УДК 577.21:575.22:581.6 https://doi.org/10.7124/FEEO.v39.1846

ДРОЗДОВ Г. І.[1]✉
СЛІЩУК Г. І.[2]
ВОЛКОВА Н. Е.[2]

[1] *Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Україна, 65082, м. Одеса, вул. Всеволода Змієнка, 2*
[2] *Інститут кліматично орієнтованого сільського господарства НААН, Україна, 67667, м. Одеса, смт Хлібодарське, вул. Маяцька дорога, 24*
✉ *drozdov.hlib@stud.onu.edu.ua*

РОЗРОБКА TAQMAN-СИСТЕМИ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДЕТЕКЦІЇ РАСИ 4 *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VASINFECTUM*

Мета. Розробити специфічну TaqMan-систему для молекулярної детекції 4-ї раси гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV), збудника фузаріозного в'янення бавовнику (*Gossypium* L.), методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. ***Методи***. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів *PHO* (фосфатна пермеаза) та *NAT* (N-ацетилтрансфераза), що містять вставки мобільних генетичних елементів (типу *Tfo1*, *MULE* та *MITE*). Дизайн внутрішнього TaqMan-зонда здійснено за допомогою інструменту «Primer3». Специфічність розробленої системи перевірено *in silico* з використанням інструменту «Primer-BLAST». У роботі використано раніше опубліковані праймери FOV4 A3-2018. ***Результати***. На основі консервативної ділянки гена транспозази всередині мобільного елемента *Tfo1* розроблено внутрішній TaqMan-зонд, оптимізований для роботи з праймерами FOV4 A3-2018. Результати. ПЛР *in silico* підтвердили специфічність системи. ***Висновки***. Розроблена TaqMan-система є надійним теоретично обґрунтованим інструментом для ідентифікації раси 4 FOV. Специфічність системи, підтверджена біоінформатикою дозволяє перейти до її лабораторної апробації *in vitro* на колекційних та природних штамах FOV з метою посилення фітосанітарного контролю та попередження епіфітотій фузаріозу бавовнику.

Ключові слова: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, TaqMan, біоінформатика, молекулярна детекція, бавовник.

Глобальні кліматичні зміни зробили економічно обґрунтованим вирощування бавовнику (*Gossypium* L.) в Україні. Окрім традиційного використання, ця культура є критично важливою для забезпечення сировинної незалежності у виробництві бездимного пороху. Попри втрати частини сортової колекції внаслідок війни, робота зі збереження та репродукції наявного генетичного матеріалу продовжується (Vozhehova et al., 2024). Впровадження нової культури несе нові ризики для біобезпеки, що вимагає використання сучасних методів молекулярної діагностики для своєчасного виявлення потенційних фітопатогенів.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* (FOV) (G.F. Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hansen. є збудником фузаріозного в'янення бавовнику – одного з найбільш деструктивних та поширених захворювань культури у світовому масштабі. Патоген колонізує ксилему, блокуючи транспорт води та поживних речовин, що призводить до системного ураження рослини. Характерними симптомами захворювання є пожовтіння та некроз листя, яке згодом всихає та опадає, а також типове побуріння судинних пучків на зрізі стебла. Уражені рослини відстають у рості, а за високого інфекційного навантаження гинуть. Гриб відзначається високою стійкістю: він здатен зберігатися у ґрунті понад 10 років навіть за відсутності рослини-господаря, що робить повну ерадикацію патогена економічно неможливою (Smith et al., 2001). Поширення інфекції відбувається як через ґрунт, так і через інфіковане насіння, що сприяє перенесенню патогена в нові регіони та перетворенню їх на ендемічні зони.

За первинною класифікацією виділяли вісім рас *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* на основі патогенності, однак сучасні дослідження дозволяють об'єднати раси 3 і 5, а також раси 4 і 7

© 2026 Дроздов Г. І., Сліщук Г. І., Волкова Н. Е. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

(Halpern H et al., 2020). Для більшості рас *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* розвиток тяжкої форми в'янення розглядається як патогенний комплекс, що потребує обов'язкової синергічної взаємодії гриба з галовою нематодою (*Meloidogyne incognita*). Натомість найбільш вірулентна та економічно значуща раса 4 належить до нематодо-незалежного патотипу. Вона здатна самостійно долати захисні бар'єри бавовнику та спричиняти критичне ураження і загибель рослин навіть за повної відсутності нематод у ґрунті, що зумовлює її стрімке поширення в найбільших бавовницьких регіонах світу. Внутрішньорасова структура раси 4 є гетерогенною і представлена чотирма генотипами, що різняться специфічними інсерціями мобільних генетичних елементів. Аналіз гена *PHO* дозволяє ідентифікувати три з них: T (містить вставку транспозона *Tfo1*), MT (*Tfo1* з інтегрованим елементом *MULE*) та MiT (*Tfo1* з інтегрованим елементом *MITE*). Четвертий генотип N (Null) відрізняється відсутністю модифікацій у гені *PHO*, натомість має ідентичну вставку *Tfo1*, локалізовану в гені *NAT* (Ortiz et al., 2017; Bell et al., 2019; Liu and Wagner, 2022).

Своєчасне виявлення збудника є критичним фактором для успішного стримування хвороби. Класичні підходи, що базуються на фенотипових ознаках або імунологічних тестах, часто виявляються малоефективними: морфологічний аналіз потребує значного часу на культивування, а імунологічні методи мають низьку специфічність (Luchi et al., 2020). Використання РЧ-ПЛР дозволяє досягти високої точності, швидкості ідентифікації патогенів та їх кількісного визначення, що значно перевершує можливості морфологічних та імунологічних методів і робить цей метод оптимальним для сучасного фітосанітарного моніторингу. На відміну від систем з інтеркалюючими барвниками як SYBR Green, що вимагають обов'язкового проведення аналізу кривих плавлення для перевірки наявності неспецифічних продуктів чи димерів праймерів, технологія TaqMan забезпечує видоспецифічність завдяки гібридизації зонда з цільовою послідовністю, що дозволяє уникнути додаткового етапу аналізу кривих плавлення після ампліфікації та створювати мультиплексні системи, за допомогою яких можливо виявляти кілька патогенів в одній реакції одночасно. Тому мета нашої роботи – розробити специфічну TaqMan-систему для молекулярної детекції генотипів N, T, MT та MiT раси 4 фітопатогена *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, збудника фузаріозного в'янення бавовнику, методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Матеріали і методи

Використано пару праймерів FOV4 A3-2018, послідовності яких опубліковано раніше (Davis et al., 2022). Дизайн TaqMan-зонду розроблено з використанням програми «Primer3» (Untergasser et al., 2012) (ліцензія не потрібна). Для дизайну встановлено такі параметри: розмір 20–30 нуклеотидів, температура плавлення на 5–10 °C вище, ніж у праймерів, для забезпечення пріоритетної гібридизації зонда з матрицею до початку елонгації; відсутність G на 5'-кінці, оскільки він має здатність до автогасіння флуоресценції репортера, що може знизити інтенсивність вихідного сигналу. Специфічність праймерів перевірено за допомогою інструменту «Primer-BLAST» (ліцензія не потрібна) (Ye et al., 2012) на веб-сайті Національного центру біотехнологічної інформації (*англ. National Center for Biotechnology Information*, *NCBI*) (National Center for Biotechnology Information…). Оцінювали можливість формування неспецифічних ампліконів не лише з послідовностями інших рас *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* та представників роду *Fusarium*, а й з генетичним матеріалом інших таксонів, включаючи геном рослини-господаря.

Результати та обговорення

На основі нуклеотидної послідовності, що містить вставку мобільного генетичного елемента *Tfo1*, та з використанням пари праймерів FOV4 A3-2018 створено TaqMan-систему для детекції генотипів N, T, MT та MiT раси 4 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (рис.).

Послідовності праймерів: прямий – CTAGAGTCCTGGTTGATG та зворотний – ATATTCCCTGCCGATATG розміром 18 нуклеотидів кожен. Розмір амплікону становить 125 п.н., GC-склад прямого та зворотного праймерів складає 50,00% та 44,40% відповідно. Праймери FOV4 A3-2018 були розроблені для ампліфікації ділянки гена транспозази в межах мобільного елемента *Tfo1*. Вибір цієї мішені зумовлений тим, що інсерція *Tfo1* у промоторну область гена NAT є унікальною для всіх відомих генотипів (N, T, MT, MiT) раси 4 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, а додаткова інсерція *Tfo1* у ген *PHO* характерна для генотипів T, MT та MiT. Таким чином, ампліфікація фрагмента *Tfo1* дозволяє детектувати всі цільові генотипи одночасно.

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR

Template masking not selected
No mispriming library specified
No internal oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm      gc%   any_th   3'_th hairpin seq
LEFT PRIMER        178   18   50.92    50.00     0.00    0.00    0.00 CTAGAGTCCTGGTTGATG
RIGHT PRIMER       302   18   50.72    44.44     0.00    0.00    0.00 ATATTCCCTGCCGATATG
INTERNAL OLIGO     239   20   63.03    55.00     0.00    0.00    0.00 TCTTAAACTCCGCCACGCCA
SEQUENCE SIZE: 480
INCLUDED REGION SIZE: 480

PRODUCT SIZE: 125, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

    1 AACAACAGCTGCGTGGCGCATCCGACGAGGAGCGGTTTGAGATATGGAGGAAACAGAGCT


   61 TTATCGGAAAGCTCCACAACTTCTGTGTGTGGGTCAACAGGAGTGACCAGCGACGGGAGC


  121 TGCTGAAACAGTACGTGTTGACGGCGTACGACGAAGGCAGCATCGAGTGCCTCTACACTA
                                                                >>>

  181 GAGTCCTGGTTGATGGCGGCATCCGCTGGAACTCTGCATATGCGATGATTGAAAGAGCTC
      >>>>>>>>>>>>>>>                                          ^^

  241 TTAAACTCCGCCACGCCATTGATCTCTTCTTCCTCAACTACAACCATATCGGCAGGGAAT
      ^^^^^^^^^^^^^^^^^^                          <<<<<<<<<<<<<<<<

  301 ATGATATCTCACAGGATATGCTTACTCCGCAGGATTGGGTTGATCTGGAACACTTCCTCG
      <<

  361 GTATCTTAAAGCCGTTCAAAGATCTAACAAAACGCATGGAAGGCCGGGCAAATAAAGCGG


  421 GCCTTGAAGGATCCCACGGCTCCCTTTACGAAACGATCGAGTCGCTAGACGTTCTCTTCA
```

Рис. Результат дизайну TaqMan-системи для детекції генотипів N, T, MT та MiT раси 4 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (скриншот програми Primer3). Показано фрагмент послідовності MH828058.1 у межах позицій 1921–2400 п.н. Символами позначено: «>» – прямий праймер (позиції 2098–2115 п.н.), «<» – зворотний праймер (позиції 2205–2222 п.н.), «^» – внутрішній зонд (позиції 2159–2178 п.н.).

За розрахунками програми «Primer3», температура плавлення прямого праймера становить 50,92 °C, а зворотного –50,72 °C. При цьому автори оригінального дослідження (Davis et al., 2022) вказують 59,00 °C як робочу температуру відпалу. Розроблено внутрішній зонд розміром 20 нуклеотидів із послідовністю TCTTAAACTCCGCCACGCCA. Так як праймери FOV4 A3-2018 фланкують ділянку всередині транспозона *Tfo1*, дизайн зонда було спрямовано на консервативну область цієї послідовності, оскільки генотипи MT та MiT містять додаткові вставки (*MULE* або *MITE*) всередині *Tfo1* у локусі *PHO*. Обрана локалізація зонда дозволяє уникнути ділянок вторинних інсерцій, забезпечуючи універсальність детекції як для простих вставок *Tfo1* (генотипи N, T), так і для складних інсерцій (MT, MiT). Розрахункова температура плавлення зонда становить 63,03 °C, що забезпечує необхідну різницю температур плавлення відносно праймерів, GC-склад при цьому становить

55,00%. Біоінформатичний аналіз вказує на відсутність внутрішньомолекулярних взаємодій, здатних знизити чутливість реакції. Розрахункові індекси схильності до самокомплементарності (any_th), комплементарності 3'-кінця (3'_th) та формування шпильок (hairpin) для обраної послідовності становлять 0,00. Це свідчить про відсутність ризику утворення стабільних вторинних структур, що робить зонд доступним для гібридизації з цільовою ДНК.

Перевірка специфічності розробленої TaqMan-системи за допомогою інструменту «Primer-BLAST» підтвердила її високу специфічність. Встановлено, що праймери та зонд утворюють цільові продукти ампліфікації виключно з матрицями ДНК генотипів N, T, MT та MiT (табл.). Не виявлено перехресних реакцій з іншими расами FOV, іншими представниками роду *Fusarium* та із геномом рослини-господаря.

Згідно з даними секвенування геному FOV, кількість копій інвертованих повторів *Tfo1* може перевищувати 60 на один геном (Bell et al., 2019). Така висока представленість мішені забезпечує значно вищу чутливість детекції порівняно з однокопійними генами. Через варіабельність кількості копій транспозона у різних ізолятів, отримані значення порогового циклу (Ct) відображають загальну біомасу міцелію та спор у ґрунті, як це було продемонстровано у дослідженнях (Davis et al., 2022).

Висновки

На основі консервативної ділянки гена транспозази мобільного елемента *Tfo1* розроблено TaqMan-зонд для ампліфікації цільового фрагмента розміром 125 п.н. Мультикопійна природа обраної мішені забезпечує високу чутливість кількісного аналізу. Термодинамічні характеристики розробленого олігонуклеотида повністю відповідають вимогам РЧ-ПЛР та узгоджені з параметрами праймерів FOV4 A3-2018, що забезпечує ефективність реакції. Верифікація специфічності *in silico* підтвердила, що запропонована система є специфічною до всіх чотирьох генотипів (N, T, MT, MiT) раси 4 FOV і не утворює неспецифічних продуктів з ДНК рослини-господаря та інших представників роду *Fusarium*. Наступним етапом дослідження є експериментальна валідація системи *in vitro* на колекційних та природних штамах *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, зразках ґрунту та інфікованому насінні. Підтвердження специфічності та чутливості розроблених систем у тестуванні *in vitro* дозволить використовувати їх для діагностики фузаріозного в'янення, посилення фітосанітарного контроля та у наукових дослідженнях, спрямованих на вивчення поширення та екології *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Інформація про фінансову підтримку, подяки: відсутня.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Таблиця. Номери доступу нуклеотидних послідовностей генотипів N, T, MT та MiT раси 4 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV), для яких підтверджено специфічність розробленої TaqMan-системи *in silico*

Генотип FOV	N	T	MT	MiT
Номер доступу	MH828069.1	KT323911.1	MH828059.1	MH828081.1
	MH828070.1	KT323912.1	MH828060.1	
	MH828071.1	KT323913.1	MH828061.1	
	MH828072.1	KT323914.1	MH828062.1	
	MH828073.1	KT323915.1	MH828063.1	
	MH828074.1	KT323916.1	MH828064.1	
	MH828075.1	KT323917.1	MH828065.1	
	MH828076.1	KT323918.1		
	MH828077.1	MH828058.1		
	MH828078.1	MH828066.1		
	MH828079.1	MH828068.1		
	MH828080.1	MH828067.1		
	MH828082.1			
	MH828083.1			

References

1. Bell A. A., Gu A., Olvey J., Wagner T. A., Tashpulatov J. J., Prom S., Quintana J., Nichols R. L., Liu J. Detection and characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* VCG0114 (race 4) isolates of diverse geographic origins. *Plant Disease*. 2019. Vol. 103 (8). P. 1998–2009. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1624-RE.

2. Davis R. L. II, Isakeit T., Chappell T. M. DNA-based quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in environmental soils to describe spatial variation in inoculum density. *Plant Disease*. 2022. Vol. 106 (6). P. 1653–1659. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1664-RE.
3. Halpern H., Qi P., Kemerait R., Brewer M. Genetic diversity and population structure of races of *Fusarium oxysporum* causing cotton wilt. *G3: Genes|Genomes|Genetics*. 2020. Vol. 10. P. 3261–3269. https://doi.org/10.1534/g3.120.401187.
4. Liu J., Wagner T. A. Detection and genotyping of Fov4 (Race 4, VCG0114), the fusarium wilt pathogen of cotton. *Method Mol. Biol*. 2022. Vol. 2391. P. 191–205. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1795-3_16.
5. Luchi N., Ioos R., Santini A. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 104. P. 2453–2468. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10395-4.
6. National Center for Biotechnology Information. GenBank database. U. S. *National Library of Medicine*. 2026. Retrieved from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.
7. Ortiz C. S., Bell A. A., Magill C. W., Liu J. Specific PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* California race 4 based on a unique *Tfo1* insertion event in the PHO gene. *Plant Disease*. 2017. Vol. 101 (1). P. 34–44. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0332-RE.
8. Smith S. N., DeVay J. E., Hsieh W. H., Lee H. J. Soil-borne populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, a cotton wilt fungus in California fields. *Mycologia*. 2001. Vol. 93 (4). P. 737–743. https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063205.
9. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B., Remm M., Rozen S. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40 (15). P. e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596.
10. Vozhehova R., Borovyk V., Zaiets S., Serhieiev L., Kohut I. Ecological plasticity and sustainability of cotton in the Southern Steppe of Ukraine. *Scientific Horizons*. 2024. Vol. 27 (2). P. 43–53. https://doi.org/10.48077/scihor2.2024.43.
11. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012. Vol. 13. P. 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

DROZDOV H. I.[1] SLISHCHUK H. I.[2], VOLKOVA N. E.[2]
[1] Odesa I. I. Mechnikov National University,
Ukraine, 65082, Odesa, Vsevoloda Zmiienka str., 2
[2] Institute of Climate-Smart Agriculture NAAS,
Ukraine, 67667, Odesa reg., Khlibodarske, Maiakska doroha str., 24

DEVELOPMENT OF A TAQMAN SYSTEM FOR MOLECULAR DETECTION OF RACE 4 *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *VASINFECTUM*

***Aim*.** To develop specific TaqMan system for *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV) fungus race 4 molecular detection, the causative agent of Fusarium wilt of cotton (*Gossypium* L.), by real-time polymerase chain reaction. ***Methods*.** Bioinformatic analysis of nucleotide sequences of the *PHO* (phosphate permease) and *NAT* (N-acetyltransferase) genes containing insertions of mobile genetic elements (types *Tfo1*, *MULE* and *MITE*). Design of the internal TaqMan probe was performed using the Primer3 tool. Specificity of the developed system was verified *in silico* using the Primer-BLAST tool. Previously published primers FOV4 A3-2018 were used in the work. ***Results*.** Based on the conserved region of the transposase gene inside the mobile element *Tfo1*, an internal TaqMan probe was developed, optimized for use with the primers FOV4 A3-2018. *In silico* PCR confirmed the specificity of the system. ***Conclusions*.** The developed TaqMan system is a reliable, theoretically substantiated tool for the FOV race 4 identification, based on the *in silico* analysis results. System's specificity, confirmed by bioinformatics, allows proceeding to its *in vitro* laboratory validation on FOV collection and natural strains, for phytosanitary control enhancement and epiphytotics of Fusarium wilt of cotton prevention.
Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, TaqMan, bioinformatics, molecular detection, cotton.

Надходження статті: 20 квітня 2026 р.
Прийняття до друку після рецензування: 20 червня 2026 р.
Публікація: 30 листопада 2026 р.