

**O'zbekistonda g'o'zaning fuzariozli vilt kassalligini keltirib chiqaruvchi
Fusarium turlarining genetik xilma-xilligi**

Xamdullayev Shuxrat Abduraxmonovich

O'zR FA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti doktoranti
(DSc)

E-mail: xamdullayevshuxrat@gmail.com

Tel: +998901358368

Bozorov Toxir Axmadovich

O'zR FA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti bosh ilmiy
xodimi

E-mail: tohirbozorov@gmail.com

Sherimbetov Anvar Gulmirzoevich

O'zR FA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti laboratoriya
mudiri

E-mail: sheranvar@mail.ru

Ro'zmetov Dilshod Rustam o'g'li

O'zR FA Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi instituti katta ilmiy
xodimi

E-mail: ruzmetov.1993@inbox.ru

Annotatsiya. Ushbu tadqiqotda O'zbekistonning turli hududlaridan ajratib olingan *Fusarium oxysporum* va *Fusarium solani* zamburug'larining genetik xilma-xilligi o'rganildi. Kasallangan g'o'za o'simliklaridan olingan izolyatlar morfologik va molekulyar genetik identifikatsiya qilindi. ITS gen hududlari bo'yicha sekvenslanib, olingan ketma-ketliklar asosida filogenetik daraxt tuzildi va turli viloyat hududlaridan olingan izolyatlar o'zaro taqqoslandi. DnaSP dasturi asosida o'tkazilgan DNK polimorfizm tahlili 224 ta polimorf saytni aniqladi. *F. oxysporum* izolyatlarida yuqori genetik xilma-xillik ($Hd = 0,348$; $Pi = 0,121$) mavjudligini, *F. solani* populyatsiyasida esa genetik barqarorlik ustunligini ko'rsatdi.

Kalit soʻzlar: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *fuzariozli vilt*, *gʻoʻza*, *filogenetik tahlil*, *DnaSP*, *genetik xilma-xillik*.

Аннотация. В данном исследовании изучено генетическое разнообразие грибов *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani*, выделенных из различных регионов Узбекистана. Изоляты, полученные из заражённых растений хлопчатника, были идентифицированы морфологическими и молекулярно-генетическими методами. Проведено секвенирование ITS-генного региона, на основе которого построено филогенетическое дерево и выполнено сравнение изолятов, полученных из разных областей. Анализ полиморфизма ДНК с использованием программы DnaSP выявил 224 полиморфных сайта. Установлено, что изоляты *F. oxysporum* характеризуются высоким генетическим разнообразием ($Hd = 0,348$; $Pi = 0,121$), тогда как популяция *F. solani* отличается генетической стабильностью.

Ключевые слова: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *фузариозное вильт*, *хлопчатник*, *филогенетический анализ*, *DnaSP*, *генетическое разнообразие*.

Abstract: This study investigated the genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolates collected from different regions of Uzbekistan. The isolates obtained from infected cotton plants were identified using morphological and molecular genetic methods. Sequencing of the ITS gene region was performed, and a phylogenetic tree was constructed to compare isolates from various regions. DNA polymorphism analysis using DnaSP software identified 224 polymorphic sites. The results showed that *F. oxysporum* isolates exhibited high genetic diversity ($Hd = 0.348$; $Pi = 0.121$), while the *F. solani* population displayed genetic stability.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium wilt*, *cotton*, *phylogenetic analysis*, *DnaSP*, *genetic diversity*.

Kirish

Gʻoʻza (*Gossypium hirsutum* L.) Oʻzbekiston qishloq xoʻjaligida eng muhim

tolali va texnik ekinlardan biri hisoblanadi. Shu sababli g'oz' hosilini pasaytiruvchi va sifat ko'rsatkichlariga salbiy ta'sir etuvchi kasalliklarni o'rganish bugungi kunda dolzarb vazifalardan biridir.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* zamburug'i keltirib chiqaradigan fuzariozli vilt kasalligi eng xavflilaridan hisoblanadi. Bu kasallik o'simliklarning barglari sarg'ayishi, so'lishi va butun vegetativ organlarning nobud bo'lishiga olib keladi. Natijada hosildorlik 20–50% gacha kamayishi mumkin. Ayrim hollarda kasallik epidemik tus olib, katta iqtisodiy yo'qotishlarga sabab bo'ladi.

Fuzariozli vilt kasalligini qo'zg'atuvchi *Fusarium* turkumiga mansub zamburug'lar yuqori darajada genetik xilma-xillikka ega bo'lib, turli geografik hududlarda ularning populyatsiyalari o'ziga xos molekulyar-genetik xususiyatlar bilan ajralib turadi. Shu bois, *Fusarium* izolyatlarining genetik va filogenetik tahlili nafaqat ularning xilma-xilligini aniqlash, balki kasallikka chidamli g'oz' navlarini yaratishda ham muhim ilmiy asos bo'lib xizmat qiladi.

Ushbu tadqiqotning dolzarbligi O'zbekistonning turli hududlaridan ajratib olingan *Fusarium* izolyatlarining genetik xilma-xilligini baholash, ularning populyatsion strukturasini tahlil qilish va filogenetik aloqalarini aniqlash zaruratidan kelib chiqadi. Tadqiqot natijalari fuzariozli vilt kasalligiga chidamlili g'oz' navlarini yaratishga ilmiy asos yaratadi.

Adabiyotlar tahlili

G'oz' (*Gossypium hirsutum* L.) dunyoning ko'plab mamlakatlarida, xususan, O'zbekistonda ham muhim qishloq xo'jalik ekinlaridan biri bo'lib, uning hosildorligi va sifatiga ta'sir etuvchi omillar orasida kasalliklar alohida o'rin tutadi. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* zamburug'i tomonidan keltirib chiqariladigan fuzariozli vilt g'oz' yetishtirishda eng jiddiy muammolardan biridir. Ushbu patogen tuproqda uzoq vaqt saqlanib, o'simlikning ildiz va tomir tizimlarini zararlab, suv va ozuqa moddalar transportini buzadi, natijada o'simlikning so'lib qolishiga olib keladi [1]. O'zbekiston sharoitida esa fuzariozning tarqalishi iqlim omillari, tuproqning tarkibi va agrotexnik tadbirlarning yetarli darajada qo'llanilmasligi bilan yanada kuchaymoqda [2].

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* ning biologik xususiyatlari va patogenligi uning irqlari va patotiplarining xilma-xilligi bilan ajralib turadi. Hozirgi kunda ushbu zamburug'ning bir nechta irqlari (1, 2, 4, 7 va boshqalar) aniqlangan bo'lib, ularning har biri o'ziga xos virulentlik darajasiga ega [3]. Masalan, 4-irqi AQShning Kaliforniya shtatida g'o'za yetishtirishda katta zarar keltiruvchi patogen sifatida aniqlangan [4]. O'zbekistonda esa 1 va 2 irqlari ko'proq uchraydi, ammo so'nggi yillarda yangi patotiplarning paydo bo'lishi ham kuzatilmoqda [5]. Ushbu irqlarni aniqlash va ularning molekulyar xususiyatlarini o'rganish chidamli navlarni yaratishda muhim ahamiyatga ega.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* ning irqlari va patotiplarini molekulyar genetik usullar yordamida tahlil qilishda patogenning o'ziga xos genetik xilma-xilligi ham e'tiborga olinishi zarur. Masalan, ITS (Internal Transcribed Spacer) hududining sekvenslash tahlili patotiplarni differensial aniqlashda samarali ekanligi isbotlangan [6]. Shu bilan birga, patogen va o'simlik o'zaro ta'sirining molekulyar mexanizmlarini o'rganish chidamlilik genlarini aniqlashda yangi imkoniyatlar ochmoqda [7].

Tadqiqot metodologiyasi

Fitopatogen zamburug'lar bilan zararlangan g'o'za o'simliklarni aniqlash va fitosanitar nazoratdan o'tkazishda quyidagi uslublardan foydalanildi [8, 9, 10].

Zamburug'larni o'stirish uchun quyidagi tarkibdagi tabiiy ozuqa muhitlaridan foydalanildi: kartoshkali destrozali agar (KDA) (kartoshka 200 g, dekstroza 20 g, agar 20 g). *Fusarium* turkumi turlari makrokonidiya hosil qilishi uchun och agar (GLA) dan foydalanildi. Ozuqa muhitining tarkibi: KCl 6 g, chinnigul barglari 3-5 mm uzunlikda, agar-agar 20 g, dis. suv 1000 ml [11].

Fitopatogen mikroorganizmlarning turlarining biologik va morfologik xususiyatlarini o'rganish uchun mo'ljallangan turlarni ekishda toza muhit hosil qilib, o'stirilayotgan turlar sofligini ta'minlash maqsadida laminar shkafni bakteritsid yoritgichlarda 40-60 daqiqa davomida sterilizatsiya qilindi.

Sof holdagi turlarni saqlashga mo'ljallangan ozuqa muhitlari, idishlar sterilizatsiya qilingan bo'lishi shart. Shisha idishlar avtoklavlarda 1 atm. bosim

ostida 1 soat davomida yoki quritish shkaflarida 160 °C da 2 soat davomida sterillandi [11].

Mikologik ekspertizalarda ajratib olingan fitopatogen mikroorganizmlarning shtammlari (kulturalari) ning makrokonidialari va mikrokonidialarining tuzilishini o'rganishda binokulyar mikroskopdan foydalanildi.

Vaqtinchalik preparatlarni tayyorlashda spirt, glitserin va suv (1:1:1) aralashmasidan foydalanildi. Mikologik tadqiqotlarda zamburug'larning organlarini mikroskopda o'rganish uchun mitseliy, konidialari, hujayralari, septalari, xlamidosporalarini ko'rishda va rasmga olish tasvirlarni yaxshilash maqsadida turli bo'yoqlardan: metil ko'k, metil binafsha va lyugol eritmalaridan foydalanildi [9].

Izolyatlardan vaqtinchalik preparatlar tayyorlandi va binokulyar mikroskopda rasmga olindi. Makrokonidiya va mikrokonidialarning shakllari, hujayralarining va mesiliylarining x40, x100, x400 kattalikdagi tasvirlari rasmga olindi.

Fusarium turkumi turlarini zararlangan o'simliklardan ajratishda va ularning turlarini aniqlashda xalqaro protokolda [12] hamda aniqlagichlarda [13, 14] tavsiya qilingan usullar qo'llanildi.

Ajaratib olingan zamburug' namunalaridan DNK ajratish uchun "Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Mini Kit" (Thermo Fisher, USA) reaktivlaridan foydalanildi. DNK namunalari ITS1, ITS4 (Internal transcribed region of the nuclear rDNA spacers) regionlari bo'yicha praymerlar [15] bilan amplifikatsiya qilindi. PZR mahsulotlari tozalandi hamda izolyatlarning qaysi turlarga mansubligi ITS regioni va TEF-1 α , TUBB genlari fragmenti bo'yicha senger sekvens qilindi.

Olingan nukleotidlar ketma-ketligi ma'lumotlari qayta ishlandi va NCBI elektron ma'lumotlar bazasining *Fusarium* turlarining sekvenslari bilan solishtirilib, tekshirilayotgan izolyatlarning turi aniqlandi.

Fusarium turlarining filogenetik o'zaro munosabatlari MEGA11 dasturi yordamida tahlil qilindi [16]. Nukleotid ketma-ketliklari avval MUSCLE algoritmi

yordamida ko'p martalik moslashtirish (multiple sequence alignment) asosida tekislandi [17].

Filogenetik daraxt Maximum Likelihood (ML) usulida qurildi va daraxtning ishonchliligini tekshirish uchun 1000 marta bootstrap takrorlash amalga oshirildi.

DnaSP v6.12.03 dasturi [18] yordamida *Fusarium* izolyatlarining DNK polimorfizmi tahlil qilindi. Tahlilga 21 ta ketma-ketlik jalb etilib, ular 1–648 nukleotid pozitsiyalari bo'yicha solishtirildi. Umumiy hisobda 401 ta sayt o'rganildi. Natijada polimorf saytlar soni, o'rtacha nukleotid farqlari, nukleotid xilma-xilligi (Pi) va Theta-W ko'rsatkichlari hisoblab chiqildi.

Populyatsion tahlilda *Fusarium oxysporum* (FOV) va *Fusarium solani* (FS) guruhlari alohida ko'rib chiqildi (1–648 nukleotid pozitsiyalari bo'yicha). Har bir populyatsiya uchun quyidagi genetik ko'rsatkichlar hisoblab chiqildi: Ketma-ketliklar soni, segregatsiyalanuvchi saytlar soni (S), haplotiplar soni (h), haplotip xilma-xilligi (Hd), o'rtacha nukleotid farqi (K), nukleotid xilma-xilligi (Pi), Jukes va Cantor modeliga asoslangan nukleotid xilma-xilligi (PiJC), Shuningdek, populyatsiyalar o'rtasidagi genetik farqlanish Fst va Nm statistik ko'rsatkichlari yordamida baholandi.

Tahlillar va natijalar

O'zbekiston paxta maydonlaridan olingan *Fusarium oxysporum* va *Fusarium solani* izolyatlarining ITS gen hududi asosida nukleotid ketma-ketliklari tahlil qilindi. Olingan nukleotid ketma-ketliklari uzunligi 648 bp gacha bo'lib, ular o'rtasida ma'lum darajada genetik farqlanish mavjudligi aniqlandi. Bu ketma-ketliklar NCBI GenBank bazasidagi ma'lumotlar bilan $\geq 92\%$ o'xshashlik ko'rsatdi. Aniqlangan zamburug' turlarini filogenetik munosabatlarini o'rganish maqsadida MEGA11 dasturida filogenetik daraxt tuzildi.

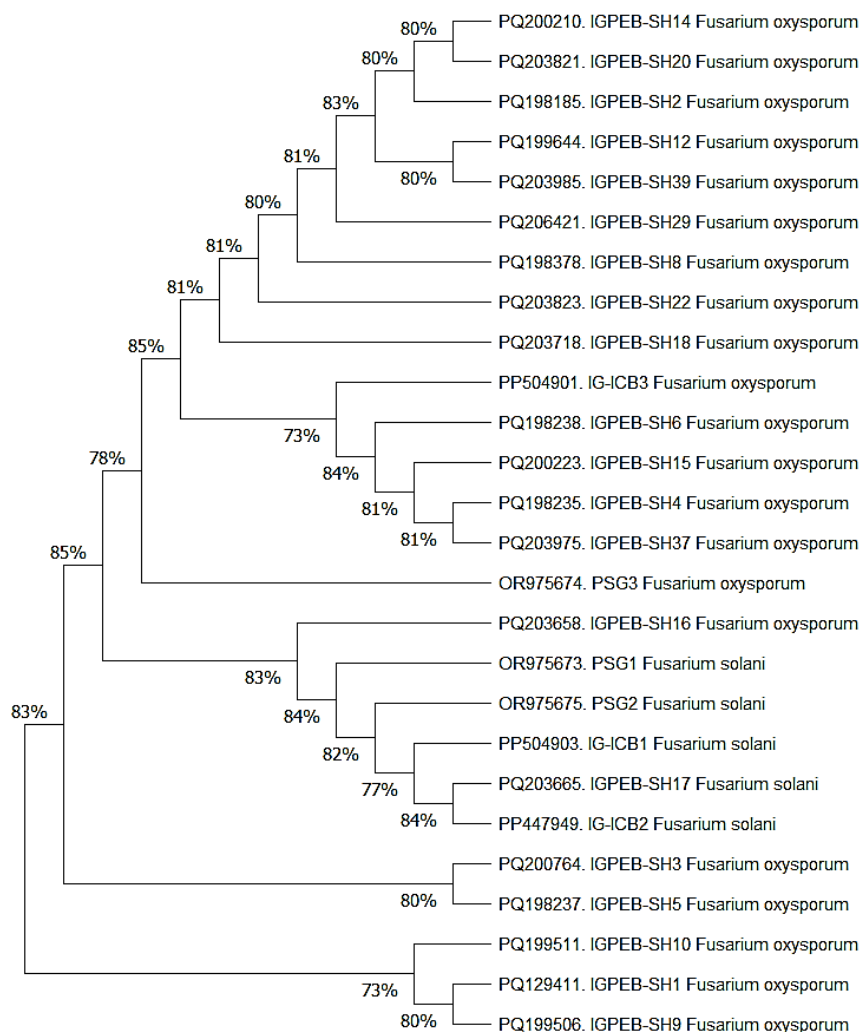
Tahlil natijalariga ko'ra, Namangan viloyatidan olingan ayrim *F. oxysporum* izolyatlari (masalan, IGPEB-SH1, IGPEB-SH2, IGPEB-SH4) bir guruhda jamlandi va 80–85% bootstrap qiymatiga ega bo'ldi. Bu ushbu izolyatlarning yaqin qarindoshlik aloqalarini ko'rsatadi. Shu bilan birga, Namangandagi boshqa

izolyatlar (IGPEB-SH10 va IGPEB-SH39) boshqa kladlarga joylashgan bo'lib, intra-hududiy xilma-xillik mavjudligini ko'rsatdi.

Buxoro viloyati izolyatlari (IGPEB-SH3, IGPEB-SH6, IGPEB-SH14) turli klasterlarga bo'lingan bo'lib, bootstrap qiymatlari 73–84% diapazonida qayd etildi. Bu hududdagi izolyatlar o'rtasida sezilarli genetik tafovut mavjudligini ko'rsatadi.

Toshkent viloyatidan ajratilgan *F. solani* izolyatlari (PSG1, PSG2, PSG3) esa yagona kladni shakllantirib, yuqori bootstrap qiymatlariga (84–85%) ega bo'ldi. Bu ularning genetik jihatdan o'zaro yaqinligini ko'rsatadi. Navoiy va Samarqand viloyatlaridan olingan izolyatlar esa ko'proq xilma-xil kladlarda joylashib, bu hududlardagi *Fusarium* izolyatlarining genetik moslashuvchanligini ko'rsatadi.

Umuman olganda, filogenetik tahlil hududiy bog'liqlikni tasdiqlash bilan birga, *Fusarium* izolyatlarining evolyutsion rivojlanishi va izolyatlarning hududiy o'ziga xosligini aniqlashga yordam beradi. Ayniqsa, hududiy genetik xilma-xillikni tahlil qilish fuzariozli vilt kasalligiga chidamli genotiplarni aniqlash uchun muhimdir.



1-rasm. O‘zbekistonning turli hududlaridan ajratib olingan *Fusarium oxysporum* va *Fusarium solani* izolyatlarining ITS gen hududi asosida tuzilgan filogenetik daraxt (MEGA11 dasturida Maximum Likelihood usuli bilan, 1000 marta bootstrap takrorlash asosida).

Turli viloyatlardan ajratib olingan *Fusarium* turi populyatsiyalarining genetik dinamikasi, moslashuvchanligi va tarqalish xususiyatlarini aniqlash maqsadida DNK polimorfizmi tahlili amalga oshirildi. Bunga ko‘ra 401 ta nukleotid saytlar o‘rganildi va ulardan 224 tasi polimorf saytlar sifatida qayd etildi. Nukleotid xilma-xilligi (P_i) ko‘rsatkichi 0,13447 bo‘lib, bu izolyatlar orasida o‘rtacha genetik farqlanish mavjudligini bildiradi. Shuningdek, Theta-W qiymati bir ketma-ketlik uchun 58,701 va bir nukleotid joyi uchun 0,14639 bo‘ldi. Ushbu ko‘rsatkichlar populyatsiyalar o‘rtasidagi genetik farqlanish darajasini aniqlashda muhim hisoblanadi.

Populyatsion tahlilda *F. oxysporum* (FOV) va *F. solani* (FS) populyatsiyalari alohida ko'rib chiqildi.

F. oxysporum populyatsiyasi: 21 ta ketma-ketlik asosida 400 segregatsiyalanuvchi sayt aniqlanib, 4 ta haplotip qayd etildi. Haplotip xilma-xilligi (Hd) 0,348 bo'lib, o'rtacha nukleotid farqi (K) 48,42 ni tashkil etdi. Nukleotid xilma-xilligi (Pi) 0,121, Jukes va Cantor modeli asosida hisoblangan xilma-xillik (PiJC) esa 0,182 ga teng bo'ldi. Bu natijalar FOV populyatsiyasida sezilarli darajada genetik xilma-xillik mavjudligini ko'rsatadi.

F. solani populyatsiyasi: 5 ta ketma-ketlik tahlil qilindi. Bu populyatsiyada faqat 1 ta haplotip aniqlangan bo'lib, haplotip xilma-xilligi (Hd) juda past (0,031) va nukleotid xilma-xilligi (Pi) ham juda past (0,001) bo'ldi. Bu FS populyatsiyasi genetik jihatdan deyarli bir xil ekanligini anglatadi.

Xulosa qilib aytganda, *F. oxysporum* populyatsiyasi yuqori darajada genetik xilma-xillikka ega bo'lib, evolyutsion jihatdan yuqori moslashuvchanlik salohiyatini namoyish etdi. *F. solani* populyatsiyasining esa genetik xilma-xilligi past bo'lgani sababli, uning moslashuvchanlik darajasi ham cheklangan. Bu natijalar *Fusarium* populyatsiyalarining evolyutsion tarixi va g'o'zaga ta'sirini tushunishda muhim ahamiyat kasb etadi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Smith S.N., Snyder W.C., Hansen H.N. (2001). "*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*: A historical perspective on cotton wilt disease". Journal of Phytopathology, 149(5), 271–278.
2. Abdullaev A.A., Rahimov Sh.M. va boshq. (2015). O'zbekistonda g'o'za kasalliklari va ularga qarshi kurash choralari. Toshkent: Fan va texnologiya nashriyoti.
3. Hillocks R.J. (1992). "Fusarium wilt". In: Cotton Diseases (Ed. R.J. Hillocks), 127–160. Wallingford, UK: CAB International.
4. Davis R.M., Colyer P.D., Rothrock C.S. (2006). "Fusarium wilt of cotton: Population diversity and implications for management". Plant Disease, 90(6), 692–703.
5. Rahimov A.Sh., Xo'jayev Sh.T. (2018). "O'zbekistonda *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*ning tarqalishi va ekologik omillarning ta'siri". Agroilm jurnali, 2(38), 25–30.

6. O'Donnell K., Gueidan C., Sink S. (2009). "Phylogenetic diversity of *Fusarium oxysporum* species complex". *Mycologia*, 101(6), 789–797.
7. Chen Z., Zhang J., Li H. (2018). "Molecular mechanisms of *Fusarium oxysporum* and cotton interaction: A review". *Plant Pathology Journal*, 34(5), 321–330.
8. Ганнибал Ф.Б., Гасич Е.Л., Орина А.С. Оценка устойчивости селекционного материала крестоцветных и паслёновых культур к альтернариозам // Методическое пособие. Под ред. М.М.Левитина. СПб. ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии. 2011. 50 с
9. Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш Й. 1974. Методы фитопатологии // М.: «Колос», 1974, 343 с.
10. Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов // Л.: Наука. 1969. - С. 320
11. Елинова Н.П. Заикина Н.А. Соколова И.П. Руководство занятиям по микробиологии // - М. «Медицина» . 1988. - С. 23
12. Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual // Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing, 388 pp.
13. Gerlach W., Nirenberg H.I. 1982. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas // Mitt. Biol. Bundes. Land-Forst. (Berlin – Dahlem), 1982, vol. 209, pp. 1-406.
14. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification // Pennsylvania State University, University Park, 193 pp.
15. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. San Diego: Academic Press; 1990.
16. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021, 38, 3022–3027
17. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 1792–1797.
18. Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* 2017, 34, 3299–3302.