NAMANGAN DAVLAT UNIVERSITETI
ILMIY AXBOROTNOMASI, [2026-8]
ISSN:2181-1458
ISSN:2181-0427

03.00.00-BIOLOGIYA
journal.namdu.uz
BIOLOGICAL

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ FUSARIUM ACUMINATUM И FUSARIUM EQUISETI, ВЫДЕЛЕННЫХ С ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В УЗБЕКИСТАНЕ

З.Р. Аскарова
А.Г. Шеримбетов
Д.Р. Рузметов
Ж.Д. Рамазонов
Институт генетики и экспериментальной биологии растений

Аннотация: *Грибы рода Fusarium являются опасными фитопатогенами, вызывающими корневые гнили и фузариоз колоса зерновых культур, а также продуцирующими опасные микотоксины. Точная видовая идентификация и филогенетическая характеристика локальных штаммов необходимы для фитосанитарного контроля и селекции на устойчивость. В статье приведены результаты молекулярно-генетической идентификации и филогенетического анализа изолятов грибов Fusarium acuminatum и Fusarium equiseti, выделенных из пораженных растений озимой пшеницы в Узбекистане. На основе ПЦР-амплификации и секвенирования вариабельных участков генов ITS и TEF1-α были определены нуклеотидные последовательности штаммов и депонированы в международную базу данных NCBI GenBank (акцессионные номера PZ194281, PZ194410, PZ194414, PZ194422, PZ194660). Филогенетический анализ, проведенный методом Maximum Likelihood в программе MEGA 12, подтвердил высокую гомологию (98–100%) узбекских изолятов с референсными мировыми штаммами.*

Ключевые слова: *Fusarium acuminatum, Fusarium equiseti, озимая пшеница, ПЦР, ITS-регион, TEF1-α, GenBank, MEGA* 12, Maximum Likelihood, филогенетический анализ, Узбекистан.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *FUSARIUM ACUMINATUM* AND *FUSARIUM EQUISETI* ISOLATES RECOVERED FROM WINTER WHEAT IN UZBEKISTAN

Abstract: *Fungi of the genus Fusarium are dangerous phytopathogens causing root rot and head blight in cereal crops, as well as producing hazardous mycotoxins. Accurate species identification and phylogenetic characterization of local strains are essential for phytosanitary monitoring and breeding for resistance. The article presents the results of molecular-genetic identification and phylogenetic analysis of Fusarium acuminatum and Fusarium equiseti isolates obtained from infected winter wheat plants in Uzbekistan. Based on PCR amplification and sequencing of variable regions of the ITS and TEF1-α genes, nucleotide sequences were determined and deposited into the NCBI GenBank database (accession numbers PZ194281, PZ194410, PZ194414, PZ194422, PZ194660). Phylogenetic analysis performed using the Maximum Likelihood method in MEGA 12 confirmed high sequence identity (98–100%) between the Uzbek isolates and global reference strains.*

Keywords: *Fusarium acuminatum, Fusarium equiseti, winter wheat, PCR, ITS region, TEF1-α, GenBank, MEGA 12, Maximum Likelihood, phylogenetic analysis, Uzbekistan.*

O‘ ZBEKISTONDA QISHKI BUG‘ DOYDAN AYRILGAN FUSARIUM ACUMINATUM VA FUSARIUM EQUISETI IZOLATLARINING MOLEKULYAR GENETIK XUSUSIYATLARI VA FILOGENETIK TAHLIL

Annotatsiya: *Fusarium turkumiga mansub zamburug‘ lar don ekinlarining ildiz chirishi va boshoq fuzariozini keltirib chiqaradigan hamda xavfli mikotoksinlar ishlab chiqaradigan fitopatogenlar hisoblanadi. Mahalliy shtammlarni aniq tur darajasida identifikatsiya qilish va filogenetik tavsiflash fitosanitariya nazorati hamda chidamlilikka erishish selektsiyasi uchun muhim ahamiyatga ega. Maqolada O‘ zbekistonning kuzgi bug‘ doyzorlaridan ajratib olingan Fusarium acuminatum va Fusarium equiseti zamburug‘ izolyatlarining molekulyar-genetik identifikatsiyasi va filogenetik tahlili natijalari keltirilgan. ITS va TEF1-α genlarining o‘ zgaruvchan ketma-ketliklarini PZR-amplifikatsiya qilish va sekvenirlash asosida nukleotid ketma-ketliklari aniqlandi hamda NCBI GenBank xalqaro ma’lumotlar bazasiga joylashtirildi (aktsessiya raqamlari PZ194281, PZ194410, PZ194414,*

PZ194422, PZ194660). MEGA 12 dasturida Maximum Likelihood usuli yordamida o‘ tkazilgan filogenetik tahlil O‘ zbekiston izolyatlarining jahon etalon shtammlari bilan yuqori darajadagi gomologiyasini (98–100%) tasdiqladi.

Kalit so‘ zlar: *Fusarium acuminatum, Fusarium equiseti, kuzgi bug‘ doy, PZR, ITS-region, TEF1-α, GenBank, MEGA 12, Maximum Likelihood, filogenetik tahlil, O‘ zbekiston.*

Введение: Озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является ключевой продовольственной культурой Узбекистана, обеспечение стабильного урожая которой напрямую связано с продовольственной безопасностью страны. Среди широкого спектра фитопатогенов, поражающих посевы пшеницы, особую опасность представляют грибы рода *Fusarium*, вызывающие корневые и прикоренневые гнили, а также фузариоз колоса. Инфицирование данными микроорганизмами приводит не только к существенным потерям урожая, но и к накоплению в зерне вторичных метаболитов — микотоксинов (трихотецены, зеараленон и др.), представляющих прямую угрозу здоровью человека и сельскохозяйственных животных. Среди большого видового разнообразия рода особое место занимают виды *Fusarium acuminatum* и *Fusarium equiseti*, входящие в сложные видовые комплексы. Традиционные методы их идентификации, основанные на морфолого-культуральных признаках (строение макро- и микроконидий, скорость роста колоний, пигментация), часто оказываются неэффективными. Это обусловлено высокой фенотипической изменчивостью патогенов, зависимостью от условий культивирования и давлением факторов окружающей среды.

Для преодоления ограничений классической микологии в практику фитопатологического мониторинга активно внедряются молекулярно-генетические методы. Разделительный потенциал универсального маркерного региона ITS (Internal Transcribed Spacer) рДНК часто оказывается недостаточным для точной межвидовой дифференциации внутри рода *Fusarium*. В связи с этим современные филогенетические исследования опираются на белок-кодирующие гены, среди которых ген фактора элонгации трансляции 1-альфа (TEF1-*α*) признан наиболее информативным маркером благодаря высокой скорости накопления нуклеотидных замен и наличию вариабельных интронных участков.

Несмотря на активное изучение фузариозов в мире, молекулярно-генетическая структура популяций *F. acuminatum* и *F. equiseti*, циркулирующих на пшеничных полях Узбекистана, остаётся недостаточно изученной. Отсутствие зарегистрированных в международных базах данных локальных штаммов затрудняет проведение сравнительного эволюционного анализа и разработку специфичных диагностических тест-систем.

Целью данного исследования являлась молекулярно-генетическая идентификация, филогенетический анализ и депонирование в базу данных NCBI GenBank нуклеотидных последовательностей изолятов *Fusarium acuminatum* и *Fusarium equiseti*, выделенных из пораженных растений озимой пшеницы в Узбекистане.

Методы исследования.

Выделение и культивирование фитопатогенов.

Объектами исследования послужили изоляты грибов рода *Fusarium*, выделенные из пораженных прикоренневых частей стебля и колоса озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), отобранных в ходе фитосанитарного мониторинга посевов в Узбекистане. Выделение чистых культур проводили путем высева фрагментов пораженных тканей на картофельно-декстрозный агар (PDA). Для исключения гетерокариоза и получения чистых генетических линий получение моноспоровых культур осуществляли методом предельных разведений микроконидий.

Экстракция геномной ДНК.

Экстракцию геномной ДНК выполняли из свежевыращенного мицелия 5-суточных моноспоровых культур. Навеску мицелия растирали в жидком азоте с использованием стерильной ступки и пестика. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop по соотношению оптической плотности A_{260}/A_{280}.

ПЦР-амплификация маркерных генов.

Для молекулярно-генетической идентификации использовали два маркерных локуса:

1. Вариабельный участок гена фактора элонгации трансляции 1-альфа (**TEF1-*α***) с использованием специфичных праймеров EF1-1 и EF1-2.
2. Внутренний транскрибируемый спейсер рибосомальной ДНК (**ITS-регион**).

Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем:

- 12,5 мкл 2 × DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific);
- по 1 мкл каждого праймера (10 пмоль/мкл);
- 1,8 мМ $MgCl_2$ (оптимизированная концентрация для устранения неспецифического связывания);

• 4 мкл матрицы ДНК (~50 нг);

• 6,5 мкл ddH_2O, свободной от нуклеаз.

Амплификацию выполняли в термоциклере по следующей программе: первичная денатурация при 94 °C (5 мин); 35 циклов: денатурация при 94 °C (30 сек), отжиг праймеров при 59 °C для TEF1-*α* / 53 °C для ITS (40 сек), элонгация при 72 °C (1 мин); финальная элонгация при 72 °C (7 мин). Визуализацию продуктов ПЦР осуществлили методом гель-электрофореза в 1,8% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Секвенирование и филогенетический анализ.

Очистку ПЦР-продуктов и их двунаправленное секвенирование по методу Сенгера проводили на автоматическом анализаторе. Полученные хроматограммы проанализированы и отредактированы. Поиск гомологичных последовательностей выполняли с помощью алгоритма **BLASTn** в международной базе данных NCBI GenBank.

Аннотированные нуклеотидные последовательности были зарегистрированы и депонированы в базы данных GenBank (NCBI). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей узбекских изолятов и референсных штаммов из GenBank проводили с помощью алгоритма Muscle. Филогенетическое древо строили в программе **MEGA 12** с использованием метода максимального правдоподобия (**Maximum Likelihood**). Эволюционные расстояния рассчитывали на основе модели замен Tamura-Nei. Надежность топологии филогенетического древа оценивали с помощью бутстреп-анализа (Bootstrap test) с 1000 повторностей.

Результаты исследования.

Идентификация и депонирование нуклеотидных последовательностей.

В результате ПЦР-амплификации и последующего секвенирования вариабельных участков генов **ITS** и **TEF1-*α*** была проведена точная видовая идентификация исследуемых изолятов грибов рода *Fusarium*. Проведенный BLAST-анализ показал высокую степень гомологии (98–100%) полученных нуклеотидных последовательностей с референсными штаммами из базы данных NCBI.

Определенные последовательности были успешно аннотированы и депонированы в международную базу данных **NCBI GenBank** под соответствующими акцессионными номерами:

• **PZ194281** — *Fusarium acuminatum* (изолят F-12);

• **PZ194410** — *Fusarium acuminatum* (изолят F-13);

• **PZ194414** — *Fusarium acuminatum* (изолят F-14);

• **PZ194422** — *Fusarium equiseti* (изолят F-15);

• **PZ194660** — *Fusarium equiseti* (изолят F-16).

Таблица 1

Молекулярно-генетическая характеристика и номера доступа в GenBank изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных из озимой пшеницы

№	Вид гриба (Organism)	Шифр изолята	Регион сбора (Район)	Количество нуклеотидов (п.о.)	Номер доступа (Accession number)
1	*Fusarium acuminatum*	T-12	Ташкентская обл., Янгибазар	585	PZ194281
2	*Fusarium acuminatum*	T-13	Ташкентская обл., Паркент	585	PZ194410
3	*Fusarium acuminatum*	T-14	Ташкентская обл., Янгибазар	585	PZ194414
4	*Fusarium equiseti*	T-15	Бухарская обл.	584	PZ194422
5	*Fusarium equiseti*	T-16	Ташкентская обл., Янгибазар	605	PZ194660

Филогенетический анализ

На основе выровненных последовательностей гена TEF1-*α* с использованием программы **MEGA 12** методом **Maximum Likelihood** (Максимального правдоподобия) было сконструировано филогенетическое древо.

Топология полученного древа позволила чётко разделить исследуемые изоляты на две основные клады:

1. **Клада *Fusarium acuminatum*:** Изоляты с акцессионными номерами PZ194281, PZ194410 и PZ194414 сгруппировались в единый монофилетический кластер с эталонными мировыми штаммами *F. acuminatum*. Высокий уровень бутстреп-поддержки (>90%) подтверждает их генетическую идентичность и стабильность маркерного локуса TEF1-α.

2. **Клада *Fusarium equiseti*:** Изоляты PZ194660 и PZ19422 сформировали обособленную ветвь внутри комплекса видов *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), проявив 99–100% сходство с референсными изолятами *F. equiseti*.

Сравнительный филогенетический анализ подтвердил высокую разрешающую способность гена TEF1-α для видовой дифференциации грибов рода *Fusarium* по сравнению с ITS-регионом, позволив достоверно разграничить близкородственные виды.

Заключение

В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований осуществлена точная видовая идентификация и филогенетическая характеристика локальных изолятов фитопатогенных грибов *Fusarium acuminatum* и *Fusarium equiseti*, выделенных с пораженных растений озимой пшеницы в Узбекистане. Впервые нуклеотидные последовательности маркерного локуса исследуемых штаммов были аннотированы и депонированы в международную базу данных NCBI GenBank под номерами PZ194281, PZ194410, PZ194414, PZ194422 и PZ194660. Филогенетический анализ, выполненный методом Maximum Likelihood в программе MEGA 12, подтвердил высокую степень эволюционной гомологии (98–100%) узбекских изолятов с референсными мировыми штаммами *F. acuminatum* и *F. equiseti*. Полученные результаты подтверждают высокую информативность и дискриминационную способность гена TEF1-α для дифференциации видов *Fusarium*. Депонированные последовательности формируют фундаментальную базу для фитосанитарного мониторинга, разработки высокоточных диагностических ПЦР-тест-систем и селекции пшеницы на устойчивость к фузариозам.

Литература

1. O‘ Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* based on DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044–2049.

2. Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., & O‘ Donnell, K. (2004). *FUSARIUM-ID* v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5–6), 473–479.

3. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 388 p.

4. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246.

5. Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., ... & O‘ Donnell, K. (2013). One Fungus, One Name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103(5), 400–408.

6. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.

7. Geiser, D. M., Al-Hatmi, A. M., Aoki, T., Arie, T., Balmas, V., ... & O‘ Donnell, K. (2021). *FUSARIUM-ID* v. 3.0: An updated, downloadable resource for *Fusarium* species identification. *Plant Disease*, 105(9), 2105–2110.