



УДК:632.57

Холмурод АБДУВАЛИЕВ,

Студент бакалавриата, Тошкентский государственный технический университет имени Ислама Каримова

E-mail: abduvaliyevholmurod8@gmail.com

Маликахон РАЗИКОВА,

Докторант, Тошкентский государственный технический университет имени Ислама Каримова

Дилобар МИРЗАЕВА,

Доцент, Тошкентский государственный технологический университет имени Ислама Каримова

Нортожи ХЎЖАМШУКУРОВ,

Профессор, Тошкентский химико-технологический институт

На основе рецензии доцента Ш.Азимов

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ АГРОЭКОСИСТЕМ ОБЛАСТЕЙ УЗБЕКИСТАНА

Аннотация

В работе представлены результаты комплексного исследования изолятов энтомопатогенных грибов рода *Metarhizium*, выделенных из насекомых-вредителей агроэкосистем Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей Республики Узбекистан. Всего из тел насекомых было получено 155 изолятов, из которых 95 были выделены от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. и 60 - от гусениц восковой моли *Galleria mellonella*. Проведён биологический скрининг антагонистической активности в отношении *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani*, а также оценено влияние перспективных изолятов на рост огурца (*Cucumis sativus* L.). По результатам биохимической оценки и молекулярной идентификации отобрано 10 штаммов, отнесённых к виду *Metarhizium anisopliae*. Установлено, что отобранные штаммы формируют конидиальные суспензии с титром не ниже $1,0 \times 10^6$ конидий/мл. Полученные данные подтверждают перспективность локальных штаммов *M. anisopliae* для разработки биопрепаратов, адаптированных к условиям орошаемого земледелия Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей.

Ключевые слова: *Metarhizium anisopliae*, энтомопатогенные грибы, Сырдарьинская область, Кашкадарьинская область, колорадский жук, биологическая защита растений.

GENETIC AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF METARHIZIUM ANISOPLIAE ISOLATES ISOLATED FROM INSECT PESTS OF AGROECOSYSTEMS OF UZBEKISTAN REGIONS

Annotation

This study presents the results of a comprehensive investigation of isolates of entomopathogenic fungi of the genus *Metarhizium* obtained from insect pests of agroecosystems in the Syrdarya and Kashkadarya regions of the Republic of Uzbekistan. In total, 155 isolates were recovered from insect bodies, including 95 isolates from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) and 60 isolates from larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). Biological screening was conducted to assess antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, as well as the effects of promising isolates on cucumber (*Cucumis sativus* L.) growth. Based on biochemical evaluation and molecular identification, ten strains were selected and assigned to *Metarhizium anisopliae*. The selected strains were shown to produce conidial suspensions with titers of at least 1.0×10^6 conidia/mL. The obtained data confirm the potential of local *M. anisopliae* strains for the development of biopreparations adapted to the conditions of irrigated agriculture in the Syrdarya and Kashkadarya regions.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, entomopathogenic fungi, Syrdarya region, Kashkadarya region, Colorado potato beetle, biological plant protection.

ЎЗБЕКИСТОН VILOYATLARI AGROEKOTIZIMALARIDAGI HASAROTLAR ZARARKUVONLARIDAN AYRILGAN METARHIZIUM ANISOPLIAE IZOLATLARINING GENETIK VA BIOLOGIK XUSUSIYATLARI

Аннотация

Ushbu ishda Ўzbekiston Respublikasining Sirdaryo va Qashqadaryo viloyatlari agroekotizimlarida uchraydigan hasharot-zararkunandalardan ajratib olingan *Metarhizium* turkumiga mansub entomopatogen zamburug' izolyatlarini kompleks tadqiq etish natijalari keltirilgan. Hasharot tanalaridan jami 155 ta izolyat olingan bo'lib, ularning 95 tasi Kolorado kartoshka qo'ng'izi (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) dan, 60 tasi esa mum kuyasi (*Galleria mellonella*) qurtlaridan ajratib olingan. *Fusarium oxysporum* va *Fusarium solani* ga nisbatan antagonistik faollik bo'yicha biologik skrining o'tkazildi, shuningdek istiqbolli izolyatlarning bodring (*Cucumis sativus* L.) o'sishiga ta'siri baholandi. Biokimyoviy baholash va molekulyar identifikatsiya natijalariga ko'ra 10 ta shtamm tanlab olinib, ular *Metarhizium anisopliae* turiga mansub deb aniqlandi. Tanlangan shtammlar kamida $1,0 \times 10^6$ konidiya/ml titrga ega bo'lgan konidial suspenziyalar hosil qilishi aniqlandi. Olingan ma'lumotlar Sirdaryo va Qashqadaryo viloyatlarining sug'oriladigan dehqonchilik sharoitlariga moslashtirilgan biopreparatlar yaratishda mahalliy *M. anisopliae* shtammlarining istiqbolli ekanligini tasdiqlaydi.

Kalit so'zlar: *Metarhizium anisopliae*, entomopatogen zamburug'lar, Sirdaryo viloyati, Qashqadaryo viloyati, Kolorado kartoshka qo'ng'izi, o'simliklarni biologik himoya qilish.

Введение. Сырдарьинская и Кашкадарьинская области относятся к ключевым сельскохозяйственным регионам Узбекистана и характеризуются интенсивным орошаемым земледелием, что создаёт благоприятные условия для массового развития насекомых-вредителей. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata*) и другие фитофаги наносят значительный экономический ущерб овощным и техническим культурам, что требует поиска экологически безопасных методов защиты растений [1].

Энтомопатогенные грибы рода *Metarhizium* являются важным компонентом природной регуляции численности насекомых и широко применяются в биологической защите растений. Однако эффективность биопрепаратов во многом зависит от адаптации штаммов к конкретным почвенно-климатическим условиям. В этой связи изучение аборигенных изолятов *Metarhizium*, циркулирующих в агроэкосистемах Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей, представляет особый научный и практический интерес [2].

Целью настоящей работы являлась изоляция, биологическая и молекулярная характеристика энтомопатогенных грибов рода *Metarhizium*, выделенных из насекомых-вредителей указанных регионов.

Материалы и методы. Материал для исследования был собран в агроэкосистемах Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей Узбекистана. Объектами изоляции служили: колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say., гусеницы восковой моли *Galleria mellonella* L.

Изоляцию энтомопатогенных грибов проводили из поражённых органов насекомых с признаками микоза. Полученные культуры очищали пересевами и идентифицировали по морфологическим признакам как представители рода *Metarhizium* [3].

Антагонистическую активность изолятов оценивали *in vitro* по способности ингибировать рост *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani*. Дополнительно изучали влияние активных изолятов на рост корневой системы и надземной части огурца.

По результатам биохимических тестов и оценки потенциальной опасности из 20 активных изолятов было отобрано 10 штаммов для дальнейших исследований.

Видовую принадлежность штаммов определяли на основе анализа гена 5'-TEF. Подсчёт конидий проводили в камере Горяева; концентрация спор у всех отобранных штаммов составляла не менее $1,0 \times 10^6$ конидий/мл [4].

Результаты и их обсуждение. В результате проведённых исследований из тел насекомых-вредителей было выделено 155 изолятов энтомопатогенных грибов рода *Metarhizium*. Из них 95 изолятов (61,3 %) были получены от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae), и 60 изолятов (38,7 %) - от гусениц восковой моли *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Изоляция грибов осуществлялась из поражённых органов насекомых с характерными признаками микоза, включая развитие мицелия и спороношение на поверхности тела. Все выделенные культуры после первичной изоляции были очищены путём пересевов на питательные среды и идентифицированы как представители рода *Metarhizium* на основании морфологических признаков (форма и размеры конидий, строение конидиеносцев, характер спороношения).

Сравнительный анализ источников выделения показал, что изоляты, полученные от *L. decemlineata*, отличались более высокой частотой встречаемости и разнообразием морфотипов по сравнению с изолятами, выделенными от *G. mellonella*. Это может указывать на более тесную экологическую связь популяций *Metarhizium* с колорадским жуком как постоянным полевым фитофагом агроэкосистем Сырдарьинской области.

Полученные изоляты были использованы для дальнейших молекулярно-генетических исследований, направленных на уточнение видовой принадлежности и оценку внутривидового генетического разнообразия. Полученные результаты свидетельствуют о высокой распространённости энтомопатогенных грибов рода *Metarhizium* среди насекомых-вредителей агроэкосистем Сырдарьинской области [3]. Преобладание изолятов, выделенных от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (61,3 %), указывает на значительную роль *Metarhizium* в естественной регуляции численности данного вредителя, который является одним из ключевых объектов защиты в орошаемых земледельческих системах региона.

Использование гусениц *Galleria mellonella* как модельного объекта позволило эффективно выявить почвенные и ассоциированные с растениями штаммы *Metarhizium*, обладающие высокой вирулентностью. Несмотря на меньшую долю выделенных изолятов (38,7 %), данный объект остаётся ценным инструментом для скрининга энтомопатогенных грибов и подтверждения их патогенного потенциала.

Различия в количестве и морфологическом разнообразии изолятов, полученных от двух видов насекомых, могут быть обусловлены экологическими особенностями хозяев, условиями их обитания и степенью контакта с почвенным резервуаром грибов. Колорадский жук, значительную часть жизненного цикла связанный с почвой, вероятно, чаще подвергается заражению почвенными популяциями *Metarhizium*, что согласуется с представлением о почве как основном резервуаре энтомопатогенных грибов.

Выделенные изоляты представляют собой перспективный материал для последующего молекулярно-генетического анализа, оценки вирулентности и отбора локально адаптированных штаммов, пригодных для разработки биологических препаратов против насекомых-вредителей агроэкосистем Сырдарьинской области.

Молекулярная идентификация отобранных перспективных изолятов была проведена с целью уточнения их видовой принадлежности. В качестве молекулярного маркера использовали участок гена ядерного фактора элонгации трансляции 1-альфа (5'-TEF), широко применяемый для таксономической идентификации представителей рода *Metarhizium* [5].

Анализ амплифицированных и секвенированных фрагментов 5'-TEF показал, что все десять отобранных штаммов (BRT-3, BST-10, CST-6, FRN-1, FRT-12, FRT-13, FST-7, HRT-18, HRT-5, KRN-1) относятся к виду *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Полученные последовательности демонстрировали высокую степень гомологии с референсными последовательностями *M. anisopliae*, депонированными в международных базах данных, что подтверждает корректность видовой идентификации.

Результаты молекулярного анализа согласуются с морфологическими признаками выделенных культур и подтверждают принадлежность отобранных изолятов к одному из наиболее значимых в биологической защите растений видов рода *Metarhizium* [6].

Для оценки концентрации жизнеспособных конидий у отобранных штаммов *Metarhizium anisopliae* был проведён подсчёт спор с использованием камеры Горяева. Конидии получали из 10–14-суточных культур, выращенных на агаризованной питательной среде, путём смыва стерильным раствором с добавлением поверхностно-активного вещества.

Подсчёт осуществляли в стандартных квадратах камеры Горяева при увеличении $\times 400$. Концентрацию конидий рассчитывали по общепринятой формуле с учётом коэффициента разведения. Для всех десяти штаммов была достигнута концентрация не ниже $1,0 \times 10^6$ конидий/мл, что соответствует требованиям к лабораторным штаммам, предназначенным для дальнейших биологических испытаний и разработки микробных препаратов (Табл. 1.)

Таблица 1. Концентрация конидий перспективных штаммов *Metarhizium anisopliae*, определённая методом камеры Горяева.

№	Штамм	Концентрация конидий, $\times 10^6$ /мл	Соответствие нормативу
1	BRT-3	1,1	соответствует
2	BST-10	1,2	соответствует
3	CST-6	1,3	соответствует
4	FRN-1	1,0	соответствует
5	FRT-12	1,4	соответствует
6	FRT-13	1,2	соответствует
7	FST-7	1,3	соответствует
8	HRT-18	1,5	соответствует
9	HRT-5	1,1	соответствует
10	KRN-1	1,6	соответствует

Заключение. В результате проведённых исследований в агроэкосистемах Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей Узбекистана выявлена высокая распространённость энтомопатогенных грибов рода *Metarhizium* среди насекомых-вредителей. Всего из тел колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) и гусениц восковой моли (*Galleria mellonella*) было выделено 155 изолятов, что подтверждает значимую роль данных грибов в естественной регуляции численности фитофагов в условиях орошаемого земледелия.

Преобладание изолятов, полученных от *L. decemlineata* (61,3 %), свидетельствует о тесной экологической связи популяций *Metarhizium* с данным вредителем, жизненный цикл которого частично связан с почвой - основным природным резервуаром энтомопатогенных грибов. Использование *G. mellonella* в качестве модельного объекта позволило эффективно выявить вирулентные и физиологически активные штаммы, перспективные для дальнейшего биологического скрининга.

В ходе in vitro-скрининга установлено, что ряд изолятов проявляет выраженную антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani*, а также оказывает положительное влияние на рост корневой системы и надземных органов огурца. По результатам биохимической оценки и анализа потенциальной опасности отобрано 10 перспективных штаммов для дальнейших исследований.

Молекулярная идентификация на основе анализа гена 5'-TEF показала, что все отобранные штаммы относятся к виду *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin - одному из наиболее изученных и востребованных видов в биологической защите растений. Полученные данные полностью согласуются с морфологическими характеристиками выделенных культур и подтверждают корректность видовой диагностики.

Определение титра конидий методом камеры Горяева показало, что концентрация спор у всех перспективных штаммов составляла не менее $1,0 \times 10^6$ конидий/мл, что соответствует требованиям к лабораторным штаммам, предназначенным для последующих биологических испытаний и разработки микробиологических препаратов.

Таким образом, изоляты *Metarhizium anisopliae*, выделенные из насекомых-вредителей агроэкосистем Сырдарьинской и Кашкадарьинской областей, представляют собой ценный биологический ресурс для создания локально адаптированных биопрепаратов. Полученные результаты расширяют представления о биоразнообразии энтомопатогенных грибов в условиях Узбекистана и могут быть использованы при разработке экологически безопасных стратегий защиты сельскохозяйственных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anitha J., Krutmuang P., Rajula J. Массовое производство и потенциал *Metarhizium anisopliae* на различных субстратах // В кн.: Recent Advances in Microbial Biotechnology.
2. Indriyanti D.R., Bintari S.H., Setiati N., Alfian J.M.Z. Плотность и жизнеспособность конидий *Metarhizium anisopliae* на различных питательных средах // Bioscientific: Journal of Biology & Biology Education. – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 237–242.
3. Турабекова Д., Хужамшукуров Н., Разикова М. Изучение морфокультуральных особенностей *Metarhizium anisopliae* в различных питательных средах // Инновации в технологиях и образовании. – Белова, 2023. – № 7. – С. 26–28.
4. Мирзаева Д., Хужамшукуров Н., Разикова М. Подбор питательной среды для культивирования гриба *Metarhizium anisopliae* // Проблемы изучения, сохранения и устойчивого использования агробактериального биоразнообразия для обеспечения продовольственной безопасности и сохранения природных ресурсов в условиях изменения климата. – Ташкент, 2023. – С. 796 – 799.
5. Худойдердиева М., Хужамшукуров Н., Разикова М. Подбор местных питательных источников для выращивания гриба *Metarhizium anisopliae* // Научные достижения в области изменения климата и устойчивого развития. – Джизак, 2025. – № 3/2/1. – С. 107–109.
6. Разикова М., Саидхонов Т., Войтко Д., Кучкарова Д., Хужамшукуров Н. Стимуляция роста растений микроорганизмами, синтезирующими меланин // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2024. – Т. 13, № 8. – С. 158–164.