ЭВОЛЮЦИЯСИНИ ЎРГАНИШ
ҲАМДА БУ ГЕНЛАРНИНГ ҒЎЗА БИОТЕХНОЛОГИЯСИДАГИ
АҲАМИЯТИ**

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

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИНГ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ– 2016

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

Буриев Забардаст Тожибаевич

Вўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлилики белгиловчи *MIC-3* кластер генлар оиласини клонлаш, тавсифлаш ва молекуляр эволюциясини ўрганиш ҳамда бу генларнинг ўўза биотехнологиясидаги аҳамияти..... 3

Буриев Забардаст Тожибаевич

Клонирование, характеристика семейства генов *MIC-3*, определяющих устойчивость к патогенам хлопчатника (*Gossypium* spp.) и изучение их молекулярной эволюции, а также значение этих генов в биотехнологии... 25

Buriev Zabardast Tojibaevich

Cloning, characterization and investigation of molecular evolution of pathogen-resistance cluster *MIC-3* gene family in cotton (*Gossypium* spp.) and its significance for cotton biotechnology..... 47

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 67

**ЎСИМЛИК ВА ҲАЙВОНОТ ОЛАМИ ГЕНОФОНДИ ИНСТИТУТИ,
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ, ГЕНЕТИКА ВА
ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ
14.07.2016.В.15.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ БИР
МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ
ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ**

БУРИЕВ ЗАБАРДАСТ ТОЖИБАЕВИЧ

**ҒЎЗАДА (*GOSSYPIMUM* SPP.) ПАТОГЕНЛАРГА ЧИДАМЛИЛИКНИ
БЕЛГИЛОВЧИ *MIC-3* КЛАСТЕР ГЕНЛАР ОИЛАСИНИ КЛОНЛАШ,
ТАВСИФЛАШ ВА МОЛЕКУЛЯР ЭВОЛЮЦИЯСИНИ ЎРГАНИШ
ҲАМДА БУ ГЕНЛАРНИНГ ҒЎЗА БИОТЕХНОЛОГИЯСИДАГИ**

АҲАМИЯТИ

03.00.14 – Геномика, протеомика ва биоинформатика
(биология фанлари)

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИНГ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ– 2016

3

Докторлик диссертациясининг мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясининг №14.07.2016/B2016.3.B158 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Геномика ва биоинформатика марказида амалга оширилди.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.flora-fauna.uz) ҳамда «ZiyoNET» ахборот-таълим тармоғига (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Абдурахмонов Иброҳим Юлчиевич биология
фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Мухамедов Рустам Султанович
биология фанлари доктори, профессор

Турдикулова Шахлохон Уткуровна
биология фанлари доктори

Ризаева София Мамедовна
биология фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: Микробиология институти

Диссертация ҳимояси Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти, Ўзбекистон Миллий университети, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ҳузуридаги 14.07.2016.B.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. Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти мажлислар

зали. Тел.: (+99871) 289-04-65, факс (+99871) 262-79-38, e-mail: igppa@academy.uz.).

Докторлик диссертацияси билан Ўсимлик ва ҳайвонот олами генофонди институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (____ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100053, Тошкент шаҳри, Боғишамол кўчаси, 232-уй, ЎҲОГИ. 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.

Б.А. Адилов

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

Ш.Юнусхонов

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий
кенгаш хузуридаги илмий семинар раиси, б.ф.д.,
профессор

КИРИШ (докторлик диссертациясининг аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда глобаллашув жараёни чуқурлашиб бораётгани туфайли жаҳон қишлоқ хўжалигида биохавфсизликни таъминлаш ва уларни биотик зарарлардан (фитопатогенлар, зараркунандалар каби) ҳимоя қилиш бўйича хавотирлар кучайди. «Патоген организмларнинг зарари дунё қишлоқ хўжалигида 1,4 триллион долларга тенг деб баҳоланади. Бу глобал ялпи ички маҳсулотнинг 5% ни ташкил этади»¹.

Мустақиллик йилларида мамлакатимизда қишлоқ хўжалиги экинлари ҳосилдорлигини ошириш борасида кенг қамровли ишлар олиб борилмоқда ва бугунги кунда қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқариши республикамиз йиллик иқтисодий даромадининг бир қисmini ташкил этмоқда. Бу борада пахтачилик соҳасида ҳам ислохотлар олиб борилиб, мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, ғўза майдонлари қисқартирилиб, ҳосилдорликни ўртача 3-4 центнерга оширишга эришилди.

Жаҳонда пахта етиштириш жараёнида турли патогенлар, хусусан ғўза вилт касаллиги (*Fusarium* ва *Verticillium*) ва ғўза илдизида шиш ҳосил қилувчи нематода (*Meloidogyne incognita*; RKN) ҳосилдорликка катта зарар

келтирмоқда. Нематодалар дунёдаги ўсимликлар ҳосилини 14% йўқотилишига олиб келади ва бу тахминан 100 миллиард долларга тенг демакдир. «АҚШда нематода билан боғлиқ ғўза ҳосилини йўқотилиши охириги ўн йил давомида сезиларли даражада ортган ва бу тахминан 205 миллион долларни ташкил этади»². Шу нуқтаи назардан, муаммонинг долзарблиги патогенларга қарши курашиш, дунё ғўза тадқиқотининг муҳим вазифаларидан бири бўлган ғўза касаллигини тарқалишига қарши замонавий биотехнология воситаларини тадқиқ этиш ва ривожлантиришдир. Бунда нематодага қарши курашишнинг генетик асосларини ўрганиш бўйича тадқиқотларни амалга ошириш қуйидагича изоҳланади: ғўзада патогенларга чидамлилиқни берувчи генларни аниқлаш; уларнинг ғўза геномидаги таркиби ва тузилишини асослаш; хромосомалардаги ўрнини аниқлаш; патогенларга чидамли линиялар олишда замонавий биотехнологик ва геномик воситаларини тадқиқ этиш.

Ўзбекистон Республикасининг 2000 йил 31 августдаги 116-II сон «Қишлоқ хўжалиги экинларини заракунандалар, касалликлар ва бегона ўтлардан химоя қилиш тўғрисида» ги Қонуни, Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2004 йил 29 мартдаги 148-сон «Ўсимликларни химоя қилиш хизмати тузилмасини такомиллаштириш ва самарадорлигини ошириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

¹<http://www.fao.org/docrep/018/i3300e/i3300e.pdf>.

²<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx>

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг 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. Ғўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлилиқнинг молекуляр-генетик тадқиқотларига йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Texas A&M University (АҚШ), Mississippi State University (АҚШ), University of California (АҚШ), University of Georgia (АҚШ), CSIRO Plant Industry (Австралия), United States Department of Agriculture (АҚШ), Northeast Institute of Geography and Agroecology (Хитой) ҳамда Геномика ва биоинформатика Марказида (Ўзбекистон) олиб борилмоқда.

Ғўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлилиқнинг молекуляр генетик тадқиқотларига оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан қуйидаги илмий натижалар олинган: нематода ва вилт касаллигининг ўзаро алоқадорлиги ва нематода-вилт комплексини ўта

хавфлилиги аниқланган ва бу касаллик билан боғлиқ бир нечта ДНК маркерлари топишган (California University, АҚШ); микросателлит маркерларни қўллаш орқали ўрта толали ғўзанинг 11- ва 14- хромосомасида RKN га чидамлилиқ QTL лари хариталаштирилган (United States Department of Agriculture, АҚШ); жуда кўплаб ДНК маркерларидан (SSR ва AFLP маркерлари) фойдаланган ҳолда, 1221 F₂ авлоди ўсимликларини текшириш орқали Mi-C11/Mi-C14 локуслари аниқланган (Georgia University, АҚШ).

Дунёда ғўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлилиқнинг молекуляр-генетик тадқиқи бўйича қатор, жумладан қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: патогенларга чидамлилиқнинг янги генларини аниқлаш; ДНК маркерлари ёрдамида QTL хариталаш; патогенларга чидамли генларни хромосомалардаги ўрнини аниқлаш; патогенларга чидамли янги биотехнологик навларни олиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ўсимликларда энг кўп маълум бўлган чидамлилиқ билан боғланган мултиген кластер генларни хорижий олимлардан B.J.DeYoung et al.³аниқлаган; L.He et al.⁴томонидан аллотетраплоид ғўзада генларнинг тавсифи ва генетик хариталаш NBS-LRR чидамлилиқ оқсилларини кодлаши аниқланган; X.D.Zhang et al.⁵ва

³ DeYoung BJ, Innes RW. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nat Immunol. 2006 Dec;7(12):1243-9.

⁴He L., Du C., Covalada L., Xu Z., Robinson F.A., Yu J.Z., Kohel R.J., Zhang H.B. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LLR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*G. hirsutum* L.) // Mol Plant Microbe Interact. 2004. 17:1234-1241.

⁵Zhang X.D., Callahan F.E., Jenkins J.N., Ma D-P., Karaca M., Saha S., Creech R.G. A novel root-specific gene, *MIC-3* with increased expression in nematode-resistant cotton (*G. hirsutum* L.) after root-knot nematode infection // Biochim.Biophys.Acta. 2002. 1576:214-218.

6

F.E.Callahan et al.⁶томонидан ғўзанинг юқори экспрессияланувчи ноёб *MIC-3* оксили илдиз нематодасига чидамли ғўзанинг зарарланган тўқималарида аниқланган; M.Wubben et al.⁷чидамлилиқ мотивлари ёки «NBS-LRR like» доменлари билан боғлиқ эмаслигини кўрсатиб берди ҳамда *MIC-3* гени оиласининг дастлабки хусусиятларини ўсимлик ҳимояланаётган пайтда аниқлади ва бу генлар бошқа маълум бўлган ҳимоя йўлларида мустақил эканлиги исботланди.

Ўзбекистонда Х.Холматов томонидан нематодаларга чидамли ўрта толали «Ғолиб» нави генетик жиҳатдан ўрганилган. Ш.Эгамбердиев томонидан *Fusarium* авлоди патогенларининг геномини молекуляр-генетик усуллар билан комплекс идентификацияланган ҳамда маҳаллий ғўза навларига нисбатан кўп учрайдиган патоген тур ва расаларнинг патогенлик хусусиятлари ўрганилган. Аммо, ғўзада касалликка чидамлилиқ учун *MIC-3* генини кластерланган супергенлари маҳаллий ва халқаро даражада ҳам ҳали тўлиқ ўрганилмаган. Ҳозирги кунда ғўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлилиқни белгиловчи *MIC-3* кластер генлар оиласини тавсифлаш ва

молекуляр эволюциясини ўрганиш ҳамда бу генларни ғўза биотехнологиясида қўллаш долзарб илмий-амалий аҳамиятга эга.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасаси илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқотлари Геномика ва биоинформатика маркази илмий-тадқиқот ишлари режасининг Ф4-Т149 «Маркерларга асосланган селекцияни ривожлантириш учун ғўза геномини тадқиқ этиш» (2007-2011 йй.), UZB2-3101-ТА-09 «Гермоплазманинг илдиз-шиш нематода ва Фузариум вилт касалликлари билан потенциал қаршилигини баҳолаш ва SNP асосидаги кандидат ген маркерларини ишлаб чиқиш» (2009-2013 йй.) ва ФА-Ф10-Т92 «Ўза генлари учун тузилган синтетик RNAi дуплекслари асосидаги бинар генетик векторлар ёрдамида юқори сифатли трансген ғўза линиялари олиш» (2009-2011 йй.) мавзуларидаги фундаментал, амалий ва халқаро лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади *MIC-3* генларини ғўза геномидаги таркиби, тузилиши, хромосомалардаги ўрнини ҳамда аллотетраплоид ва уларнинг аجدодларига яқин бўлган диплоид геномлардаги дупликация механизмлари ва молекуляр эволюцияланиш кўламини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Gossypium турларидаги аллотетраплоид ва уларнинг аجدодларига яқин ҳисобланадиган диплоид ғўзалардаги *MIC-3* гени оилаларини клонлаш ва секвенслаш;

Gossypium турларидаги *MIC-3* генларини батафсил филогенетик таҳлил қилиш ва классификациялаб, уларни субоилаларга ажратиш;

⁶Callahan F.E., Zhang X-D., Ma D-P., Jenkins J.N., Hayes R.W., Tucker M.L. Comparison of *MIC-3* protein accumulation in response to root-knot nematode infection in cotton lines displaying a range of resistance levels // J Cotton Sci. – USA, 2004. 8:186-190.

⁷Wubben M.J., Callahan F.E., Hayes R.W., Jenkins J.N. Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the *MIC* (*Meloidogyne-induced cotton*) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*G. hirsutum* L.) // Planta. 2008. 228:111-123.

7

ғўза геномидаги *MIC-3* генлари кетма-кетликларида тахминий гаплотипларни аниқлаш ва *MIC-3* ген аъзоларининг хромосомаларда кластер ҳолатида жойлашувини тасдиқлаш учун келажақдаги маркерларга асосланган селекция дастурлари учун фойдали бўлган SNP маркерларини ишлаб чиқиш;

MIC-3 генларини тахминий оксил кетма-кетликларини ва нуклеотидлар алмашинуви тезликларини тавсифлаш билан *MIC-3* генларини ғўза геномини полиплоидизацияга учрашидан олдин ва кейинги молекуляр эволюцияланиш тезлиги, генларни дупликацияси, геномда сақланиб қолиш механизмларини ўрганиш;

MIC-3 генлари маълумотларига асосланиб, ғўза геном эволюциясини ўрганиш, ҳамда *Gossypium* авлодидаги геномлар дивергенцияланиши вақтларини қайта баҳолаш;

MIC-3 генлари нуклеотидларини «синоним» ва «носиноним» алмашинуви тезлигига асосланиб, нематода ва бошқа касалликларга чидамлиликини белгилайдиган адаптив селекция жараёнини ўрганиш;

MIC-3 генлари экспрессиясини *Fusarium* ва *Verticillium* вилти билан зарарланиш жараёнида чидамли ва чидамсиз ғўза генотипларини қиёсий ўрганиш;

MIC-3 генлари орасидаги спейсер кетма-кетликларни аниқлаш ва шу асосида ўзида минимал промотор регионлари тутган бинар генетик векторлар тузиш ҳамда уларни модел ўсимлик *Arabidopsis*га трансформация қилиш орқали келажақда ғўза ва ўсимликлар биотехнологияси учун фойдали промотор кетма-кетликларни аниқлаш;

ўсимлик генлари, хусусан *MIC-3* генлари функцияларини ўрганиш учун ўзида РНК дуплекслари тутувчи ўсимлик генларининг бинар векторлари асосларини тузиш ва оптималлаштириш.

Тадқиқот объекти. Ўсимлик материали сифатида қўш гаплоидли *G. barbadense* Pima 3-79 ([AD]₂-геном), *G. tomentosum* ([AD]₃-геном), *G. mustelinum* ([AD]₄-геном) ҳамда *G. hirsutum* ([AD]₁-геном) нинг тўққизта генотипи, шу жумладан Clewewilt, M240, M315, Голиб, ST213, M8, Texas Маркер-1 (TM-1) линия ва навлари, таъсирчан изолиния (Sisoline)лар ва қизил мутант линия (REDM)лардан фойдаланилган. Ундан ташқари, тадқиқот жараёнига киритилган учта диплоид турлардан аввалдан мавжуд бўлган AD тетраплоид турларининг A₁ (А-субгеноми) ва D₁ (D-субгеноми) геномларига жуда яқин бўлган *G. herbaceum* (A₁-геном) ва *G. Raimondii* (D₅-геном) ҳамда F-геномли Африка ёввойи тури *G. longicalyx* ишлатилган. *MIC-3* генларининг хромосомаларда жойлашувини аниқлаш учун полиморфизмларни скрининг қилиш йўли билан моносомик ва монотелиодисомик линияларда *G. hirsutum* х *G. barbadense* интер специфик F₁ дурагайлари ва уларга ўхшаш бўлган бирламчи моносомик *G. hirsutum* х *G. mustelinum* лар каби F₁ дурагайларида делецияларни аниқлаш тестидан фойдаланилди.

Тадқиқот предмети 15 та тетраплоид ва диплоид ғўза генотипларида аниқланган касалликларга чидамлилиқни бошқарадиган ноёб *MIC-3* генлари ҳисобланади.

8

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертацияда молекуляр биологиянинг асосий усуллари (ДНК ажратиш, генларни секвенслаш ва клонлаш), генетик тузилмаларни таҳлил қилиш, филогенетик кластерлаш, ген конверцияси ва рекомбинацияси, молекуляр эволюция дивергенцияси вақти, молекуляр маркерлар ва бинар вектор конструкцияларини ишлаб чиқиш, генетик трансформация ҳамда биоинформатика ва статистик таҳлилнинг замонавий усулларида фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

биринчи марта ғўзанинг 15 та аллотетраплоид ва диплоид геномларидан *MIC-3* суперген оиласига мансуб 169 та индивидуал ген аъзолари клонланган, секвенс қилинган ва тавсифланган;

ушбу 169 та *MIC-3* ген аъзолари таҳлили асосида 15 та ғўза генотипларида 4 тадан 16 тагача ген аъзолари мавжудлиги ва улар 2-10 тагача

субоилаларга бўлиниши аниқланган. Барча *Gossypium* турларида 169 та *MIC-3* генлари кетма-кетликлари филогенетик жиҳатдан умумий миқдорда 17 та геномларга хос бўлган субоилаларга ажратилган;

аллотетраплоид геномларида аниқланган *MIC-3* генларининг таҳлили асосида A_t ва D_t геномларга хос бўлган 42 та гаплотип кетма-кетликлари исботланган. *MIC-3* генларига хос SNP маркерлари яратилган ҳамда гаплотип ва субоила гуруҳлари асосида A_t геномда 9 та тахминий *MIC-3* локуслари ва D_t геномда 3 та тахминий локуслар аниқланган;

биринчи марта геномларга хос бўлган *MIC-3* генларидан олинган махсус SNP маркерлар яратилган ва *MIC-3* генлари ўзанинг 4- ва 19-гомелогик хромосомаларида кластер ҳолида жойлашганлиги аниқланган;

биринчи марта ўзанинг 15 та тетраплоид ва диплоид генотипларида *MIC-3* генларининг нуклеотидлар алмашинуви тезлиги ва молекуляр эволюция жараёнлари аниқланган;

MIC-3 генларини кодловчи ДНК кетма-кетликларидаги синоним (K_s) ва носиноним (K_a) нуклеотидларни ўртача сонини баҳолаш асосида «хамкорликдаги» бошланғич эволюция амалга ошганлигига қарамай *MIC-3* генлари «туғилиш ва ўлим» эволюцион модели остида 1-экзонда тозаловчи ва 2-экзонда дивергенция селекцияси таъсирида эволюцияланиб борганлиги аниқланган;

илк бор «генларни амплификацияланиши» *MIC-3* генларининг барча дупликацияланган нусхаларини сақланиб қолишини таъминловчи механизм сифатида эканлиги ва ўзани ҳимояланиш жараёнида генларнинг янги функцияларини «шарпали ўлжа» модели остида пайдо бўлиши аниқланган; ҳар хил геномларда *MIC-3* генларининг дупликацияси турли тезликларда содир бўлиши исботланган. Аллотетраплоид геномларда ҳар ~1 миллион йилда, A/F-геномларда ҳар ~2 миллион йилда ва D геномларда ҳар ~8 миллион йилда битта дупликация содир бўлиши аниқланган;

MIC-3 генларининг экспрессияси таҳлиliga кўра *Fusarium* ва *Verticillium* вилтига чидамли генотипларида бу генларнинг фаол эканлиги аниқланган; биринчи марта ўзида *MIC-3* гени илдиз-специфик промоторини тутган 2,5 кб узунликдаги регионнинг генлараро спейсер кетма-кетликлари

9

клонланган, секвенсланган ва тавсифланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат: *MIC-3* гени ДНК даги кетма-кетликлари тавсифланган ва натижалар замонавий ўза селекцияси, биотехнологияси бўйича амалий дастурларида вилт ва нематодага чидамлилиқни оширишда фойдаланиш учун илмий асос сифатида тавсия этилади;

MIC-3 гени учун SNP маркерлар яратилган ва улардан тўғридан-тўғри ўзанинг маркерларга асосланган селекциясида (MAC) янги навлар яратишда фойдаланиш учун тавсия этилади;

MIC-3 промоторлари кетма-кетлиги остидаги *GUS* маркер генидан иборат бир нечта бинар векторлар тузилган ҳамда модел *Arabidopsis*

ўсимлигига трансформация қилинган. Ўсимликлар биотехнологияси учун ўта фойдали бўлган илдиз тўқимасидагина ишлайдиган *MIC-3* генининг минимал промотори тавсия этилади;

ўсимликлар биотехнологияси учун генлар фаоллигини ўрганишда фойдаланиладиган синтетик RNAi вектор конструкциялари яратилган ва ғўза биотехнологиясида янги линиялар олинган.

Тадқиқот натижаларининг ишончилиги замонавий усул ва ёндашувлар ёрдамида тасдиқланган. Маълумотлар вариациялар таҳлили (ANOVA), молекуляр вариациялар таҳлили (AMOVA), Wilcoxon таҳлили ҳамда замонавий секвенс таҳлил алгоритмлари (Sequencher, ClustalX, Mega 4.1, BLASTX), филогенетик таҳлил усули (UPGMA, Mega 4.1, NJ), ген конверсия ва рекомбинацион тест (GeneConv, DNASP, RDP3, SiScan) ва алмашиниш даражаси (KaKs билан Juke-Cantor тузатишлари; кодонга асосланган Z-тестлар) таҳлили каби классик статистик усуллардан фойдаланиб, қайта ишланган, таҳлил қилинган ва тасдиқланган. Ғўза геномида “синоним” нуклеотидларини йиллар давомида ўзгариб бориши $r=Ks/2T$ формуласи ёрдамида ҳисобланган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти биринчи марта молекуляр эволюция ва селектив кучлар, шунингдек диплоид ва тетраплоид ғўза турларида илк бор таърифланган «ген амплификацияси» *MIC-3* генлари дупликацияланган нусхаларининг сақланиб қолиши аниқланганлиги, «bait and switch» (шарпали хўрак) модели остида ўсимликнинг ҳимоявий фаолияти давомида янги ген функцияларини юзага келтирувчи механизмларнинг таърифланганлиги ҳақидаги янги билим ва тушунчалар билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ғўзада касалликка нисбатан юқори чидамлилики таъминловчи, ижобий селекциялар асосида шаклланган *MIC-3* генларидан олинган SNP маркерлари ғўзанинг вилт ва нематодаларга чидамли навларини яратишда замонавий MAC дастурларида қўлланилиши, бундан ташқари, ўсимликлар биотехнологиясида *MIC-3* ген промоторидан ҳар қандай ген функцияларини ғўза ва бошқа ўсимликларнинг илдиз қисмига қайта йўналтиришда, трансген ҳолатларнинг хавфсизлигини таъминлашда самарали фойдаланилиши, генлар фаоллигини ўрганишда қўлланиладиган синтетик RNAi вектор конструкцияларини яратилганлиги билан изоҳланади.

10

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *MIC-3* кластер генлар оиласини тавсифлаш ва молекуляр эволюциясини ўрганиш ҳамда уларни ғўза биотехнологиясида қўллаш доирасида олинган натижалар асосида:

ўсимлик хужайраларида ген экспрессиясини сусайтирувчи кичик интерференция берувчи РНК (siRNA) усули учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтиро патентлари (12.01.2011, № IAP 04300; 02.06.2011, № IAP 04383; 23.05.2011, № IAP 04360; 23.05.2011, № IAP 04361) олинган. Илмий тадқиқот натижалари ўсимликлар биотехнологиясида генлар, жумладан *MIC-3* генлари фаоллигини аниқлаш, вектор

конструкциялар трансформацияси орқали янги линиялар олиш имконини берган;

МІС-3 кластер генлари АҚШ қишлоқ хўжалиги Департаменти томонидан молиялаштирилган №6064-21000-014-00-D «Маркерларга асосланган ва анъанавий селекция ёрдамида ғўзани генетик яхшилаш ва генларни *Gossypium* нинг экзотик турлари орасидан гибридлаш» лойиҳаси доирасида фойдаланилган (2013-2018 йй.) (АҚШ Қишлоқ хўжалиги департаментининг 2016 йил 26 сентябрдаги маълумотомаси). *МІС-3* кластер генларидан фойдаланган ҳолда нематодаларга чидамли линияларни олиш ҳамда ғўзанинг патогенларга чидамлилигини янада ошириш имконияти яратилган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 13 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, «Conference of American Society of Agronomy» (New York, 2006), «Ўсимликлар молекуляр биологиясининг долзарб муаммолари» (Тошкент, 2008), «Ќўзанинг дунё генетик хилма хиллиги асосий ва амалий лойиҳалар асосида» (Тошкент, 2010), «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010), «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2010), «International Cotton Genome Initiative conference» (Canberra, 2010), «5th World cotton Research Conference» (Mumbai, 2011), «International Cotton Genome Initiative (ICGI) conference» (Brasilia, 2006; Raleigh, 2012), «International Cotton conference» (Bremen, 2014), «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» (Тошкент, 2016) мавзуларидаги республика ва халқаро илмий-амалий конференцияларда 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, 5 таси республика ва 5 таси хорижий журналларда нашр этилган ҳамда тадқиқотда қўлланилган усуллар билан боғлиқ 4 та республика патенти олинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 171 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида амалга оширилган илмий-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 очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга татбиқ этиш ҳамда нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Чидамлик генлари ва чидамликлар геномикасининг ютуқлари**» деб номланган биринчи бобида ғўза бўйича олиб борилган молекуляр-генетик тадқиқотлар келтириб ўтилган.

Ўсимликларда чидамлик генларининг тавсифи, молекуляр-эволюцияси ва ўсимликлар биотехнологиясида қўлланилиши ҳақидаги маълумотлар, ушбу йўналишдаги асосий муаммолар ва уларни ҳал этишдаги имкониятлар санаб ўтилган.

Диссертациянинг «**Ўзанинг кластер генларини ўрганишдаги материал, шароит ва услублар**» деб номланган иккинчи боби тадқиқотларда фойдаланилган усулларга бағишланади.

Бунда ўсимлик материаллари ва фойдаланилган реагентлар, ДНК ажратиш усуллари, клонлаш, ДНК кетма-кетликларини ўқиш (секвенс) ва уларни замонавий статистика усуллари ёрдамида филогенетика, гаплотиплаш, ген конверцияси, рекомбинация ва молекуляр эволюция асосида олиб борилган таҳлил натижалари бўйича батафсил маълумот келтирилган.

Диссертациянинг «***Gossypium* турининг MIC-3 генларини тавсифлаш ва хромосома бўйича жойлашуви**» деб номланган учинчи бобида MIC-3 ген оиласининг жойлашган ўрни, структураси ва таркиби ўрганилиб, клонланган, секвенс қилинган, ҳамда аллотетраплоид ва диплоид ғўза геномларида тавсифланган.

Тадқиқотлар қуйидаги натижаларни ўз ичига олади:

MIC-3 гени учун 15 та ғўза генотипининг ҳар биридан ПЗР ёрдамида олинган тахминан 150 та индивидуал клонлар инсерцияси секвенс қилинди. *Gossypium* турининг MIC-3 гени ампликонлари 653-713 н.ж. оралиғида бўлиб, барча аллотетраплоид генотипларида ампликонлар 653-706 н.ж., *G. herbaceum* турида 703-713 н.ж., *G. raimondii* турида 653-691 н.ж. ва *G. longicalyx* турида 706 н.ж. узунликларни ташкил қилган (1-жадвал). Барча ўрганилган *Gossypium* турлари учун кўплаб ДНК кетма-кетликларининг ўзаро қиёсий таҳлиллари асосида MIC-3 генининг 721 н.ж. узунлигидаги тўлиқ консенсус кетма-кетлиги тузилди. *Gossypium* туридаги MIC-3 генининг интрон ва экзон қисмлари MIC-3 генининг нуклеотид ва оқсил кетма кетликлари асосида аннотация қилинди (Zhang ва бошқ., 2002).

***Gossypium* туридаги MIC-3 ген оиласининг тавсифи**

Генотип	Аъзол ар	Ампликон узунликлари	Инсерция-делецияли ўзгаришлар	Умумий SNP лар
---------	-------------	-------------------------	----------------------------------	-------------------

	сони	вариацияси	экзон 1	интрон	3' UTR	
Gh_TM1	10	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Sisoline	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_ST213	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 22 (D _t)
Gh_M8	12	697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -		17 (A _t), 20 (D _t)
Gh_REDM	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Golib	16	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 15 -	21 (A _t), 22 (D _t)
Gh_Cleviewilt	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_M240	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_M315	15	653 (D _t) 697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 - -	18 (A _t), 27 (D _t)
Gb_3-79	11	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 15	11 (A _t), 29 (D _t)
<i>G. tomentosum</i>	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	10 (A _t), 24 (D _t)
<i>G. mustelinum</i>	15	653 (D _t) 668 (A _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9* 9 -	- - - -	15,29 29 15 -	12 (A _t), 28 (D _t)
<i>G. herbaceum</i>	9	703 707 709 713	- - - -	12 8 6 8	6 6 6 -	19 (A)
<i>G. raimondii</i>	4	651 653 691	9 9 -	- - -	31 29 -	33 (D)

<i>G. longicalyx</i>	11	706	-	-		- 14 (F)
----------------------	----	-----	---	---	--	----------

***Эътибор беринг:** *G. mustelinum* MIC-3 генининг специфик ампликони A₁-геномнинг биринчи экзонидаги 9 н.ж. узунликдаги индели триплетга эга бўлиб, у бошқа генотипларда кузатилаган D₁-геноми учун специфик бўлган инделларга нисбатан юқорида жойлашган; Gh – *G. hirsutum*; Gb – *G. barbadense*.

Тадқиқотларда барча *Gossypium* турларидан кўплаб геном кетма кетликларининг ўзаро қиёсий таҳлилларига кўра қуйидагилар, яъни MIC-3 генининг оксил кодламайдиган 5' UTR региониди 11 н.ж. узунлигига, икки

13

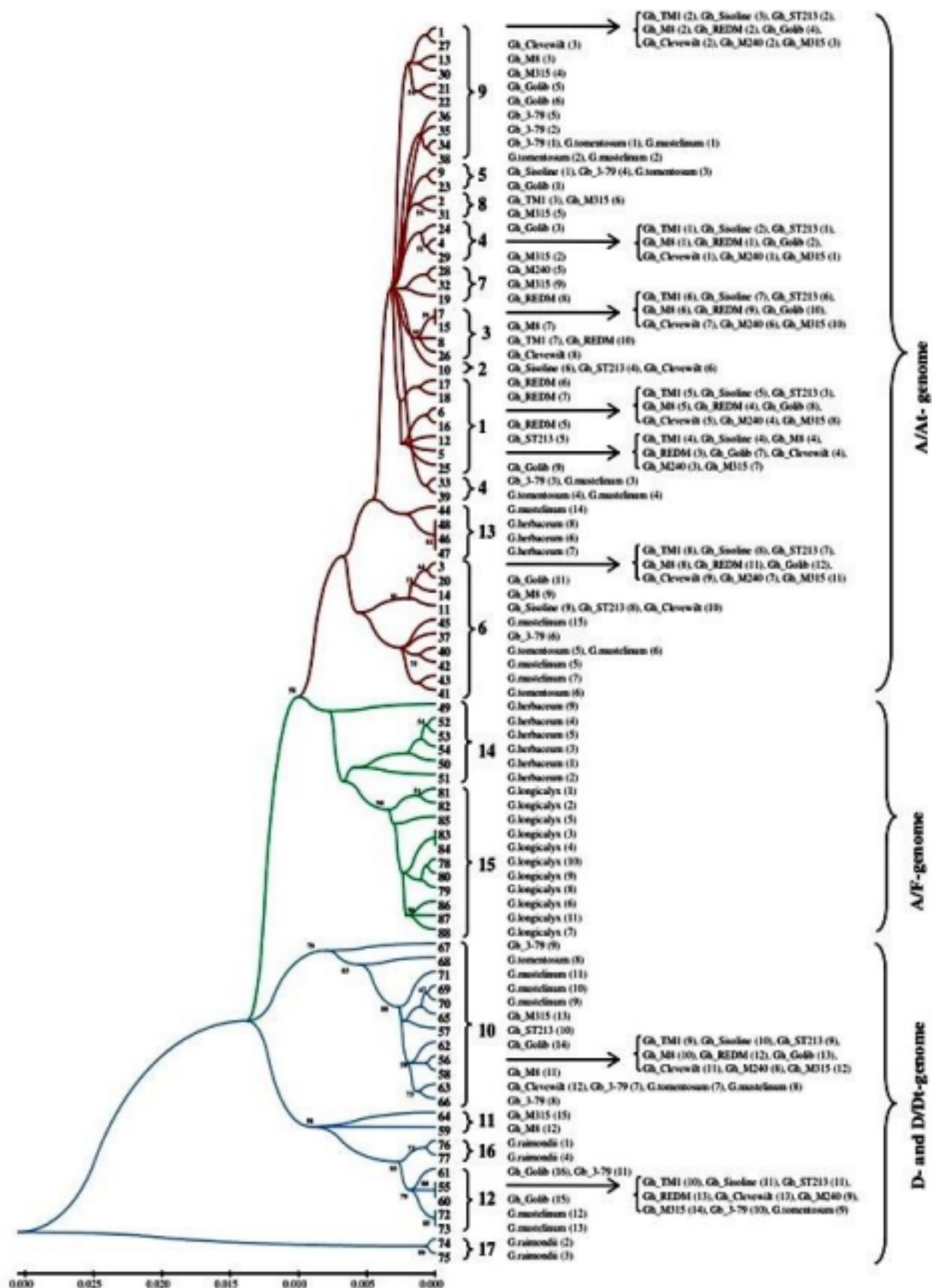
оксил кодловчи регионларида 221-230 н.ж. (экзон 1) ва 193 н.ж. (экзон 2), ягона оксил кодламайдиган интрон региониди 65-77 н.ж. ва оксил кодламайдиган 3' UTR региониди 151-195 н.ж. узунлигига мувофиқ келгани аниқланди.

Йирик инсерция-делеция (indel) ўзгаришлари туфайли вариациялар содир бўлган, булар ўрганилган ғўза генотипидаги MIC-3 ген оиласининг баъзи аъзоларида кузатилган. Масалан, *G. herbaceum* туридан (А-геном) ташқари ўрганилган барча ғўза геотипларининг биринчи экзонида D геноми учун специфик 9 н.ж. узунлигидаги индел мавжудлиги аниқланди. Аҳамиятлиси шуки, *G. mustelinum* At-геномига хос бўлган кодон триплетларини юқори йўналишида (upstream) силжитувчи 9 н.ж. узунликдаги индел топилди (1-жадвал).

Шунингдек, *G. hirsutum* M8 линиядан ташқари барча аллотетраплоид авлодларининг 3'UTR региониди 15 н.ж. ва 29 н.ж. узунлигидан иборат икки йирик индел мавжудлиги аниқланди. Бунда 29 н.ж. узунлигидаги индел (структура ва жойлашиши аниқланган) аллотетраплоидларнинг тахминий D-геном аждоди ҳисобланган *G. raimondii* турига ҳам тегишлидир. 15 н.ж. узунлигидан иборат инделлар ноёб бўлиб, улар фақатгина аллотетраплоид генотипларида аниқланди, аммо улар диплоидларнинг тахминий аждоди ҳисобланган А ва D геномларда мутлақо учрамади. Ғўзанинг AD геномидаги (1-жадвал) MIC-3 ампликонларининг 3'UTR региониди учрайдиган индел намуналари ўрганилиб, 15 н.ж. ва 29 н.ж. узунликдаги индел комбинацияларидан иборат янада мураккаб ампликонлари *G. mustelinum* (3 та турли типлари), *G. barbadense* Pima 3-79 линияси (икки типда) ва *G. hirsutum* туркимининг Ғолиб навларида (икки тип) аниқланди. Ушбу жараёнда *G. barbadense* Pima 3-79 линияси ва *G. hirsutum* туркумининг Ғолиб навларидаги MIC-3 индел намуналари фақат 15 н.ж. узунликдаги ампликон инделлари ўхшаш бўлиб, бу *G. barbadense* ва Ғолиб нави ўртасидаги ўзаро дурагайланиш содир бўлганлигидан далолат беради. Бошқа томондан, *G. hirsutum* турининг M8 линияси барча ген клонидан ҳар қандай MIC-3 ген аъзосининг 3'UTR региониди 15 н.ж. ёки 29 н.ж. узунликдаги инделлар топилмади. M8 линиясидан фақатгина 12 та MIC-3 ген аъзолари аниқланган.

Wubben va бошқ. (2008) томонидан олиб борилган изланишларда ғўзанинг айнан М8 генотипидаги 15 та турли ген аъзолари тўғрисида баён этилган. Бунга бизнинг ПЗР ёрдамида амалга оширилган клонлаш тажрибаларида баъзи *MIC-3* гени аъзоларининг амплификацияланмай қолгани сабаб бўлиши мумкин.

Филограммада генларнинг 169 та аъзолари 17 та турли субоилаларга ажратилганлиги кўрсатилди (1-расм). *G. hirsutum* генотипидаги 110 та ген аъзолари 12 та субоилаларга ажратилди, булардан 1-9 гача бўлган субоилалар А₁-геномга, 10-12 гача бўлгани эса D₁-геномга хос бўлган. 13- ва 14-субоилалар *G. herbaceum*, 15- субоила *G. longicalyx*, 16- ва 17- субоилалар *G. raimondii* *MIC-3* гени оиласи учун хос бўлганлиги аниқланди. *G. mustelinum* *MIC-3* генининг биргина аъзоси (*MIC-3_14*) дан ташқари барча



1-расм. *Gossypium* туркумининг 86 та турли *MIC-3* генлари асосида тузилган «яқин қўшниларнинг бирлашуви» усулидаги эгри филогенетик шажараси:
Бутстреп қийматлари (>50%) кўрсатилган.

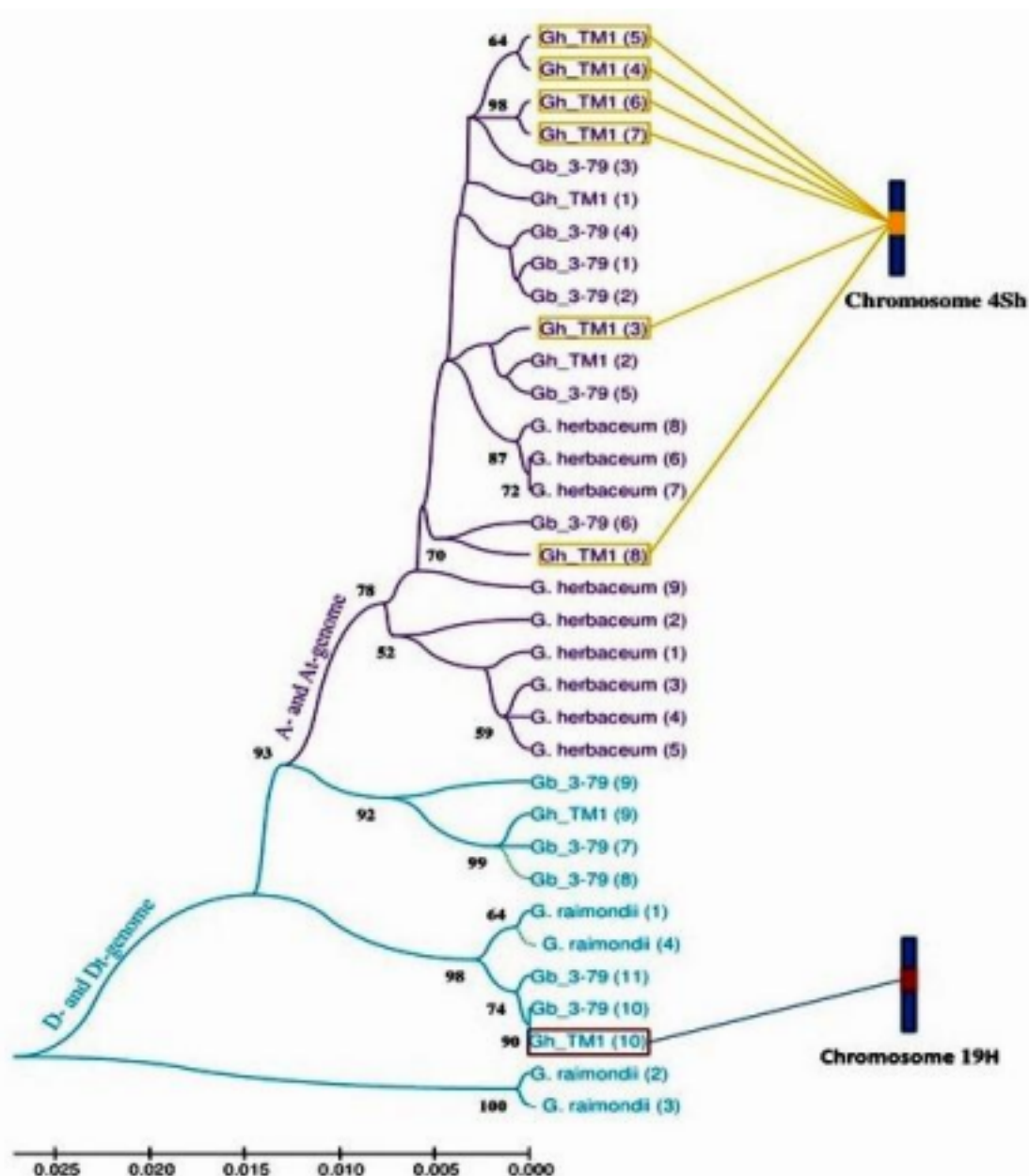
аллотетраплоид ген аъзолари *G. hirsutum* 12-оиласига киритилди (1-расм). Бироқ, *MIC-3_14* А-геномда топилган 13-субоилага киритилди. AD геномли ғўзаларнинг тахминий аجدодлари ҳисобланган *G. herbaceum* (А-геном) ва *G. raimondii* (D-геном) икки турли субоилага эга бўлган. Баъзи турлар учун хос бўлган субоилаларнинг мавжудлиги ҳам кузатилди. Масалан, 1-субоила касалликка чидамсиз изолиниялар ҳисобланган (S-изолиния) ST213 ва Clewewilt билан биргаликда фақатгина *G. hirsutum* турида аниқланди, 8-субоила эса M315-линиянинг, ҳамда 11-субоила M8 ва M315 ўрта толали ғўза линияларининг нуклеотид кетма-кетлигидан иборат эканлиги кузатилди.

Тетраплоид ғўзада *MIC-3* генларининг гаплотипларини аниқлаш учун *G. hirsutum* асосида тузилган *MIC-3* генларининг «қўшниларнинг бирлашуви» (Neighbour Joining) филограммасидан фойдаланилди. Чунки бу тур линияларда турли гуруҳларнинг кенг қамровли вакиллари мавжуд. *G. hirsutum* (AD) гаплотиплари тахминий икки йирик – 1) A_t -геном ва 2) D_t -геном гаплотиплари гуруҳига ажратилди. Бу гуруҳлаш диплоид ғўзаларнинг тахминий аجدодлари бўлган *G. herbaceum* ва *G. raimondii* кластеризациясига асосан амалга оширилди. *G. herbaceum* ва *G. raimondii* консенсус кетма кетликларидан гаплотиплар жадвалида референс кетма-кетлик сифатида фойдаланилди (диссертацияга қаранг). *G. hirsutum* *MIC-3* генлари субоилаларининг классификациясига (юқорида келтирилган) мувофиқ равишда натижалар шуни кўрсатдики, *G. hirsutum* туркумининг A_t -геномида ўртача 3,5 аллел ёки гаплотип/локус бўлган 9 та, D_t -геномида эса ўртача 3,3 тахминий аллел ёки гаплотип/локус бўлган 3 та тахминий локуслардан (гаплотип гуруҳлар) иборатлиги аниқланди. Тахминий локуслардаги гаплотиплар ёки тахминий аллелларнинг сони A_t -геномда 2 дан 6 гача ва D_t -геномда 4 дан 6 гача бўлганлиги аниқланди. Тетраплоид *MIC-3* ген кетма кетликларининг A_t -геномида 25 та SNP ва D_t -геномида 26 та SNP лардан ташкил топганлиги, уларнинг 113 (A, D), 162 (D) ва 568 (D) жойлашувларидан ташқари барчаси биаллел эканлиги маълум бўлди.

Ҳар бир SNP учун нуклеотид жуфтлигининг ўртача миқдори A_t -геномда 182,6 н.ж ва D_t -геномда 108,8 н.ж. узунлигига тенг. TM-1 (*G. hirsutum* учун стандарт линия) ва Pima 3-79 (*G. barbadense* учун қўш гаплоидли стандарт линия) ғўза линияларида *MIC-3* генларининг алоҳида филогенетикаси (1-расм) ва уларнинг секвенс таҳлилларига асосланиб, ушбу икки ғўза тури ўртасида полиморфизмларни аниқлашда муҳим бўлган GSP (геном специфик праймерлари) маркерлари дизайн қилинди. Кейинчалик ушбу кандидат ген маркерлари делеция таҳлили учун ишлатилди. Бу эса моносомик, монотелодисомик, CS-B ва NTN гибридларни ўз ичига олган цитогенетик коллекцияни скрининг қилиш орқали амалга оширилди (Stelly ва бошқ., 2005; Goutirez ва бошқ., 2009). Ҳар иккала ота-она турлари ўртасидаги полиморфизмлар деярли барча F_1 дурагайларда намоён бўлди. Бироқ, TM-1 ғўза линияси A_t -геномидан ажратиб олинган *MIC-3* генларининг 8 та турли

аъзоларидан 7 тасига хос бўлган барча 8 та GSP аллеллари 4-хромосома (H04 моносомик) ёки унинг калта елкаси (Te04Lo монотелодисомик) бўйича моносомик бўлган гипоанеуплоид F₁ ўсимликларда (*G. hirsutum*) учрамади.

16



2-расм. *G. hirsutum* (TM-1), *G. barbadense* (Pima 3-79) ва AD геномли ғўзаларнинг икки тахминий диплоид аجدодларининг *MIC-3* генлари асосида тузилган «яқин қўшниларнинг бирлашуви» усулидаги эгри филогенетик шажараси:

Шох узунликлари, бутстреп қийматлари (>50%), хромосомада жойлашуви ва геномнинг келиб чиқиши кўрсатилган, соддалаштириш мақсадида улар ранглар билан ажратилган.

Шунингдек, ушбу маркерларнинг барчаси 4-хромосомаси алмаштирилган CS-B04 линияда ҳам *G. hirsutum* *MIC-3* аллелларининг йўқлигини кўрсатди. Булардан фарқли равишда, барча 8 та GSP локуслари бошқа бир нечта хромосомаси алмаштирилган линиялар ва 4-хромосоманинг узун елкаси йўқ (нуқсонли) монотелодисомик F₁ ўсимликда (Te04sh)

гетерозигота ҳолатда бўлганлиги аниқланди.

Тўпланган натижалар ТМ-1 линиясининг 8 та A_1 -геном *MIC-3* аъзоларидан 7 таси 4-хромосоманинг калта елкасида жойлашганлигини кўрсатиб, ғўза геномида *MIC-3* генларининг кластерли жойлашуvidан

17

далолат беради (2-расм). Гарчи, ТМ-1 ва Pima 3-79 линиялари ўртасидаги D_1 -геном *MIC-3* гаплотипга хос бўлган турли GSP маркерлари аниқланган бўлсада, улар делеция таҳлиллари, ҳамда хромосомал локализация тажрибаларида полиморф эмаслигини кўрсатди. 3-79 *MIC-3* аъзоларида ўзаро бир-бирини қопловчи сайтларнинг мавжудлиги, цитогенетик линияларда GSP полиморфизмларни фарқлашни қийинлаштирди. Аммо, *G. mustelinum* линияси *MIC-3* аъзоларининг батафсил секвенс таҳлиллари икки турдаги GSP праймерларини (ТМ-1 ва Pima 3-79 ўртасида полиформик бўлмаган) тузишимиз учун ёрдам берди. Ушбу праймерлар делеция таҳлилида генотипга хос бўлган аллелларни аниқловчи бўлиб, ТМ-1 ва *G. mustelinum* *MIC-3* ген аъзолари ўртасида полиморфизмга эга. Учламчи моносомик F_1 турлараро NTN 12-19 ва NTN 10-19 гибридларида ТМ-1 аллели турлича етишмаган. Ушбу ТМ-1 аллели SNP маркерига хос, аммо *G. mustelinum* аллелига мос эмас. NTN 12-19 ва NTN 10-19 ўсимликларида ТМ-1 линиясига хос бўлган 12- ва 19- ҳамда 10- ва 19-хромосомаларнинг узун ёки калта елкалари нуқсонли бўлиб, уларда ушбу хромосомаларнинг тегишли қисмлари мавжуд эмас. Булар биргаликда, ТМ-1 линияси D_1 -геном *MIC-3* аъзоларидан бирининг (*MIC_3_10*) 19-хромосомадаги чегарасини аниқлаб беради. Бироқ, 10- ва 12-хромосомалари нуқсонли бўлган биринчи авлод турлараро моносомик дурагайлари (Н10 ва Н12) соғлом F_1 дурагай каби GSP *MIC-3* маркерларининг ТМ-1 ва *G. mustelinum* аллеларига эга бўлганлиги аниқланди.

Натижалар D_1 -геномдан олинган *MIC-3* гени аъзоси ушбу хромосомаларда эмас, балки 19-хромосомада жойлашганлигини кўрсатди. Шунингдек, яна бир қатор бошқа хромосомалари бўйича нуқсонли бўлган гипо-анеуплоид F_1 ўсимликлари ҳам соғлом F_1 дурагай каби SNP маркерларининг ТМ-1 ва 3-79 линияларидан ўтган аллелларига эга бўлганлиги маълум бўлди. *G. hirsutum* ғўза турида ҳозирча 19-хромосоманинг дастлабки моносомик линияси йўқлиги боис натижалар ушбу D_1 -геном *MIC-3* аъзосининг *G. hirsutum* ғўза тури 19-хромосомасида жойлашганлигини аниқ билиш имконини бермайди.

MIC-3 генлари экспрессиясининг таҳлиллари вилт патогени билан зарарланган ва зарарланмаган бир қанча ғўза генотипларида олиб борилди. Бунда *MIC-3* генлари *Fusarium* ва *Verticillium* билан зарарланган тўқималарда юқори даражада оверэкспрессиялангани аниқланди. Оверэкспрессия чидамли генотипларда сезиларли даражада юқори бўлгани аниқланди. Ушбу маълумотлар *MIC-3* генларининг нафақат илдизда шиш ҳосил қилувчи (галл нематодаси) (RKN) нематода касаллигида, балки касалликка алоқадор бўлган

оқсил (PR-protein) каби ғўзанинг вилт касаллиги ва бошқа касалликлардан химояланишида муҳим роль ўйнаши кўрсатиб берилди.

Диссертациянинг «*Gossypium* турларида *MIC-3* ген оиласининг молекуляр эволюцияси» деб номланган тўртинчи бобида 15 тетраплоид ва диплоид ғўза генотипларида нуклеотид алмашинуви тезлиги ва *MIC-3* мультиген оиласининг молекуляр эволюцияси намуналари тўғрисида маълумот берилган.

18

Тадқиқотлар қуйидаги натижаларни ўз ичига олади:

Барча 169 та *MIC-3* ген аъзоларининг интрон ва UTR секвенс регионларини олиб ташланиши натижасида *MIC-3* ген аъзолари учун характерли бўлган ва уларни кодловчи 131 та ДНК секвенси 15 та ғўза генотипларидан топилди, ҳамда улар кейинчалик тахминий оқсил кодловчи кДНК секвенслари алоҳида 56 та гуруҳларга ажратилди. Ушбу кодловчи ДНК кетма-кетликлари кўп бора ClustalX дастури ёрдамида 423 н.ж. узунлигига муваффақиятли тенглаштирилди, бу дастур *MIC-3* генларининг бутун кодловчи регионларини, шу жумладан биринчи (231 н.ж.) ва иккинчи (192 н.ж.) экзонларни қамраб олади. Бу 56 та ўзига хос тахминий кДНК кетма-кетликлари, барча 15 ғўза генотипларида назарда тутилган 29 хил махсус оқсил кетма-кетликларини ҳосил қилди. Умумий олганда, *Gossypium* туркумининг тахминий *MIC-3* оқсил кетма-кетликлардаги аминокислоталар фарқи 141 аминокислота позицияларидан (30%) 42 позициясида аниқланди.

A_1 -геномдан олинган оқсил гуруҳларига нисбатан D_1 -геномдан олинган тахминий *MIC-3* оқсилларида кўплаб аминокислота ўзгаришлари рўй берган. Аминокислоталар ўзгариши тахминий *MIC-3* оқсилларининг A_1 - ва F-геном гуруҳларида нисбатан камроқ кузатилган. Бундан фарқли ўлароқ, энг кўп сонли аминокислота ўзгаришлари D_5 - геномли *MIC-3* генларининг барча 4 тахминий оқсилларида кузатилди.

Шунингдек, *MIC-3* генлари оиласининг молекуляр эволюцияси *Gossypium* генотипларининг 15 та тетраплоид ва диплоид вариациясига асосланиб ўрганилди, булар биргаликда филогенетик жиҳатдан турли етти геномларни ифодалайди ва улардан кўпинча эволюцион тадқиқотларда фойдаланилади. Синоним (d_S) ва носиноним (d_N) нуклеотидлар алмашинувининг тезлиги *MIC-3* генларининг ҳар иккинчи экзони ижобий танлов босими остида эканлигини тахмин қилишга имкон беради, бу вақтнинг ўзида функцияларни сақлаш учун биринчи экзон кучли изоляцион танлов босими остида бўлади (2-жадвал). Нуклеотидлар алмашинуви коэффицентларига асосланиб, биз қуйидаги хулосага келдик, яъни кучли изоляцион танлов остида 1-ва 2-экзонда дивергент танловда *MIC-3* генлари «туғилиш ва ўлим» жараёни ёрдамида эволюцияга учрайди (2-жадвал). Олинган натижаларга кўра, «ген амплификацияси» механизми *MIC-3* генларининг икки ҳисса ортган барча нусхаларини *Gossypium* геномларида сақлаш учун ёрдам беради, бу ўз навбатида R-ген эволюциясининг «шарпали ўлжа» моделига айнан мутаносибдир.

Маълумотлар *MIC-3* генларининг дупликацияси турли тезликларда содир бўлганини кўрсатади, аллотетраплоидларда ~1 миллион йилда бир марта, A/F геном тўпламида ~2 миллион йилда бир марта ва D геном тўпламида ~8 миллион йилда бир марта (3-расм). *MIC-3* генлари оиласидаги ўзгаришлар функционал турғунликни (1-экзонда изоляцион танлов орқали) ошириш мақсадида гўёки эволюцион танловни акс эттиради, шу билан бир вақтда турли зараркунанда ва патогенларга жавоб бериш мақсадидаги янги «ўзгартирувчи» (2-экзонда дивергент танлов орқали) ишланмалар учун имкониятларни кенгайтиради. Бундай эволюцион роллар гипотезага мувофиқ

19

2-жадвал

Ўзанинг *MIC-3* ген оиласи учун нуклеотид алмашинуvinинг генотип ичидаги ўртача кўрсаткичлари

Генотиплар	Геном	A _t			D _t			Умумий*		
		d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S
Gh_TM-1	[AD] ₁	0.80	2.19	0.37	4.19	4.33	0.97	1.85	2.57	0.72
Gh_Sisoline	[AD] ₁	0.69	1.94	0.36	4.19	4.33	0.97	1.56	2.34	0.66
Gh_M315	[AD] ₁	0.67	1.89	0.35	2.86	3.49	0.82	1.57	2.38	0.66
Gh_M8	[AD] ₁	0.78	1.94	0.40	3.53	3.23	1.09	1.36	2.14	0.64
Gh_Clewevilt	[AD] ₁	0.80	1.89	0.42	2.79	2.86	0.98	1.61	2.16	0.74
Gh_Golib	[AD] ₁	0.66	2.24	0.30	4.19	4.33	0.97	1.50	2.55	0.59
Gh_M240	[AD] ₁	0.76	2.09	0.36	4.19	4.33	0.97	1.67	2.46	0.68
Gh_ST213	[AD] ₁	0.58	2.04	0.28	4.19	4.33	0.97	1.37	2.48	0.55
Gh_REDM	[AD] ₁	0.97	1.97	0.49	4.04	3.74	1.08	1.51	2.37	0.64
Gb_Pima 3-79	[AD] ₂	0.31	1.04	0.30	2.84	2.76	1.03	1.90	1.87	1.02
<i>G. mustelinum</i>	[AD] ₄	0.39	0.79	0.49	2.30	2.11	1.09	1.73	1.34	1.29
<i>G. tomentosum</i>	[AD] ₃	0.49	0.83	0.60	2.90	2.84	1.02	1.78	1.62	1.10
<i>G. herbaceum</i>	A ₁	-	-	-	-	-	-	0.43	0.41	1.05
<i>G. raimondii</i>	D ₅	-	-	-	-	-	-	3.70	2.83	1.31
<i>G. longicalyx</i>	F	-	-	-	-	-	-	0.35	2.37	0.15
Хамма <i>G. hirsutum</i>	[AD] ₁	2.06	0.61	0.30	2.79	2.37	0.85	1.32	2.39	0.55
Хамма <i>Gossypium</i> турлари	-	1.90	0.58	0.31	2.57	2.20	0.86	1.80	2.58	0.70

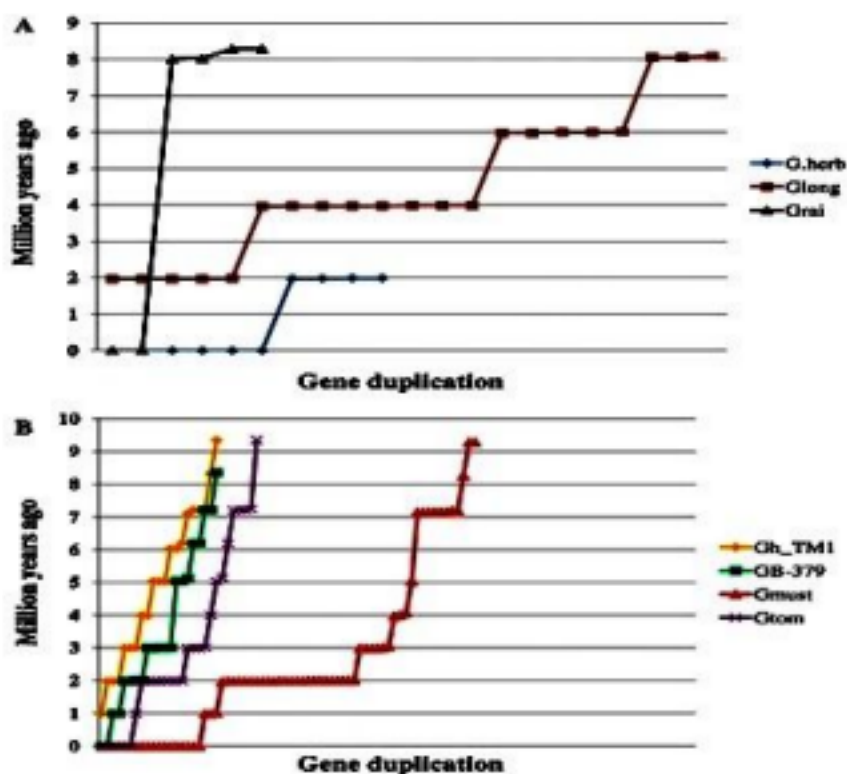
Эслатма: Gh – *G. hirsutum*; Gb – *G. barbadense*; Sisoline – чидамсиз изолиния; *Умумий A_t ва D_t комбинацияси; d_s – синоним нуклеотидлар алмашинуви тезлиги; d_N – носиноним нуклеотидлар алмашинуви тезлиги; $d_N:d_s$ – носиноним алмашинувнинг синоним алмашинуви кўрсаткичига бўлган нисбати, икки кетма-кетликнинг бир-биридан ажралишидан бошлаб, яъни бу тахминан $d_N:d_s$ билан баробар, носиноним алмашинувларнинг синоним алмашинувларга бўлган сонлар нисбати; қалин ҳарфларда 1 кўрсатилганга нисбатан $d_N:d_s$ қийматлари юқорироқ; d_N ва d_s қийматлари 100х га кўпайтирилган.

ҳисобланади, яъни ушбу ноёб чидамлилик генлари оиласи аъзолари томонидан *Gossypium* туркумида зараркунанда ва патогенларга қарши курашда мослашувчан афзалликлари билан таъминланади.

Диссертациянинг «**MIC-3 генлараро регионларидан илдиз специфик промоторларни молекуляр тавсифлаш ва илдиз учун специфик экспрессияни амалга ошириш мақсадида илдиз специфик промотор билан генетик конструкциялар яратиш**» деб номланган бешинчи бобида ғўза биотехнологияси келажаги учун фойдали бўлган, илдиз учун хос, минимал узунликдаги *MIC-3* гени промотерининг нуклеотид кетма кетликлари ҳамда синтетик РНК дуплекслар ёрдамида вектор конструкцияси яратилган.

Тадқиқотлар қуйидаги натижаларни ўз ичига олади:

20



3-расм. *Gossypium* диплоид ва аллотетраплоид турларининг *MIC-3* гени оиласида ген дупликацияси намунаси:

(A) диплоид турлар: Gherb – *G. herbaceum*; Glong – *G. longicalyx*; Grai – *G. raimondii*; (B) – аллотетраплоид турлар: Gh_TM1 – *G. hirsutum* TM-1, GB-379 – *G. barbadense* Pima 3-79; Gmust – *G. mustelinum*, ва Gtom – *G. tomentosum*. **Эслатма:** ушбу изланишларда фойдаланилган бошқа *G. hirsutum* генотиплари (Sisoline, M315, Cleviewilt, M240, ST213, Golib, M8 ва REDM) ҳам худди шундай ген дупликацияси намунасига эга, улар бу ерда

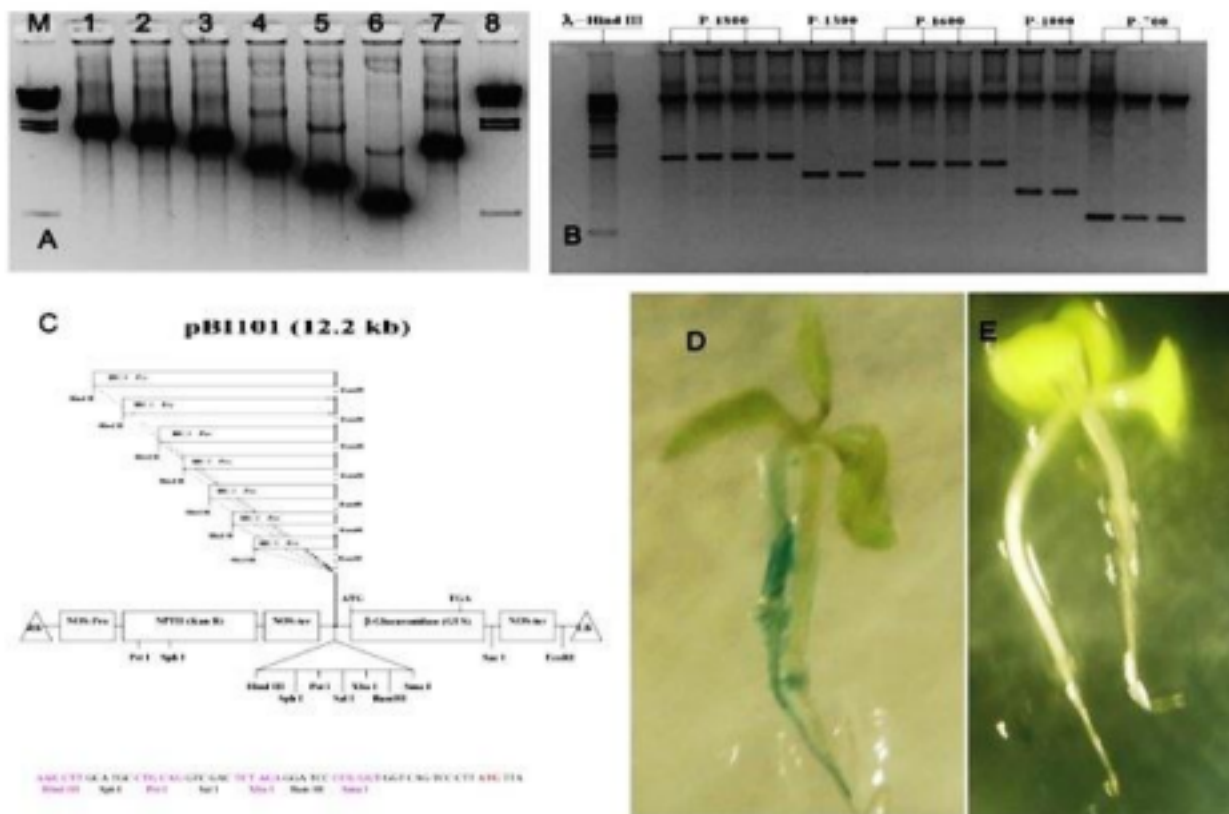
келтирилмаган. Дивергенция вақти баҳолари (MYA) *MIC-3* аъзоларининг жуфтликлардаги синоним алмашинувлари тезлиги коэффицентини ҳар бир генотип/турлар учун $2,6 \times 10^{-9}$ синоним алмашинувларни сайт/йил нисбатидан фойдаланиб ҳисобланган.

MIC-3 гени кластерларининг 2,5 kb генлараро регионлари амплификация қилинди, клонланди ва *MIC-3* генларининг биринчи экзон қисмидан тузилган праймерлар жуфтлиги ёрдамида нуклеотидлар кетма-кетлиги аниқланди. Кўплаб нуклеотидлар кетма-кетлиги алайнментлари (қиёсламалари) учун 220-240 н.ж. (тўғри) ва 130-154 н.ж. (тескари) консенсус позициясидан фойдаланилди. Ушбу генлараро *MIC-3* гени кетма-кетлиги таҳлилларининг натижасида ТАТА-боксда промотор кетма-кетлиги хусусиятларини, ҳамда патоген ва илдизга хос кўплаб турли мотивлар кетма-кетлигини идентификациялаш имконини берди. Ушбу 2,5 kb промотор кетма кетлигининг турли фрагментларини амплификация қилиш учун бир нечта праймер жуфтликлари тузилди.

Бу минимал промотор регионларини аниқлаш учун имкон яратди. Тузилган праймер жуфтликларининг охирида фермент рестрикция сайтлари мавжуд бўлиб, улар *GUS* репортер генини ўзида тутган бинар плазмида векторига киритиш учун муҳим ҳисобланади. Бизнинг тадқиқотимизда *MIC-3* генининг 2562 н.ж. промотор фрагменти Hind III ва BamHI рестрикция сайт адаптерларини ўзида тутган праймерлар жуфтлиги билан қайта

21

амплификация қилинди. 5'-терминал делецияларининг турли узунликдаги қисқартирилган промотор фрагментлари ҳар бирига хос праймерлар жуфтлиги ёрдамида бир хил тарзда амплификация қилинди (4-расм). Ушбу промотор фрагментлари оммавий фойдаланилиши мумкин бўлган pBI101 векторига киритилди, бу *GUS* генини кодловчи регионнинг юқори қисмида жойлашган. Натижада pBI101-MIC3_Pr::GUS серияли бинар векторлари асосида қуйидагилар тузилди: P-2500 (- 2500/-1, 2500 н.ж.), P-2200 (- 2200/-1, 2200 н.ж.), P-1800 (-1882/-1, 1882 н.ж.), P-1600 (-1658/-1, 1658 н.ж.), P-1300 (-1381/-1, 1381 н.ж.), P-1000 (- 1057/-1, 1057 н.ж.), P-700 (-708/-1, 708 н.ж.).



4-расм. *MIC-3* промотори функциясини тасдиқлаш:

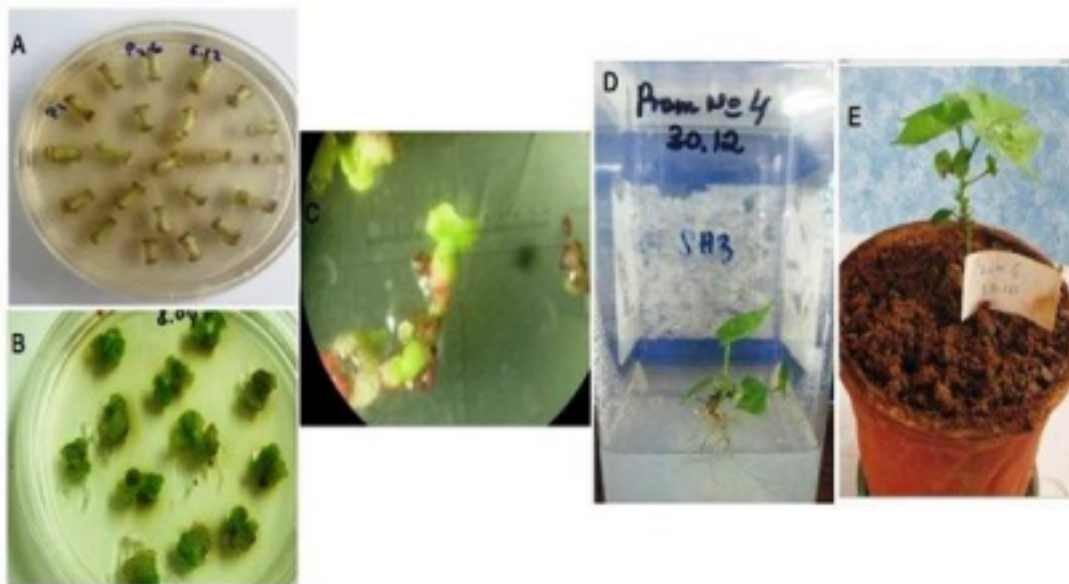
A – *MIC-3* гени промоторининг фрагментларга ажратилган нуклеотид кетма-кетлиги [1,9-Marker λ /Hind III, 2 Pr-2500, 3 Pr-2200, 4 Pr-1882, 5 Pr-1381, 6 Pr-1057, 7 Pr-708, 8 Pr-1658]; B ва C – *GUS* маркер генини ўзида тутган pBI101 бинар векторига субклонлаш. P-700::GUS ни экспрессияловчи трансген арабидопсис ўсимликларида *GUS* экспрессияси намунасини гистокимёвий бўяш; (D) – 1 ҳафталик трансформация қилинган ниҳолча; (E) – назорат арабидопсис ўсимлиги.

Векторлар *Agrobacterium tumefaciens* бактерияларининг LBA4404 штамми (ғўза трансформацияси учун) ёки GV3101 штаммига (арабидопсис трансформацияси учун) киритилди, ҳамда арабидопсис ўсимлигида *in planta* трансформация тажрибалари ўтказилди. Бу *MIC-3* промоторининг 708 н.ж. узунлигидаги минимал региони ҳар қандай ген экспрессияни ўсимликнинг илдиз қисмига йўналтириш учун етарли бўлишидан дарак беради. Векторсиз трансформация тўпламлари билан биргаликда, ушбу *MIC-3* вектор тўплами Coker-312 ғўза навининг жами 1383 дона гипокотил кесмаларига трансформация қилинган. Векторсиз тўплам сифатида, яъни салбий назорат

22

учун 125 дона гипокотил кесмалари сув билан ишлов берилди. Соматик регенерация усулида *GUS* маркер генини бошқарувчи *MIC-3* гени промотор регионларини ўзида тутган бир неча трансген ғўза ўсимликлари олинди (5-расм) ва улар навбатдаги молекуляр ва функционал босқичларда тавсифлаш учун ўстирилмоқда. Илдиз учун специфик бўлган бу ноёб промотор фақатгина ўсимлик илдизида ҳар қандай ген экспрессиясини амалга ошириш учун ўсимликлар биотехнологияси соҳасида фойдали бўлиши мумкин. Шунингдек, *MIC-3* генлари учун синтетик РНК

дуплекарларидан иборат бинар векторлар асослари яратилган ва оптималлаштирилган бўлиб, улар ушбу генлар фаоллигини ўрганиш учун тайёрлаб қўйилган.



5-расм. *MIC-3* специфик промотор конструкциялари қўлланилган ғўза трансформацияси ва соматик эмбриогенези:

А – гипокотил кесмалари; В – каллусогенез; С – соматик регенерация қилинган эмбрион ўсимликлар; D – илдиз ва ниҳоллар ривожланиши; Е – тупроқли тувакларга кўчириш.

ХУЛОСА

«Ќўзада (*Gossypium* spp.) патогенларга чидамлиликини белгиловчи *MIC-3* кластер генлар оиласини клонлаш, тавсифлаш ва молекуляр эволюциясини ўрганиш ҳамда бу генларнинг ғўза биотехнологиясидаги аҳамияти» мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Биринчи марта комплекс, йирик, фақат ғўза учун хос бўлган ва илдизда экспрессияланувчи *Gossypium* тури аллотетраплоид ва диплоид ғўза геномларида *MIC-3* ген оиласининг жойлашган ўрни ва структураси аниқланди, клонланди ҳамда секвенс қилинди.

2. 15 та ғўза генотипларидан жами 169 та *MIC-3* гени аъзоларининг ҳар бир генотип/турлари 2-10 та субоилалардан, 4-16 тагача ген аъзоларидан иборат эканлиги билан изоҳланади.

23

3. Барча *MIC-3* гени аъзолари нуклеотидлар полиформизми (SNPs) ва тахминий гаплотиплари филогенетик гуруҳ жиҳатдан жами 17 та геном специфик субоилаларга мансублиги билан тасдиқланади.

4. Аллотетраплоид геномлардан ажратиб олинган *MIC-3* гени аъзоларининг кейинги таҳлилари натижасида аниқланган A_1 -ёки D_1 -геномлар учун хос бўлган 42 гаплотип кетма-кетликлардан *MIC-3* гени специфик SNP полиформизмларни аниқлашда фойдаланиш тавсия этилади.

5. Биринчи марта *MIC-3* асосида геном специфик SNP маркерлари яратилган ҳамда гаплотипик ассоциациялари ва узун-ПЗР тажрибалари ёрдамида *G. hirsutum* тури 4- ва 19-хромосомаларининг гомелог сегментларида *MIC-3* гени аъзоларининг кластерли жойлашувлари исботланди.

6. Биринчи марта 15 та тетраплоид ва диплоид ғўза генотипларида нуклеотид алмашинуви тезлиги ва *MIC-3* мультиген оиласининг молекуляр эволюцияси асосланган. *MIC-3* гени оиласининг ДНК кетма-кетликларини кодлаш учун синоним (d_S) ва носиноним (d_N) нуклеотидлар алмашинувининг ўртача миқдорини баҳолаш орқали ғўза геномида ушбу ген оиласининг селектив чекловлари ва молекуляр эволюцияси аниқланди.

7. Молекуляр эволюциянинг бошида турғунлаштирувчи «ҳамкорликдаги» эволюция амалга ошган бўлсада, *MIC-3* генлари «туғилиш ва ўлим» эволюцион модели остида 1-экзонда тозаловчи ва 2-экзонда дивергенцияловчи селекция таъсирида эволюцияланиб бориши билан асосланади.

8. Натижалар «ген амплификацияланиши» *MIC-3* генлари барча дупликацияланган нусхаларининг сақланиб қолишини таъминловчи механизм сифатида эканлиги ва ғўзани ҳимояланиш жараёнида генларнинг янги функцияларини «шарпали ўлжа» модели остида яратилиши билан изоҳланади.

9. *MIC-3* генларининг дупликацияси аллотетраплоид геномларда ҳар ~1 миллион йилда, A/F геномларда ҳар ~2 миллион йилда ва D геномларда ҳар ~8 миллион йилда битта дупликация содир бўлиши аниқланган ген дупликацияси намунаси ғўза геноми эволюциясида патоген воситасидаги селекция жараёнларининг ролини тушуниш учун тавсия этилади.

10. Ғўза навларининг чидамли ва чидамсиз генотипларида *Fusarium* ва *Verticillium* билан зарарланиши жараёнида *MIC-3* генларининг юқори даражадаги экспрессияланганлиги, *MIC-3* генларининг муҳим аҳамиятга эгалиги билан асосланади.

11. Илк маротаба ғўза илдизи учун хос сигнал кетма-кетлигига эга *MIC 3* промоторини ўз ичига олган 2,5 кб узунликдаги генлараро спейсер региони клонланган, нуклеотид кетма-кетлиги секвенс қилинган ва промотор мотивлари тавсифланган.

12. Ғўза илдиз учун хос, минимал узунликдаги *MIC-3* гени промоторининг нуклеотид кетма-кетликлари ҳамда синтетик РНК дуплексларига эга бир нечта генетик бинар векторлар тузилди, трансформация қилинди ва улар ўсимликлар биотехнологияси учун тавсия этилди.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ЦЕНТР
ГЕНОМИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ**

БУРИЕВ ЗАБАРДАСТ ТОЖИБАЕВИЧ

**КЛОНИРОВАНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ
MIS-3, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАТОГЕНАМ
ХЛОПЧАТНИКА (*GOSSYPIMUM* spp.) И ИЗУЧЕНИЕ ИХ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭВОЛЮЦИИ, А ТАКЖЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭТИХ
ГЕНОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

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

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

25

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за № 14.07.2016/B2016.3.B158.

Докторская диссертация выполнена в Центре геномики и биоинформатики АН РУз.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице Научного совета (www.flora-fauna.uz) и Информационно-образовательном портале «ZiyoNET» (www.ziynet.uz).

Научный консультант Абдурахмонов ИброхимЮлчиевич доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Мухамедов Рустам Султанович доктор биологических наук, профессор

Турдикулова Шахлохон Уткуровна
доктор биологических наук

Ризаева София Мамедовна
доктор биологических наук, профессор

Ведущая организация: Институт микробиологии

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2016 года в ____ часов на заседании разового Научного совета на основе Научного совета 14.07.2016.В.15.01 при Институте генофонда растительного и животного мира, Национальном университете Узбекистана и Институте генетики и экспериментальной биологии растений (Адрес: 100053, г.Ташкент, ул. Богишамол, дом 232. Актывый зал Института генофонда растительного и животного мира. Тел.: (+99871) 289-04-65, факс (+99871) 262-79-38, e-mail: igppa@academy.uz).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института генофонда растительного и животного мира (зарегистрировано за № ____). Адрес: 100053, г.Ташкент, ул. Богишамол, дом 232. ИГРЖМ. Тел.: (+99871) 289-04-65.

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

К.Ш. Тожибаев

председатель Научного совета по присуждению
учёной степени доктора наук, д.б.н.

Б.А. Адилев

ученый секретарь Научного совета по
присуждению учёной степени доктора наук,
к.б.н., старший научный сотрудник

Ш.Юнусхонов

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

Актуальность и востребованность темы диссертации. В связи с углублением глобализации на сегодняшний день усилена обеспокоенность в обеспечении биологической безопасности в мировом сельском хозяйстве и защите его от биотических (в виде фитопатогенов и вредителей) угроз. «Вред патогенных организмов в мировом сельском хозяйстве, оценен в 1,4 триллиона долларов. Это равно 5% глобальной валовой внутренней продукции»¹.

За годы независимости, в нашей стране ведутся широкомасштабные работы по повышению урожайности сельскохозяйственных культур и на сегодняшний день сельскохозяйственное производство составляет часть ежегодного экономического дохода страны. При этом осуществляются реформы в отрасли хлопководства и на основе проводимых программных мер получены определённые результаты, то есть, сокращены площади посевов хлопчатника и увеличена урожайность в среднем на 3-4 центнера.

В процессе производства хлопка во всём мире разные патогены, такие как, вилт (*Fusarium* и *Verticillium*) и образующая галлы в корнях хлопчатника нематода (*Meloidogyne incognita*; RKN) наносят большой вред урожаю. На нематоды приходится примерно 14% от всех мировых потерь, что выражается в сумме около \$ 100 млрд. долларов в год. «Значительные потери урожая хлопка в США за последние 10 лет из-за нематоды оцениваются примерно в 205 млн. долларов в год»². С этой точки зрения, проблема борьбы с патогенами действительно является одной из важнейших задач мировых исследований на хлопчатнике, поэтому необходимо исследовать распространение болезней, а также развивать современные методы биотехнологии. Проведение исследований по изучению генетических основ борьбы с нематодой обосновываются следующим образом: необходимо выявление генов; придающих устойчивость к патогенам у хлопчатника; обоснование их структуры и состава в геноме хлопчатника; определение места расположения на хромосомах; исследование современных средств биотехнологии и геномики для получения устойчивых к патогенам линий.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Законом Республики Узбекистан №116-II «О защите сельскохозяйственных растений от вредителей, болезней и сорняков» от 31 августа 2000 г., Постановлением Кабинета Министров Республики Узбекистан №148 «О мерах по совершенствованию структуры и повышению эффективности службы защиты растений» от 29 марта 2004 г., а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий

¹<http://www.fao.org/docrep/018/i3300e/i3300e.pdf>.

²<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx>

Узбекистана V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и защита окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации.

Научные исследования, направленные на молекулярно-генетическое изучение устойчивости хлопчатника (*Gossypium* spp.) к патогенам осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, Texas A&M University (США), Mississippi State University (США), University of California (США), University of Georgia (США), CSIRO Plant Industry (Австралия), United States Department of Agriculture (США), Northeast Institute of Geography and Agroecology (Китай), а также в Центре Геномики и биоинформатики (Узбекистан).

В результате исследований, проведенных в мире по молекулярно-генетическому изучению устойчивости хлопчатника (*Gossypium* spp.) к патогенам получен ряд научных результатов: выявлена взаимосвязь между нематодами и вилтом, опасности нематоды и вилта в комплексе, а также обнаружены несколько ДНК-маркеров, связанных с этой болезнью (California University, США); картировали, используя микросателлитные маркеры, QTL локусы устойчивости к RKN на хромосомах 11 и 14 упланд-хлопчатника (United States Department of Agriculture, США); выявлены Mi-C11 и Mi-C14 локусы при использовании большого числа ДНК маркеров (SSR и AFLP маркеры) и обследований 1221 F₂ особей генетической популяции (Georgia University, США).

В мире по молекулярно-генетическому изучению устойчивости хлопчатника (*Gossypium* spp.) к патогенам по ряду, приоритетных направлений, проводятся исследования, в том числе: определение новых генов устойчивости к патогенам; QTL картирование с помощью ДНК маркеров; определение места расположения устойчивых генов к патогенам на хромосомах; получение новых биотехнологических сортов, устойчивых к патогенам

Степень изученности проблемы. Большинство известных мультигенных кластерных генов связанных с устойчивостью, выявлены зарубежными учеными B.J.DeYoung et al.³; характеристика и генетическое картирование генов, кодирующих NBS-LRR белки устойчивости, у аллотетраплоидного хлопчатника определяли L.He et al.⁴; высокая экспрессия уникального корень-специфичного *MIC-3* (*Meloidogyne Induced Cotton-3*) белка хлопчатника из тканей растений, устойчивых к нематоду, при инфицировании нематодами была выявлены X.D.Zhang et al.⁵, F.E.Callahan et

³DeYoung BJ, Innes RW. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nat Immunol. 2006 Dec;7(12):1243-9.

⁴He L., Du C., Covaleda L., Xu Z., Robinson F.A., Yu J.Z., Kohel R.J., Zhang H.B. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LLR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*G. hirsutum* L.) // Mol Plant Microbe Interact. 2004. 17:1234–1241.

⁵Zhang X.D., Callahan F.E., Jenkins J.N., Ma D-P., Karaca M., Saha S., Creech R.G. A novel root-specific gene, *MIC-3* with increased expression in nematode-resistant cotton (*G. hirsutum* L.) after root-knot nematode infection // Biochim.Biophys.Acta. 2002. 1576:214-218

28

al.⁶; тогда как M.Wubben et al.⁷ показали, что мотивы устойчивости или домены «NBS-LRR like» не связаны, кроме того они определили предварительные свойства семейства *MIC-3* генов во время защитных реакций растений и доказали, что эти гены независимы от других известных защитных путей.

В Узбекистане генетическое изучение упланд-хлопчатника «Голиб», устойчивого к нематодам, проведено Х.Холматовым. Ш.Эгамбердиевым комплексно идентифицированы молекулярно-генетическими методами патогены рода *Fusarium*, а также изучены патогенные свойства видов и рас патогенов, встречающихся значительно чаще по отношению к местным сортам хлопчатника. Однако, кластерные супергены устойчивости к заболеваниям у хлопчатника еще не изучены полностью, как на национальном, так и на международном уровне. В данный момент, с научно практической точки зрения очень важно изучение молекулярной эволюции и характеристики семейства кластерных генов *MIC-3*, определяющих устойчивость к патогенам на хлопчатнике (*Gossypium* spp.) а также, применение этих генов в биотехнологии.

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

Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно исследовательских работ фундаментальных, прикладных и международных проектов Центра геномики и биоинформатики: Ф4-Т149 «Исследование структуры и функции генома хлопчатника для разработки маркер ассоциированной селекции» (2007-2011 гг.); UZB2-3101-TA-09 «Оценка потенциальной гермоплазмы устойчивости против галловой нематоды и фузариозного вилта и разработка кандидатных генетических маркеров, основанных на SNP» (2009-2013 гг.); «Получение высококачественных трансгенных линий хлопчатника с помощью бинарных генетических векторов, основанных на синтетических RNAi дуплексах, созданных для генов хлопчатника» (2009-2011 гг.).

Целью исследования является определение состава, структуры, расположения на хромосомах, а также механизмов дупликации и молекулярной эволюции *MIC-3* генов у аллотетраплоидных и близких к их предкам диплоидных геномов хлопчатника.

Задачи исследования:

клонировать и секвенировать все члены семейства *MIC-3* генов аллотетраплоидных и считающихся близкими к их предкам диплоидных геномов у видов *Gossypium*;

выполнить подробный филогенетический анализ и классификацию *MIC-3* генов на подсемейства у видов *Gossypium*;

⁶Callahan F.E., Zhang X-D., Ma D-P., Jenkins J.N., Hayes R.W., Tucker M.L. Comparison of *MIC-3* protein accumulation in response to root-knot nematode infection in cotton lines displaying a range of resistance levels // J Cotton Sci. – USA, 2004. 8:186-190.

⁷Wubben M.J., Callahan F.E., Hayes R.W., Jenkins J.N. Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the *MIC* (*Meloidogyne-induced cotton*) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*G. hirsutum* L.) // Planta. 2008. 228:111-123.

29

выявить предположительные гаплотипы *MIC-3* последовательностей в геноме хлопчатника и разработать SNP маркеры для подтверждения кластерной локализации членов *MIC-3* генов на специфических хромосомах, полезных для будущих программ маркер-ассоциированной селекции;

охарактеризовать предполагаемые белковые последовательности и скорости нуклеотидных замещений для изучения моделей и скорости молекулярной эволюции, дупликации генов и механизмов поддержания мультигенного семейства *MIC-3* до и после аллополиплоидизации в геноме хлопчатника;

исследовать эволюцию генома хлопчатника на основе информации *MIC 3* генов и повторно оценить время дивергенции геномов в роде *Gossypium*; исследовать адаптивные селекционные паттерны на основе синонимичных и несинонимичных коэффициентов замещения, способствующих устойчивости к нематодам и болезням;

сравнительно исследовать экспрессию *MIC-3* генов при инфицировании *Fusarium* и *Verticillium* у устойчивых и неустойчивых генотипов хлопчатника;

выявить межгенные спейсерные последовательности между несколькими *MIC-3* генами и на их основе создать бинарные векторы, содержащие в себе минимальный промоторный регион и трансформировать их в модельное растение *Arabidopsis* для определения в дальнейшем полезных для биотехнологии хлопчатника и растений промоторных последовательностей;

сконструировать и оптимизировать основы бинарных векторов, содержащих РНК дуплексы, для изучения функции растительных генов, включая *MIC-3* гены.

Объект исследования. В качестве растительного материала использованы удвоенный гаплоид вида *G. barbadense* Pima 3-79 ([AD]₂-геном), *G. tomentosum* ([AD]₃-геном), *G. mustelinum* ([AD]₄-геном) и 9 генотипов *G. hirsutum* ([AD]₁-геном), включая линию и сорта Clewewilt, M240, M315, Голиб, ST213, M8, Texas Marker-1 (TM-1), чувствительные изолинии (Sisoline) и красные мутантные линии (REDM). Кроме этого, тремя диплоидами, включенными в исследование, являлись *G. Herbaceum* (A₁-геном) и *G. raimondii* (D₅-геном), геномы, которые наиболее близкородственны к A_t-(A-субгеном) и D_t-(D-субгеном) геномам, ныне существующих AD тетраплоидных видов, и F-геном африканского дикого хлопчатника *G. longicalyx*. Использовано делеционное тестирование для определения хромосомной локализации *MIC-3* генов путем скрининга полиморфизмов у моносомных и монотелодисомных интерспецифичных F₁

гибридов *G. hirsutum* x *G. barbadense* и аналогичных первичных моносомных F₁ гибридов *G. hirsutum* x *G. mustelinum*.

Предметом исследования являются уникальные гены *MIC-3*, которые управляют устойчивостью к заболеваниям, выявленные из 15 тетраплоидных и диплоидных генотипов хлопчатника.

Методы исследования. В работе были использованы основные методы

30

молекулярной биологии (выделение ДНК, секвенирование и клонирование генов), анализ генетической структуры, филогенетическое кластерирование, методы генной рекомбинации и конверсии, времени молекулярно эволюционной дивергенции, разработки маркеров и бинарных векторных конструкций, генетической трансформации, а также современные методы биоинформатики и статистического анализа.

Научная новизна исследования заключается в том, что:

впервые клонировано, секвенировано и охарактеризовано 169 индивидуальных членов, принадлежащих к супергенному семейству *MIC-3* из 15 аллотетраплоидных и диплоидных генотипов;

выявлено на основе анализа 169 *MIC-3* генов, что в 15 генотипах хлопчатника имеются от 4 до 16 членов гена, которые делятся на 2-10 подсемейства. У всех видов *Gossypium* эти последовательности 169 *MIC-3* генов были филогенетически разделены в общем количестве на 17 геном специфичных подсемейств;

доказано на основе анализа *MIC-3* генов, выявленных у аллотетраплоидных видов, наличие 42 гаплотипных последовательностей, характерных для A_t- и D_t-геномов. Были созданы SNP маркеры, идентичные *MIC-3* генам и на основе гаплотипных и подсемейственных групп, были определены 9 предполагаемых *MIC-3* локусов в A_t-геноме и 3 предполагаемых локуса в D_t-геномах аллотетраплоидного хлопчатника;

впервые созданы SNP маркеры, полученные из геном-специфичных *MIC-3* генов, и выявлено, что *MIC-3* гены расположены в кластерном виде на 4- и 19-гомеологичных хромосомах хлопчатника;

впервые определены скорости нуклеотидных замен и процессы молекулярной эволюции *MIC-3* генов у 15 тетраплоидных и диплоидных генотипов хлопчатника;

выявлено на основе оценки среднего числа синонимичных (d_s) и несинонимичных (d_N) нуклеотидных замен для кодирующих последовательностей ДНК семейства *MIC-3* генов, что несмотря на раннюю «совместную» эволюцию, семейство *MIC-3* генов видов хлопчатника развивается путем эволюции «рождения и смерти» с изолирующим отбором в экзоне-1 и дивергентной селекцией в экзоне-2;

впервые определена «амплификация гена» как возможный механизм сохранения всех дублирующих копий *MIC-3* генов и появление новых функций генов в процессе защиты хлопчатника в рамках модели «исчезающей приманки»;

доказано, что дубликации *MIC-3* генов в различных геномах происходили с различными скоростями. Выявлено, что одна дубликация происходит один раз за ~1 миллион лет у аллотетраплоидов, один раз в ~2 миллиона лет у A/F геномов, и один раз в ~8 миллионов лет у D-геномов; по анализу экспрессии *MIC-3* генов выявлена активность генов у генотипов, устойчивых к вилту *Fusarium* и *Verticillium*; впервые клонирована, секвенирована и охарактеризована межгенная спейсерная последовательность региона длиной в 2,5 kb, содержащая корень-

31

специфичный промотор гена *MIC-3*.

Практические результаты исследования заключаются в следующем: охарактеризована последовательность семейства генов *MIC-3* в ДНК, которая рекомендуется как основа для использования в повышении устойчивости к вилту и нематод в программах современной селекции и биотехнологии хлопчатника;

разработаны SNP маркеры для *MIC-3* генов, которые рекомендуются для использования в маркер-ассоциированной селекции (MAC) хлопчатника для создания новых сортов;

составлено несколько бинарных генетических векторов, состоящих из маркерных генов *GUS* с последовательностями промотора *MIC-3*, которые трансформированы в модельное растение *Arabidopsis*. Рекомендуется, корень-специфичный минимальный промотор гена *MIC-3*, являющийся очень полезным в биотехнологии растений;

созданы синтетические RNAi векторные конструкции, используемые при изучении активности генов в биотехнологии растений, получены новые линии в биотехнологии хлопчатника.

Достоверность результатов исследования была подтверждена с помощью современных методов и подходов. Данные были обработаны, проанализированы и утверждены с использованием классических статистических методов, таких как вариационный анализ данных (ANOVA), анализ молекулярной вариации (AMOVA), анализ Wilcoxon и современные алгоритмы анализа последовательностей (Sequencher, ClustalX, Mega 4.1, BLASTX), методы филогенетического анализа (UPGMA, Mega 4.1, NJ), тесты генной конверсии и рекомбинации (GeneConv, DNASP, RDP3, SiScan) и анализ степени замещения (KaKs с поправками Juke-Cantor, Z-тесты на основе кодонов). Изменение синонимичных нуклеотидов в геноме хлопчатника в течение многих лет рассчитывали по формуле $r = Ks/2T$.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования интерпретируется обеспечением впервые полученных новейших знаний и пониманий о молекулярной эволюции, селективных силах, а также впервые обнаруженной «амплификации гена», как возможного механизма сохранения всех дубликаций копий *MIC-3* генов у диплоидных и тетраплоидных видов хлопчатника и появлением новых функций генов при защите хлопчатника в

рамках модели «исчезающей приманки» («bait and switch»).

Практическая значимость работы заключается в том, что SNP маркеры, полученные из *MIC-3* генов, сформированные на основе позитивной селекции и обеспечивающие повышенную устойчивость хлопчатника к заболеваниям, могут использоваться для современных МАС программ при создании сортов, устойчивых к нематодам и вилту, а также промотор *MIC-3* гена, может быть эффективно использован в биотехнологии растений для перенаправления функций любых генов к корням хлопчатника и других растений, в обеспечении безопасности многих трансгенных событий и созданием синтетических RNAi векторных конструкций, используемых в

32

изучении активности генов.

Внедрение результатов исследования. Благодаря изучению молекулярной эволюции и характеристики семейства кластерных генов *MIC-3*, а также на основе результатов, полученных в рамках использования этих генов в биотехнологии хлопчатника:

получены патенты (12.01.2011, № IAP 04300; 02.06.2011, № IAP 04383; 23.05.2011, № IAP 04360; 23.05.2011, № IAP 04361) на изобретение Интеллектуального агентства Республики Узбекистан на метод малой интерферирующей РНК (siRNA) для подавления генной экспрессии в растительных клетках. Результаты научного исследования позволили создать новые линии путем трансформации векторных конструкций генов биотехнологии растений, например, за счет изучения активности *MIC-3* генов;

кластерные гены *MIC-3* использованы в рамках проекта № 6064-21000-014-00-D «Генетическое улучшение хлопчатника с помощью маркер ассоциированной и традиционной селекции, и интрогрессия генов из экзотических видов *Gossypium*» (2013 – 2018 годы), профинансированного Департаментом сельского хозяйства США (справка United States Department of Agriculture от 26 сентября 2016 года). При использовании кластерных генов *MIC-3* создана возможность получения устойчивых к нематодам линий, а также повышения устойчивости хлопчатника к патогенам.

Апробация результатов работы. Результаты исследования изложены в виде лекций и прошли апробацию на 13 международных и республиканских научно-практических конференциях, в том числе «Conference of American Society of Agronomy» (New York, 2006), «Ўсимликлар молекуляр биологиясининг долзарб муаммолари» (Тошкент, 2008), «Ѓўзанинг дунё генетик хилма-хиллиги асосий ва амалий лойиҳалар асосида» (Тошкент, 2010), «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010), «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2010), «International Cotton Genome Initiative conference» (Canberra, 2010), «5th World cotton Research Conference» (Mumbai, 2011), «International Cotton Genome Initiative (ICGI) conference» (Brasilia, 2006; Raleigh, 2012), «International Cotton conference» (Bremen, 2014), «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий

муаммолари» (Тошкент, 2016).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 28 научных работ. Из них 10 научных статей, в том числе 5 в республиканских и 5 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, а также получены 4 республиканских патента, связанных с методами использованными в данной работе.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 171 страниц.

33

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 под названием **«Гены резистентности и успехи геномики устойчивости»** приведены молекулярно-генетические исследования, проведенные по хлопчатнику.

Перечислены, использование генов устойчивости в биотехнологии растений, молекулярная эволюция и их характеристика, а также основные проблемы данного направления, обсуждены возможные пути их решения.

Вторая глава диссертации под названием **«Материалы, условия и методы исследования кластерных генов хлопчатника»** посвящается методам, использованным в исследовании.

Здесь приведено детальное описание растительного материала и использованных реагентов, методов выделения ДНК, клонирования, секвенирования ДНК и анализа последовательностей с использованием методов филогении, гаплотипирования, генной конверсии, рекомбинации и молекулярной эволюции с применением современных статистических подходов.

В третьей главе диссертации под названием **«Характеристика и хромосомная локализация *MIC-3* генов у видов *Gossypium*»** изучены состав, структура и расположение семейства генов *MIC-3*, а также, клонированы, секвенированы и охарактеризованы аллотетраплоидные и диплоидные геномы хлопчатника.

Исследования включают в себя следующие результаты:

Примерно 150 индивидуальных клональных инсерций, полученных при помощи ПЦР, для продуктов *MIC-3* генов секвенировали из каждого для 15 генотипов хлопчатника. Ампликоны *MIC-3* генов видов рода *Gossypium* колебались от 653-706 п.о., включая 653-706 п.о. длины ампликона у всех аллотетраплоидных генотипов, 703-713 п.о. ампликонов у *G. herbaceum*, 653-691 п.о. ампликонов у *G. raimondii*, и 706 п.н. ампликонов у *G. longicalyx* (таблица 1).

Множественное выравнивание последовательности формирует *MIC-3* полноразмерную консенсусную последовательность в 721 п.о для всех изученных видов *Gossypium*. Интронные и экзонные части *MIC-3* генов вида *Gossypium* были аннотированны, согласно *MIC-3* нуклеотидной и белковой последовательности (Zhang et. al., 2002).

Таблица 1

Характеристика семейства *MIC-3* генов видов *Gossypium*

Генотип	Число членов	Вариация длины ампликона	Инсерционно-делеционные изменения			Общие SNP
			экзон 1	интрон	3' UTR	
Gh_TM1	10	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Sisoline	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_ST213	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 22 (D _t)
Gh_M8	12	697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	- -	17 (A _t), 20 (D _t)
Gh_REDM	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Golib	16	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 15 -	21 (A _t), 22 (D _t)
Gh_Cleviewilt	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_M240	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	16 (A _t), 21 (D _t)

Gh_M315	15	653 (D _t) 697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 - -	18 (A _t), 27 (D _t)
Gb_3-79	11	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15,29 15	11 (A _t), 29 (D _t)
<i>G. tomentosum</i>	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15,29 -	10 (A _t), 24 (D _t)
<i>G. mustelinum</i>	15	653 (D _t) 668 (A _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9* 9 -	- - - -	15,29 29 15 -	12 (A _t), 28 (D _t)
<i>G. herbaceum</i>	9	703 707 709 713	- - - -	12 8 6 8	6 6 6 -	19 (A)
<i>G. raimondii</i>	4	651 653 691	9 9 -	- - -	31 29 -	33 (D)
<i>G. longicalyx</i>	11	706	-	-	-	14 (F)

***Обратите внимание:** 9 п.о. вставок в первом экзоне A_t-генома специфичного ампликона *MIC-3* гена *G. mustelinum* имеет триплет, расположенный выше по сравнению другими D_t- геномными специфическими вставками, наблюдаемыми у других генотипов. Gh – *G. hirsutum*; Gb – *G. barbadense*.

35

Множественное выравнивание геномных последовательностей из всех видов *Gossypium* в нашем исследовании показало, что наши последовательности соответствуют 11 п.о. из некодирующей 5' UTR области, двум кодирующим областям в 221-230 п.о. (экзон 1) и 193 п.о. (экзон 2), единой некодирующей интронной области в 65-77 п.о. и некодирующей 3' UTR области в 151-195 п.о. гена *MIC-3*. Изменения были связаны с большими инсерционно-делеционными (indel) изменениями, наблюдаемыми у некоторых членов семейства *MIC-3* генов в каждом изученном генотипе хлопчатника. Например, все изученные генотипы хлопчатника, за исключением *G. herbaceum* (A-геном), имели специфическую D-геномную вставку в 9 п.о. в первом экзоне. Интересно отметить, что наблюдалось появление смещения положения триплета на 9 п.о. вверх в пределах A-генома, сгруппированных (см филогенетическая группировка согласно мутациям SNP) по *MIC-3* ампликонам *G. mustelinum* (таблица 1).

Кроме того, все аллотетраплоидные родословные, за исключением сорта М8 *G. hirsutum*, имели две другие крупные вставки из 15 пар оснований и 29 пар оснований, найденные в 3'UTR области, из которых 29 пар оснований вставки (как структура, так и положение установлены) связаны с предположительным D-геномным предком аллотетраплоидов – *G. raimondii*. Вставка из 15 пар оснований была уникальна и обнаруживалась только у изученных аллотетраплоидных генотипов и не была связана ни с A-, ни с D-геном предпологаемых диплоидных предков. Изучая паттерны вставки в 3'UTR из MIC-3 ампликонов из АД хлопчатника (таблица 1), более сложные ампликоны с комбинацией вставки 15 и 29 п.о. были обнаружены у *G. mustelinum* (3 разных типа), линии Pima 3-79 *G. barbadense* (два типа) и сорта Голиб *G. hirsutum* (два вида). При этом паттерны вставки у линии Pima 3-79 *G. barbadense* и сорта Голиб *G. hirsutum* MIC-3 были сходными, где только возникновение ампликонов вставки с 15 п.о. было уникальным для этих генотипов, предполагая интрогрессию между *G. barbadense* и сортом Голиб. С другой стороны, либо 15, либо 29 пар оснований вставки в 3'UTR любого из MIC-3 членов не были найдены среди всех клонов сорта М8 *G. hirsutum*. Только 12 членов генов MIC-3 были обнаружены у М8. Wubben и др. (2008) сообщали о 15 различных членах из того же генотипа М8. Это может быть связано с отсутствием некоторых из MIC-3 членов при ПЦР клонировании в этой работе.

169 членов MIC-3 генов были сгруппированы в 17 различных подсемейств в филограмме (рисунок 1). 110 членов MIC-3 генов из генотипов *G. hirsutum* были сгруппированы в 12 подсемейств, из которых подсемейства от 1 до 9, были специфическими для A_t-генома и от 10 до 12 – для D_t-генома (рисунок 1). Подсемейства 13 и 14 были специфическими для *G. herbaceum*, подсемейство 15 – для *G. longicalyx*, и подсемейства 16 и 17 – для семейства MIC-3 генов *G. raimondii*. Все аллотетраплоидные члены MIC-3 гена, за исключением одного члена из *G. mustelinum* (MIC-3_14), были сгруппированы в 12 подсемейств *G. hirsutum* (рисунок 1). Однако, MIC-3_14

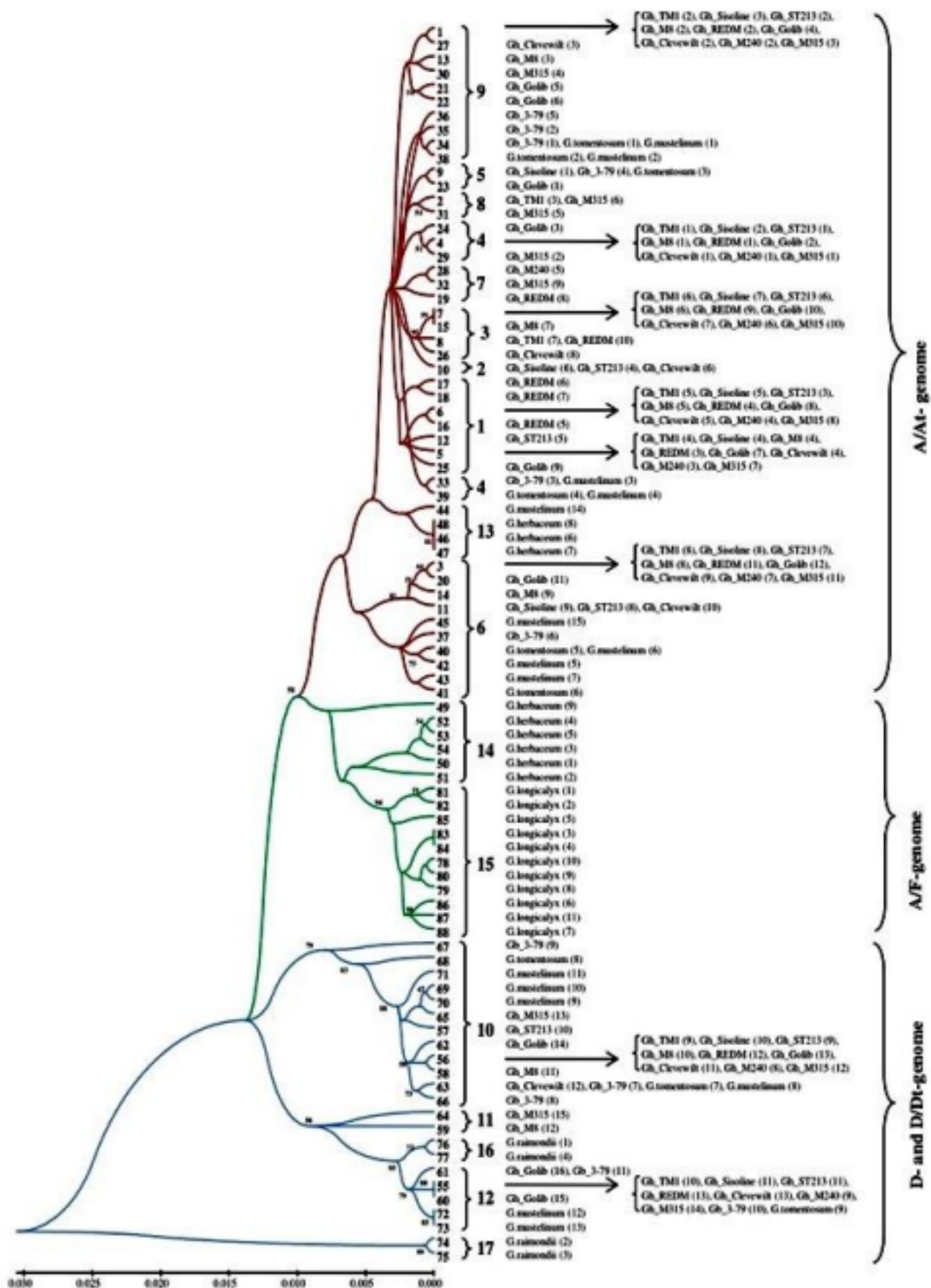


Рисунок 1. Кривая филогенетического дерева методом ближайших соседей, полученная из 86 различных МІС 3-генов видов *Gossypium*: Показаны бутстреп значения ($> 50\%$).

был сгруппирован в рамках 13-го подсемейства, найденного у А-генома. Как *G. herbaceum*, так и *G. raimondii*, предполагаемые А- и D-геномные предки АД хлопчатника, имели два различных подсемейства. Наблюдалось присутствие некоторых видоспецифичных подсемейств. Например, подсемейство 1 было обнаружено только у *G. hirsutum*, включая чувствительные изолинии (S-изолинии), ST213 и Cleve wilt, подсемейство 8 включает последовательности M315 и подсемейство 11 содержит последовательности M8 и M315 упланд сортов.

Для идентификации гаплотипов *MIC-3* генов у тетраплоидного хлопчатника, из-за широкого представительства различных групп линий от этого вида в данном исследовании были использованы филограммы *MIC-3* генов, полученные из *G. hirsutum* Neighbour Joining. Гаплотипы *G. hirsutum* (AD) были разделены на две предполагаемые большие группы:

1) A_t -геномные гаплотипы и 2) D_t -геномные гаплотипы, согласно кластеризации соответствующими предполагаемыми диплоидными предками, *G. herbaceum* и *G. raimondii*. Консенсусные последовательности *G. herbaceum* и *G. raimondii* использовались в качестве референсных последовательностей в гаплотипных таблицах (см. диссертацию). В соответствии с классификацией подсемейства *MIC-3* генов у *G. hirsutum* (смотри выше), результаты показали, что A_t -геном имел 9 предположительных локусов (гаплотипных групп) со средним значением 3,5 аллеля или гаплотипа/локуса, а D_t -геном состоял из 3 предположительных локусов (гаплотипных групп) со средним значением 3,3 аллеля или гаплотипов/локуса у *G. hirsutum*. Число гаплотипов или предполагаемых аллелей на предполагаемый локус колебалась от 2-6 в A_t -геноме до 4-6 в D_t геноме. Тетраплоидные *MIC-3* последовательности включали 25 SNP в A_t геноме и 26 SNP в D_t -геноме, где все были биаллельными, за исключением позиции 113 (A, D), 162 (D) и 568 (D). Среднее число пар оснований на SNP в A_t -геноме по сравнению с D_t - геномом составляло 182,6 п.о. и 108,8 п.о., соответственно.

Согласно отдельному филогенетическому анализу (рисунок 2) и анализу последовательности *MIC-3* для TM-1 (стандартная линия для *G. hirsutum*) и Pima 3-79 (двойная гаплоидная стандартная линия для *G. barbadense*), для различения межвидовых геномных полиморфизмов между этими двумя видами были разработаны несколько GSP маркеров. Эти кандидатные генетические маркеры затем были использованы для анализа делеций путем скрининга цитогенетических линий, в том числе моносомных, монотелодисомных, CS-B, а также NTN гибридов (Stelly и др., 2005; Goutirez и др., 2009).

Оба родительских типа полиморфизмов присутствовали в большинстве гибридов F_1 . Вместе с тем, все восемь TM-1 GSP аллелей, представляющих 7 из 8 различных A_t -геномов, полученных из *MIC-3* членов TM-1,

отсутствовали у гипоанеуплоидных F₁ растений, которые имели нехватку по хромосоме 4 *G. hirsutum* H04 моносомик) или короткого плеча хромосомы 4 (Te04L монотелодисомик).

38

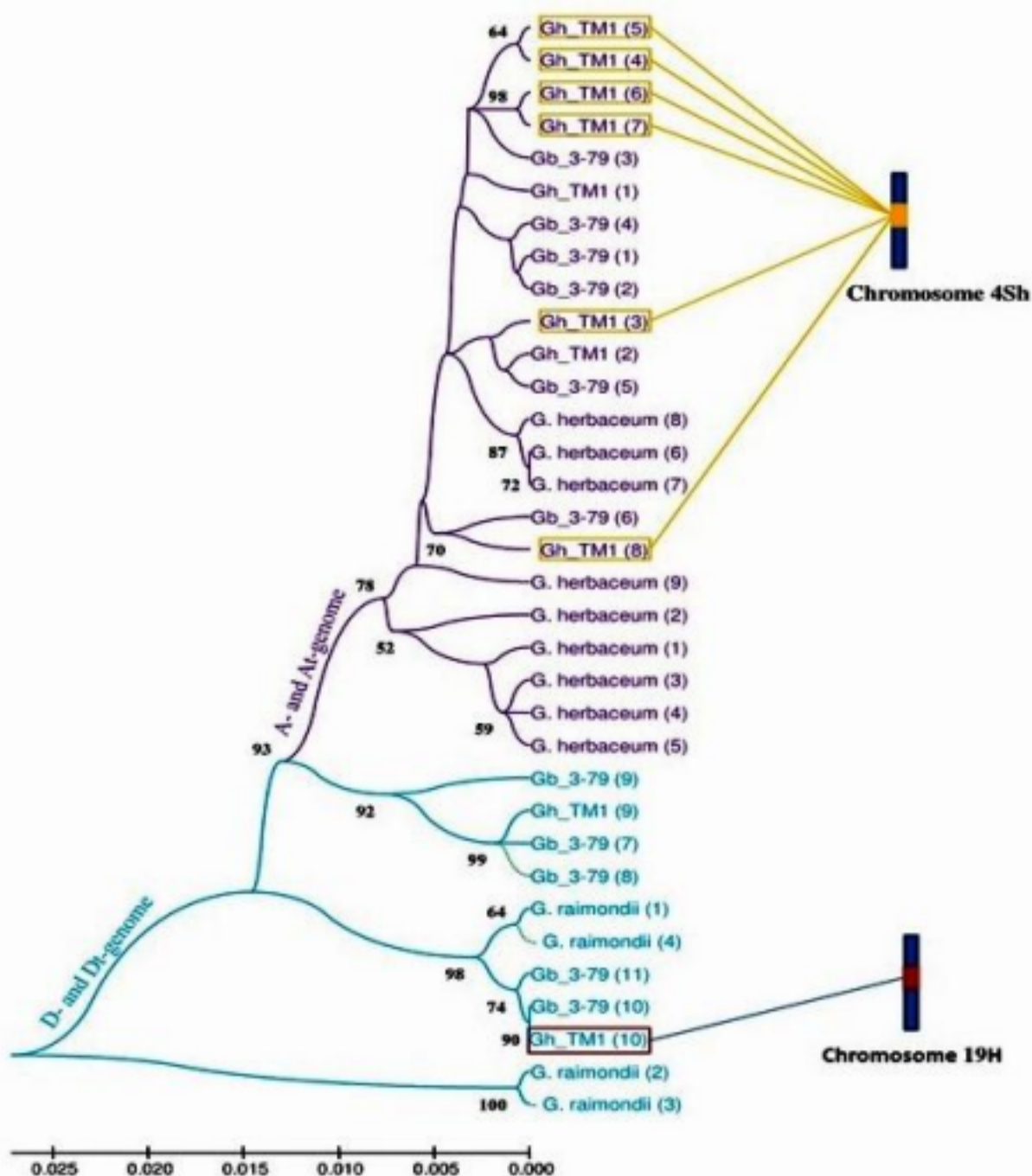


Рисунок 2. Кривая филогенетического дерева методом ближайших соседей, полученная из *MIC-3* генов *G. hirsutum* (TM-1), *G. barbadense* (Pima 3-79), а также двух предполагаемых диплоидных предков AD хлопчатника:

Длина ветви, бутстреп значения (> 50%), хромосомные позиции, и геном происхождения для простоты показаны и цветовым кодом.

Эуплоидные дисомные хромосом-замещенные линии CS-B04 также не имели те же *MIC-3* аллели *G. hirsutum* для всех этих маркеров. В отличие от

этого, все восемь GSP локусов были гетерозиготными у всех других замещенных линий и у монотелодисомных замещенных F₁ растений (Te04sh), лишенных длинного плеча хромосомы 4. Совокупные результаты показали, что 7 из 8 A_t-геномов *MIC-3* члена TM-1 находятся на коротком плече

39

хромосомы 4, предполагая потенциальные доказательства для кластерной локализации *MIC-3* генов в геноме хлопчатника (рисунок 2). Хотя было найдено несоответствие между линиями TM-1 и Pima 3-79 у нескольких D_t-геномных *MIC-3* гаплотипов, они не были полиморфными при делеционном анализе и в экспериментах по хромосомной локализации. Это было связано с наличием перекрывающихся сайтов в пределах линии Pima 3-79 *MIC-3* членов, которые ограничивают нас при дифференцировке GSP полиморфизмов у цитогенетических линий. Вместе с тем, подробный анализ последовательности *MIC-3* членов, полученных из *G. mustelinum*, помог разработать два различных GSP праймера (не полиморфных между TM-1 и Pima 3-79), которые были полиморфными между TM-1 и *G. mustelinum* членами *MIC-3* гена, обнаруживая генотип-специфические аллели при делеционном анализе. У третичных моносомных F₁ межвидовых гибридов 12-19 NTN и 10-19 NTN дифференцированно отсутствовала TM-1 аллель, специфичная для данного SNP маркера, но не аллель *G. mustelinum*. NTN 12-19 растения сегментально дефицитные по частям TM-1 хромосом 12 и 19, в то время как NTN 10-19 – сегментально дефицитные по частям TM-1 хромосом 10 и 19. Вместе они разграничивают один из D_t-геномного *MIC-3* члена (*MIC_3_10*) TM-1 на хромосоме 19. В отличие от первичных моносомных межвидовых гибридов H10 и H12 являются недостаточными для хромосом 10 и 12 *G. hirsutum*, но содержат TM-1 и GSP *MIC-3* маркеры *G. mustelinum*.

Результат показывает, что этот *MIC-3* элемент, полученный из Dt-генома, не находится ни в одной из этих хромосом, а также поддерживает локализацию на хромосоме 19. Остальные гипоанеуплоидные F₁ растения не имели нехваток по другим хромосомам, но содержали как TM-1, так и Pima 3-79 аллели для этого конкретного SNP маркера. Хотя первичные моносомы для хромосомы 19 еще не существуют у *G. hirsutum*, тем не менее, результаты ясно показывают, что этот D_t-геномный *MIC-3* элемент расположен на хромосоме 19 *G. hirsutum*.

Анализ экспрессии генов *MIC-3* генов у ряда инфицированных и неинфицированных вилтом генотипов хлопчатника показал, что гены *MIC-3* высоко избыточно экспрессируются в тканях, инфицированных *Fusarium* и *Verticillium*, и избыточная экспрессия была выражена выше у устойчивых генотипов. Эти данные указывают на важность *MIC-3* генов не только в RKN патогенезе, но и, в качестве PR-белка с потенциальной защитной функцией при заражении вилтом и, возможно, другими болезнями хлопчатника.

В четвертой главе диссертации под названием «Молекулярная

эволюция семейства *MIC-3* генов у видов *Gossypium*» представлены данные о скорости обмена нуклеотидов у 15 тетраплоидных и диплоидных генотипов хлопчатника и образцы молекулярной эволюции мультигенного семейства *MIC-3*.

Исследования включают в себя следующие результаты:

После удаления интронных и UTR областей последовательностей из всех 169 членов *MIC-3* гена, были сформированы 131 отличительные кодирующие последовательности ДНК для членов *MIC-3* гена из

40

15 генотипов, которые были дополнительно сгруппированы в 56 различных белок-кодирующих предполагаемых последовательностей кДНК. Эти кодирующие последовательности ДНК были успешно многократно выравнены по 423 п.о. с использованием ClustalX, которая охватывает всю кодирующую область *MIC-3* генов, в том числе первый (231 п.н.) и второй (192 п.н.) экзоны. Эти 56 отличительных предположительных последовательностей кДНК образуют 29 отличительных предсказанных белковых последовательностей у всех 15 генотипов хлопчатника. В совокупности, различия среди аминокислот были замечены у 42 из 141 аминокислотных позиций (30%) предполагаемых *MIC-3* белковых последовательностей видов *Gossypium*. Имелось большее число аминокислотных изменений у предположительных *MIC-3* белков, полученных из D₄-генома, по сравнению с группой белков, полученных из A₁-генома. Аминокислотные изменения были менее выражены у A₁ и F-геномной группы предполагаемых *MIC-3* белков. В отличие от этого, наибольшее число аминокислотных изменений наблюдалось у всех четырех предположительных белков D₅-геномных *MIC-3* генов.

Кроме того, была изучена молекулярная эволюция семейства генов *MIC-3* на основе анализа его вариации у 15 тетраплоидных и диплоидных генотипов *Gossypium*, которые в совокупности представляют семь филогенетически различных геномов, которые часто используются для эволюционных исследований. Скорость синонимичных (d_s) и не синонимичных (d_N) нуклеотидных замен позволяют предположить, что второй из двух экзонов *MIC-3* генов находится под сильным положительным давлением отбора, в то время как первый экзон был под сильным изолирующим отбором для сохранения функции (таблица 2).

На основе коэффициентов нуклеотидных замен, мы пришли к выводу, что *MIC-3* гены эволюционируют посредством процесса «рождения и смерти» при сильном изолирующем отборе в экзоне-1 и дивергентном отборе в экзоне-2 (таблица 2). Полученные результаты свидетельствуют, что механизм «амплификации гена» помогает сохранить все удвоенные копии *MIC-3* генов в геномах *Gossypium*, что наилучшим образом согласуется с моделью «исчезающей приманки» эволюции R-гена.

Данные показывают, что дубликации *MIC-3* генов происходили с различными скоростями, один раз за ~1 миллион лет (MY) у

аллотетраплоидов, один раз в ~2 миллион лет у А-/F-геномных филогенетических ветвей, и один раз в ~8 миллион лет у D- геномных филогенетических ветвей (рисунок 3). Изменения в семействе *MIC-3* генов, как оказалось, отражают эволюционный отбор для повышения функциональной устойчивости (через изолирующий отбор в экзоне-1), а также расширение возможностей для разработки новых «переключателей» (за счет дивергентного отбора в экзоне-2) для реагирования на различные вредители и патогены. Такие эволюционные роли совпадают с гипотезой, что члены этого уникального семейства генов устойчивости обеспечивают приспособительные преимущества у *Gossypium* в борьбе с вредителями и патогенами.

41

Таблица 2

Средние внутри-генотипные оценки нуклеотидных замен для семейства *MIC-3* генов хлопчатника

Генотипы	Геном	A _t			D _t			Итого*		
		d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S
Gh_TM-1	[AD] ₁	0.80	2.19	0.37	4.19	4.33	0.97	1.85	2.57	0.72
Gh_Sisoline	[AD] ₁	0.69	1.94	0.36	4.19	4.33	0.97	1.56	2.34	0.66
Gh_M315	[AD] ₁	0.67	1.89	0.35	2.86	3.49	0.82	1.57	2.38	0.66
Gh_M8	[AD] ₁	0.78	1.94	0.40	3.53	3.23	1.09	1.36	2.14	0.64
Gh_Cleviewilt	[AD] ₁	0.80	1.89	0.42	2.79	2.86	0.98	1.61	2.16	0.74
Gh_Golib	[AD] ₁	0.66	2.24	0.30	4.19	4.33	0.97	1.50	2.55	0.59
Gh_M240	[AD] ₁	0.76	2.09	0.36	4.19	4.33	0.97	1.67	2.46	0.68
Gh_ST213	[AD] ₁	0.58	2.04	0.28	4.19	4.33	0.97	1.37	2.48	0.55
Gh_REDM	[AD] ₁	0.97	1.97	0.49	4.04	3.74	1.08	1.51	2.37	0.64
Gb_Pima 3-79	[AD] ₂	0.31	1.04	0.30	2.84	2.76	1.03	1.90	1.87	1.02
<i>G. mustelinum</i>	[AD] ₄	0.39	0.79	0.49	2.30	2.11	1.09	1.73	1.34	1.29
<i>G. tomentosum</i>	[AD] ₃	0.49	0.83	0.60	2.90	2.84	1.02	1.78	1.62	1.10
<i>G. herbaceum</i>	A ₁	-	-	-	-	-	-	0.43	0.41	1.05
<i>G. raimondii</i>	D ₅	-	-	-	-	-	-	3.70	2.83	1.31
<i>G. longicalyx</i>	F	-	-	-	-	-	-	0.35	2.37	0.15
Все <i>G. hirsutum</i>	[AD] ₁	2.06	0.61	0.30	2.79	2.37	0.85	1.32	2.39	0.55

Все <i>Gossypium</i> виды	-	1.90	0.58	0.31	2.57	2.20	0.86	1.80	2.58	0.70
---------------------------	---	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Gh – *G.hirsutum*; Gb – *G.barbadense*; Sisoline – чувствительные изолинии; *Итого – комбинация A_t и D_t ; d_S – скорость синонимичных нуклеотидных замен; d_N – скорость несинонимичных нуклеотидных замен; $d_N:d_S$ – отношение скорости несинонимичных замен к синонимичным, начиная с расхождения двух последовательностей, что примерно равно $d_N:d_S$, отношение числа несинонимичных замен к синонимичным. **Примечание:** что скорости $d_N:d_S$, значение которых больше 1, выделены жирным шрифтом; значения d_N и d_S умножены на 100х.

В пятой главе диссертации под названием «Молекулярная характеристика корень специфичных промоторов из *MIC-3* межгенного региона и создание генетических конструкций с корень специфичным промотором для достижения корень специфичной экспрессии» говорится о создании векторной конструкции с помощью синтетических РНК дуплексов и нуклеотидной последовательности минимальной длины корень специфичного промотора гена *MIC-3*, полезных в будущем для биотехнологии хлопчатника.

Исследования имеют следующие результаты:
2.5 kb межгенные регионы *MIC-3* генного кластера были амплифицированы,

42

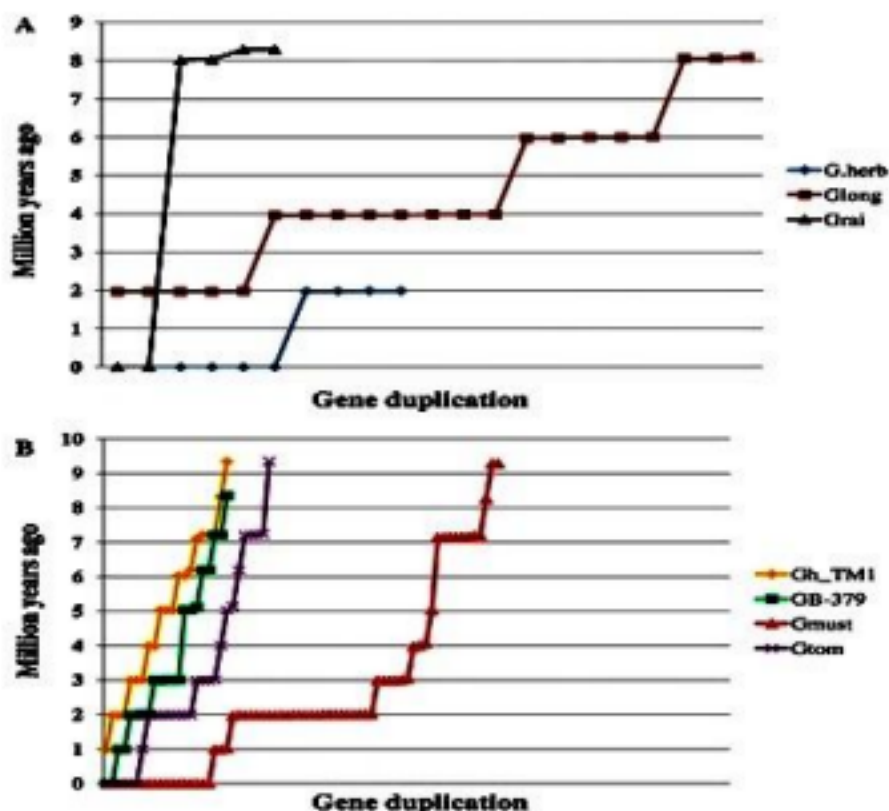


Рисунок 3. Паттерн дупликации генов в семействе *MIC-3* генов диплоидных и аллотетраплоидных видов *Gossypium*:

(A) диплоидные виды: Gherb – *G. herbaceum*, Glong – *G. longicalyx*, Grai – *G. raimondii*; (B) – аллотетраплоидные виды: Gh_TM1 – *G. hirsutum* TM-1, GB-379 – *G. barbadense* Pima

3-79; Gmust–*G. mustelinum*, и Gtom–*G. tomentosum*. **Примечание:** другие генотипы *G. hirsutum* (Sisoline, M315, Cleviewilt, M240, ST213, Голиб, M8 и REDM), использованные в этом исследовании, имели те же паттерны генной дупликации, они не включены для простоты рисунка, оценки времени дивергенции (MYA) были рассчитаны с использованием коэффициентов синонимичных замен в парах членов *MIC-3* гена на генотип / вид с использованием $2,6 \times 10^{-9}$ синонимичных замен на сайт / год.

клонированы и секвенированы с использованием праймерных пар из первого экзона *MIC-3* генов. Была использована консенсусная позиция 220-240 п.о. (прямого) и 130-154 (обратного) множественного выравнивания последовательностей. Анализ этой межгенной *MIC-3* последовательности позволил идентифицировать характеристики последовательности промотора с ТАТА-боксом и множественные различные мотивы последовательности, связанные с корневой специфичностью и патогеном. Несколько пар праймеров было разработано для амплификации различных фрагментов этого 2,5 т.п.о. промоторной последовательности.

Это позволило идентифицировать минимальный промоторный регион. Рассчитанные пары праймеров имеют рестрикционные сайты на своих концах для вставки в предварительный двоичный плазмидный вектор, содержащий *GUS*-репортерный ген. Вкратце, фрагмент промотора *MIC-3* 2562 п.о., охарактеризованный в данной работе, был вновь амплифицирован с парой праймеров, несущих Hind III, а также BamHI адаптеры сайтов рестрикции. Укороченные фрагменты промотора с различными длинами

43

5'-концевых делеций были аналогичным образом амплифицированы с каждой конкретной парой праймеров (рисунок 4). Эти промоторные фрагменты были встроены в общедоступный вектор pBI101, до *GUS*-гена кодирующего региона, в результате чего получена серия pBI101-MIC3_Pr::GUS бинарных векторов, а именно: P-2500 (-2500 / -1, 2500 п.о.), P-2200 (-2200 / -1, 2200 п.о.), P-1800 (-1882 / -1, 1882 п.о.), P-1600 (-1658 / -1, 1658 п.о.), P-1300 (-1381 / -1, 1381 п.о.), P-1000 (-1057 / -1, 1057 п.о.), P-700 (-708 / -1, 708 п.о.). Эти векторы были перенесены в штамм LBA4404 (для преобразования хлопчатника) или GV3101 (для трансформации арабидопсиса) *Agrobacterium tumefaciens* и использован для *in planta* трансформации *Arabidopsis*. Трансгенные растения отбирали, высевая на канамицин-содержащие чашки сагаром. Трансгенные растения *Arabidopsis*, имеющие минимальный вектор промоторной области, pBI101-700::GUS, показал экспрессию *GUS* только в корне растения, как показано определением *GUS* при выращивании на агаре (рисунок 4). Это позволило предположить, что минимальная область промотора *MIC-3* в 708 п.о. достаточна, чтобы направить экспрессию любого гена к корням растения. При помощи этих *MIC-3* векторов были преобразованы в общей сложности 1383 гипокотили Кокер-312, включая без векторные преобразования.

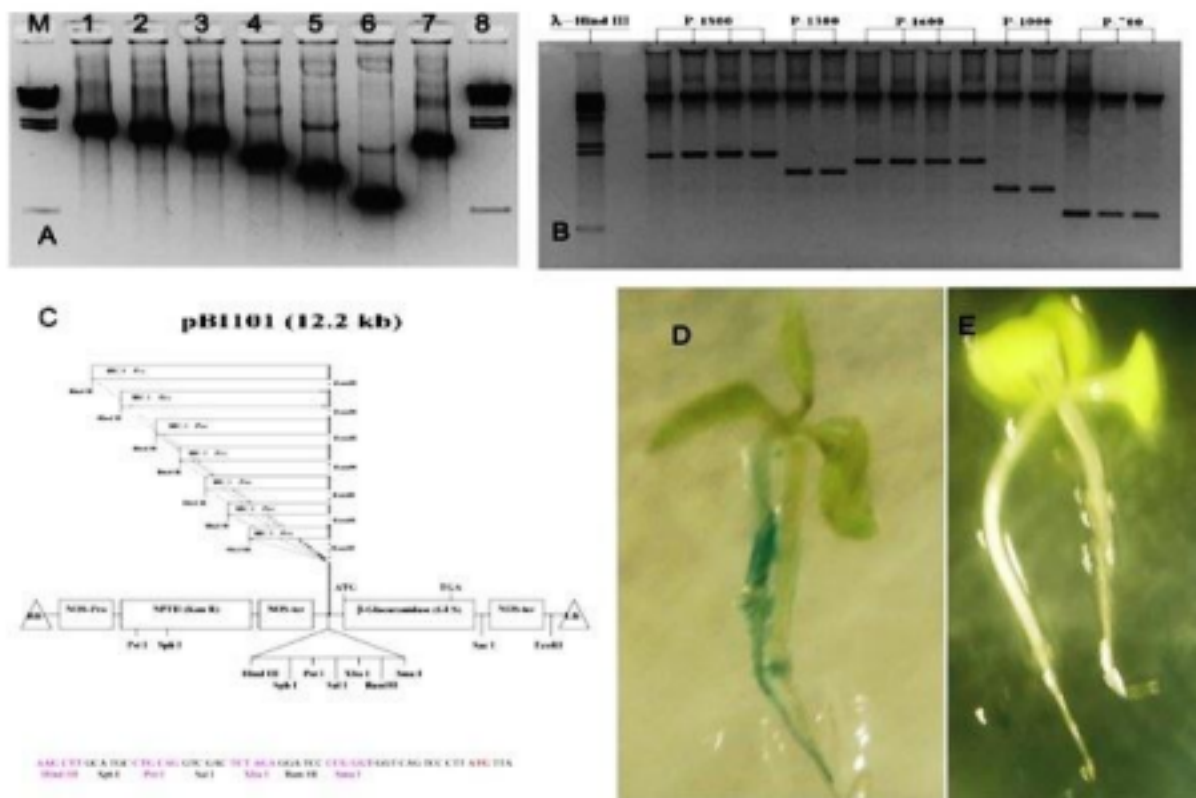


Рисунок 4.Верификация функций *MIC-3* промотора:

А – фрагментированные последовательности *MIC-3* промотора [1,9 – маркер λ/HindIII, 2 Pr-2500, 3 Pr-2200, 4 Pr-1882, 5 Pr-1381, 6 Pr-1057, 7 Pr-708, 8 Pr-1658]; В и С – субклонирование в pBI101 бинарный вектор с GUS маркерным геном; гистохимическое окрашивание экспрессируемых *GUS* паттернов в трансгенных растениях *Arabidopsis*, экспрессирующих P-700::GUS: (D) 1 – недельные трансформированные проростки; (E) контрольные растения *Arabidopsis*.

44

В качестве отрицательного контроля 125 гипокотилей обрабатывали водой. Некоторые трансгенные эмбрионы растений хлопчатника, несущие промоторные области *MIC-3* гена, перенаправляющие функционирование маркерного гена *GUS*, были соматически регенерированы (рисунок 5) для дальнейшей характеристики на молекулярном и функциональном уровне. Этот уникальный корневой промотор будет полезен для биотехнологии растений в целях экспрессии любого гена только в корнях растений. Также, были сконструированы и оптимизированы основы бинарных векторов содержащие РНК дуплексы растительных генов, для изучения функции растительных генов, включая *MIC-3* гены.

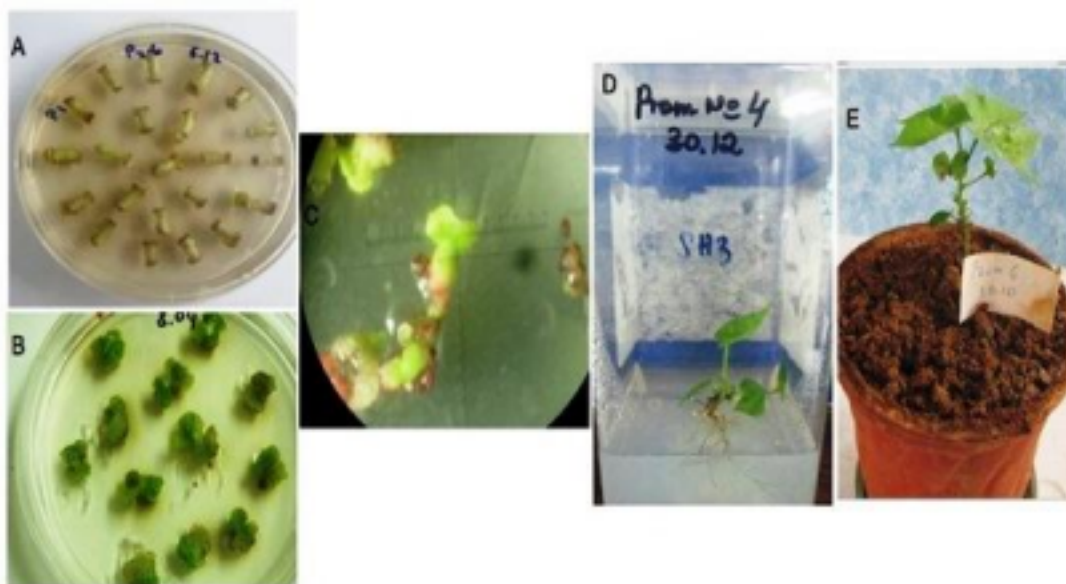


Рисунок 5. Трансформация хлопчатника и соматический эмбриогенез с использованием *MIC-3* специфичных промоторных конструкций: А – участки гипокотыля; В – каллусогенез; С – соматически регенерированные эмбрионы; D – укоренение и проращивание; E – перенос в почву в горшках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований по докторской диссертации на тему «Клонирование, характеристика семейства генов *MIC-3*, определяющих устойчивость к патогенам хлопчатника (*Gossypium* spp.) и изучение их молекулярной эволюции, а также значение этих генов в биотехнологии» представлены следующие выводы:

1. Впервые клонированы, секвенированы и выявлены положение, структура и содержание комплексного, крупного, специфичного только для хлопчатника, и экспрессируемого в корне семейства генов *MIC-3* у аллотетраплоидных и диплоидных видов *Gossypium*.

2. 169 последовательностей геномной ДНК членов *MIC-3* генов из 15 генотипов хлопчатника состоят из 4 до 16 членов гена из 2-10 подсемейств на каждый генотип/вид.

3. Все члены *MIC-3* генов с использованием нуклеотидных

45

полиморфизмов (SNP) и предполагаемых гаплотипов были филогенетически сгруппированы в 17 геномно специфических подсемейств. 4. Рекомендуется использование 42 гаплотипных последовательностей, полученных в результате анализа членов *MIC-3* гена из аллотетраплоидного A_4 - или D_4 -геномов для определения специфичных для гена *MIC-3* SNP полиморфизмов.

5. Впервые были разработаны *MIC-3* геном-специфичные SNP маркеры и с использованием гаплотипических ассоциаций и экспериментов с длинными ПЦР была доказана кластерная локализация членов *MIC-3* гена в гомеологичных сегментах хромосом 4 и 19 у *G. hirsutum*.

6. Впервые были определены скорости нуклеотидных замен и паттерны молекулярной эволюции мульти-генного семейства *MIC-3* в 15 тетраплоидных и диплоидных генотипах хлопчатника. Оценкой среднего числа синонимичных (d_S) и несинонимичных (d_N) нуклеотидных замен для кодирующих последовательностей ДНК семейства *MIC-3* генов выявлены селекционные ограничения и молекулярная эволюция семейства этого гена в геноме хлопчатника.

7. Гены *MIC-3* эволюционируют в соответствии с моделью «рождения и смерти» под влиянием изолирующего отбора в экзоне-1 и дивергентной селекции в экзоне-2, хотя в начале молекулярной эволюции происходила стабилизирующая «совместная» эволюция.

8. Результаты также поясняют наличие «амплификации гена» как возможного механизма сохранения всех дублирующих копий *MIC-3* генов и разработки новых функций генов в процессе защиты хлопчатника в рамках модели «исчезающей приманки».

9. Прохождение дупликации *MIC-3* генов, один раз за ~1 миллион лет у аллотетраплоидных геномов, один раз в ~2 миллиона лет у А / F геномов, и один раз в ~8 миллиона лет у D-геномов, а также выявленная оценка времени и образец дупликации генов рекомендуется для понимания роли патоген-опосредованных процессов отбора в эволюции геномов хлопчатника.

10. Высокая экспрессия *MIC-3* генов во время заражения патогенами *Fusarium* и *Verticillium* у устойчивых и неустойчивых генотипов сортов хлопчатника, ассоциируется с важным значением *MIC-3* генов.

11. Впервые была клонирована и секвенирована нуклеотидная последовательность, а также охарактеризованы промоторные мотивы межгенного спейсерного региона длиной 2,5 kb, содержащего в себе *MIC-3* промотор с сигнальной корень-специфичной последовательностью.

12. Созданы и трансформированы бинарные генетические векторы с минимальной нуклеотидной последовательностью промотора корень-специфичного *MIC-3* гена, содержащего синтетические РНК дуплексы, которые рекомендуются для биотехнологии растений.

BURIEV ZABARDAST TOJIBAEVICH

**CLONING, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF
MOLECULAR EVOLUTION OF PATHOGEN- RESISTANCE CLUSTER
MIC-3 GENE FAMILY IN COTTON (*GOSSYPIUM* SSP.) AND ITS
SIGNIFICANCE FOR COTTON BIOTECHNOLOGY**

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

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

47

The theme of the doctoral dissertation is registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under number 14.07.2016/B2016.3.B174.

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

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian and English) on the webpage of the Scientific Council (www.flora_fauna.uz) and on the website of “ZiyoNET” information

and education portal (www.ziyonet.uz).

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

Official opponents: Mukhammedov Rustam Sultanovich Doctor of Biological Sciences, Professor

Turdikulova Shakhlokhon Utkurovna
Doctor of Biological Sciences

Rizaeva Sofiya Mamedovna
Doctor of Biological Sciences, Professor

Leading organization: Institute of Microbiology

The defence of the dissertation will be held on “___” _____ 2016 at _____ at the meeting of the once only Scientific Council No.14.07.2016.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. Conference hall of the Palace of the Institute of Gene Pool of Plants and Animals. Tel.: (+99871) 289-04-65; Fax (+99871) 262-79-38; e-mail: igppa@academy.uz).

The doctoral dissertation can be looked through in Information Resource Centre of the Institute of Gene Pool of Plants and Animals (registered with No.____). Address: 232 Bogishamol str., 100053, Tashkent. Tel.: (+99871) 289-04-65.

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

K.Sh.Tojibaev

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

B.A. Adilov

Scientific Secretary of the Scientific Council on Award of Scientific Degree of Doctor of Sciences, Ph.D, senior researcher

Sh.Yunuskhonov

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

INTRODUCTION (annotation of doctoral dissertation)

Topicality and relevance of the theme of the dissertation. Due to the globalization, there are urgently pressing concerns for world agricultural

production to provide bio-safety/bio-security of the world's leading crop species and safeguarding them from biotic (phytopathogens, pests) threats. "Biological threats from harmful organisms in agricultural practice cost over \$1.4 trillion in crop damage, equaling 5% of global domestic product (GDP)"¹.

During the years of independence, in our country extensive work has been done to improve crop yields, and today agricultural production is part of the country's annual economic income. At the same time reforms in the cotton sector are being carried out and certain results obtained on the basis of held program measures, i.e. areas of cotton crops were reduced, and yields have been increased by an average of 3-4 quintals.

World cotton production suffers from wilt diseases (*Fusarium* and *Verticillium*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*; RKN) nematodes. RKN accounts for an estimated 14% of all worldwide plant losses, which is reflected in the amount of about \$100 billion dollars annually. "The significant cotton yield lost in the USA during the last 10 years of period because of RKN estimated to be about \$205 million annually"². The actuality of the problem in this context, together with fighting wilt pathogens, is to study and develop modern biotechnology tools against biological vectors conditioning to spread wilt diseases in cotton. Conducting research on the genetic basis of nematode management is justified as follows: need to identify genes conferring resistance to pathogens in cotton; study their structure and composition in the cotton genome; determining the location on the chromosomes; study of modern biotechnology and genomics approaches for creation of lines resistant to pathogens.

This dissertation investigation serves to some extent to address the tasks defined by the Law of the Republic of Uzbekistan No 116-II "On protection of agricultural plants against pests, diseases and weeds" of 31 August, 2000, the Resolution No.148 of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan "On measures of improving the structure and increasing the efficiency of plant protection service" issued on March 29, 2004 as well as other legal documents approved in this direction.

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 Uzbekistan in "V: Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection".

Review of international researches on the topic of the dissertation. The molecular-genetic basis of disease resistance of *Gossypium* genus, in particular, resistance against nematode pests were studied by scientist and research groups of the leading research centres and higher educational institutions of the world, including Texas A&M University (USA), Mississippi State University (USA),

¹<http://www.fao.org/docrep/018/i3300e/i3300e.pdf>.

²<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx>

Department of Agriculture (USDA) of the USA, Plant Industry (Australia), Northeast Institute of Geography and Agroecology (China) as well The Centre of genomics and bioinformatics (Uzbekistan).

As a result of the researches carried out in the world on the molecular-genetic study of cotton (*Gossypium* spp.) resistance to pathogens, a number of scientific results have been obtained: there were revealed a connection between wilt disease and nematode infection, threat of nematode-wilt disease complex, as well as several DNA markers associated with this disease (University of California, USA); using microsatellite markers the researchers of United States Department of Agriculture (USA) have mapped RKN resistance QTLs on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton; using a large number of DNA markers (SSR and AFLP) and screening an additional 1221 F₂ individuals of genetic population for RKN resistance the researchers from University of Georgia (USA) have identified the Mi-C11 Mi-C14 loci.

In the world, the following studies on the molecular-genetic study of the cotton (*Gossypium* spp.) resistance to pathogens (including the below mentioned priority areas) are being carried out: identification of new genes of resistance to pathogens; QTL mapping by DNA markers; determination of chromosomal location of genes of resistance to pathogens; obtaining new biotechnological cultivars resistant to pathogens.

The degree of study of the problem. Most of known resistance-associated multi-gene clusters in plants were studied by foreign scientists – DeYoung B.J. et al.³; He L. et al.⁴ characterized and mapped the NBS-LRR protein encoding resistance genes in allotetraploid cotton; Zhang X. D. et al.⁵ and Callahan F. E. et al.⁶, identified high expression of a unique root-specific cotton *MIC-3* protein in root-knot nematode (RKN) resistant plants during nematode infection; Wubben M. et al.⁷ showed that *MIC-3* multi-gene family not associated with any specific resistant motifs or NBS-LRR like domains; identified the preliminary functional features of the *MIC-3* gene family during plant defense response and showed that it is independent of other well-known defense pathways.

In Uzbekistan, a genetic study of upland cotton crop “Golub” resistant to nematodes, was carried out by H. Kholmatov, Sh. Egamberdiev comprehensively has identified the pathogens of *Fusarium* genus by molecular genetic methods, and

³DeYoung BJ, Innes RW. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nat Immunol. 2006 Dec;7 (12):1243-9.

⁴He L., Du C., Covalada L., Xu Z., Robinson F.A., Yu J.Z., Kohel R.J., Zhang H.B. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LLR-encoding resistance gene analogue family in polyploid cotton (*G. hirsutum* L.) // Mol Plant Microbe Interact. 2004. 17:1234-1241.

⁵Zhang X.D., Callahan F.E., Jenkins J.N., Ma D-P., Karaca M., Saha S., Creech R.G. A novel root-specific gene, *MIC-3* with increased expression in nematode-resistant cotton (*G. hirsutum* L.) after root-knot nematode infection // Biochim.Biophys.Acta. 2002. 1576:214-218.

⁶Callahan F.E. Zhang X-D., Ma D-P., Jenkins J.N., Hayes R.W., Tucker M.L. Comparison of *MIC-3* protein accumulation in response to root-knot nematode infection in cotton lines displaying a range of resistance levels // J Cotton Sci. – USA, 2004. 8:186-190.

⁷Wubben M.J., Callahan F.E., Hayes R.W., Jenkins J.N. Molecular characterization and temporal expression analyses indicate that the *MIC* (*Meloidogyne-induced cotton*) gene family represents a novel group of root-specific

also was studied the pathogenic properties of pathogens species and races, occurring more often in relation to the local cotton varieties. However, clustered supergenes for disease resistance in cotton have not yet been studied in detail in both national and international levels. Currently, with the scientific and practical point of view it is very important to study the molecular evolution and characteristics of the clustered family of *MIC-3* genes which determine the resistance to pathogens in cotton (*Gossypium* spp.) as well as the application of these genes in biotechnology.

Connection of the theme of dissertation with the scientific-research works of the higher educational institution, where the dissertation is conducted. The dissertation research has been done in the Centre of Genomics and Bioinformatics in accordance within the framework of fundamental, applied and international projects: F4-T149 “Investigation of the structure and function of cotton genome for the development of marker-assisted selection” (2007-2011); UZB2-31017-TA-09 “Evaluation of potential germplasm resistance against root-knot nematode and Fusarium wilt diseases in cotton and development of SNP-based candidate gene markers” (2009-2013); “Obtaining high quality cotton transgenic lines using genetic binary vectors based on synthetic duplex RNAi established for cotton genes” (2009-2011).

The aim of the research is to determine *MIC-3* gene position, structure, content, and complexities as well as molecular evolution and gene duplication mechanisms in allotetraploid and putative ancestor-like diploid cotton genomes.

The main tasks of the study:

- cloning and sequencing all members of *MIC-3* genes from major putative ancestor-like diploid and allotetraploid genomes of *Gossypium* species; performing a detailed phylogenetic analysis and classification of *MIC-3* genes into sub-families in *Gossypium* species;

- discovering the putative haplotypes of *MIC-3* sequences in cotton genome and developing the SNP markers to confirm clustered localizations of *MIC-3* gene members on specific cotton chromosomes useful for future marker-assisted selection programs;

- characterizing putative protein sequences and nucleotide substitution rates to study patterns and rates of molecular evolution, gene duplication, and maintenance mechanisms of *MIC-3* multi-gene family before and after allopolyploidization in cotton genome;

- studying cotton genome evolution based on *MIC-3* gene information and re-estimate the divergence times of *Gossypium* genomes;

- studying adaptive selection patterns based on “synonymous” and “nonsynonymous” substitution rates contributing to nematode and disease resistance;

- studying *MIC-3* gene expression during *Fusarium* and *Verticillium* wilt infection process in susceptible and resistant genotypes of cotton cultivars; determining the intergenic spacer regions between several *MIC-3* genes and on

their basis constructing binary vectors containing minimal promoter region, and transforming them into model plant *Arabidopsis* to identify promoter sequences

51

useful for future cotton and plant biotechnology;

constructing and optimizing binary vectors bearing synthetic RNAi duplexes to study the function of plant genes including *MIC-3*.

The objects of the research. Plant materials used were doubled-haploid line Pima 3-79 of *G. barbadense* ([AD]₂-genome), *G. tomentosum* ([AD]₃-genome), *G. mustelinum* ([AD]₄-genome), and nine genotypes of *G. hirsutum* ([AD]₁-genome), including Cleviewilt, M240, M315, Golib, ST213, M8, Texas Marker-1 (TM-1), susceptible isoline (Sisoline), and red mutant line (REDM). Three of the diploids included in this study were *G. herbaceum* (A₁-genome) and *G. raimondii* (D₅-genome), the genomes of which are most closely related to the A_t- (A-subgenome) and D_t- (D-subgenome) genomes of the extant AD tetraploid species, and the F-genome African wild cotton, *G. longicalyx*. We used deficiency testing to delimit chromosomal locations of *MIC-3* genes, by screening polymorphisms against a set of monosomic and monotelodisomic interspecific *G. hirsutum* x *G. barbadense* F₁ hybrids and analogous primary monosomic F₁ hybrids *G. hirsutum* x *G. mustelinum*.

The subject of the research is the unique disease resistance *MIC-3* gene family from 15 tetraploid and diploid cotton genotypes.

The methods of the research work. In this work, all basic molecular biology methods including DNA isolation, gene sequencing and cloning, genetic structure analyses, phylogenetic clustering, tests for recombination and gene conversions, molecular evolution divergence times as well as marker development, binary vector constructions and genetic transformation methods as well as modern bioinformatics and statistical tests were applied.

Scientific novelty of the research includes the following:

for the first time, a total of 169 individual members belonging to *MIC-3* supergene family from 15 allotetraploid and diploid genomes were cloned, sequenced and characterized;

a detailed sequence analysis of 169 *MIC-3* gene found out that in 15 cotton genotypes were detected 4 to 16 gene members with 2 to 10 subfamilies per genotype/species. These 169 *MIC-3* gene sequences from *Gossypium* species were phylogenetically grouped into a total of 17 genome-specific subfamilies;

analysis of allotetraploid genome-derived *MIC-3* gene members further identified 42 haplotype sequences, specific to A_t- or D_t-genomes, that helped to identify *MIC-3* gene specific SNPs. Based on haplotype and subfamily groups, 9 putative *MIC-3* loci in A_t-genome and 3 putative loci in D_t-genome of allotetraploid cottons were identified;

for the first time, *MIC-3* derived genome specific SNP markers were developed, and clustered localizations of *MIC-3* gene members in homeologous segments of chromosomes 4 and 19 of *G. hirsutum* were identified;

for the first time, nucleotide substitution rates and patterns of molecular evolution of *MIC-3* multi-gene family in 15 tetraploid and diploid cotton genotypes were reported.

estimation of an average number of synonymous (d_s) and nonsynonymous (d_N) nucleotide substitutions for coding DNA sequences of *MIC-3* gene family

52

detected that despite an early-course concerted evolution may be evident, *MIC-3* gene family of cotton species are evolving under a “birth-and-death” evolution with purifying selection in exon-1 and diversifying selection in exon-2.

for the first time “gene amplification” was suggested as a possible mechanism to preserve all duplicated copies of *MIC-3* genes and to develop new gene functions during cotton plant defenses under “bait and switch” model.

the results indicated that *MIC-3* gene duplication events occurred at various rates, once per 1 million years (MY) in the allotetraploids, once per ~2 MY in the A/F genome clade, and once per ~8 MY in the D-genome clade;

expression analysis detected that *MIC-3* genes are highly expressed in *Fusarium* and *Verticillium* wilt resistant cotton genotypes;

for the first time, 2.5 kb intergenic spacer region, containing a *MIC-3* promoter with root-specific signal sequence were cloned, sequenced and characterized.

Practical results of the research:

MIC-3 gene sequences are recommended for modern cotton breeding and biotechnology programs to develop wilt and nematode resistant as well as other pathogen-related diseases of cotton;

SNP markers developed for *MIC-3* genes are recommended for marker assisted selection (MAS) of cotton to develop new cotton cultivars; several genetic binary vectors consisting of *GUS* marker gene with the promoter sequences of *MIC-3* gene have been made and the vectors are transformed into the model plant *Arabidopsis*. A minimal root-specific promoter of *MIC-3* gene, which is very useful in plant biotechnology, is recommended; synthetic RNAi vector constructs used in the study of gene activity in plant biotechnology have been created, new lines of cotton biotechnology have been obtained.

The reliability of the obtained results is confirmed by the use of modern approaches and methods. The data have been processed and analyzed using classical statistical tools such as analysis of variance (ANOVA), analysis of molecular variance (AMOVA), and Wilcoxon matched pairs signed-rank test, modern sequence analysis (Sequencher, ClustalX, Mega 4.1, BLASTX) algorithms, phylogenetic analysis methods (UPGMA, Mega 4.1, NJ), gene conversion and recombination tests (GeneConv, DNASP, RDP3, SiScan), and substitution rate (KaKs with Juke-Cantor corrections; codon-based Z-tests) analyses. The number of synonymous substitutions per site per year for *MIC-3* genes of cotton genomes were calculated using the expression $r = K_s/2T$.

Theoretical and practical significance of the research results. The scientific significance of the research results are interpreted by providing novel

knowledge, understanding, and the detailed account of molecular evolution, selective forces. For the first time, we discovered “gene amplification” and mechanisms that retain all duplicate copies of *MIC-3* genes in diploid and tetraploid cotton species, and occurrence of new gene functions during plant defenses in cotton under “bait and switch” model.

The practical significance of the work is that the *MIC-3* derived SNP markers

53

and *MIC-3* sequences evolving under positive selection providing increased disease resistance for cotton can be used for modern MAS programs to develop nematode and wilt resistant varieties, *MIC-3* gene promoter can be effectively used to redirect any gene function to plant roots including cotton that will provide safety of many transgenic events, and developed synthetic RNAi constructions are used in gene activity study.

Implementation of the research results. In response to the study of molecular evolution and characteristics of the clustered family of *MIC-3* genes as well as on the basis of the results obtained under the use of these genes in biotechnology of cotton:

patents for the invention (12.01.2011, № IAP 04300; 02.06.2011, № IAP 04383; 23.05.2011, № IAP 04360; 23.05.2011, № IAP 04361) on the method of small interfering RNA (siRNA) for suppression of gene expression in plant cells have been obtained from the Intelligent Agency of the Uzbekistan Republic. The results of the scientific research have allowed to create new lines by transforming the vector constructs of plant biotechnology genes, for example, by studying the activity of *MIC-3* gene;

clustered *MIC-3* genes have been used in the project № 6064-21000-014-00-D “The genetic improvement of cotton by using marker-associated and traditional breeding and introgression of genes from exotic *Gossypium* species” (2013-2018), funded by the US Department of Agriculture (reference United States Department of Agriculture of 26 September 2016). By using clustered *MIC-3* genes the possibility of obtaining nematode resistant lines, as well as improving the cotton resistance to pathogens has been created;

Testing of the research results. Basic results of the research were presented in the form of lectures, and were approved at 13 international and local scientific conferences including “Conference of American Society of Agronomy” (New York, 2006), “Actual problems of molecular biology of plants” (Tashkent, 2008), “World genetic diversity of cotton is the basis of basic and applied projects” (Tashkent, 2010), “Biology – the Science of the 21st Century” (Pushino, 2010), “Actual problems of development of bioorganic chemistry” (Tashkent, 2010), “International Cotton Genome Initiative conference” (Canberra, 2010), “5th World cotton Research Conference” (Mumbai, 2011), “International Cotton Genome Initiative (ICGI) Conference” (Brasilia, 2006; Raleigh, 2012), “International Cotton Conference” (Bremen, 2014), “Modern problems of genetics, genomics and biotechnology” (Tashkent, 2016).

Publication of the research results. A total of 28 scientific works were

published on the theme of the dissertation. 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 5 national and 5 international journals. In addition, 4 patents related to the methods used in this work were received.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of an introduction, five chapters, a conclusion and a list of references. The size of the dissertation is 171 pages.

54

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; and 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 discussed. A summary of the application of the research results and the structure of the dissertation were given.

In the second chapter of the dissertation titled **“Materials, conditions and methods of investigation of clustered genes of cotton”**, the detailed descriptions of plant materials and used reagents, methods of DNA isolation, cloning, sequencing, and sequence analyses using phylogenetic, haplotyping, gene conversion, recombination, and molecular evolutionary tests with application modern statistical approaches were given.

In the third chapter of the dissertation titled **“Characterization and chromosomal localization of *MIC-3* genes of *Gossypium* species”**, the composition, structure and location of the gene family *MIC-3* were investigated, as well as allotetraploid and diploid genomes of cotton were cloned, sequenced and characterized.

The studies include the following results:

Approximately, 150 individual PCR-derived clonal inserts for *MIC-3* gene products were sequenced from each of 15 cotton genotypes. The amplicons from *MIC-3* genes of *Gossypium* species ranged from 653-706 bp, including 653-706 bp amplicon length in all allotetraploid genotypes, 703-713 bp amplicons in *G. herbaceum*, 653-691 bp amplicons in *G. raimondii*, and 706 bp long amplicons in *G. longicalyx* (Table 1).

Multiple sequence alignment formed 721 bp long *MIC-3* full-length consensus genomic sequences for all *Gossypium* species studied. Intronic and exonic parts of the *MIC-3* genes of *Gossypium* species were annotated according to *MIC-3* nucleotide and protein sequence (Zhang et al., 2002).

Multiple sequence alignment of the genomic sequences from all *Gossypium* species in our study demonstrated that our sequences corresponded to 11 bp from non-coding 5'UTR region, two coding regions of 221-230 bp (exon 1) and 193 bp

(exon 2), single noncoding intronic region of 65-77 bp, and noncoding 3' UTR region of 151-195bp of *MIC-3* gene. The variations were due to large insertion and deletion (indel) changes observed in some members of *MIC-3* gene family in each studied cotton genotype. For example, all the studied cotton genotypes, except *G. herbaceum* (A- genome), had the 9 bp D-genome specific indel in the first exon. It is interesting to note that there was the occurrence of a triplet position shifting toward upstream direction in 9 bp indel within A-genome grouped (according SNP mutation, see phylogenetic grouping) on *MIC-3* amplicons of *G. mustelinum* (Table 1).

Table 1**Characteristics of *MIC-3* gene family of *Gossypium* species**

Genotype	Number of members	Amplicon length variation	Indel changes			Total SNP
			exon 1	intron	3' UTR	
Gh_TM1	10	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Sisoline	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_ST213	11	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	16 (A _t), 22 (D _t)
Gh_M8	12	697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	- -	17 (A _t), 20 (D _t)
Gh_REDM	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_Golib	16	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15.29 15 -	21 (A _t), 22 (D _t)
Gh_Cleviewilt	13	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	17 (A _t), 21 (D _t)
Gh_M240	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	16 (A _t), 21 (D _t)
Gh_M315	15	653 (D _t) 697 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9 -	- - -	15.29 - -	18 (A _t), 27 (D _t)

Gb_3-79	11	653 (D _t) 682 (D _t) 706 (A _t ,D _t)	9 9 -	- - -	15.29 15	11 (A _t), 29 (D _t)
<i>G. tomentosum</i>	9	653 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 -	- -	15.29 -	10 (A _t), 24 (D _t)
<i>G. mustelinum</i>	15	653 (D _t) 668 (A _t) 682 (D _t) 706 (A _t , D _t)	9 9* 9 -	- - - -	15.29 29 15 -	12 (A _t), 28 (D _t)
<i>G. herbaceum</i>	9	703 707 709 713	- - - -	12 8 6 8	6 6 6 -	19 (A)
<i>G. raimondii</i>	4	651 653 691	9 9 -	- - -	31 29 -	33 (D)
<i>G. longicalyx</i>	11	706	-	-	-	14 (F)

***Note:** 9 bp indel in the first exon of A_t-genome specific *MIC-3* gene amplicon of *G. mustelinum* has a triplet upstream shift compared to other D_t-genome specific indels observed in other genotypes. Gh – *G. hirsutum*; Gb – *G. barbadense*.

Moreover, all allotetraploid lineages, except *G. hirsutum* cv. M8, had two other major indels of 15 bp and 29 bp found in 3'UTR region, of which 29 bp indel (both structure and position wise) shared with the putative D-genome ancestor to allotetraploids, *G. raimondii*. The 15 bp indel was unique to only allotetraploid

56

genotypes studied and were not shared with either A- or D-genome putative diploid ancestors. Studying the indel pattern in 3'UTR of *MIC-3* amplicons of AD cottons (Table 1), more complex amplicons, with the combination of 15 and 29 bp indel, were found in *G. mustelinum* (three different types), and *G. barbadense* Pima 3-79 (two types) and *G. hirsutum* cv. Golib (two types). In that, *G. barbadense* Pima 3-79 and *G. hirsutum* cv. Golib *MIC-3* indel patterns were similar where occurrence of amplicons with 15 bp indel alone were unique to these genotypes, suggesting introgression between *G. barbadense* and Golib lines. On the other hand, either 15 or 29 bp indels in 3'UTR of any of *MIC-3* members of the *G. hirsutum* cv. M8 among all clones were not found. Only 12 *MIC-3* gene members were detected in M8. Wubben (2008) reported 15 distinct members from the same M8 genotype. It could be due to missing of some of *MIC-3* members in PCR-cloning experiment of this work.

169 gene members were grouped into 17 different sub-families in the phylogram (Figure 1). One hundred and ten members of *G. hirsutum* genotypes were grouped into 12 sub-families, out of which subfamilies 1 to 9 were specific to A_t-genome and 10 to 12 were specific to D_t-genome (Figure 1). Subfamilies 13 and 14 were specific to *G. herbaceum*, subfamily 15 was specific to *G. longicalyx*, and subfamilies 16 and 17 were specific to *G. raimondii* MIC-3 gene family. All allotetraploid MIC-3 gene members, except one of *G. mustelinum*-derived member (MIC-3 _14), were clustered within 12 sub-families of *G. hirsutum* (Figure 1). However, MIC-3 _14 was clustered within the 13th subfamily found in A-genome. Both *G. herbaceum* and *G. raimondii*, the putative A- and D-genome ancestors to AD cottons, had two distinct subfamilies. Species-specific presence of some sub families was observed. For example, subfamily 1 was found only in *G. hirsutum* including susceptible isoline (Sisoline), ST213, and Cleve wilt, sub-family 8 included sequences of M315, and subfamily 11 contained sequences of M8 and M315 upland cultivars.

To identify haplotypes of MIC-3 genes in tetraploid cotton, *G. hirsutum* derived NJ phylogram of MIC-3 genes were used because of wide representation of a diverse group of lines from this species in this study. *G. hirsutum* (AD) haplotypes were broadly divided into two putative broad groups: 1) A_t-genome haplotypes and 2) D_t-genome haplotype according to clustering with respective putative diploid ancestors, *G. herbaceum* and *G. raimondii*. The consensus sequences of *G. herbaceum* and *G. raimondii* were used as the reference sequence in the haplotype tables (see the dissertation). Consistent with subfamily classifications of MIC-3 genes in *G. hirsutum* (see above), the results showed that A_t-genome had 9 putative loci (haplotype group) with an average of 3.5 allele or haplotype/ locus, and D_t-genome consisted of 3 putative loci (haplotype groups) with an average of 3.3 putative alleles or haplotypes/locus in *G. hirsutum*. The number of haplotypes or putative alleles per putative locus ranged from 2-6 in A_t-genome and 4-6 in D_t-genome. The tetraploid MIC-3 sequences included 25 SNPs in the A_t-genome and 26 SNPs in the D_t-genome, all biallelic, except positions 113 (A, D), 162 (D) and 568 (D). The average number of bp per SNP in the A_t-genome versus D_t- genome was 182.6 bp and 108.8 bp, respectively.

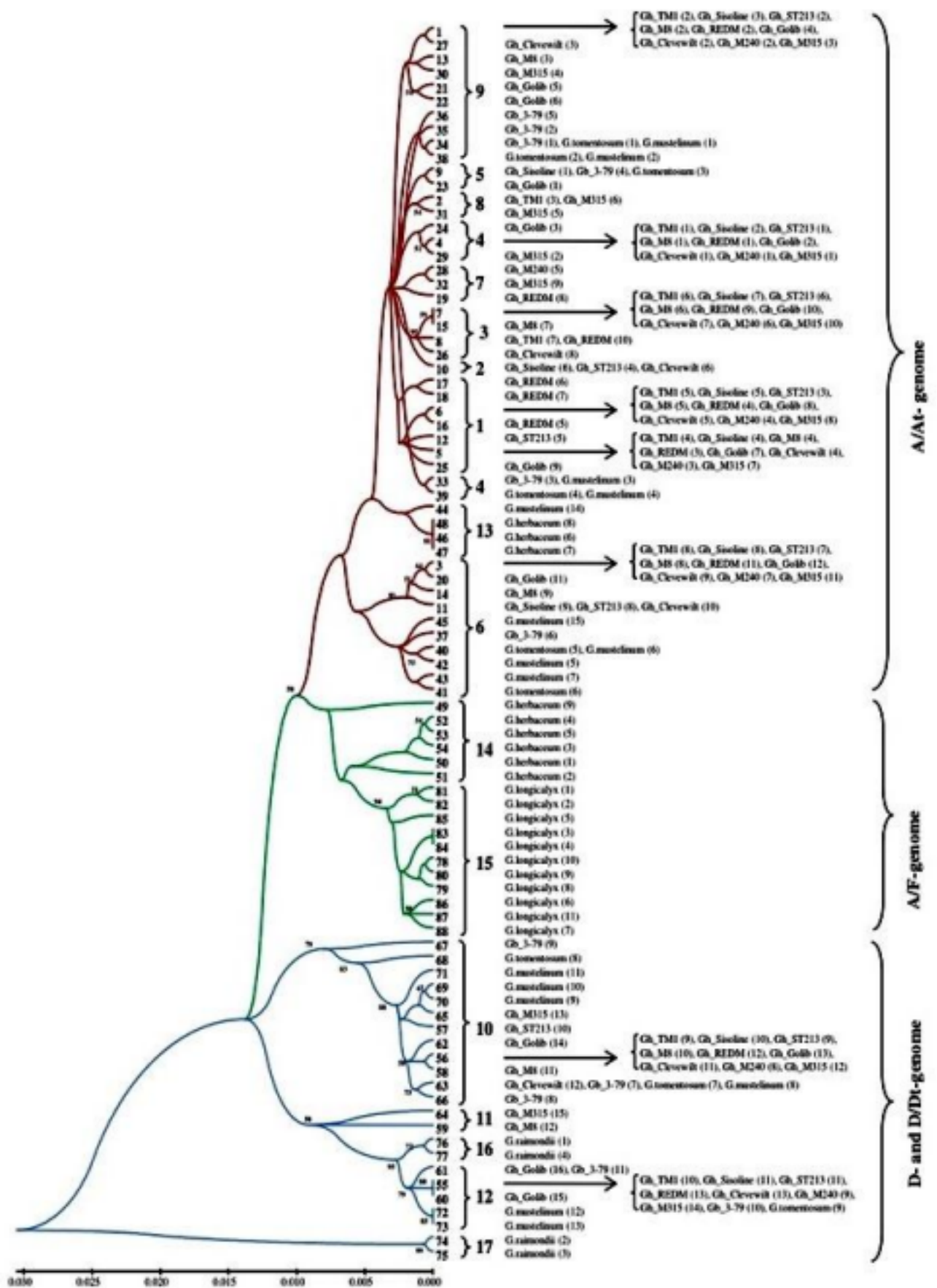


Figure 1. Curved Neighbour-Joining phylogenetic tree derived from 86 different *MIC-3* genes of *Gossypium* species:
Bootstrap values (>50%) are shown.

According to a separate phylogenetic (Figure 2) and *MIC-3* sequence analyses of TM-1 (a standard line for *G. hirsutum*) and Pima 3-79 (a double haploid standard line for *G. barbadense*), several GSP markers were designed to distinguish the interspecific genomic polymorphisms between these two species.

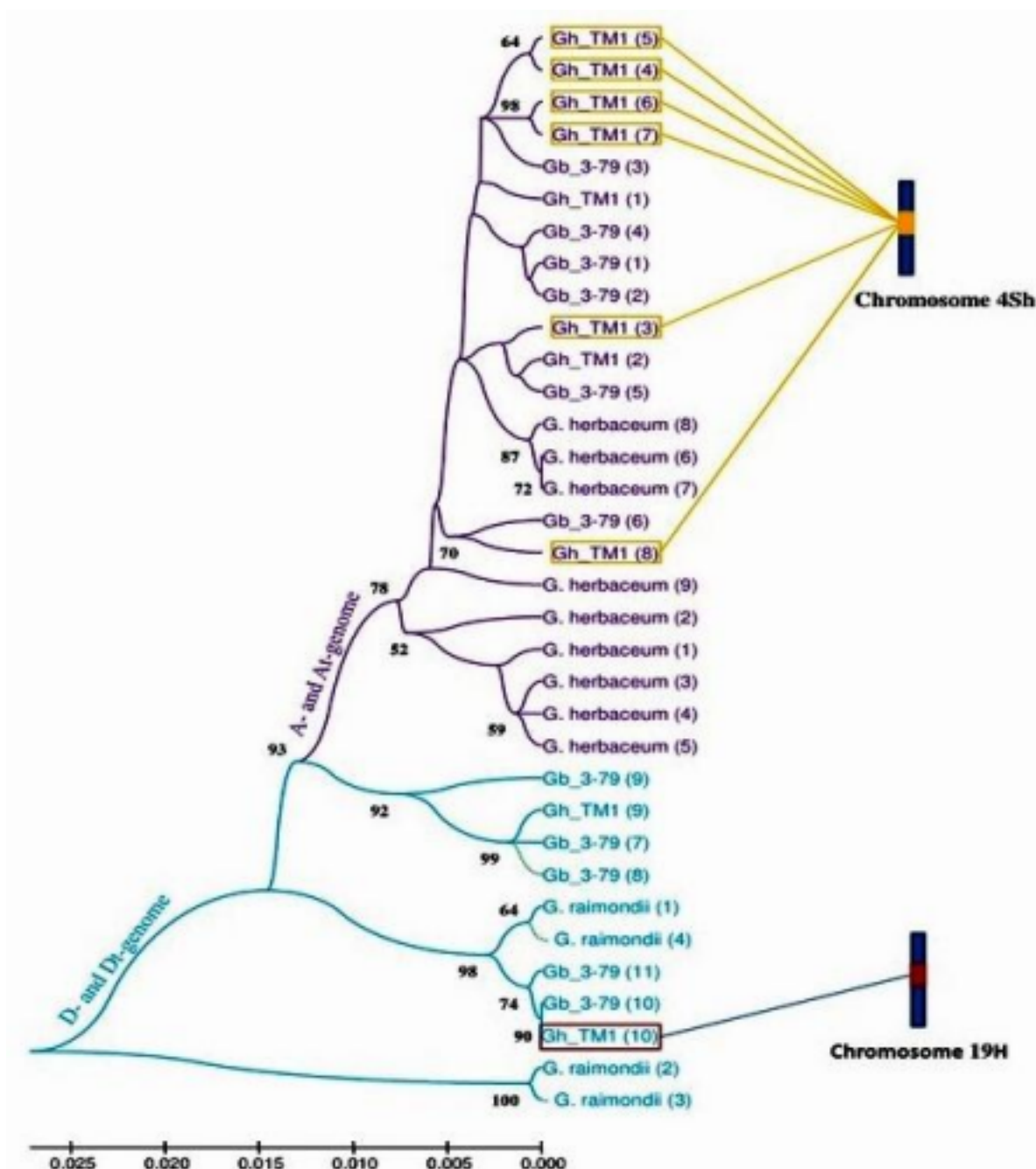


Figure 2. Curved Neighbour-Joining phylogenetic tree derived from *MIC-3* genes of *G. hirsutum* (TM-1), *G. barbadense* (Pima 3-79), and two putative diploid ancestors of AD cottons:

Branch length, bootstrap support values (>50%), chromosomal positions, and genome origins are shown and colour-coded for simplicity.

These candidate gene markers were then used for deletion analysis by screening the cytogenetic stocks, including monosomic, monotelodisomic, CS-B,

and NTN hybrids (Stelly et al. 2005; Goutirez et al. 2009). Both parental types of

59

polymorphisms were present in most of the F₁ hybrids. However, all of eight TM-1 GSP alleles, representing 7 out of 8 different A_t-genome-derived *MIC-3* members of TM-1, were absent from the hypoaneuploid F₁ plants that lacked *G. hirsutum* chromosome-4 (H04 monosomic) or the short arm of chromosome 4 (Te04Lo monotelodisomic). The euploid disomic chromosome substitution line CS-B04 also lacked the same *G. hirsutum MIC-3* alleles for all of these markers. In contrast, all of the eight GSP loci were heterozygous in all of the other substitution lines and in the monotelodisomic F₁ substitution plant (Te04sh) deficient for the long arm of chromosome-4. The results collectively indicated that 7 out of 8 A_t-genome *MIC-3* members of TM-1 are in the short arm of chromosome 4, implying potential evidence for clustered localization of *MIC-3* genes in cotton genome (Figure 2). Although several D_t-genome *MIC-3* haplotype specific GSPs between TM-1 and 3-79 were found, they failed to be polymorphic in deletion analysis and chromosomal localization experiments. This was due to existence of overlapping sites within 3-79 *MIC-3* members that limited us to differentiate GSP polymorphisms in cytogenetic stocks. However, the detailed sequence analysis of *G. mustelinum*-derived *MIC-3* members helped to design two different GSP primers (not polymorphic between TM-1 and Pima 3-79), that were polymorphic between TM-1 and *G. mustelinum MIC-3* gene members, detecting genotype specific alleles in deletion analysis. Tertiary monosomic F₁ interspecific hybrids NTN 12-19 and NTN 10-19 differentially lacked the TM-1 allele specific to this SNP marker, but not the *G. mustelinum* allele. The NTN 12-19 plant is segmentally deficient for parts of TM-1 chromosomes 12 and 19, whereas NTN10-19 is segmentally deficient for parts of the TM-1 chromosomes 10 and 19. Together, they delimit one of the D_t-genome *MIC-3* member (*MIC_3_10*) of TM-1 to chromosome-19. In contrast, primary monosomic interspecific hybrids H10 and H12 were deficient for *G. hirsutum* chromosomes 10 and 12, but contained the TM-1 and *G. mustelinum* GSP *MIC-3* markers.

The result indicated that this D_t-genome-derived *MIC-3* member is not located in either of these chromosomes, and further supports the localization to chromosome-19. The other hypoaneuploid F₁ plants lacked other chromosomes, but contained both TM-1 and 3-79 alleles for this specific SNP marker. Although a primary monosomic for chromosome-19 is not yet available for *G. hirsutum*, the results nevertheless clearly indicate that this D_t-genome *MIC-3* member is located in chromosome 19 of *G. hirsutum*.

Gene expression analysis of *MIC-3* genes in a number of wilt pathogen infected and non-infected cotton genotypes revealed that *MIC-3* genes were highly overexpressed during *Fusarium* and *Verticillium* infected tissues and the overexpression was pronouncedly higher in resistant genotypes (data not shown; see the dissertation). This data showed the importance of *MIC-3* genes not only in RKN pathogenesis but also, as a PR-protein, its potential guarding function in wilt

pathogenesis and possibly in other diseases of cotton.

In the fourth chapter of the dissertation titled “**Molecular evolution of *MIC-3* gene family in *Gossypium* species**”, the data on nucleotide exchange rate at 15 tetraploid and diploid cotton genotypes and patterns of molecular evolution of

60

multigene *MIC-3* family were presented.

The studies include the following results:

After removal of intronic and UTR sequence regions from all 169 *MIC-3* gene members, 131 distinctive coding DNA sequences for *MIC-3* gene members from the 15 cotton genotypes were formed that were further grouped into 56 putatively protein-coding distinct cDNA sequences. These coding DNA sequences were successfully aligned to 423 bp multiple sequence alignment using ClustalX that covers entire coding region of *MIC-3* genes, including the first (231 bp) and second (192 bp) exons. These 56 distinctive putative cDNA sequences generated 29 distinctively predicted protein sequences in all 15 cotton genotypes. Collectively, amino acid differences were seen at 42 of 141 amino acid positions (30%) of putative *MIC-3* protein sequences of *Gossypium* species. There were more amino acid changes in D₁-genome-derived putative *MIC-3* proteins compared to the A₁-genome-derived protein group. Amino acid changes were less pronounced in the A₁- and F-genome group of putative *MIC-3* proteins. In contrast, there were observed the greatest number of amino acid changes within just 4 putative proteins of D₅-genome *MIC-3* genes.

Further, molecular evolution of the *MIC-3* gene family was studied based on the analysis of its variation in 15 tetraploid and diploid *Gossypium* genotypes that collectively represent seven phylogenetically distinct genomes, which are often used for evolutionary studies. Synonymous (d_S) and non-synonymous (d_N) nucleotide substitution rates suggest that the second of the two exons of the *MIC-3* genes has been under strong positive selection pressure, while the first exon has been under strong purifying selection to preserve function (Table 2). Based on nucleotide substitution rates, we conclude that *MIC-3* genes are evolving by a “birth-and-death” process under strong purifying selection in exon-1 and diversifying selection in exon-2 (Table 2). The results suggest that a “gene amplification” mechanism has helped to retain all duplicate copies of *MIC-3* genes in the *Gossypium* genomes, which best fits with the “bait and switch” model of R gene evolution. The data indicate *MIC-3* gene duplication events occurred at various rates, once per 1 million years (MY) in the allotetraploids, once per ~2 MY in the A/F genome clade, and once per ~8 MY in the D-genome clade (Figure 3). Variations in the *MIC-3* gene family seem to reflect evolutionary selection for increased functional stability (through purifying selection in exon-1), while also expanding the capacity to develop novel “switch” pockets (through diversifying selection in exon-2) for responding to diverse pests and pathogens. Such evolutionary roles are congruent with the hypothesis that members of this unique resistance gene family provide fitness advantages in *Gossypium* as it combats pests and pathogens.

The fifth chapter of the dissertation titled “**Molecular characterization of root specific promoters from *MIC-3* intergenic regions and developind genetic genetic constructions with root-specific promoters for achieving root specific expression**” discusses the creation of vector designed using synthetic RNA duplexes and the nucleotide sequence of a minimum length of root-specific gene promoter *MIC-3*, which will be useful in the future for cotton biotechnology.

61

Table 2

Average within-genotype nucleotide substitution estimates for *MIC-3* gene family of cotton

Genotypes	Geno me	A _t			D _t			Total*		
		d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S	d _N	d _S	d _N :d _S
Gh_TM-1	[AD] ₁	0.80	2.19	0.37	4.19	4.33	0.97	1.85	2.57	0.72
Gh_Sisoline	[AD] ₁	0.69	1.94	0.36	4.19	4.33	0.97	1.56	2.34	0.66
Gh_M315	[AD] ₁	0.67	1.89	0.35	2.86	3.49	0.82	1.57	2.38	0.66
Gh_M8	[AD] ₁	0.78	1.94	0.40	3.53	3.23	1.09	1.36	2.14	0.64
Gh_Cleviewilt	[AD] ₁	0.80	1.89	0.42	2.79	2.86	0.98	1.61	2.16	0.74
Gh_Golib	[AD] ₁	0.66	2.24	0.30	4.19	4.33	0.97	1.50	2.55	0.59
Gh_M240	[AD] ₁	0.76	2.09	0.36	4.19	4.33	0.97	1.67	2.46	0.68
Gh_ST213	[AD] ₁	0.58	2.04	0.28	4.19	4.33	0.97	1.37	2.48	0.55
Gh_REDM	[AD] ₁	0.97	1.97	0.49	4.04	3.74	1.08	1.51	2.37	0.64
Gb_Pima 3-79	[AD] ₂	0.31	1.04	0.30	2.84	2.76	1.03	1.90	1.87	1.02
<i>G. mustelinum</i>	[AD] ₄	0.39	0.79	0.49	2.30	2.11	1.09	1.73	1.34	1.29
<i>G. tomentosum</i>	[AD] ₃	0.49	0.83	0.60	2.90	2.84	1.02	1.78	1.62	1.10
<i>G. herbaceum</i>	A ₁	-	-	-	-	-	-	0.43	0.41	1.05
<i>G. raimondii</i>	D ₅	-	-	-	-	-	-	3.70	2.83	1.31
<i>G. longicalyx</i>	F	-	-	-	-	-	-	0.35	2.37	0.15
All <i>G. hirsutum</i>	[AD] ₁	2.06	0.61	0.30	2.79	2.37	0.85	1.32	2.39	0.55
All <i>Gossypium</i> species	-	1.90	0.58	0.31	2.57	2.20	0.86	1.80	2.58	0.70

Gh – *G. hirsutum*; Gb – *G. barbadense*; Sisoline – Susceptible isoline; *Total - A_t and D_t

combination; d_S -synonymous nucleotide substitution rates; d_N -non-synonymous nucleotide substitution rates; $d_N:d_S$ is the ratio of the rate of nonsynonymous to synonymous substitution since divergence of two sequences, which is roughly equal to $d_N:d_S$, the ratio of the numbers of nonsynonymous to synonymous substitutions. **Note:** that $d_N:d_S$ rates greater than 1 shown in bold faced letters; d_N and d_S values have been multiplied by 100x.

The researches have the following results:

A 2.5 Kb intergenic regions of *MIC-3* gene clusters were amplified, cloned and sequenced using a primer pair from the first exon of *MIC-3* genes. The consensus position of 220-240 bp (forward) and 130-154 (reverse) of multiple sequence alignment was used. The analysis of this intergenic *MIC-3* sequence identified a promoter sequence signatures with TATA-box and many different sequence motifs related to root-specificity and pathogen infection. Several primer pairs were designed to amplify different fragments of this 2.5 kb promoter sequence.

This allowed to identify a minimal promoter region. The designed primer pairs have a restriction enzyme sites at their ends to be inserted into upstream of binary plasmid vectors containing a *GUS* reporter gene. Briefly, a 2562 bp promoter

62

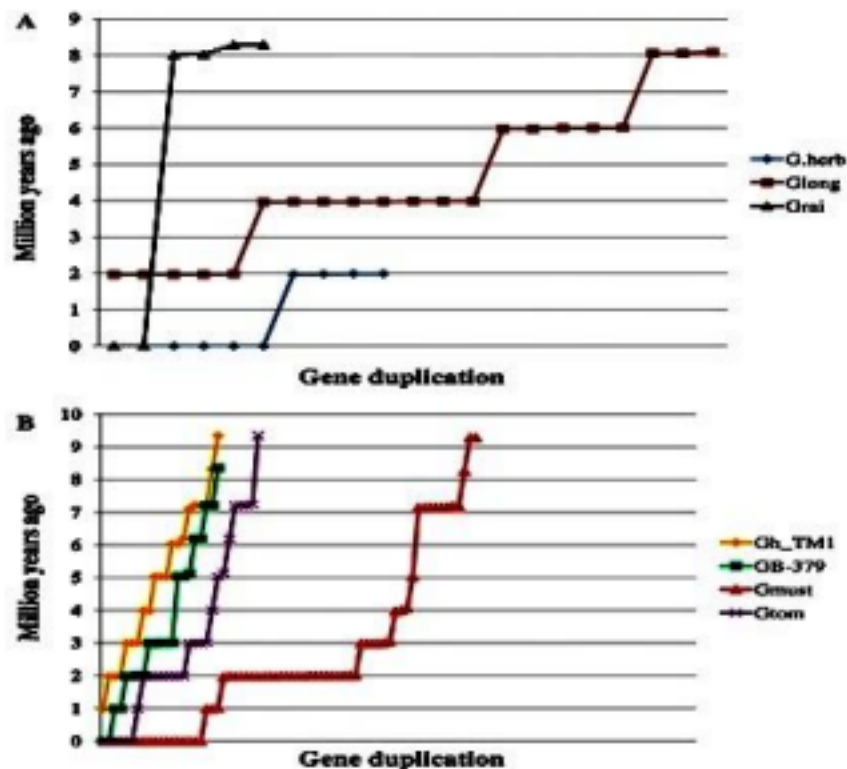


Figure 3. Gene duplication pattern in the *MIC-3* gene family of diploid and allotetraploid *Gossypium* species:

(A) diploid species: Gherb – *G. herbaceum*, Glong – *G. longicalyx*, Grai – *G. raimondii*; (B) – allotetraploid species: Gh_TM1 – *G. hirsutum* TM-1, GB-379 – *G. barbadense* Pima 3-79; Gmust – *G. mustelinum*, and Gtom – *G. tomentosum*. Note: the other *G. hirsutum* genotypes (Sisoline, M315, Clevevilt, M240, ST213, Golib, M8 and REDM) used in this study have the same gene duplication pattern; they are not included for simplicity of the figure. Divergence time

estimates (MYA) were calculated using synonymous substitution rates in pairs of *MIC-3* gene members per genotype/species using 2.6×10^{-9} synonymous substitutions per site/year.

fragment of *MIC-3*, characterized through our project, was re-amplified with a pair of primers carrying an Hind III and a BamHI restriction site adapters. Shorter promoter fragments with different lengths of 5'-terminal deletions were similarly amplified with each specific primer pairs (Figure 4). These promoter fragments were inserted into publicly available pBI101 vector, upstream of *GUS* gene coding region, resulting in a series of pBI101-MIC3_Pr::GUS binary vectors, namely P-2500 (-2500/-1, 2500 bp), P-2200 (-2200/-1, 2200 bp), P-1800 (-1882/-1, 1882 bp), P-1600 (-1658/-1, 1658 bp), P-1300 (-1381/-1, 1381 bp), P-1000 (-1057/-1, 1057 bp), P-700 (-708/-1, 708 bp). The vectors were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (for cotton transformation) or GV3101 (for *Arabidopsis* transformation) and used for *in planta* *Arabidopsis* transformation experiments. Transgenic plants were recovered selecting seedlings on kanamycin

containing agar plates. Transgenic *Arabidopsis* plants bearing a minimal promoter region vector, pBI101-700::GUS, showed *GUS* expression in only root of the plant when subjected to the *GUS*-assay during the growth in the agar plate (Figure 4).

63

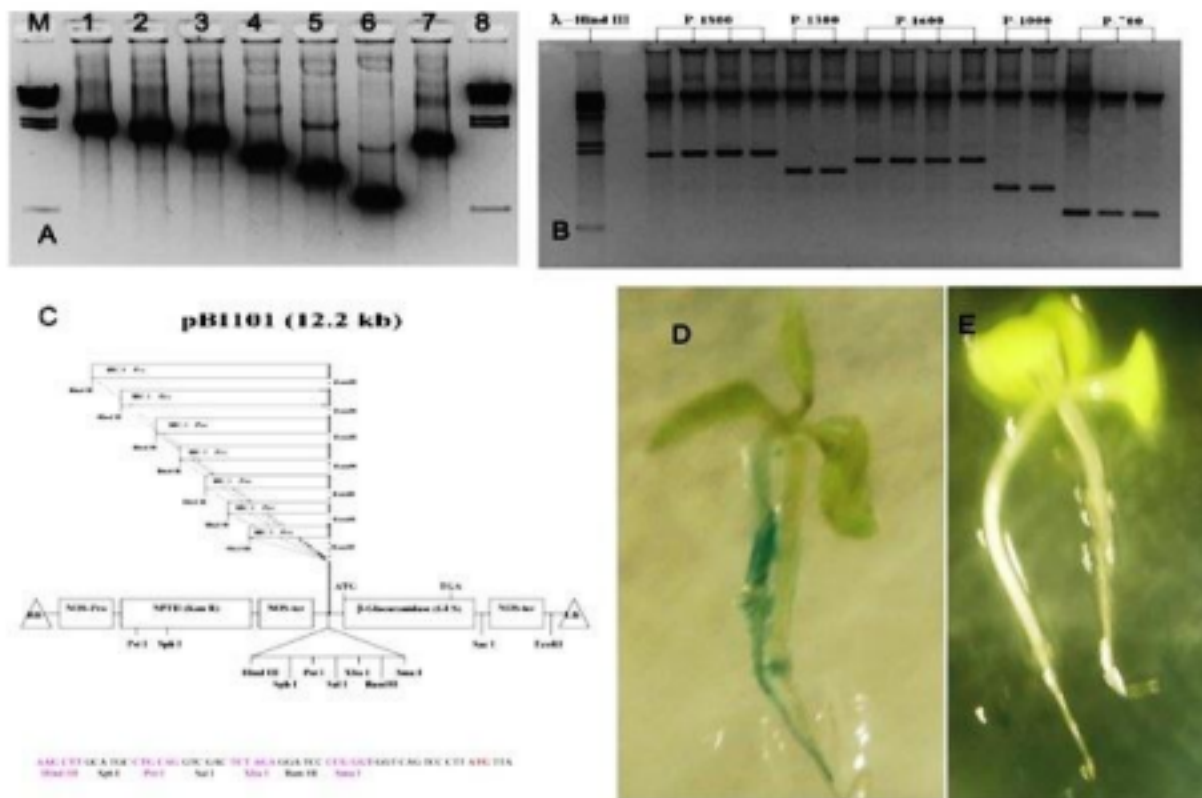


Figure 4. *MIC-3* promoter function verification:

A—fragmented *MIC-3* promoter sequences [1,9 – Marker λ /Hind III, 2 Pr-2500, 3 Pr-2200, 4 Pr-1882, 5 Pr-1381, 6 Pr-1057, 7 Pr-708, 8 Pr-1658]; B and C— sub-cloning into pBI101 binary

vector with GUS marker gene; Histochemical staining of GUS expression pattern in transgenic Arabidopsis plants expressing P-700::GUS: (D) 1-week-old transformed seedling; (E) control Arabidopsis plants.

This suggested that the 708 bp minimal region of the *MIC-3* promoter will be sufficient to direct any gene expression to the roots of a plant. These *MIC-3* vector sets were transformed into a total of 1383 hypocotyl sections of Coker-312, including no vector transformation sets. As a no vector, negative control, 125 hypocotyl sections were treated with water.

Several transgenic cotton embryo plants were somatically regenerated (Figure 5) that bear *MIC-3* gene promoter regions driving *GUS* marker gene which are being grown for further characterization in molecular and functional level. This unique root specific promoter will be useful for plant biotechnology industry to express any gene in plant roots only. Furthermore, binary vectors with syntetic RNAi duplexes to study plant gen function, including *MIC-3* genes, were constructed and optimized to be used in plant biotechnology.

64

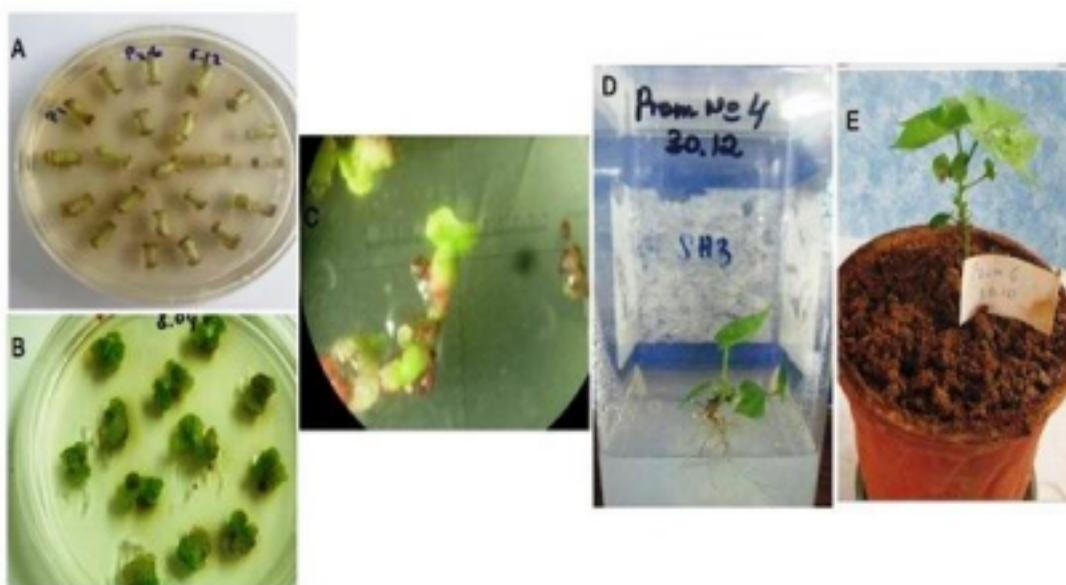


Figure 5. Cotton transformation and somatic embryogenesis using *MIC-3* specific promoter constructions:

A–hypocotyl sections; B– callusogenesis; C–somatically regenerated embryo plants; D– rooting and shooting; E–transferring into soil pots.

CONCLUSION

On the basis of the performed investigation on the theme of this doctoral dissertation “Cloning, characterization and investigation of molecular evolution of pathogen-resistance cluster *MIC-3* gene family in cotton (*Gossypium* spp.) and its significance for cotton biotechnology” the following conclusions were presented:

1. For the first time, the position, structure and content of the complex, large, only cotton specific, and root expressed *MIC-3* gene family of *Gossypium* species were cloned, sequenced and characterized in allotetraploid and diploid cotton genomes.

2. The results identified a total of 169 *MIC-3* gene member genomic DNA sequences from 15 cotton genotypes and revealed 4 to 16 gene members with 2 to 10 subfamilies per studied genotype/species.

3. All *MIC-3* gene members were phylogenetically grouped into a total of 17 genome-specific subfamilies using nucleotide polymorphisms (SNPs) and putative haplotypes.

4. The analysis of allotetraploid genome-derived *MIC-3* gene members further identified 42 haplotype sequences, specific to A_t - or D_t - genomes, that helped to identify *MIC-3* gene specific SNPs.

5. For the first time, genome specific *MIC-3*-derived SNP markers were developed, and haplotypic associations and long-PCR experiments have confirmed clustered localizations of *MIC-3* gene members in homeologous segments of chromosomes 4 and 19 of *G. hirsutum*.

6. For the first time, nucleotide substitution rates and patterns of molecular evolution of *MIC-3* multigene family in 15 tetraploid and diploid cotton genotypes were reported. Estimation of an average number of synonymous (d_s) and

65

nonsynonymous (d_N) nucleotide substitutions for coding DNA sequences of *MIC-3* gene family detected selective constraints and molecular evolution of this gene family in cotton genomes.

7. The results suggested that, despite an early-course, “concerted” evolution may be evident, *MIC-3* gene family of cotton species were evolving under a “birth and-death” evolution with purifying selection in exon-1 and diversifying selection in exon-2.

8. The results also suggested “gene amplification” as a possible mechanism to preserve all duplicate copies of *MIC-3* genes and to develop new gene functions during cotton plant defenses under “bait and switch” model.

9. The results indicated *MIC-3* gene duplication events occurred at various rates, once per ~1 million years (MY) in the allotetraploids, once per ~2 MY in the A/F genome clade, and once per ~8 MY in the D-genome clade. The identified intriguing time estimate and gene duplication pattern should be useful to understand the role of pathogen-mediated selection processes in the evolution of cotton genomes;

10. It was shown that *MIC-3* genes are highly expressed during *Fusarium* and *Verticillium* wilt infection process in susceptible and resistant genotypes of cotton

cultivars that show the significance of *MIC-3* genes during wilt diseases of cotton.

11. For the first time, 2.5 kb intergenic spacer region containing a *MIC-3* promoter with root-specific signal sequence was cloned, sequenced and characterized.

12. A set of several binary genetic vectors, driving *GUS* marker gene under various lengths of *MIC-3* promoter sequences, as well as binary vectors with syntetic RNAi duplexes to study plant gen function, including *MIC-3* genes, were constructed and transformed into model plant *Arabidopsis* that identified and confirmed root specificity of minimally required *MIC-3* gene promoter sequences useful for future cotton biotechnology.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Буриев З.Т., Бозоров Т.А., Абдурахмонов И.Ю., Якубов М.Д., Абдукаримов А. Соматический эмбриогенез и регенерация хлопчатника (*Gossypium hirsutum*. L) сорта Кокер-312 // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2008. – №2. – С. 80-83. (03.00.00; № 2).

2. Абдурахмонов И.Ю., Бозоров Т.А., Буриев З.Т., Шерматов Ш.Э., Абдукаримов А. РНК-интерференция гена *HY5* хлопчатника в модельном растении Арабидопсис // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2008. – Специальный выпуск. – С. 18-21. (03.00.00; № 5).

3. Buriev Z.T., Saha S., Abdurakhmonov I.Y., Jenkins J.N., Abdukarimov A., Scheffler B.E., Stelly D.M. Clustering, haplotype diversity, and locations of *MIC 3*, a unique root-specific defence-related gene family in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L) // Theoretical and Applied Genetics. – Berlin, 2009. – №120(3). –P.

587-606 (Research gate, 40, IF=3,85).

4. Abdurakhmonov I.Y., Saha S., Jenkins J.N., Buriev Z.T., Shermatov S.E., Scheffler B.E., Pepper A.E., Yu J.Z., Kohel R.J., Abdukarimov A. Linkage disequilibrium based association mapping of fiber quality traits in *G.hirsutum* L. variety germplasm // *Genetica*. – Berlin, 2009. – №136(3). –P. 401-17. (Research gate, 40, IF=1,37).

5. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Logan-Young C.J., Abdukarimov A., Pepper A.E. Duplication, divergence and persistence in the Phytochrome photoreceptor gene family of cottons (*Gossypium spp.*) // *BMC Plant Biology*. – USA, 2010. – №10. –P. 119. (Research gate, 40, IF=4,99).

6. Буриев З.Т., И.Ю. Абдурахмонов, Ш. Э. Шерматов, А. Абдукаримов Молекулярная характеристика семейства генов *MIC-3* рода *Gossypium* // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2010. – №6. – С. 73-75. (03.00.00; № 2).

7. Buriev Z.T., Saha S., Shermatov S.E., Jenkins J.N., Abdukarimov A, Stelly D.M., Abdurakhmonov I.Y. Molecular evolution of the clustered *MIC-3* multigene family of *Gossypium* species // *Theoretical and Applied Genetics*.–Berlin,2011. – №123(8). –P. 1359-73. (Research gate, 40, IF=5.29).

8. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Abdukarimov A., Pepper A.E. Cotton PHYA1 RNAi enhances major fiber quality and agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L) // *Nature Communications*. – USA, 2014. – №4. 1-10 (Research gate, 40, IF=12,51).

9. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Сравнение скоростей несинонимичных и синонимичных нуклеотидных замен генов *MIC-3* у хлопчатника // *Узбекский биологический журнал*. – Ташкент, 2016. – Специальный выпуск. – С. 37-40. (03.00.00, № 5).

10. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю., Шерматов Ш.Э., Рузибаев Х.С., Абдукаримов А. Хромосомная локализация генов *MIC-3* хлопчатника //

67

Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2016. – Специальный выпуск. – С. 33-37. (03.00.00; № 5).

11. Патент Республики Узбекистан № IAP 04300. Малая интерферирующая РНК (siRNA) для подавления генной экспрессии в растительных клетках / Абдукаримов А., Абдурахмонов И.Ю., Буриев З.Т., Бозоров Т.А. // *Официальный бюллетень*. – 2011. – № 2.

12. Патент Республики Узбекистан № IAP 04383. Малая интерферирующая РНК (siRNA) для подавления генной экспрессии в растительных клетках / Абдукаримов А., Абдурахмонов И.Ю., Буриев З.Т., Бозоров Т.А.// *Официальный бюллетень*. – 2011. – № 2.

13. Патент Республики Узбекистан № IAP 04360. Малая интерферирующая РНК (siRNA) для подавления генной экспрессии в растительных клетках / Абдукаримов А., Абдурахмонов И.Ю., Буриев З.Т., Бозоров Т.А.// *Официальный бюллетень*. – 2011. –№ 6.

14. Патент Республики Узбекистан № IAP 04361. Малая

интерферирующая РНК (siRNA) для подавления генной экспрессии в растительных клетках / Абдукаримов А., Абдурахмонов И.Ю., Буриев З.Т. // Официальный бюллетень, – 2011. – № 6.

II бўлим (II часть; Part II)

15. Buriev, Z., Saha, S., Abdurakhmonov, I.Y., Jenkins, J.N., Abdukarimov, A., Scheffler, B.E., Stelly, D.M., Wubben, M. A strategy for developing snp markers for the *MIC-3* root-specific gene family associated with nematode resistance in *Gossypium* spp. // Proceedings International Cotton Genome Initiative Conference. Available: <http://cgi.tamu.edu/pds/icgi06-abs-final>. 2006.

16. Buriev, Z., Saha, S., Abdurakhmonov, I.Y., Jenkins, J.N., Abukarimov, A., Scheffler, B.E., Stelly, D.M., Wubben, M. 2006. Evidence of clustering for the *MIC-3* root-specific gene family associated with nematode resistance in *Gossypium* spp. American Society of Agronomy Abstracts. CDROM.

17. Бозоров Т.А., Абдурахмонов И.Ю., Буриев З.Т., Абдукаримов А.А. Создание RNAi конструкции. // Актуальные проблемы молекулярной биологии растений: Материалы международной научно-практической конференции: Ташкент, 2008. – С. 25-26 .

18. I.Y. Abdurakhmonov, Z.T. Buriev, S.E. Shermatov, G.T. Mavlonov, A. Abdukarimov. Molecular diversity and population structure analysis in a global set of *G. hirsutum* exotic and variety germplasm resources and association mapping of the main fibre quality traits // Proceedings of the International Cotton Genome Initiative Conference. – Canberra. - 2010. – P.22.

19. Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Shermatov S.E., Abdukarimov A., Stelly D.M., Abdurakhmonov I.Y. Molecular evolution of clustered *MIC-3* (Meloidogyne Induced Cotton-3) multigene family of *Gossypium* species. // Proceedings of the International Cotton Genome Initiative Conference. – Canberra, 2010. – P.66.

20. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю., Шерматов Ш.Э., Абдукаримов А. Характеристика семейства генов *MIC-3* у вида *GOSSYPIMUM* // Биология –

68

Наука XXI века: 14-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. – Пушино, 2010. – С.115.

21. Буриев З.Т. Изучение нуклеотидных последовательностей семейства генов *MIC-3* рода *Gossypium* // Ёўзанинг дунёвий хилма-хиллиги генофонди фундаментал ва амалий тадқиқотлар асоси: халқаро илмий анжуман материаллари. – Ташкент, 2010. – С. 167

22. Buriev Z.T., Shermatov S.E., Abdurakhmonov I.Y. Function and molecular evolution of *MIC-3* gene family of cotton. // Актуальные проблемы развития биоорганической химии. Материалы международной научной конференции. – Ташкент, 2010. – С. 148.

23. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Shermatov S.E. Marker-assisted selection for complex fiber traits in cotton // 5th World Cotton Research Conference, Special session of ICGI. – Mumbai, India: 2011. P. 406

24. Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Shermatov S.E., Abdukarimov A., Stelly D.M., Abdurakhmonov I.Y. Molecular evolution of clustered *MIC-3* (Meloidogyne Induced Cotton-3) multigene family of *Gossypium* species. // World Cotton Research Conference-5. – Mumbai, India, 2011. P. 412
25. Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Sukumar S., Abdukarimov A., Jenkins J., Pepper A. Phytochrome RNA interference enhances major fiber quality and agronomic traits of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). // ICGI conference. –Raleigh, NC, 2012.
26. Patent Application of Uzbekistan № IAP: 20120069, Patent Application of USA № USPTO:13/445696, Patent Application of internationally № PCT/US13/27801. Cotton *PHYA1* RNAi Improves Fiber Quality, Root Elongation, Flowering, Maturity and Yield Potential in *Gossypium hirsutum* L. / Abdurakhmonov I.Y., Buriev Z.T., Saha S., Jenkins J.N., Abdukarimov A., Pepper A.E. // – 2012.
27. Abdurakhmonov I.Y., Shapulatov U.M., Shermatov S.E., Buriev Z.T., Abdullaev A.A., Kushanov F.N., Egamberdiev S.S., Salahutdinov I.B., Ubaydullaeva H.A., Makamov A.H., Darmanov M.M., Ayubov M.S., Norov T.M., Tulanov A.A., Mavlonov G.T., Abdukarimov A. Achievements and perspectives of cotton “omics” in Uzbekistan: // Proceedings of the International Cotton conference Bremen. – Germany, 2014. – P. 47-63
28. Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. Молекулярное разнообразие и дифференциация мультигенного семейства *MIC-3* хлопчатника // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: Материалы Республиканская научная конференция: – Тошкент: 2016 – С. 78.

Босишга рухсат этилди: 08.11.2016 йил
Бичими 60x45 $\frac{1}{16}$, «Times New Roman»
гарнитурада рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 5. Адади: 100. Буюртма: № ____.

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

«АКАДЕМИЯ НОШИРЛИК МАРКАЗИ» ДУК