

**БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ *ALTERNARIA MACROSPORA* ДЛЯ РОЗРОБКИ СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДЕТЕКЦІЇ**

<sup>2</sup>Г. І. Сліщук <https://orcid.org/0000-0003-4245-8557>

<sup>1</sup>Г. І. Дроздов <https://orcid.org/0009-0004-1922-1433>

<sup>1</sup>Н. Ю. Васильєва <https://orcid.org/0000-0001-8856-3497>

<sup>2</sup>Н. Е. Волкова <https://orcid.org/0000-0002-9333-4872>

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна

e-mail: drozdov.hlib@stud.onu.edu.ua, tatkamic@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут кліматично орієнтованого сільського господарства НААН,

Маяцька дор., 24, смт Хлібодарське, Одеський район, Одеська область, 67667, Україна

e-mail: natavolki@ukr.net, geoncrfqq@gmail.com

**Мета.** Розробити специфічні праймери та TaqMan-зонди для детекції фітопатогенного гриба *Alternaria macrospora* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. **Методи.** Біоінформатичний аналіз послідовностей *A. macrospora*, наявних у генетичній базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI). Пошук гомологів здійснювали з використанням інструменту «BLAST» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для оцінки роздільної здатності генетичних локусів проводили філогенетичний аналіз у програмі raxmlGUI. Множинне вирівнювання послідовностей виконували за допомогою алгоритму MAFFT. Дизайн праймерів та TaqMan-зондів здійснювали за допомогою інструменту «Primer3» (<https://primer3.ut.ee/>). Специфічність праймерів перевіряли *in silico* із використанням інструменту «Primer-BLAST». **Результати.** Проаналізовано 82 нуклеотидні послідовності *A. macrospora*, з них 48 послідовностей ITS регіону (Internal Transcribed Spacer) та послідовності генетичних локусів 18S rRNA і 28S rRNA (Ribosomal RNA), RPB2 (RNA Polymerase II Second Largest Subunit), GAPDH (Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase), TEF1 (Translation Elongation Factor 1-alpha), histone H3, calmodulin, actin, allergen alt a 1. Встановлено, що традиційний молекулярний маркер ITS має низьку роздільну здатність для ідентифікації *A. macrospora* та не дозволяє відрізнити цей вид від інших представників *Alternaria*. Виявлено, що гени calmodulin та histone H3 містять видоспецифічні ділянки, які можуть бути використані для диференціації *A. macrospora*. На основі послідовностей цих генів розроблено дизайн пар праймерів (прямий та зворотний) та внутрішніх TaqMan-зондів, що показали специфічність до *A. macrospora* при перевірці *in silico*. **Висновки.** Гени calmodulin та histone H3 виявилися перспективними молекулярними маркерами для специфічної детекції *A. macrospora*. Розроблена TaqMan-система дозволяє *in silico* специфічно ідентифікувати *A. macrospora*.

**Ключові слова:** *Alternaria macrospora*, бавовник, біоінформатика, молекулярна детекція, ПЛР у реальному часі.



В умовах глобальних кліматичних змін вирощування бавовнику (*Gossypium L.*), який вважався нетиповою культурою для України, стає економічно виправданим. Окрім текстильної промисловості, бавовник має стратегічне значення для оборонного сектору як сировина для виробництва нітроцелюлозного пороху, що є важливим завданням для держави в сучасних умовах. Попри втрати насінневого фонду внаслідок воєнних дій, українські вчені розмножують та підтримують збережені сорти [1]. Хоча наразі через тривалу відсутність промислового культивування бавовнику в Україні специфічні патогени практично не зафіксовані, досвід сусідніх регіонів свідчить про їх потенційну появу в майбутньому. Для забезпечення фітосанітарної безпеки та успішної інтродукції культури необхідною є розробка методів превентивного моніторингу та ранньої молекулярної детекції патогенів.

*Alternaria macrospora* Zimm. є фітопатогенним грибом, що спричиняє альтернаріозну плямистість листя бавовнику, відому більше ніж століття. Цей патоген має глобальне поширення і був ідентифікований у багатьох бавовносіючих регіонах світу. Захворювання характеризується появою коричнево-сірих плям на листках, які згодом висихають і можуть випадати, утворюючи характерний симптом «дірчастості». За високого ступеня ураження спостерігається передчасна дефоліація рослин, що спричиняє значний недобір врожаю, сумарні втрати волокна та насіння можуть сягати 30% [2].

Розповсюдження фітопатогену відбувається через насіння після розкриття коробочок і експозиції насіння до середовища, де присутній патоген, який також здатний зберігатися в ґрунті на рослинних залишках, перезимовуючи в них [3, 4].

Для ефективного контролю захворювання важливою є швидка та точна ідентифікація патогена. Традиційні методи діагностики, засновані на морфологічних ознаках, та імунологічні методи є трудомісткими та часовитратними [5]. Метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР) пропонує значні переваги порівняно з традиційними підходами, він характеризується високою чутливістю, специфічністю, широким динамічним діапазоном кількісного визначення та швидкістю, особливо перспективним є використання TaqMan-технології, яка базується на гідролізних зондах із подвійним флуоресцентним міченням.

TaqMan-зонди підвищують специфічність детекції порівняно з інтеркалюючими барвниками, оскільки вимагають специфічної гібридизації зонда з цільовою послідовністю для генерації флуоресцентного сигналу. Метод дозволяє проводити мультиплексування до шести мішеней в одній реакції завдяки використанню різних флуорофорів. Метою роботи є розробка специфічних праймерів та TaqMan-зондів для детекції фітопатогенного гриба *Alternaria macrospora* методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

## Матеріали та методи

### Пошук нуклеотидних послідовностей

Проведено пошук усіх доступних нуклеотидних послідовностей *A. macrospora* у генетичній базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) підбази «nucleotide collection nr/nt» [6]. Використано



82 послідовності, серед яких 48 послідовностей — *ITS*, внутрішні транскрибовані спейсерні області *ITS1* та *ITS2*, що оточують ген *5.8S rRNA*; по 2 — *28S rRNA*, *18S rRNA* (*Ribosomal RNA*), 7 — *RPB* (*RNA Polymerase II Second Largest Subunit*), по 5 — *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase*), *TEF1* (*Translation Elongation Factor 1-alpha*), 4 — *histone H3*, по 3 — *calmodulin*, *actin*, *allergen alt a 1* (станом на 01.03.2026 р.). Для філогенетичного аналізу використовували нуклеотидні послідовності, вказані в таблиці 1, як зовнішні групи використано види *Curvularia lunata*, *Setosphaeria rostrata*, *Curvularia spicifera*.

Таблиця 1

Нуклеотидні послідовності, використані для проведення філогенетичного аналізу *Alternaria macrospora*

Table 1

Nucleotide sequences used for the phylogenetic analysis of *Alternaria macrospora*

Локус	Вид	Ідентифікатор
1	2	3
<i>ITS</i> та <i>18S rRNA</i> , <i>28S rRNA</i>	<i>A. macrospora</i>	AF229469.1, AY154689.1, DQ156342.1, JQ936189.1, KC584204.1, KJ718193.1, KM186140.1, KM213867.1, KM514668.1, KM514669.1, KU877347.1, KX099951.2, KX139165.1, KX139166.1, MG571434.1, MH397128.1, MH553176.1, MK247907.1, MK304108.1, MK571458.1, MK605693.1, MK605694.1-MK605696.1, MN049541.1, MT908714.1, MW686901.1, MW686903.1, MW750591.1, MW750594.1-MW750596.1, MZ919476.1, NG_062890.1, NG_069135.1, OK447930.1, OK447931.1, OK639093.1, OK668228.1, OL597910.1, ON920832.1, OQ555157.1, PP593850.1, PQ433119.1, PQ483101.1, PQ483102.1, PV738943.1, PV770024.1, PV793674.1, PV888613.1
	<i>A. sp.</i>	KM246290.1, MK279381.1, MK640610.1, MK649891.1, MK649892.1, MN955465.1, MN955469.1-MN955476.1, OM780227.1, OM780228.1
	<i>A. cucumerina</i>	KJ718153.1, MK684057.1, MK684058.1, MK798648.1, MK798651.1, MK798652.1, OQ555092.1-OQ555094.1, OQ555148.1, OQ555150.1, OQ555155.1, OQ555168.1, OQ555171.1
	<i>A. alternata</i>	MK796105.1, MK796106.1, OQ555091.1
	<i>A. acalyphicola</i>	NR_136069.1, OW984575.1
	<i>A. blumeae</i>	MN612547.1, MN612548.1
	<i>A. agerati</i>	KJ718098.1
	<i>A. aragakii</i>	NR_136073.1
	<i>A. citrullicola</i>	NR_136084.1
	<i>A. cyatopsidis</i>	KJ718156.1
<i>C. lunata</i>	PX061231.1	



## Продовження таблиці 1

1	2	3
<i>Histone H3</i>	<i>A. macrospora</i>	MK605862.1-MK605865.1
	<i>A. solani</i>	CP022031.1, KF308917.1-KF308919.1, KF308930.1, KF308934.1, KF308935.1, KF308960.1, KT384305.1, MG012348.1-MG012355.1, MN506006.1, MZ687141.1-MZ687191.1, OR122992.1-OR123002.1
	<i>A. cucumerina</i>	MK683962.1, MK799383.1, MK799386.1, MK799387.1, OR572276.1-OR572278.1, OR572280.1-OR572284.1, PQ610997.1, PQ610998.1, PQ611000.1, PQ611001.1
	<i>S. rostrata</i>	LT860200.1
<i>Calmodulin</i>	<i>A. macrospora</i>	JQ646243.1, OL804164.1, OL804165.1
	<i>A. linariae</i>	KR911771.1, KR911772.1, KR911777.1, MH243769.1, MH243778.1-MH243781.1, MH243783.1, MH243789.1, MH243792.1-MH243795.1, MH243800.1, MH243807.1, MZ558743.1, OP297204.1, PP842242.1-PP842244.1
	<i>A. grandis</i>	JQ646249.1, KR911763.1, MH243770.1, MH243771.1, MH243773.1-MH243775.1, MH243777.1, MH243782.1, MH243784.1, MH243785.1, MH243787.1, MH243790.1, MW591988.1-MW591992.1, PP842230.1, PP842231.1
	<i>A. protenta</i>	JQ646236.1, MW591972.1-MW591983.1, PP842232.1-PP842236.1
	<i>A. solani</i>	CP022027.1, JQ646232.1, KJ397979.1, MW591958.1-MW591971.1
	<i>A. tomatophila</i>	KJ397980.1, MW591984.1-MW591987.1
	<i>A. porri</i>	JQ646235.1, MH175192.1
	<i>A. agripestis</i>	JQ646266.1
	<i>A. carthami</i>	JQ646238.1
	<i>A. cichorii</i>	JQ646247.1
	<i>A. cirsinoxia</i>	JQ646261.1
	<i>A. cretica</i>	JQ646250.1
	<i>A. cyphomandrae</i>	JQ646270.1
	<i>A. danida</i>	JQ646237.1
	<i>A. dichondrae</i>	JQ646267.1
	<i>A. linicola</i>	JQ646273.1
	<i>A. multirostrata</i>	JQ646272.1
	<i>A. passiflorae</i>	JQ646263.1
	<i>A. scorzonerae</i>	JQ646234.1
	<i>A. solani-nigri</i>	JQ646233.1
<i>A. subcylindrica</i>	JQ646254.1	
<i>C. spicifera</i>	MN599705.1	
<i>RPB2</i>	<i>A. macrospora</i>	KC584410.1, KJ718366.1, KU877349.1, MK605901.1, MK605902.1, MK605903.1, MK605904.1



1	2	3
GAPDH	<i>A. macrospora</i>	AY278805.1, KC584124.1, KJ718032.1, OL754654.1, OL754655.1
	<i>A. cucumerina</i>	AY562409.1, MK683869.1, MK683871.1, MT515306.1, OR572169.1, OR572170.1, OR572171.1, OR572172.1, OR572173.1, OR572174.1, OR572175.1, OR572176.1, OR572177.1, OR572178.1, OR572179.1, OR572180.1, OR572181.1, OR572182.1, OR572183.1
	<i>A. anodae</i>	KJ717963.1
	<i>A. rostellata</i>	JQ646332.1
TEF1	<i>A. macrospora</i>	KC584668.1, KJ718540.1, KU877348.1, OL962435.1, OL962436.1
	<i>A. zinniae</i>	LC480241.1, OM522523.1
	<i>A. cassiae</i>	EU130543.1
	<i>A. citrullicola</i>	KJ718492.1
	<i>A. physalidis</i>	MN087408.1
Actin	<i>A. macrospora</i>	JQ671734.1, OL830293.1, OL830294.1
	<i>A. porri</i>	JQ671726.1
	<i>A. solani</i>	CP022029.1
Allergen alt a 1	<i>A. macrospora</i>	AY563294.1, KJ718701.1, KJ718702.1

Примітка: Як зовнішні групи використано *Curvularia lunata*, *Curvularia spicifera*, *Setosphaeria rostrata*.

Note: *Curvularia lunata*, *Curvularia spicifera*, and *Exserohilum rostratum* were used as outgroups.

### Аналіз специфічності послідовностей

Пошук гомологів проводили з використанням «BLASTn» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [7]. Послідовності локусів *A. macrospora* порівнювали з усіма доступними послідовностями у базі даних NCBI для оцінки ступеня подібності з іншими видами роду *Alternaria* та спорідненими таксонами.

Множинне вирівнювання послідовностей (MSA) виконано на сервері GUIDANCE2 [8] з алгоритмом MAFFT [9]. Видалено позиції з низькою вірогідністю вирівнювання. Філогенетичні дерева побудовано методом максимальної правдоподібності (ML) у програмі *raxmlGUI* [10] з моделлю заміщення нуклеотидів GTR+G. Бутстреп-аналіз виконано з 1000 повторними вибірками. Візуалізацію дерев здійснено в iTOL v6 [11].

### Дизайн праймерів та TaqMan-зондів

Дизайн праймерів та TaqMan-зондів розроблено з використанням програми «Primer3» [12]. Параметри дизайну: розмір праймерів 18–25 нуклеотидів, температура плавлення 58–62 °C, вміст GC 40–65%, розмір ампліконів 70–150 пар нуклеотидів. Для TaqMan-зондів встановлено такі параметри: розмір 20–30 нуклеотидів, температура плавлення на 5–10 °C вище ніж у праймерів, вміст GC 40–70%, відсутність G на 5'-кінці для запобігання гасінню флуоресценції.



### Перевірка специфічності праймерів *in silico*

Специфічність розроблених праймерів перевірено за допомогою інструменту «Primer-BLAST» [13] на веб-сайті NCBI. Оцінювали можливість формування неспецифічних ампліконів не лише з ДНК інших видів роду *Alternaria*, але й з генетичним матеріалом інших таксонів.

### Результати дослідження та їх обговорення

#### Аналіз молекулярних маркерів

В ході дослідження було показано, що для локусів *ITS*, *TEF1*, *GAPDH* та *actin* зафіксовано 100% ідентичність з низкою сторонніх видів, що ускладнює розробку специфічних праймерів на їх основі. Послідовності *18S rRNA* та *28S rRNA* входять до складу рибосомального оперону разом з *ITS* регіоном і демонструють такий самий високий рівень консервативності, як і сам *ITS* регіон.

Послідовності гену *allergen alt a 1* між штамами *A. macrospora* мають генну варіативність з внутрішньовидовою ідентичністю лише 98,52%. Між послідовностями гена *RPB2* показник ідентичності становить 99,90%. За результатами аналізу, найнижчі показники ідентичності порівняно з іншими встановлено для генів *calmodulin* та *histone H3*. Для *calmodulin* максимальний рівень ідентичності з іншими видами не перевищував 99,74%, а для *histone H3* цей показник становить 99,80%. Ці локуси обрані як найбільш перспективні.

#### Виявлення специфічних ділянок у генах *calmodulin* та *histone H3*

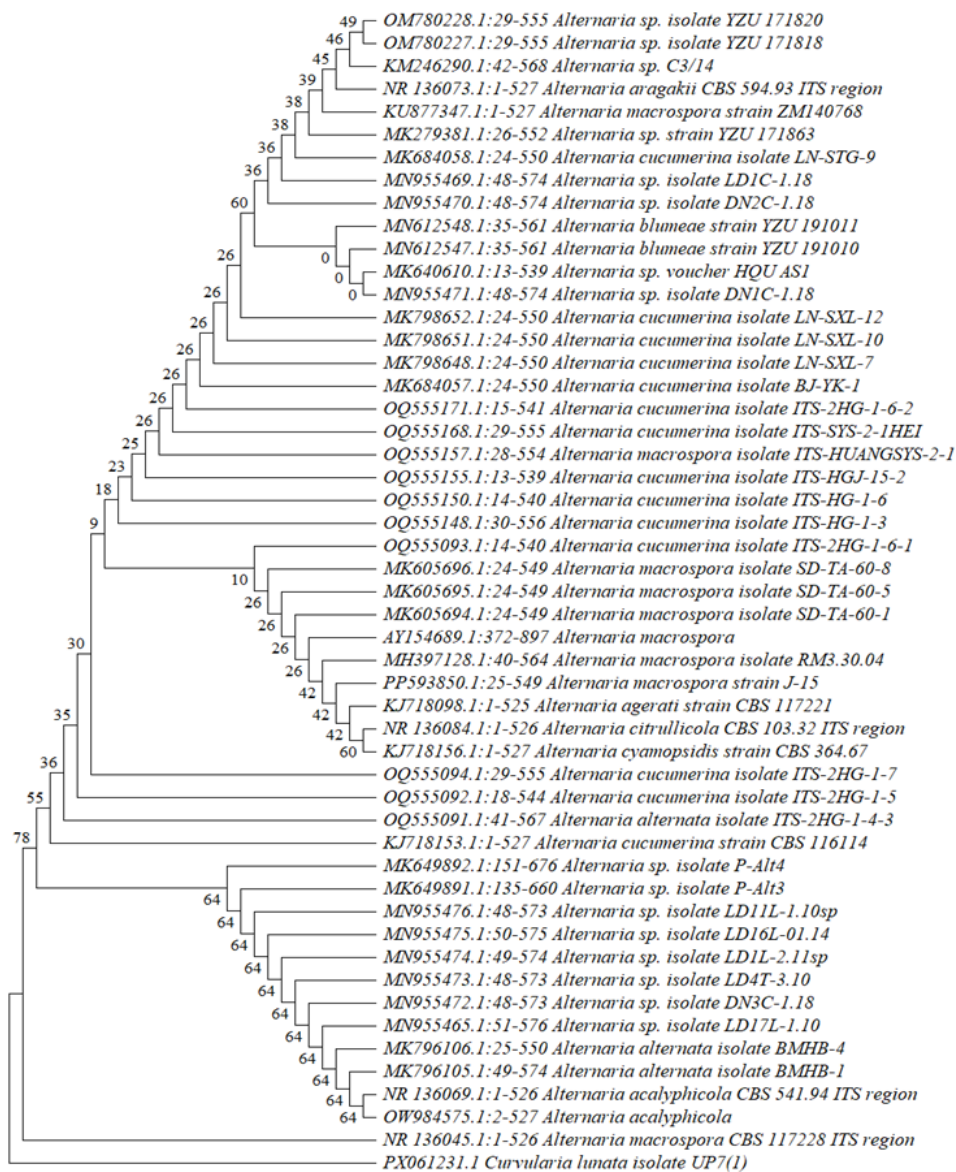
За допомогою множинного вирівнювання послідовностей генів *calmodulin* та *histone H3* виявлено наявність видоспецифічних ділянок для *A. macrospora*. У гені *calmodulin* видоспецифічна нуклеотидна ділянка виявлена лише для розробки прямого праймера, тоді як зворотний праймер є специфічним у межах роду. Окремі сегменти гена *histone H3* демонструють високу ідентичність з *A. solani*, тоді як інші з *A. cucumerina*, така гетерогенність свідчить про виражену «мозаїчність» нуклеотидної послідовності гена. Теоретично це може свідчити про інтрагенну рекомбінацію та гібридне походження *A. macrospora*. Система на основі гена *histone H3* забезпечує видоспецифічність завдяки комбінації праймерів, що взаємно виключають ампліфікацію ДНК близьких видів за рахунок невідповідностей на 3'-кінцях.

#### Оцінка роздільної здатності

Філогенетичний аналіз на основі *ITS* послідовностей підтвердив низьку роздільну здатність цього регіону для диференціації *A. macrospora* від близькоспоріднених видів [14]. На філогенетичному дереві (рис. 1) послідовності *A. macrospora* не формують чітко відокремленої клади, а натомість перемішані з послідовностями інших видів роду *Alternaria*, що робить цей маркер непридатним для точної ідентифікації. Показники бутстреп-аналізу для більшості внутрішніх вузлів виявилися низькими, що свідчить про статистичну ненадійність топології дерева. Як зовнішню групу використано ізолят *C. lunata* UP7(1) (PX061231.1).

Дендрограма, отримана на підставі проведеного філогенетичного аналізу, демонструє, що для гена *calmodulin* всі ізоляти *A. macrospora* сформували окремий кластер (рис. 2). Отримана топологія свідчить про обмежену роздільну здатність гену *calmodulin* для певних видів, наприклад він не дозволяє





**Рис. 1. Філогенетичне дерево, побудоване на основі ITS-регіону.**

Як зовнішню групу використано послідовність *Curvularia lunata* (PX061231.1). Бутстреп-аналіз було проведено з 1000 повторними вибірками, і значення вище 50% показано на відповідних гілках

**Fig. 1. Phylogenetic tree based on the ITS region.**

*Curvularia lunata* (PX061231.1) was used as an outgroup. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates, and values above 50% are shown on the corresponding branches.

The symbol \* indicates type material sequences.



диференціювати *Alternaria solani* та *A. protenta*, які на дендрограмі є поліфілетичними, цей кластер згорнуто у єдину таксономічну одиницю, яка об'єднує 34 ідентичні послідовності ізолятів із GenBank (16 ізолятів *A. solani* та 18 ізолятів *A. protenta*). Кластер *A. linariae* об'єднав 29 послідовностей, серед яких 21 належить *A. linariae*, 5 — *A. tomatophila*, по одній — *A. subcylindrica* та *A. cretica* (зазначені види є таксономічними синонімами), а також одна послідовність *A. solani*. Кластер *A. grandis* сформували 21 послідовність (20 ізолятів *A. grandis* та 1 — *A. danida*). Високі значення бутстрепа (87–89%) для кластера *A. macrospora* свідчать про достовірність формування топології. Як зовнішню групу використано послідовність *C. spicifera* (MN599705.1).

Аналіз локусу *histone H3* виявив складну топологічну структуру, за якої ізоляти *A. macrospora* не утворюють єдиної монофілетичної групи (рис. 3). Послідовності досліджуваних ізолятів демонструють вищу подібність з *A. cucumerina*, що призводить до їхнього фактичного змішування в топології філогенетичного дерева. Це узгоджується з ключовим дослідженням філогенії секції *Porri* роду *Alternaria*, де встановлено, що *A. macrospora* філогенетично ближча до *A. cucumerina*, ніж до *A. solani* [15]. Ізолят XJ-BZ-16-8 (МК605862.1) розташований відокремлено від інших зразків. На відміну від локусу *calmodulin*, де цільовий вид був монофілетичним із високою підтримкою, тут спостерігаються помірні значення бутстрепа (65–67%) для вузлів, що об'єднують ізоляти *A. macrospora*. Як зовнішню групу використано ізолят *S. rostrata* (LT860200.1).

На основі виявлених видоспецифічних ділянок у генах *calmodulin* (табл. 2, рис. 4) та *histone H3* (табл. 3, рис. 5) розроблено два набори праймерів (прямий, зворотний) та TaqMan-зонди для кожного гена. Для системи на основі гена *calmodulin* розмір амплікону становить 110 (п.н.). При цьому індекс взаємодоповнюваності між праймерами становить PAIR ANY\_TH COMPL 0,00 (загальна взаємодія) та PAIR 3'\_TH COMPL 0,00 (взаємодія на 3'-кінцях), що вказує на малий потенціал утворення димерів праймерів. Для гена *histone H3* розроблено аналогічний набір, що утворює довший амплікон розміром 155 п.н. Індокси взаємодоповнюваності для пари праймерів *histone H3* дорівнюють PAIR ANY\_TH COMPL 0,00 та PAIR 3'\_TH COMPL 3,90, що свідчить про високу специфічність і мінімальний ризик утворення неспецифічних продуктів. Попри виявлену філогенетичну неоднорідність локусу, специфічність розробленої ПЛР-системи забезпечується дизайном праймерів до консервативної ділянки на основі виявлених однонуклеотидних замінів, яка залишається стабільною для всіх штамів *A. macrospora*, включаючи дивергентний ізолят XJ-BZ-16-8. Прямий праймер для гена *histone H3* сконструйований таким чином, що його 3'-термінальний нуклеотид утворює невідповідність (*англ.* mismatch) із послідовностями *A. cucumerina*, аналогічно, зворотний праймер розроблений із розрахунком на невідповідність 3'-кінця із послідовностями *A. solani*. Оскільки ефективність роботи Taq-полімерази критично залежить від комплементарності саме 3'-кінця праймера, це гарантує відсутність неспецифічної ампліфікації. Обидві системи відповідають вимогам РЧ-ПЛР: температура плавлення праймерів перебуває у вузькому діапазоні, а температура плавлення зондів є суттєво вищою.



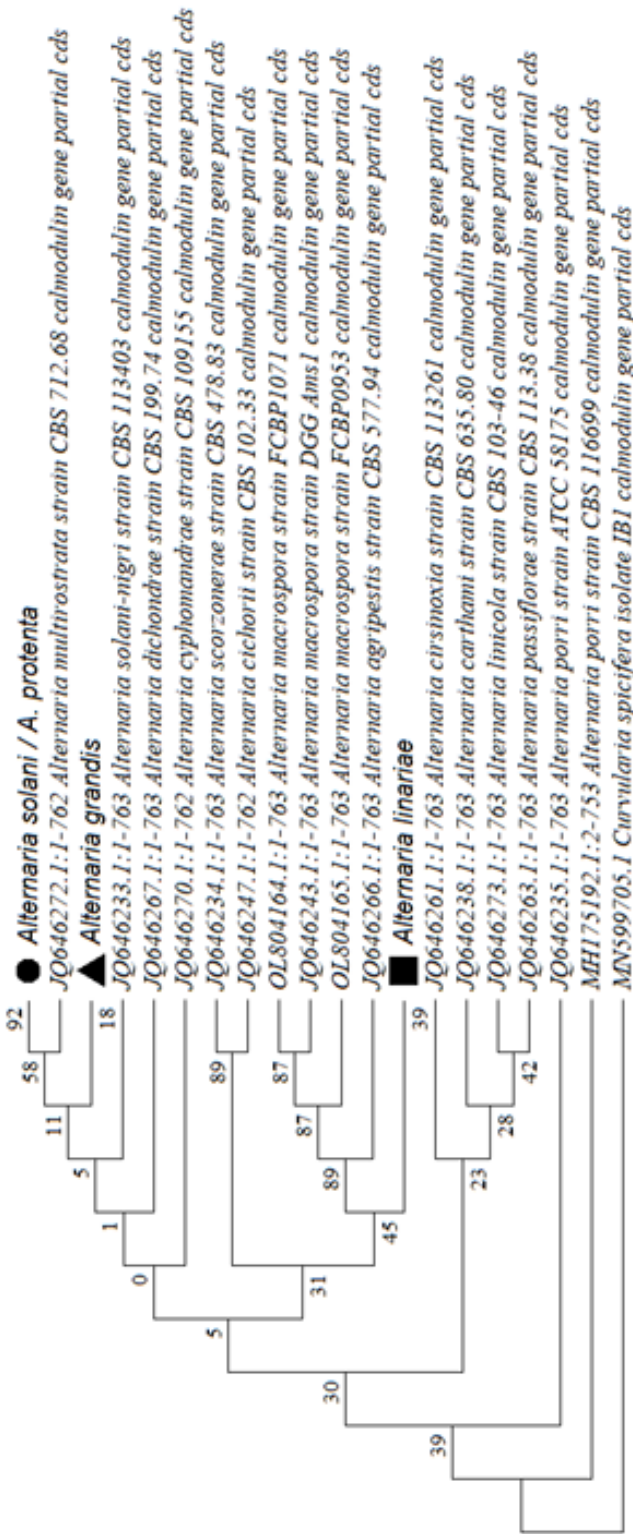


Рис. 2 Філогенетичне дерево, побудоване на основі послідовності гена *calmodulin*.

Як зовнішню групу використано послідовність *Curvularia spicifera* (MN599705.1). Символами позначено згорнуті кластери: ● — 34 послідовності (16 *A. solani* та 18 *A. protenta*); ▲ — 21 послідовність (20 *A. grandis* та 1 *A. danida*); ■ — 29 послідовностей (21 *A. linariae*, 5 *A. tomatophila*, 1 *A. subcylindrica*, 1 *A. cretica*, дані види є таксономічними синонімами та 1 *A. solani*).

Бутстреп-аналіз було проведено з 1000 повторними вибірками, і значення вище 50% показано на відповідних гілках

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the *calmodulin* gene sequence.

*Curvularia spicifera* (MN599705.1) was used as an outgroup. Symbols denote collapsed clusters: ● — 34 sequences (16 *A. solani* and 18 *A. protenta*); ▲ — 21 sequences (20 *A. grandis* and 1 *A. danida*); ■ — 29 sequences (21 *A. linariae*, 5 *A. tomatophila*, 1 *A. subcylindrica*, 1 *A. cretica*, these species are taxonomic synonyms, and 1 *A. solani*). Numbers at the nodes represent bootstrap support values (1000 replicates).

Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates, and values above 50% are shown on the corresponding branches.









За результатами порівняльного аналізу локусів-кандидатів найбільш перспективними маркерами обрано гени *calmodulin* та *histone H3*, які продемонстрували найнижчі показники гомології з іншими представниками роду. На основі видоспецифічних ділянок у генах *calmodulin* та *histone H3* розроблено дві системи РЧ-ПЛР (праймери та TaqMan-зонди) для ампліфікації коротких ампліконів (110 п.н. для *calmodulin* та 155 п.н. для *histone H3*). Верифікація специфічності *in silico* показала, що обидва набори праймерів і зонди є специфічними до *A. macrospora* і не утворюють неспецифічних продуктів з ДНК рослини-господаря. Розроблені TaqMan-системи на основі генів є потенційним інструментом для виявлення патогену та посилення фітосанітарного контролю. Наступним етапом дослідження є експериментальна верифікація розроблених TaqMan-систем *in vitro* з використанням ДНК ізольованих штамів *A. macrospora*, а також ДНК близькоспоріднених видів роду *Alternaria* для підтвердження відсутності перехресної ампліфікації. Підтвердження специфічності та чутливості розроблених систем у тестуванні *in vitro* дозволить використовувати їх для аналізу листя, насіння бавовнику з метою діагностики альтернаріозної плямистості, також системи можуть бути використані для молекулярного моніторингу ґрунтів і рослинних решток як потенційних резервуарів інфекції та у наукових дослідженнях, спрямованих на вивчення поширення та екології *A. macrospora*.

## BIOINFORMATIC ANALYSIS OF *ALTERNARIA MACROSPORA* FOR MOLECULAR DETECTION

<sup>2</sup>H. I. Slishchuk <https://orcid.org/0000-0003-4245-8557>

<sup>1</sup>H. I. Drozdov <https://orcid.org/0009-0004-1922-1433>

<sup>1</sup>N. Yu. Vasylieva <https://orcid.org/0000-0001-8856-3497>

<sup>2</sup>N. E. Volkova <https://orcid.org/0000-0002-9333-4872>

<sup>1</sup>Odesa I. I. Mechnikov National University,  
2 Zmiiienka Vsevoloda St, Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: drozdov.hlib@stud.onu.edu.ua

<sup>2</sup>Institute of Climate-Smart Agriculture of the National Academy  
of Agrarian Sciences of Ukraine,

24 Maiatska Rd, Khlibodarske village, Odesa district, Odesa region, 67667, Ukraine

### Summary

**Aim.** To develop specific primers and TaqMan probes for the detection of the phytopathogenic fungus *Alternaria macrospora* using real-time polymerase chain reaction. **Methods.** Bioinformatics analysis was conducted on *A. macrospora* sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genetic database. Homolog searches were performed using the BLAST tool. To evaluate the resolution of genetic loci, phylogenetic analysis was carried out using raxmlGUI software. Multiple sequence alignment was performed using the ClustalW algorithm. Primers and TaqMan probes were designed using the Primer3 tool, and their specificity was verified *in silico* using Primer-BLAST. **Results.** A total of 82 nucleotide sequences of *A. macrospora* were analyzed, including 48 sequences of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region, as well as sequences of the 18S rRNA and 28S rRNA (Ribosomal RNA), RPB2 (RNA



*Polymerase II Second Largest Subunit*), *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase), *TEF1* (Translation Elongation Factor 1-alpha), histone H3, calmodulin, actin and allergen alt a 1 genetic loci. It was established that the traditional ITS molecular marker has low resolution for the identification of *A. macrospora* and does not allow for the differentiation of this species from other members of the *Alternaria* genus. The calmodulin and histone H3 genes were found to contain species-specific regions that can be utilized for *A. macrospora* differentiation. Based on these gene sequences, primer pairs (forward and reverse) and internal TaqMan probes were designed, showing high specificity to *A. macrospora* during *in silico* testing. **Conclusions.** The calmodulin and histone H3 genes proved to be promising molecular markers for the specific detection of *A. macrospora*. The developed TaqMan system enables the specific *in silico* identification of *A. macrospora*.

*Keywords:* *Alternaria macrospora*, bioinformatics, *Gossypium*, molecular detection, real-time PCR.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. 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, no 2. P. 43–53.
2. Chaudhari R., Parmar G., Parmar S., Talpada M., Detroja A. Field evaluation of fungicides for management of *Alternaria* leaf blight in cotton. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*. 2024. Vol. SP-8, no 6. P. 105–109.
3. Raut L., Hamde V. Screening of antifungal potential of rhizospheric isolates against *Alternaria* leaf blight disease of Bt-cotton *in vitro*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016. Vol. 5, no 8. P. 769–784.
4. Rotem J. Overwintering of *Alternaria macrospora* in cotton debris. *Phytoparasitica*. 1990. Vol. 18, no 2. P. 143–152.
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.
6. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). GenBank database. U.S. National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Accessed March 01, 2026).
7. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215, no 3. P. 403–410.
8. Sela I., Ashkenazy H., Katoh K., et al. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – V. 43. – P. W7–W14.
9. Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – V. 30(4). – P. 772–780.
10. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30(9). – P. 1312–1313.



11. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // *Nucleic Acids Research*. – 2024. – V. 52(W1). – P. W78–W82.
12. 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, no 15. Article e115.
13. 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. Article 134.
14. Woudenberg J., Groenewald J., Binder M., Crous P. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*. 2013. Vol. 75. P. 171–212.
15. Woudenberg J., Truter M., Groenewald J., Crous P. Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. *Studies in Mycology*. 2014. Vol. 79. P. 1–47.
16. Simmons E. *Alternaria* themes and variations (74-105). *Mycotaxon*. 1994. Vol. 50. P. 219–270.

#### REFERENCES

1. Vozhehova R, Borovyk V, Zaiets S, Serhieiev L, Kohut I. Ecological plasticity and sustainability of cotton in the Southern Steppe of Ukraine. *Sci. Horiz*. 2024;27(2):43–53.
2. Chaudhari R, Parmar G, Parmar S, Talpada M, Detroja A. Field evaluation of fungicides for management of *Alternaria* leaf blight in cotton. *Int. J. Adv. Biochem. Res*. 2024;SP-8(6):105–109.
3. Raut L, Hamde V. Screening of antifungal potential of rhizospheric isolates against *Alternaria* leaf blight disease of Bt-cotton in vitro. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*. 2016;5(8):769–784.
4. Rotem J. Overwintering of *Alternaria macrospora* in cotton debris. *Phytoparasitica*. 1990;18(2):143–152.
5. Luchi N, Ioos R, Santini A. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2020;104:2453–2468.
6. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). GenBank database. U.S. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
7. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990;215(3):403–410.
8. Sela I, Ashkenazy H, Katoh K, et al. GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:W7–W14.
9. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol*. 2013;30(4):772–780.
10. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312–1313.



11. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res.* 2024;52(W1):W78-W82.
12. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B, Remm M, Rozen S. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
13. 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;13:134.
14. Woudenberg J, Groenewald J, Binder M, Crous P. *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* 2013;75:171–212.
15. Woudenberg J, Truter M, Groenewald J, Crous P. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Stud. Mycol.* 2014;79:1–47.
16. Simmons E. *Alternaria* themes and variations (74-105). *Mycotaxon.* 1994; 50:219–270.

Стаття надійшла до редакції 26.03.2026  
Стаття затверджена до друку 04.05.2026  
Стаття опублікована 29.05.2026

