

Оптимизация ПЦР-диагностики для идентификации грибов рода *Fusarium*

¹З.Р. Аскарлова, ²А.Г. Шеримбетов, ²Д.Р. Рузметов, ²Ж.Д. Рамазонов

¹Чирчикский государственный педагогический университет (ЧГПУ),

²Институт генетики и экспериментальной биологии растений

Аннотация: Грибы рода *Fusarium* являются широко распространенными фитопатогенами, поражающими сельскохозяйственные культуры, включая пшеницу, и продуцирующими микотоксины, представляющие опасность для человека и животных. Точная и быстрая идентификация видов грибов рода *Fusarium* имеет ключевое значение для фитосанитарного мониторинга и защиты растений.

В статье рассматривается оптимизация ПЦР-диагностики 10 изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных из пшеницы, возделываемой в Бухарской и Ташкентской (Паркент, Янгибазар) областях, с использованием молекулярных маркеров ITS, β -tubulin (TUB2) и TEF1- α .

Результаты исследования показали, что TEF1- α маркер обладает наибольшей специфичностью, воспроизводимостью и разрешающей способностью, превосходя ITS и β -tubulin.

Ключевые слова: *Fusarium*, ПЦР-диагностика, молекулярная идентификация, ITS-регион, β -тубулин, TEF1- α , генетические маркеры, фитопатогенные грибы, оптимизация ПЦР, видовая дифференциация.

Abstract: Fungi of the genus *Fusarium* are widespread phytopathogens that infect agricultural crops, including wheat, and produce mycotoxins dangerous to humans and animals. Accurate and rapid identification of species within the *Fusarium* genus is of key importance for phytosanitary monitoring and plant protection.

The article discusses the optimization of PCR diagnostics for 10 isolates of fungi of the genus *Fusarium*, isolated from wheat in the Bukhara and Tashkent (Parkent, Yangibazar) regions, using ITS, β -tubulin (TUB2), and TEF- α molecular markers.

The results of this study showed that TEF1- α possesses the highest specificity, reproducibility, and resolving power, outperforming both ITS and β -tubulin.

Keywords: *Fusarium*, PCR diagnostics, molecular identification, ITS region, β -tubulin, TEF1- α , molecular genetic markers, phytopathogenic fungi, PCR optimization, species differentiation.

Annotatsiya: *Fusarium* turkumiga mansub zamburug'lar keng tarqalgan fitopatogenlar bo'lib, ular qishloq xo'jaligi ekinlarini, jumladan bug'doyni zararlaydi hamda inson va hayvonlar uchun xavfli bo'lgan mikotoksinlarni ishlab

chiqaradi. *Fusarium* turkumiga mansub turlarini aniq va tezkor identifikatsiya qilish fitosanitariya monitoringi va o'simliklarni himoya qilishda muhim ahamiyatga ega.

Maqolada Buxoro va Toshkent viloyatlari (Parkent, Yangibozor) bug'doyzorlaridan ajratib olingan 10 ta *Fusarium* turkumiga mansub zamburug'lar izolyatlarining PZR-diagnostikasini ITS, β -tubulin (TUB2) va TEF1- α molekulyar markerlari yordamida optimallashtirish qilingan.

Natijalar shuni ko'rsatdiki, TEF1- α markeri o'zining spetsifikligi, natijalarning aniqligi va turlarni bir biridan yuqori darajada identifikatsiya qilish bo'yicha ITS va β -tubulin markerlaridan sezilarli darajada ustun ekanligini namoyon etdi.

Kalit so'zlar: *Fusarium*, PZR-diagnostika, molekulyar identifikatsiya, ITS-region, β -tubulin, TEF1- α , molekulyar genetik markerlar, fitopatogen zamburug'lar, PZRni optimallashtirish, turlarni differensiyatsiya qilish.

Введение: Грибы рода *Fusarium* в условиях Ташкентской области поражают однолетние, двулетние, многолетние, травянистые, древесные, культурные и дикие растения, включающие 70 видов, принадлежащих 20 семействам. Патогенные виды грибов рода *Fusarium* поражают надземные и подземные части растений, и приводят к загниванию стеблей, увяданию листьев, загниванию семян, корнеплодов, клубней, плодов [7]. Грибы рода *Fusarium* способны инфицировать растения и продуцировать микотоксины в широком диапазоне температур. Одним из ведущих факторов развития заболевания является избыток влажности более 71%, особенно в период цветения. Отрицательное влияние фузариоза на растения выражается в подавлении фотосинтеза, иммунитета и ферментов, что приводит к гибели растения [9].

Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые данными грибами, наносят существенный ущерб урожаю и приводят к значительным экономическим потерям. Для правильного и своевременного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности зерна фитопатогенными грибами на разных стадиях его производства и переработки необходима их детекция и точная идентификация. [1].

Традиционная идентификация видов грибов рода *Fusarium* основана на морфологических признаках (форма и размеры макро- и микроконидий, строение конидиеносцев, пигментация колоний). Однако данный метод требует высокой квалификации специалиста и часто затруднён из-за значительной фенотипической вариабельности и сходства морфологических характеристик близкородственных видов [8].

В последние десятилетия молекулярно-генетические методы заняли ведущую позицию в систематике и диагностике грибов. Наиболее широко применяемым универсальным маркером для идентификации грибов является внутренний транскрибируемый спейсер (ITS-регион) рДНК,

рекомендованный в качестве «штрих-кода» грибов [6]. Однако для грибов рода *Fusarium* ITS-регион часто обладает недостаточной разрешающей способностью для точной видовой дифференциации [4].

В связи с этим всё большее значение приобретают белок-кодирующие гены, такие как ген β -тубулина (β -*tub*) и ген фактора элонгации трансляции 1-альфа (TEF1- α). Эти маркеры характеризуются более высокой скоростью эволюции и наличием информативных вариабельных участков, что повышает точность межвидовой дифференциации [5]. В ряде исследований показано, что TEF1- α обладает высокой дискриминационной способностью и может рассматриваться как один из наиболее надёжных маркеров для идентификации видов грибов рода *Fusarium* [2].

Таким образом, оптимизация ПЦР-диагностики с использованием информативных молекулярных маркеров является актуальной задачей современной молекулярной микологии. Сравнительный анализ ITS, β -тубулина и TEF1- α является наиболее эффективным методом для точной идентификации представителей грибов рода *Fusarium*.

Целью данного исследования являлась оптимизация ПЦР-диагностики и сравнительная оценка ITS, β -*tubulin* и TEF1- α молекулярных маркеров для идентификации 10 изолятов грибов рода *Fusarium* выделенных из поражённых растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Узбекистана.

Методы исследования.

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использовали 10 изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных из поражённых растений посевов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в Бухарской и Ташкентской (Паркент, Янгибазар) областей Республики Узбекистан. Выделение грибов проводили из инфицированных тканей растений с последующим культивированием на питательной среде PDA.

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли из мицелия 10 изолятов грибов рода *Fusarium* с использованием набора **GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)** согласно инструкции производителя.

Качество и концентрацию полученной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра **Nanodrop**, измеряя соотношение A260/A280 и A260/A230 для определения чистоты ДНК. Для ПЦР использовали 4 мкл выделенной ДНК в каждой реакции.

Эффективность метода ПЦР зависит от ряда показателей, в том числе, от буферного состава реакционной смеси, температуры, временного режима, специфичности и чувствительности отобранных праймеров.

ПЦР-амплификация. Для молекулярной идентификации изолятов грибов рода *Fusarium* использовали три генетических маркера: ITS (Internal Transcribed Spacer), β -*tubulin* (*TUB2*) и TEF1- α (Translation Elongation Factor 1- α).

Полимеразную цепную реакцию проводили в общем объёме 25 мкл. Состав реакционной смеси включал:

-12,5 мкл 2× DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific),

- по 1 мкл прямого (F) и обратного (R) праймеров,
- 4 мкл геномной ДНК,
- 6,5 мкл ddH₂O свободной от нуклеаз.

Амплификацию проводили в термоциклере с индивидуально подобранными температурными режимами для каждого маркера:

β-tubulin (TUB2):

- денатурация — 95 °С,
- отжиг — 63 °С,
- элонгация — 72 °С;

TEF1-α:

- денатурация — 94 °С,
- отжиг — 59 °С,
- элонгация — 72 °С;

ITS:

- денатурация — 95 °С,
- отжиг — 53 °С,
- элонгация — 72 °С.

После завершения 40 циклов ПЦР проводили финальную элонгацию при 72 °С. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в агарозном геле с визуализацией в УФ-свете.

Результаты исследования:

Магний хлорид является одним из важных составных частей буфера. Ион магния (Mg^{2+}) является кофактором для полимеразной активности ДНК и обеспечивает соединение дНТФ в процессе синтеза ДНК. Ионы магния в активном сайте фермента катализируют фосфодиэфирную связь между 3'-ОН и фосфатной группой дНТФ. Кроме этого, ионы Mg^{2+} облегчают образование комплекса между праймерами и ДНК матрицей.

Поставленная для амплификации фрагмента гена *tef-1α*, первичная ПЦР показала, что у образцов 1, 22 и 23 из 23 видов грибов рода *Fusarium* ПЦР продукт не синтезировался, и интерпретировали его как отсутствие амплификации (рис.1).

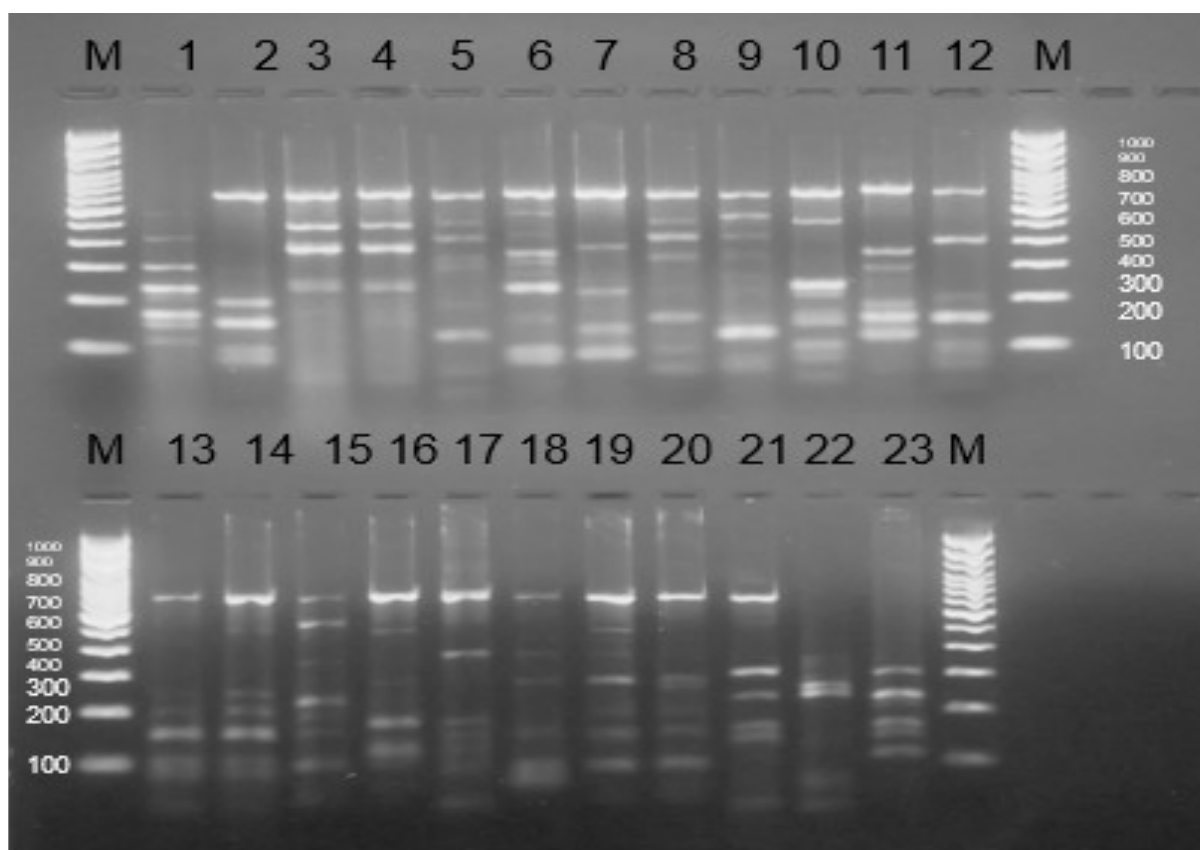


Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации региона гена *tef-1α*, проведенной специфическими праймерами EF1-1 и EF1-2 + $MgCl_2$ гриба рода *Fusarium*

Поэтому, в последующих экспериментах была проведена оптимизация ПЦР при разной концентрации $MgCl_2$ (0,75, 1,0, 1,4 и 1,8 мМ). На образцы первоначально показавшие отсутствие целевого ПЦР продукта, была повторно проведена ПЦР с концентрацией ионов магния в реакции в диапазоне от 0,75 до 1,8 мМ. Результаты гель электрофореза ПЦР продуктов показали, что у образцов, первоначально показавшие отсутствие целевого ПЦР продукта, при 0,75 мМ концентрации $MgCl_2$ в реакции также ПЦР продукт не синтезировался, а при 1,0 мМ концентрации $MgCl_2$ в реакции появился ПЦР продукт слабой интенсивности свечения. При 1,4 мМ концентрации ионов магния в реакции выявила наличие целевого ПЦР продукта средней интенсивности свечения, а при 1,4 мМ концентрации $MgCl_2$, образцы показали наличие целевого ПЦР продукта сильной интенсивности. Таким образом была определена оптимальная концентрация $MgCl_2$ в ПЦР смеси -1,8 мМ (рис.2).

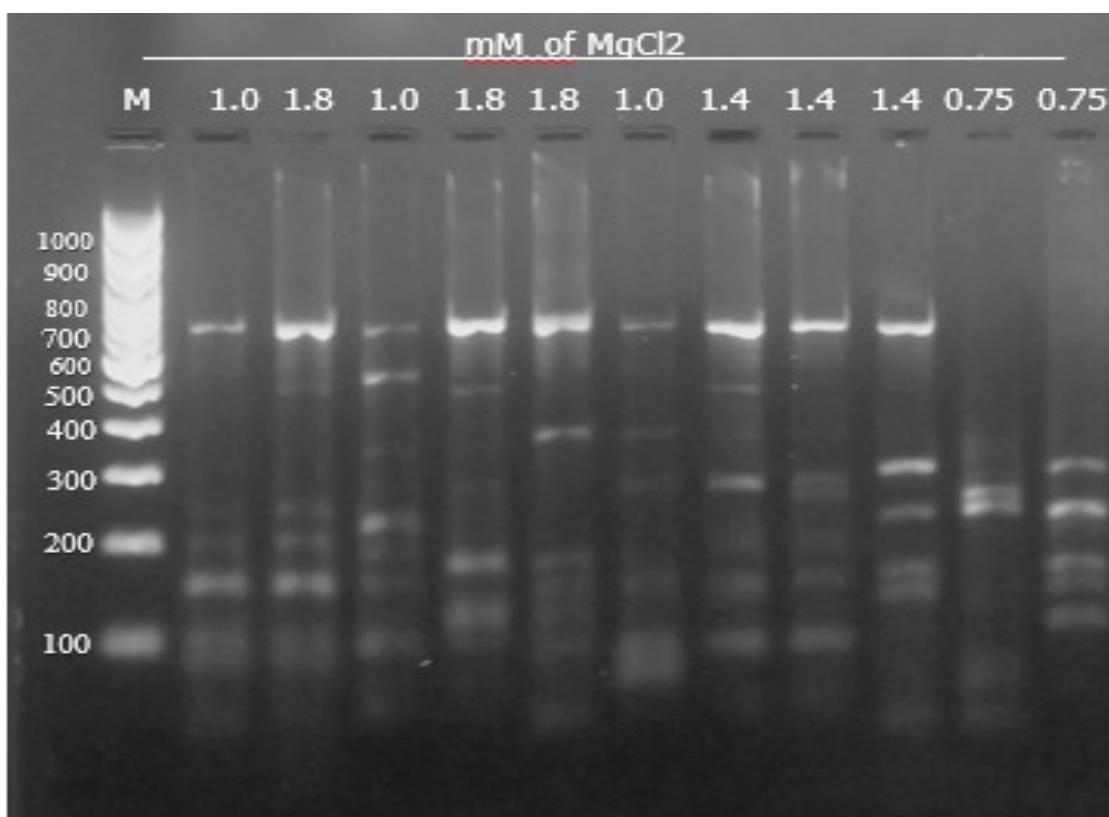


Рис.2. Оптимизация ПЦР диагностики для идентификации грибов рода *Fusarium* (с различной концентрацией $MgCl_2$) (Ampli Taq Gold TM Fast PCR Master Mix)

Амплификация всех трёх маркеров прошла успешно у всех 10 изолятов.

- **TEF1- α :** получены интенсивные и специфичные ПЦР продукты у всех изолятов, без выраженных неспецифических продуктов.
- **ITS:** ампликоны присутствовали у всех изолятов, но следует отметить, что их разрешающая способность по дискриминации близких видов (после секвенирования) является низкой.
- **β -tubulin (TUB2):** получены удовлетворительные ампликоны, но их интенсивность уступала TEF1- α .

Сравнение результатов показало, что молекулярный маркер TEF1- α обеспечивает наибольшую специфичность и воспроизводимость, что делает его наиболее информативным маркером для молекулярной идентификации видов грибов рода *Fusarium* (рис.3).

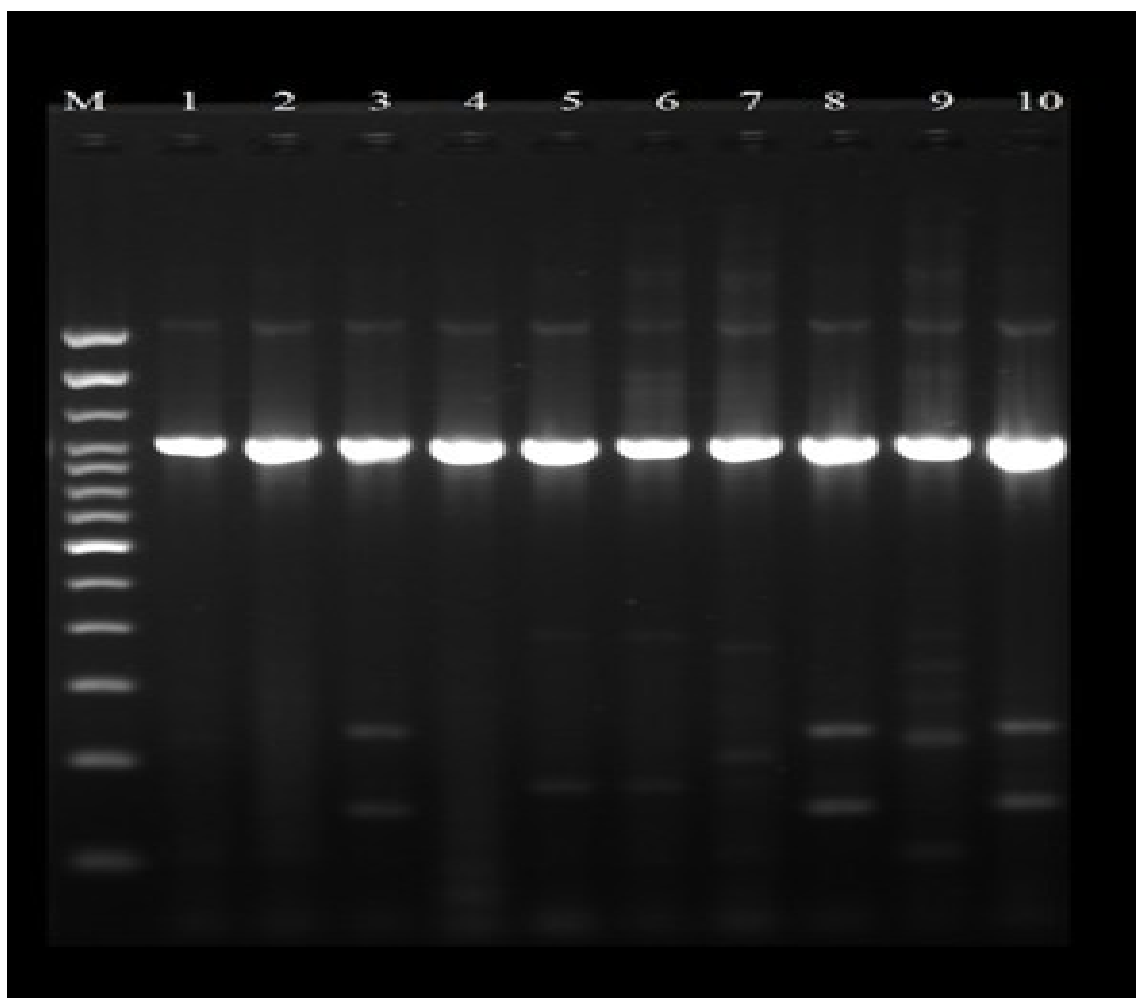


Рис.3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов TEF1- α 10 изолятов грибов рода *Fusarium* на 1,8% агарозном геле.

Закключение. Оптимизация ПЦР-диагностики показала, что среди исследованных маркеров TEF1- α является наиболее эффективным для молекулярной идентификации 10 изолятов грибов рода *Fusarium* выделенных из пшеницы Бухарской и Ташкентской областей. ITS имеет ограниченную видовую разрешающую способность, а β -*tubulin* уступает TEF1- α по специфичности и интенсивности ампликона.

Результаты подтверждают целесообразность использования TEF1- α как основного маркера для ПЦР-диагностики видов грибов рода *Fusarium*, что важно для точной идентификации грибов и повышения эффективности фитосанитарного мониторинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова С.Л., Жемчужина А.И., Жемчужина Н.С., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Идентификация возбудителей ржавчины пшеницы методом полимеразной цепной реакции. Вестник РАСХН. 2011; №5:15–17.
2. Geiser D.M., Jiménez-Gasco M.D., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kistler H.C., O'Donnell K. *Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium*. Eur J Plant Pathol. 2004;110:473–479.
3. Leslie J.F., Summerell B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, 2006.
4. O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C. *Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(5):2044–2049.
5. O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Sarver B.A.J., Balajee S.A., Schroers H.J., Summerell B.A., Zhang N., Aoki T., Park B., Geiser D.M. *Internet-accessible DNA sequence database for identifying Fusarium species*. Fungal Genet Biol. 2015;82:1–13.
6. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., et al. *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(16):6241–6246.
7. Sherimbetov A.G. *Identification of the species of fungi of the genus Fusarium affecting sweet pepper plants (Capsicum annuum L.)*. International Scientific Journal “Modern Biology and Genetics”. 2024; №1(7).
8. Summerell B.A., Laurence M.H., Liew E.C.Y., Leslie J.F. *Fusarium: molecular systematics, evolution, and population biology*. APS Press, 2010.
9. Нугманова Т.А., Кабаргина М.В. *Грибы рода Fusarium – многообразие свойств, значение как объектов промышленной биотехнологии*. ООО «Биоин-Ново», Москва, Российская Федерация, 2024.