

FTAMP: 68.37.29

Ұ.А. АБЫЛАЕВА, А.А. САРДАР, А.К. ТУРСУНОВА, Ш.М. ТУРБЕКОВА,  
Г.Д. АБИШЕВА

Ж. Жиёмбаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институты,  
Алматы, Қазақстан  
e-mail: ablay.ula@mail.ru

## АЛМАТЫ ОБЛЫСЫ ЖАҒДАЙЫНДА *SOLANUM LYCOPERSICUM* (ҚЫЗАНАҚ) ОҚШАУЛАНҒАН ПАТОГЕНДІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫ ИЗОЛЯЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.15

### Түйін

*Solanum lycopersicum* (қызанақ) - бүкіл әлемде тұтынылатын ең маңызды көкөніс дақылы. Оның өндірісін шектейтін негізгі факторлардың бірі саңырауқұлақ аурулары. Қоршаған ортаның белгілі бір абиотикалық және биотикалық факторларының, атап айтқанда зиянды микроорганизмдердің негізінде пайда болатын аурулар кешенінің дамуы жеміс өнімділігінің төмендеуіне әкеледі және қызанақтың жоғары және тұрақты өнімділігін алуға теріс әсер етеді. Қорғаныс шараларының негізі - ол көбінесе ауру қоздырғыштарының түрлік құрамы мен биологиялық ерекшеліктерін білуге негізделеді. Осыған сүйене отырып, қызанақты фитопатогендерден қорғау шараларын ұйымдастырып, аурудың дамуын шектеуге ықпал ететін ғылыми негізделген әдістерді қамтуы керек.

Зерттеу жұмысының өзектілігі – Алматы облысы Қарасай ауданы жағдайында қызанақ дақылының «Ламадор» сортында кездесетін *Fusarium*, *Alternaria* және *Aspergillus* туыстығына жататын саңырауқұлақтар класикалық және молекулалық-генетикалық әдістер арқылы түрлік құрамға дейін анықталды.

Мақалада *S. lycopersicum* дақылының саңырауқұлақ ауру қоздырғыштары баяндалған. Дақылдың негізгі аурулары: көшеттердің залалдануы, фузариоздық солу, қоңыр дақ, сақтау кезіндегі жемістердің шіруі. Ауру белгілері бар қызанақ үлгілерінен бөлініп алынған патогендерге морфологиялық-культуралдық қасиеттері бойынша фитопатологиялық және молекулалық-генетикалық зерттеулер жүргізіліп, түрге дейін идентификация жасалынды. Дәстүрлі микологиялық әдістерді бірлесіп қолдану нәтижесінде қызанақ дақылынан алынған 4 изоляттың ішінде *Fusarium* туыстығының 2 түрі: *Fusarium equiseti* және *Fusarium oxysporum* изоляттары, *Alternaria* туыстығынан: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* туыстығынан: *Aspergillus flavus* анықталды.

**Кілтті сөздер:** ITS-аймақ, қызанақ, патоген, идентификация, праймер.

Қызанақ – әлемде ең көп тұтынатын көкөністердің бірі. Қызанақ өндіру қарқыны артуымен қатар өсірудің түрлі әдістері пайда болып, қазіргі уақытта әртүрлі экологиялық жағдайларда және үнемі жаңарып тұратын сорттар өсірілуде. Кең ауқымды эртартапандыру, өсімдік шаруашылығының күшеюі және әлемдік сауда жүйесі әсіресе жаңа аурулар пайда болған жерлерде фитосанитарлық жағдайды жақсартуға септігін тигізіп жатыр [1]. Қазіргі уақытта ауылшарушылығы дақылдарына 8,5 мыңға жуық ауру қоздырғыштары зиян келтіреді. Зиянды ағзалардың әсерінен жалпы өнім тапшылығы жыл сайын вегетациялық кезеңде орта есеппен 30-35% және дайын өнімді тасымалдау және сақтау кезеңінде 15-25% құрайды [2]. Қызанақ, бактериялар мен саңырауқұлақтардың дамуы үшін жақсы орта болып табылады, залалданған өнім ішінара немесе толық жарамсыз болады [3].

Біздің елімізде де ең көп таралған көкөніс дақылдарының бірі – қызанақ. Бұл оның жоғары өнімділігіне, пайдаланудың әртүрлілігіне, жоғары биологиялық құндылығына және өнімнің жоғары дәміне байланысты [4]. Елімізде қызанақ дақылы ашық және қорғалған танапта кеңінен өсіріледі. Соңғы жылдары қызанақ өнімділігінің төмендеуіне және жеміс сапасының нашарлауына саңырауқұлақ, вирустық және бактериялық ауру

қоздырғыштарының түрлерімен залалдануы әсер етті. Сонымен қатар климаттық жағдайлардың өзгеруі және түрлі зиянкестердің теріс әсері ықпал етіп отыр [5].

Қазіргі уақытта елімізде қызанақ өсірумен негізінен фермерлер мен жалға алушылар айналысады. Олардың көпшілігі фитосанитарлық нормалар мен талаптарды орындамайды, атап айтқанда, ауыспалы егісті сақтамайды, себу алдында тұқымдарды зарарсыздандырмайды. Мұның бәрі түрлі инфекциялардың жиналуына және аурулар, зиянкестер мен арамшөптердің кең таралуына ықпал етеді. Әсіресе, саңырауқұлақ аурулары айтарлықтай зиянды. Олардың ішінде ең көп таралған және зиянды түрлеріне фитофтороз, альтернариоз, фузариум және ботритиоз қоздырғыштары жатады. Бұл аурулар қызанақ жемістерінің сапасына айтарлықтай әсер етеді, оңай еритін көмірсулар, минералдар мөлшері азаяды, сонымен қатар адам денсаулығына зиянды органикалық қосылыстар жинақталады. Аталған ауру түрлерімен залалданған алқапта 50-60% өнімді жоғалтады [6]. Барлық патогенді аурулардың өзіндік ерекшеліктері бар. Ашық танап жағдайында бір агроэкологиялық аймақтағы патогендердің кешенді құрамы және зияндылық деңгейі әртүрлі болады. Осы жағдайда, қорғаныс шараларын жүргізу барысында қоздырғыштардың түрлік құрамы мен биологиялық ерекшеліктерін, олардың дамуына әсер ететін қоршаған орта факторларын білу маңызды. Сондықтан, қорғаныс шараларын уақытылы және тиімді жүргізу және халықаралық стандарттардың талаптарына сәйкес сапалы жоғары өнім алу үшін, аурулардың диагностикалық белгілерін, олардың қоздырғыштарының биоэкологиялық ерекшеліктерін жақсы меңгеру керек. Зерттеу жұмысының мақсаты Алматы облысы, Қарасай ауданында өсірілген қызанақ ауруларының қоздырғыштарының түрлік құрамын, олардың морфологиялық-культуралдық және молекулалық-генетикалық сипаттамаларын анықтау болды.

### **Зерттеу материалдары мен әдістері**

Зерттеу жұмыстары зертханада және танаптық жағдайда жүргізілді. Танаптық кіші мөлдекті тәжірибе жұмыстары: ашық танапта көшетті көшіріп отырғызу, өсімдіктің өсуін бақылау, өнімді жинау – көкөніс шаруашылығы және бақша шаруашылығы туралы тәжірибелік іс әдістемесі (1992) және көкөніс дақылдарын мемлекеттік сорттық сынау әдістемесі (1985) бойынша жүргізілді.

Қызанақтың ауруларына есеп – оның тамырларын визуалды қарау және өнімдерін жинау барысында жүргізілді. Дақылдың саңырауқұлақ ауруларының түрлік құрамын зерттеу үшін бүкіл вегетациялық кезеңде залалдану белгілері бар үлгілер жиналды (жапырақтары, жемістері, жеміс түйіні, тамыры).

Зерттеу жұмыстары қызанақтың «Ламадор» сортына жүргізілді. Жұмыс барысында ауру қоздырғыштары және олардың түрлік құрамы анықталды. Аталмыш өсімдіктегі кездесетін фитопатогенді саңырауқұлақтардың түрлік құрамын анықтау үшін, стандартты әдістер қолданылды. Зертханалық жағдайда зақымдалған өсімдік үлгілеріне микробиологиялық талдау жүргізілді [7]. Қызанақтың сау және ауру тіндерінің (жапырақтары, сабақтары, жемістері) шекарасында ауру қоздырғыштарымен залалданған мүшелерінен ұсақ фрагменттері ағынды суда, содан кейін тазартылған суда мұқият жуылып, спиртте зарарсыздандырылды (бактериялардан зардап шеккен мүшелерден басқа), сүзгі қағазына (стерильді суға малынған) және картоптың декстрозды агарлы ортасына қойылды. Өскен колонияларға М.К. Хохряковтың әдістемесі бойынша 7-тәулікте микроскопиялық препарат жасалынды. Қызанақтың саңырауқұлақ ауруларының қоздырғыштарын өсіру үшін ең қолайлы қоректік орта болып: картопты агар (КА), картопты-декстрозды агар (КДА) және Чапек агары (ЧА) іріктелініп алынды.

Патогендердің конидиальды споралары биологиялық әдіспен (микроскоптың көмегімен) анықталды. Спора болмаған жағдайда зерттеу материалы жасанды қоректік ортаға егілді. Түр құрамын анықтау үшін отандық және шетелдік авторлардың анықтамалық құралдары пайдаланылды.

Молекулалық-генетикалық зерттеу бөлімі келесі кезеңдерден тұрады: жалпы ДНҚ-ны оқшаулау, ПТР бойынша амплификация, ПТР өнімін секвенирлеу, секвенирлеуден алынған нәтижелерді деректер қорындағы мәліметтермен салыстырмалы талдау (сәйкестендіру).

Оқшауланған саңырауқұлақтың таза культураларынан, ДНҚ-ны бөліп алу «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Ресей) реагентімен, өндірушілердің арнайы хаттамасы бойынша орындалды.

Оқшауланып алынған ДНҚ үлгілерін және амплификацияланған ПТР өнімдерін тексеру үшін агарозды геледегі электрофорез әдісі пайдаланылды. Оқшауланған ДНҚ-ны сапалы анықтау үшін үлгілер электрофорез үшін көлденең камерада этидий бромиді қосылған 1% агарозды геледе бөлінді. Эталон ретінде Generuler (Thermo Scientific, US) маркері қолданылды. Электрофорез нәтижелері геледі құжаттау жүйесі трансиллюминатор Quantum-ST 5 (Vilbert Lourmat) арқылы талданды.

ПТР талдау ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G '3) және кері ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC '3) праймерлері арқылы жүзеге асырылды [8]. ПТР реакциясына қажетті реагенттер қоспасында (25 мкл) 4 мкл HF буфері (Thermo scientific), 0,5 мкл дезоксирибонуклеозид трифосфаты (dntp) қоспасы, праймерлердің әрқайсысының 0,3 мкл қоспасы, ДНҚ полимераза ферменті Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific) 0,2 мкл және 2 мкл ДНҚ болды нысаны болды. Реакция SimpliAmp Thermo Cycler (Life Technologies Corporation) термоциклерінде келесі режимдері бойынша жүргізілді: бастапқы денатурация - 98°C, температурада 30 сек, 98°C – 10 сек, 60°- 20 сек және 72°C-30 соңғы ұзарту 72°C температурада 5 мин.

ПТР фрагменттерін бөгде қоспалардан тазарту «ExoSap IT™» реактивтерінің жиынтығын қолдану арқылы жүргізілді.

ITS аймақтың нуклеотидтер тізбегінің тікелей реттілігін анықтау Сенгер бойынша (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) секвенаторында жүзеге асырылды.

Секвенирлеуден алынған деректерді биоақпараттық талдау және гомологиялық нуклеотидтер тізбегін іздеу GenBank және Bold Systems ашық генетикалық деректер базасында жүргізілді [9-10].

### Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Аурудың зияндылығын төмендету үшін ауру қоздырғыштарының түрлік құрамын және биологиялық ерекшеліктерін білу қажет. Қызанақ дақылынан оқшауланған саңырауқұлақ қоздырғыштарының түрлік құрамы анықталды. Оларға саңырауқұлақтар түрінен *Alternaria*, *Fusarium*, аскомицет түрінен *Aspergillus* анықталды. Фитопатогендердің морфологиялық белгілерін анықтау картопты-декстрозды қоректік ортада жүргізілді.

*Fusarium* – колониялар үлпілдек, ақ түсті. Микроскоптық препарат нәтижесінде макро және микроконидиялар анықталды. Микроконидиялар 1-2 жасушалы, дөңгелек, сопақша, кейде сәл қисық. Макроконидиялардың пішіні – орақ, эллипс тәрізді. Шетіндегі жасуша сәл тарылған, доғал тәріздес. Макроконидиялардың әдетте 3-5 жасушалы. Өлшемдері: 20-60x4-7 мкм [11].

*Alternaria* – егін жинауға дейін және одан кейін ауылшаруашылық өнімдеріне, соның ішінде дәнді дақылдарға, жемістер мен көкөністерге зиян келтіретін саңырауқұлақтардың барлық жерде кездесетін бір түрі. *Alternaria* бірнеше түрі өсімдік патогенезінде маңызды рөл атқаратын фитотоксиндер және адамдар мен жануарларға зиянды болуы мүмкін микотоксиндер болып саналатын қайталама метаболиттерді шығаруға қабілетті [12].

*Aspergillus* – шамамен 300-ден астам анықталған зең түрлерінен тұратын саңырауқұлақтар тұқымдасы. *Aspergillus* әртүрлі қоршаған орталарда кездеседі, себебі ол ылғалдылығы жоғары ортада жақсы көбейеді. Саңырауқұлақ денесі мицелийден тұрады. Мицелий жұқа, түтікшелі, бозғылт түсті, кең тармақталған, жұқа қабырғалы гифалардан тұрады. Кейбір гифалар субстратта тармақталады, ал кейбіреулері қоректік ортадағы затты сіңіру үшін субстратқа еніп орналасады. Конидиялар ұсақ сфера тәрізді, бір жасушалы, бір

ядролы немесе көп ядролы, қара, қоңыр немесе сары-жасыл түсті болып келеді және ауа ағымдары арқылы таралады. Олар қолайлы субстратта өсіп, ұрық түтігін шығарады. Ұрық түтігі септумға айналады, тармақталып, мицелий түзеді [13].

*Fusarium spp.*



колонияның қоректік ортада өсуі



микроскоптық құрылымы

*Alternaria spp.*



колонияның қоректік ортада өсуі



микроскоптық құрылымы

*Aspergillus spp.*



колонияның қоректік ортада өсуі



микроскоптық құрылымы

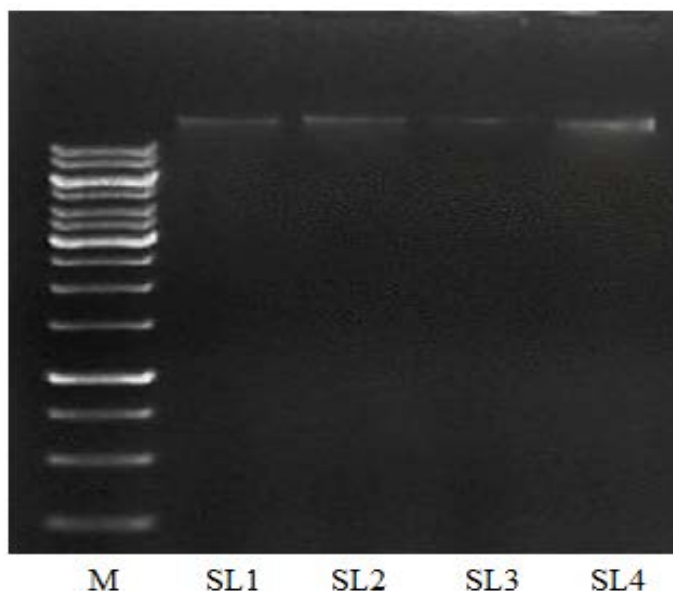
Сурет 1 – Картопты-декстрозды агар қоректік ортасында өсірілген саңырауқұлақтардың морфологиялық-микроскоптық ерекшеліктері

1-суретте көрсетілгендей, анықтамалық нұсқаулықтар бойынша анықтау кейде дәл бола бермейтіні белгілі. Осыған байланысты, бөлініп алынған фитопатогенді саңырауқұлақтарды түрге дейін анықтау үшін молекулалық-генетикалық әдістермен растау жүргізілді. Секвенирлеу әдісі арқылы қызанақ дақылы ауруларының қоздырғыштары *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* штамдарының нуклеотидтік тізбегі анықталды.

Келесі зерттеу жұмысы іріктеліп алынған саңырауқұлақтарды молекулалық-генетикалық идентификациялау бойынша жүргізілді. Кез-келген молекулалық-генетикалық зерттеулердің бастапқы кезеңі ДНҚ-ны бөліп алу болып табылады. Осыған

орай, зерттеу жұмысында мицелийлі саңырауқұлақтардан геномдық ДНҚ-ны оқшаулау бойынша жұмыс жасалынды.

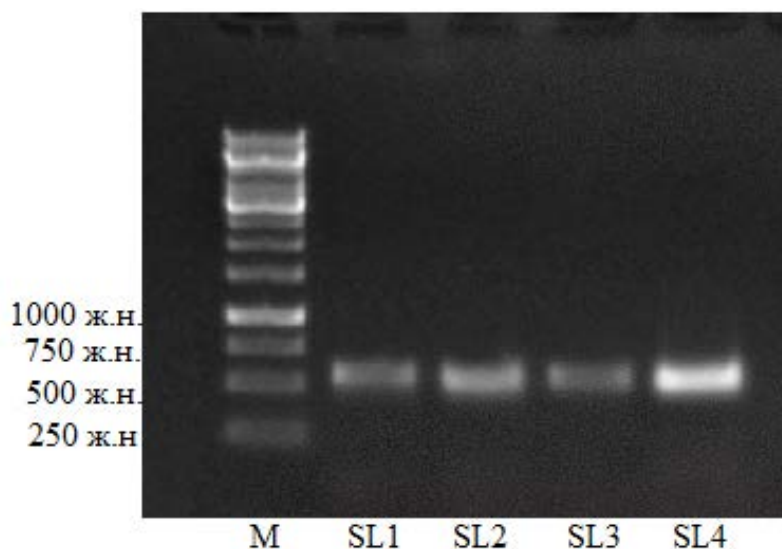
Бірінші кезеңде, ДНҚ бөліп алу үшін, «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Ресей) коммерциялық өндірушілер ұсынған хаттама бойынша жүргізілді. Зерттеулер нәтижесінде бұл хаттама мицелий саңырауқұлақтарынан ДНҚ-ны бөліп алу кезінде тиімді екендігі анықталды. Микромицеттердің ДНҚ оқшаулау нәтижелерін анықтау 1% агарозды геледегі электрофорез әдісі көмегімен жүргізілді. Осы коммерциялық жинақты пайдалану арқылы геномдық ДНҚ бөлініп алынды (Сурет 2).



Сурет 2 - Саңырауқұлақтардың ДНҚ электрофореграммасы

2-суретте көрсетілгендей, геномдық ДНҚ экстракциясының нәтижесі барлық үлгілерде оң болды.

ПТР жүргізу үшін геннің таксономиялық маңызды аймақтары транскрипцияланған ішкі аралық (ITS) факторы ITS 1/ITS4 әмбебап праймерлерінің көмегімен жүзеге асырылды. ПТР өнімдерін тексеру мақсатында 1% агарозды геледегі электрофореграмма жасалынды. Тізбектің күтілетін мөлшері-570 ж.н. (Сурет 3).



Сурет 3 - Изоляттардың ITS1/ITS4 праймерлерімен амплификациясы

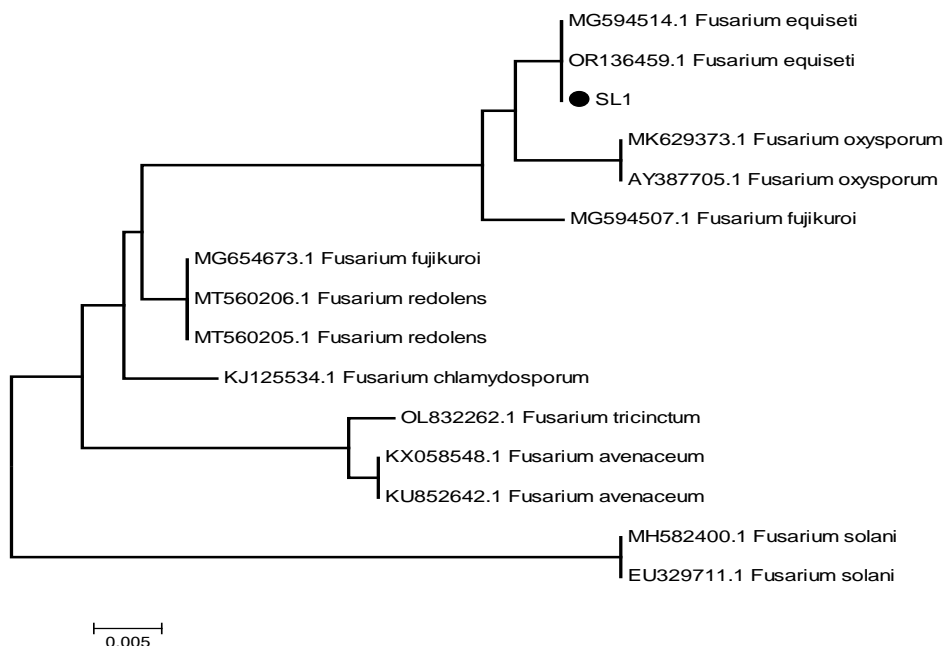
3-суретте көрсетілгендей, ITS1/ITS4 праймерлерімен амплификациялау нәтижесінде шамамен 570 ж.н. тұратын ДНҚ тізбектері алынды, бұл учаскенің өлшеміне сәйкес келеді.

ITS аймағының нуклеотидтер тізбегінің тікелей реттілігі (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) генетикалық анализаторында өндіруші компанияның ұсыныстарына сәйкес жүргізілді.

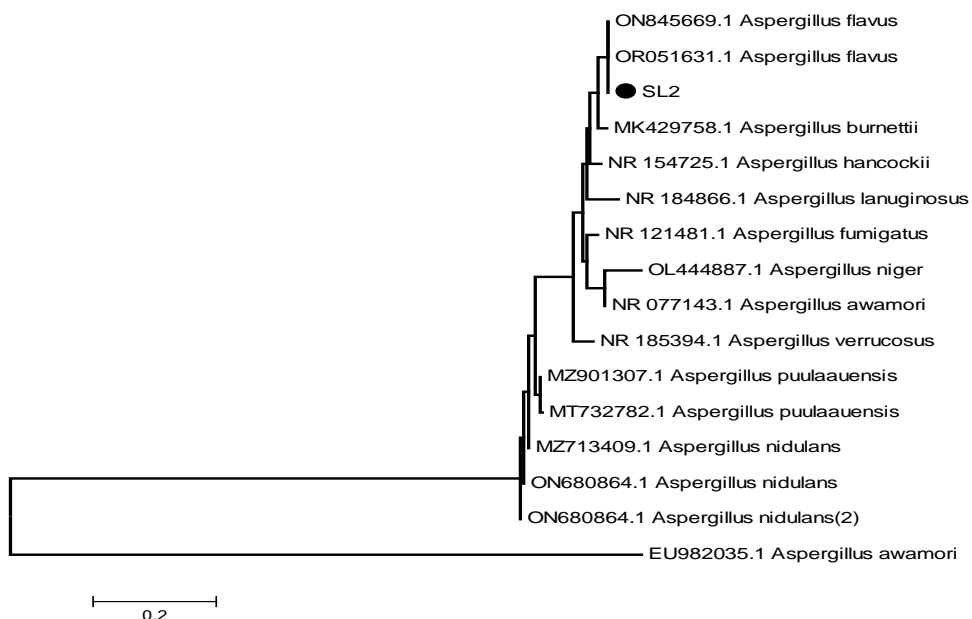
Алынған нуклеотидтер тізбегін GENE BANK дерекқорындағы қол жетімді тізбектермен салыстыру BLASTN бағдарламасы арқылы жүзеге асырылды.

Зерттелетін штамдарда ITS аймағын филогенетикалық талдау нәтижелері генетикалық қашықтықты есептеудің кластерлік әдісін Neighbor-Joining пайдалана отырып, MEGA7 бағдарламасында салынған филогенетикалық ағаштар түрінде ұсынылған.

**А**



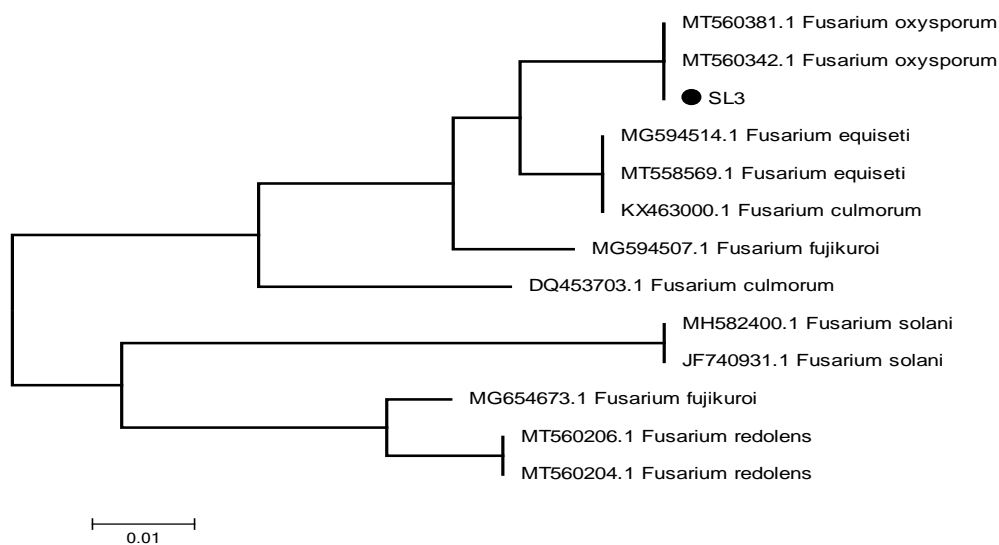
**Б**



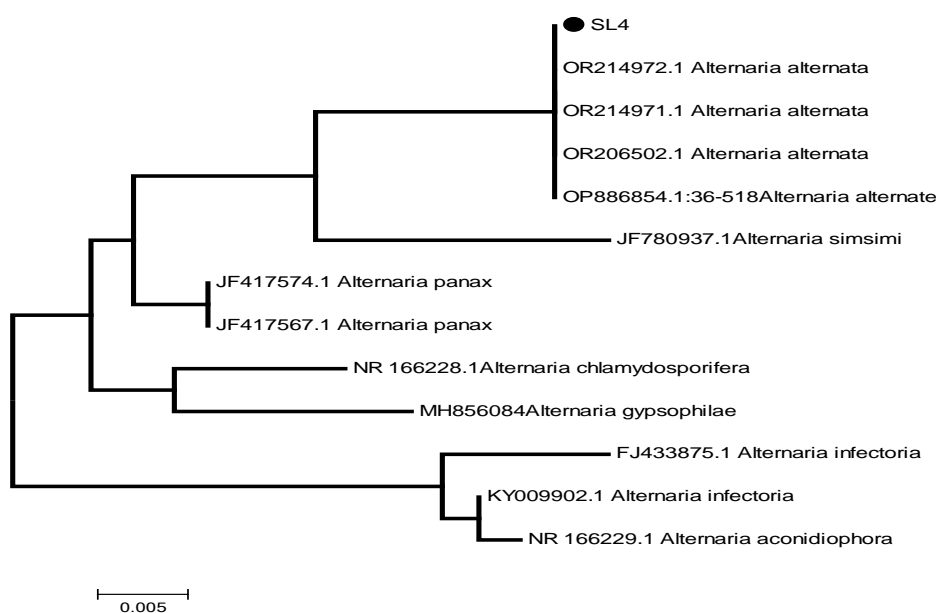
Сурет 4 - SL1 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 9 типтік штамдар тізбектері енгізілген (А). SL2 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 12 типтік штамдар тізбектері енгізілген (Б)

Жоғарыдағы суретте (сурет 4) көрсетілгендей, SL1 штамы *Fusarium equiseti* мен ал SL2 штамы *Aspergillus flavus* шатмдарының нуклеотидтік тізбектерімен бірегей тармақта байланысқанын көреміз.

А



Б



Сурет 5 - SL3 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 6 типтік штамдар тізбектері енгізілген (А). SL4 штамына ITS учаскесі негізінде салынған филогенетикалық ағаш. Талдауға GenBank-те NCBI сақталған 13 типтік штамдар тізбектері енгізілген (Б)

5-суретте SL3 штамына ең жақын *Fusarium oxysporum* екенін, сонымен бірге, SL4 штамының *Alternaria alternata* бір тармақта байланысқанын көруге болады.

Сонымен, филогенетикалық ағаш Neighbor-Joining (NJ) әдісін қолдану арқылы ITS учаскесі негізінде құрастырылды. Молекулалық-генетикалық талдау нәтижесі бойынша

штамдар төмендегідей идентификацияланды: SL1- *Fusarium equiseti*, SL2- *Aspergillus flavus*, SL3- *Fusarium oxysporum*, SL4- *Alternaria alternata*.

### Қорытынды

Қызанақ (*Solanum lycopersicum*) – әлемдегі ең көп қолданысқа ие көкөніс болып табылады. Ылғалдылығы Құрамында судың мөлшері 94,5%, яғни жоғары болғандықтан, бұл көкөніс түрі түрлі ауру қоздырғыштарымен залалданады. Көптеген патогенді саңырауқұлақтар, қызанақ жемістерінің өнімділігі мен сапасына теріс әсер ететін болғандықтан, негізгі зерттеу нысаны болып табылады.

Қызанақ дақылдарының патогенді саңырауқұлақтар себебінен пайда болатын ауруларымен күрес шараларын жүргізу үшін, ең алдымен патогенді дұрыс анықтау маңызды. Осыған орай, Алматы облысы, Қарасай ауданында өсірілген «Ламадор» сортына жататын, ауру белгілері бар қызанақ дақылдарына дәстүрлі микологиялық және молекулалық-генетикалық әдістерді ұштастыра отырып зерттеу жүргіздік.

Жүргізілген зерттеулерге сәйкес, ауру белгілері бар дақылдардан саңырауқұлақтардың таза культуралары бөлініп алынып, дәстүрлі микологиялық әдістер арқылы морфологиялық-культуралдық қасиеттері сипатталды. Алайда, кейбір аурулардың сыртқы белгілері ұқсас болғандықтан, патогенді нақты анықтау қиынға соғады. Сол себепті, қазіргі уақытта молекулалық-генетикалық әдістерді пайдалану арқылы ауру қоздырғыштарды түрге дейін идентификациялау тиімді саналады. Зерттеу қорытындысы бойынша, қызанақ дақылдарының изоляттарының ішінен екі *Fusarium* түрі: *Fusarium equiseti* және *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* түрлері идентификацияланды.

### Қаржыландыру

Зерттеулер ҚР АШМ 2021-2023 жж. 267 «Ғылымның және ғылыми зерттеулердің қолжетімділігін дамыту» бюджеттік бағдарламасының 101 «Ғылыми зерттеулердің және ісшаралар субъектілерін бағдарламалық нысаналы қаржыландыру» кіші бағдарламасы бойынша «Жеміс, көкөніс, дәнді, малазықтық, бұршақ дақылдары мен өсімдіктер карантинін қорғаудың кешенді жүйелерін әзірлеу және жетілдіру» МҚЖ жұмыс жоспарына сәйкес жүргізілді. Авторлар осы зерттеулерді жүргізуге көмектескені үшін әріптестеріне алғыс білдіреді.

### Әдебиеттер:

1 Dominique Blanchard. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control*. Second Edition, 2013. 415 P.

([https://books.google.kz/books?id=\\_Sc6\\_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs\\_ViewAPI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.kz/books?id=_Sc6_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false))

2 О. А. Паластрова. *Болезни томата и обоснование мер борьбы с ними в условиях Курганской области*: диссертация / - Курган : КГСХА, 2006. - 153 с. (<https://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti/viewer>)

3 О. А. Паластрова, А. С. Степановских. *Защита томата от болезней в Зауралье* : моногр. / - Куртамыш : Куртамышская типография, 2007. - 136 с. - ISBN 978-5-98271-079-6 : 99.84 р

4 Исмаилова Э. Т. и др. *Морфологические и молекулярно-генетические характеристики возбудителей основных грибных болезней томатов, произрастающих в Алматинской области* // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2017. – С. 75 ([chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wp-content/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya\\_2017-1-70.pdf](chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wp-content/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya_2017-1-70.pdf))

5 Смоляная Н.М. и др. *Видовой состав основных возбудителей болезней томата*. Сборник материалов Всероссийской (национальной) научно-практической конференции [Электронный ресурс]: материалы Всеросс. (национальной) науч.-практич. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения С. И. Леонтьева 2019 / – 488 с. (<https://agro.omgau.ru/nauka/sborniki-nauchnykh>)



statej/item/138-materialy-vserossijskoj-natsionalnoj-nauchno-prakticheskoy-konferentsii-posvyashchennoj-100-letiyu-so-dnya-rozhdeniya-s-i-leonteva.html)

6 Джаймурзина А.А., Карбозова Р.Д., Есжанов Т.К., Умираниева Ж.З. Система защиты томата от болезней на Юго-Востоке Казахстана // Земледелие, агрохимия, кормопроизводство, агроэкология, лесное хозяйство // Известия. – 2012. – № 3. – С. 21-24 (doi: 10.37884/1-2022/08)

7 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во Москва, 1976. – 307 с (https://studizba.com/files/show/djvu/2947-1-a-i-netrusov-m-a-egorov--praktikum-po.html)

8 White T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor // PCR Protocol a Guide to Methods and Applications.- Academic Press.- 1990.- N.Y.- P.315-322 (https://www.researchgate.net/publication/223397588\_White\_T\_J\_T\_D\_Bruns\_S\_B\_Lee\_and\_J\_W\_Taylor\_Amplification\_and\_direct\_sequencing\_of\_fungal\_ribosomal\_RNA\_Genes\_for\_phylogenetics)

9 National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс].-URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov (дата обращения 30.11.22)

10 Barcode of life data system [Электронный ресурс].-URL: https://www.boldsystems.org(дата обращения 30.11.22)

11 *Fusarium solani*. Электронный ресурс: (https://www.pesticidy.ru/pathogens/Fusarium\_solani)

12 A. Patriarca, G. Vaamonde, V.F. Pinto. *Alternaria*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2017, Pages 14 (doi:10.1007/978-1-4939-6707-0\_2)

13 *Aspergillus: Habitat, reproduction and importance*. Электронный ресурс: (https://www.biologydiscussion.com/fungi/aspergillus-habitat-reproduction-and-importance-ascomycotina/24000)

У.А. АБЫЛАЕВА, А.А. САРДАР, А.К. ТУРСУНОВА, Ш.М. ТУРБЕКОВА,  
Г.Д. АБИШЕВА

Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина  
растений им. Ж. Жиенбаева, Алматы, Казахстан  
e-mail: ablay.ula@mail.ru

## ИЗОЛИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ *SOLANUM LYCOPERSICUM* (ТОМАТ) В УСЛОВИЯХ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ

### Аннотация

*Solanum lycopersicum* (томат) - самая важная овощная культура, потребляемая во всем мире. Одним из основных факторов, ограничивающих его производство, являются грибковые заболевания. Развитие комплекса болезней, возникающих на основе определенных абиотических и биотических факторов окружающей среды, в частности вредных микроорганизмов, приводит к снижению урожайности плодов и отрицательно сказывается на получении высокой и стабильной урожайности томата. В основе защитных мероприятий лежит знание видового состава и биологических особенностей возбудителей болезней. Исходя из этого, следует организовать мероприятия по защите томатов от фитопатогенов и включить научно обоснованные методы, способствующие ограничению развития болезни.

Актуальность исследовательской работы заключается в том, что в условиях Карасайского района Алматинской области грибы, относящиеся к родам *Fusarium*, *Alternaria* и *Aspergillus*, встречающиеся у сорта томата «Ламадор», были идентифицированы до видового состава с помощью классических и молекулярно – генетических методов.

В статье описаны возбудители грибковых заболеваний культуры *S. lycopersicum*. Основные болезни культуры: заражение рассады, фузариозное увядание, бурая пятнистость, гниль плодов при хранении. Были проведены фитопатологические и молекулярно-генетические исследования по морфологическим и культуральным свойствам патогенов, выделенных из образцов томата с признаками болезни, и проведена идентификация до вида. В результате совместного применения традиционных микологических методов из 4 изолятов, полученных из культуры томата, были идентифицированы 2 родственных вида *Fusarium* : *Fusarium equiseti* и *Fusarium oxysporum*, из

родственных видов *Alternaria* : *Alternaria alternata*, так же из родственных видов *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*.

**Ключевые слова:** ITS-участок, томат, патоген, идентификация, праймер.

IRSTI: 68.37.29

U.A. ABYLAEVA, A.A. SARDAR, A.K. TURSUNOVA, Sh.M. TURBEKOVA,  
G.D ABISHEVA

Kazakh Research Institute of plant protection and quarantine named after Zh. Zhiembayev,  
Almaty, Kazakhstan  
e-mail: ablay.ula@mail.ru

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATO) IN THE CONDITIONS OF THE ALMATY REGION

**doi:10.53729/MV-AS.2023.03.15**

### Abstract

*Solanum lycopersicum* (tomato) is the most important vegetable crop consumed worldwide. One of the main factors limiting its production are fungal diseases. The development of a complex of diseases arising on the basis of certain abiotic and biotic environmental factors, in particular harmful microorganisms, leads to a decrease in fruit yield and has a negative effect on obtaining a high and stable yield of tomatoes. The basis of protective measures is the knowledge of the species composition and biological characteristics of pathogens. Based on this, it is necessary to organize measures to protect tomatoes from phytopathogens and include scientifically based methods that contribute to limiting the development of the disease.

The relevance of the research work lies in the fact that in the conditions of the Karasai district of the Almaty region, fungi related to the *Fusarium*, *Alternaria* and *Aspergillus* found in the tomato variety "Lamador" were identified to the species composition using classical and molecular genetic methods.

The article describes the pathogens of fungal diseases of *S. lycopersicum* culture. The main diseases of the culture: infection of seedlings, fusarium wilting, brown spotting, rot of fruits during storage. Phytopathological and molecular genetic studies were carried out on the morphological and cultural properties of pathogens isolated from tomato samples with signs of the disease, and identification to the species was carried out. As a result of the joint application of traditional mycological methods, 2 related species of *Fusarium* were identified from 4 isolates obtained from tomato culture: *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum*, from related species of *Alternaria*: *Alternaria alternata*, as well as from related species of *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*.

**Keywords:** ITS-region, tomato, pathogen, identification, primer.

Tomatoes are one of the most consumed vegetables in the world. Along with the increase in the rate of tomato production, various methods of cultivation appear, and currently varieties are grown in different environmental conditions and constantly updated. Large – scale diversification, increased crop production and the World Trade System contribute to improving phytosanitary conditions, especially in areas where new diseases have appeared [1]. Currently, about 8.5 thousand pathogens cause damage to agricultural crops. The total product deficit due to harmful organisms is on average 30-35% annually during the growing season and 15-25% during the transportation and storage period of finished products [2]. Tomatoes are a good substrate for the development of bacteria and fungi, the infested product becomes partially or completely unsuitable [3].

One of the most common vegetable crops in our country is tomatoes. This is due to its high yield, variety of use, high biological value and high taste of the product [4]. In the country, the tomato crop is widely grown in open and protected soil. In recent years, a decrease in tomato yield

and a deterioration in fruit quality has been affected by infestation with fungal, viral and bacterial pathogens. At the same time, changes in climatic conditions and the negative impact of various pests contribute [5].

Currently, the cultivation of tomatoes in the country is mainly carried out by farmers and tenants. Most of them do not comply with phytosanitary norms and requirements, in particular, do not observe crop rotation, do not disinfect seeds before sowing. All this contributes to the accumulation of various infections and the widespread spread of diseases, pests and weeds. Fungal diseases are especially harmful. Among them, the most common and harmful species include pathogens of late blight, alternariosis, fusarium and botrytis. These diseases significantly affect the quality of tomato fruits, the amount of easily soluble carbohydrates, minerals is reduced, as well as the accumulation of organic compounds harmful to human health. In the field infected with these types of diseases, 50-60% are productive [6]. All pathogenic diseases have their own characteristics. In the conditions of open soil, the complex composition of pathogens in one agroecological zone and the level of harmfulness will be different. In this case, in the process of carrying out protective measures, it is important to know the species composition and biological features of pathogens, environmental factors affecting their development. Therefore, for timely and effective implementation of protective measures and a high-quality tomato harvest in accordance with the requirements of international standards, it is necessary to better master the diagnostic signs of diseases, the bioecological features of their pathogens. The purpose of the research work was to determine the species composition of pathogens of tomato diseases grown in Karasay district, Almaty region, their morphological, cultural and molecular genetic characteristics.

### **Materials and methods of research**

Research work was carried out in laboratory and field conditions. Field small-scale experimental work was carried out on: planting seedlings in open ground, plant growth control, harvesting - the methodology of experimental work on vegetable growing and horticulture (1992) and the methodology of State varietal testing of vegetable crops (1985).

The calculation of diseases of tomatoes was carried out in the process of visual inspection of the roots and harvesting of products [13]. To study the species composition of fungal diseases of tomatoes, samples with signs of infestation were collected during the entire growing season (leaves, fruits, fruit nodules, roots).

Research work was carried out on the tomato variety "Lamador". In the course of the work, pathogens and their species composition were identified. Standard methods were used to determine the species composition of phytopathogenic fungi found in this plant. Microbiological analysis of affected plant samples was carried out in laboratory conditions [7]. To determine the species composition of phytopathogenic fungi found in tomato plants, standard methods were used. At the border of healthy and diseased tissues of tomatoes (leaves, stems, fruits), small fragments of organs affected by pathogens were thoroughly washed in running water, then purified water, sterilized in alcohol (except for organs affected by bacteria), placed on filter paper (soaked in sterile water) and in a dextrose agaric medium of potatoes. The grown colonies were microscopy for 7 days according to the methodology of M. K. Khokhryakov. To determine the most suitable nutrient medium for growing pathogens of fungal diseases of tomatoes, the growth medium of colonies of phytopathogens was studied: potato (PA) and potato-dextrose (PDA) Agars, Chapeco Agar (Cha).

In the absence of spores, the research material was grafted onto an artificial nutrient medium. Reference tools of domestic and foreign authors were used to determine the species composition.

The Department of molecular genetic research consists of the following stages: isolation of common DNA, amplification by PCR, comparative analysis (identification) of the PCR product (sequencing), data obtained from sequencing with data from the database.

From pure fungal cultures, DNA extraction was carried out with a reagent "«Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Russia), according to a special protocol of manufacturers.

The method of electrophoresis in agarose gel was used to test isolated DNA samples and amplified PCR products. For qualitative determination of isolated DNA, the samples were separated in a 1% agarose gel with the addition of ethidium bromide in a horizontal chamber for electrophoresis. The generuler (Thermo Scientific, US) marker was used as a benchmark. The results of electrophoresis were analyzed using the gel documentation system transilluminator Quantum-ST 5 (Vilbert Lourmat).

PCR analysis was carried out using its 1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G '3) and reverse its 4 (5'tcc TCC GCT TAT TGA TAT GC' 3) primers [8]. In the mixture of reagents required for the PCR reaction (25 µL), there were 4 µL of HF buffer (Thermo scientific), 0.5 µL of deoxyribonucleoside triphosphate (dntp) mixture, 0.3 µL of each of the primers mixture, DNA polymerase enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific) 0.2 µL and 2 µL of DNA. The reaction was carried out in the Thermocycle SimpliAmp Thermo Cycler (Life Technologies Corporation) according to the following mode: initial denaturation - 98°C, temperature 30 sec, 98°C – 10 sec, 60°- 20 sec and final extension 72°C-30 for 5 min at 72°C.

Purification of PCR fragments from foreign impurities was carried out using a set of reagents "ExoSap IT™".

Determination of the direct sequence of nucleotide sequences of the its region was carried out in the Senger sequencer (Applied Biosystems , Genetic Analyzer 3500).

Bioinformatics analysis of data from sequencing and the search for homologous nucleotide sequences was carried out in the open genetic database GenBank and Bold Systems [9-10].

## Results and discussion

To reduce the harmfulness of the disease, it is necessary to know the species composition and biological characteristics of pathogens. The species composition of fungal pathogens isolated from tomato plants has been established. They were identified by *Alternaria* from the type of immature fungi, *Fusarium*, *Aspergillus* from the type of ascomycetes. The determination of morphological signs of phytopathogens was carried out on a potato – dextrose nutrient medium.

*Fusarium*-colonies are fluffy, white in color. Macro and microconidia were detected under the microscope. Microconidia are 1-2-cell, rounded, Oval, sometimes slightly curved. The Shape of macronidias is sickle, elliptical. The cell at the edge is slightly narrowed, obtuse. Macroconidias are usually 3-5-cell. Dimensions: 20-60x4-7 microns [11].

*Alternaria* is a ubiquitous type of fungus that causes damage to agricultural products, including cereals, fruits, and vegetables, before and after harvesting. Several species of *Alternaria* are capable of producing secondary metabolites, which are considered phytotoxins that play an important role in plant pathogenesis and mycotoxins that can be harmful to humans and animals [12].

*Aspergillus* is a genus of fungi consisting of more than 300 identified mold species. *Aspergillus* is found in different environments because it reproduces well in environments with high humidity. The body of the fungus consists of mycelium. The mycelium consists of thin, tubular, pale colored, widely branched, thin-walled hyphae. Some hyphae branch out in the substrate, and some settle by penetrating the substrate to absorb the substance in the culture medium. Conidia are small spherical, unicellular, single-core or multi-core, black, brown or yellow-green in color. Conidia spread through air currents. They grow in a suitable substrate and produce a germ tube. The germ tube turns into a septum, branches and forms a mycelium [13].

*Fusarium spp.*

colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

*Alternaria spp.*

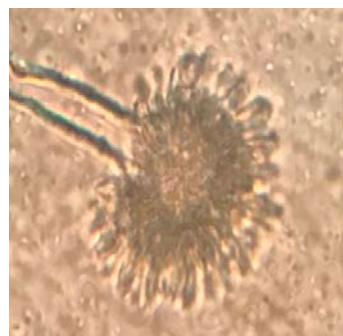
colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

*Aspergillus spp.*

colony growth in a nutrient medium



microscopic structure

Figure 1-Morphological and microscopic features of mushrooms grown in a potato dextrose Agar nutrient medium

It is known that identification by determinants is sometimes not accurate, as shown in Figure 1. In this regard, confirmation was carried out by molecular genetic methods for the identification of isolated phytopathogenic fungi to the species. Using the sequencing method, the nucleotide sequence of *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* strains, the causative agents of tomato crop diseases, was determined.

The following research work was carried out on molecular genetic identification of selected fungi. The initial stage of any molecular genetic research is DNA sequencing. In this regard, in the research work, work was carried out to isolate genomic DNA from mycelial fungi.

At the first stage, work was carried out on the protocol proposed by commercial manufacturers of «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Russia) for DNA extraction. As a result of research, it was found that this protocol is effective in extracting DNA from mycelium fungi. Determination of the results of DNA isolation of micromycetes was carried out using the method of electrophoresis in 1% agarose gel. Using this commercial kit, genomic DNA was isolated (figure 2).

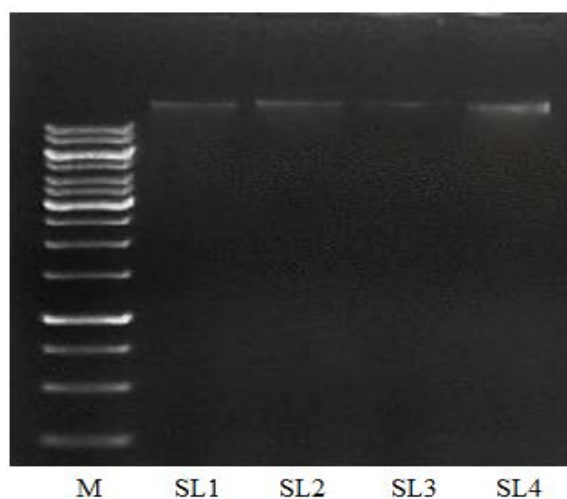


Figure 2 - DNA electrophoregram of fungi

The result of genomic DNA extraction was positive in all samples, as shown in Figure 2.

For PCR, taxonomically important regions of the gene were transcribed using the iits internal transcribed spacer (ITS) factor ITS 1/ITS4 universal primers. In order to test PCR products, an electrophoregram of 1% agarose gel was performed. The expected size of the amplicon is 570 b.p. (Figure 3).

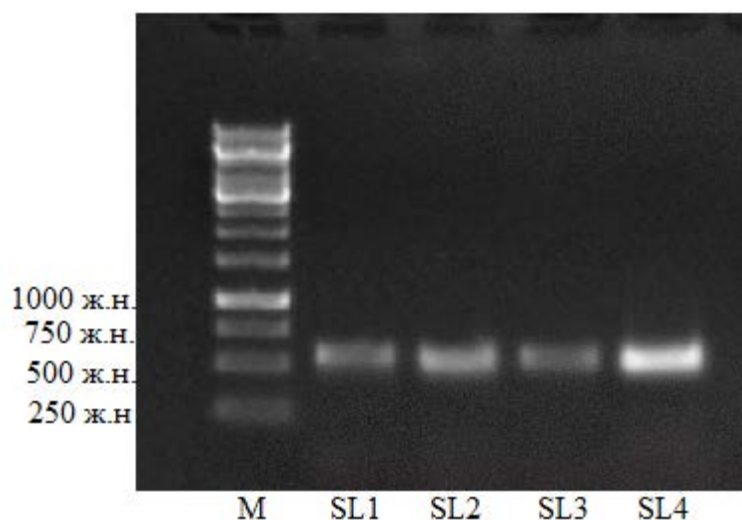


Figure 3 - amplification of isolates with ITS1/ITS4 primers

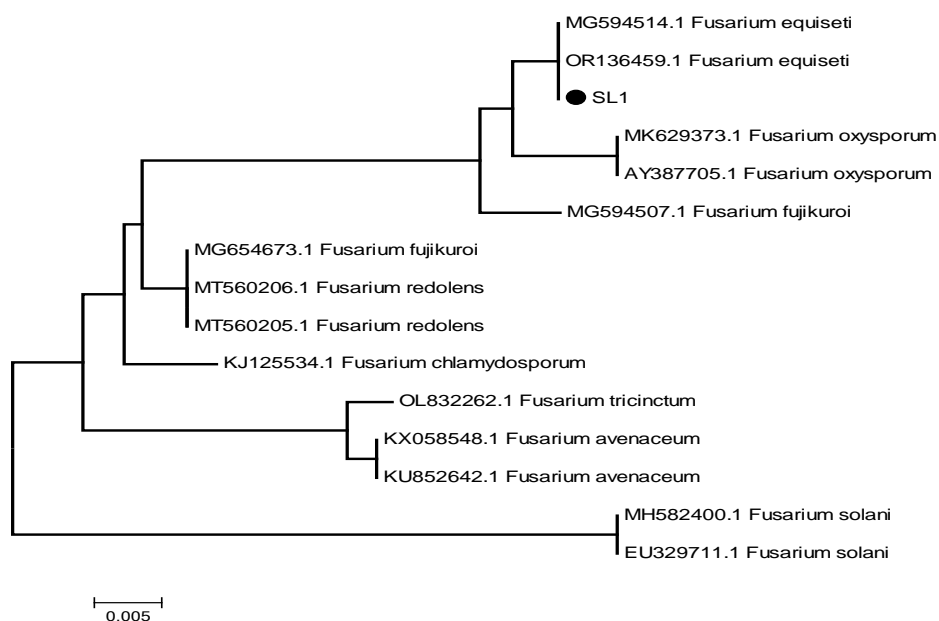
Amplification with ITS1/ITS4 primers, as shown in Figure 2, resulted in amplicons of about 570 b.p., which corresponds to the size of the site.

Direct sequencing of nucleotide sequences of the ITS region (Applied Biosystems, Genetic Analyzer 3500) was carried out in accordance with the recommendations of the manufacturing company.

Comparison of the obtained nucleotide sequences with the available sequences in the GENE BANK database was carried out using the BLASTN program.

The results of phylogenetic analysis of the ITS region in the studied strains are presented in the form of phylogenetic trees built in the MEGA7 program using Neighbor-Joining, a cluster method for calculating genetic distances.

A



B

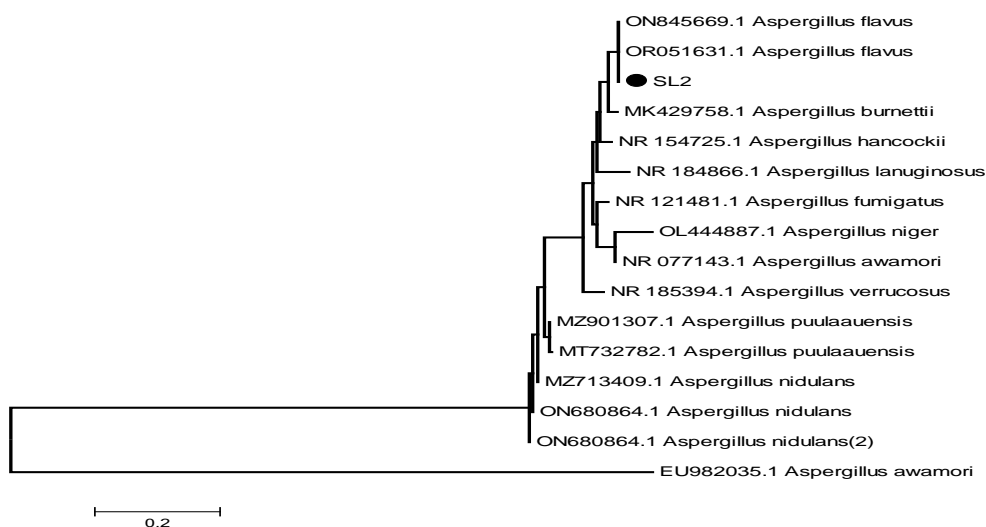
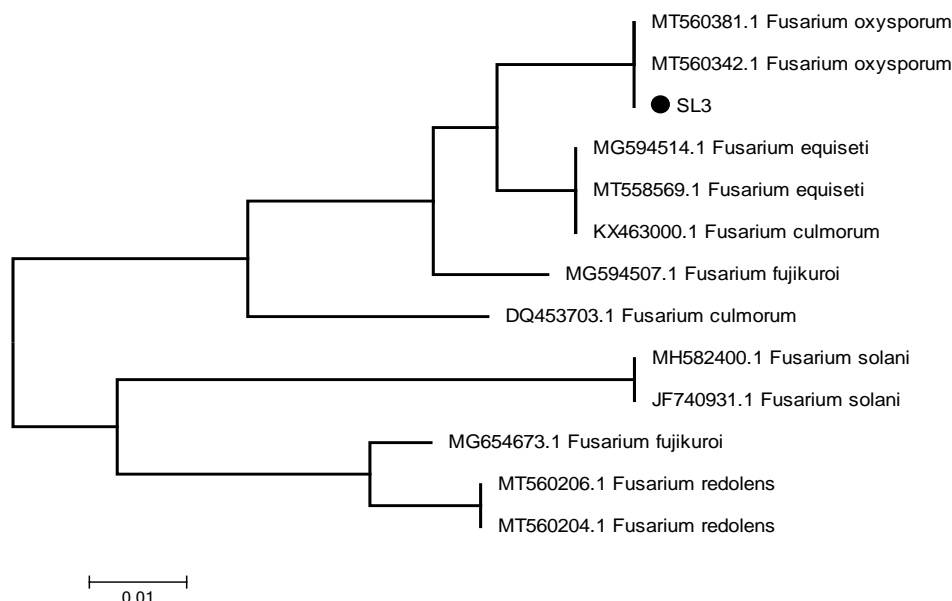


Figure 4-a phylogenetic tree built on the basis of the ITS region for the SL1 strain. The analysis included 9 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (a). A phylogenetic tree built on the SL2 strain based on ITS site. The analysis included 12 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (B)

As shown in the figure above (Figure 4), we see that the strain SL1 is linked in a unique branch to the nucleotide chains of the *Fusarium equiseti* and the strain SL2 to the shatms of *Aspergillus flavus*

A



B

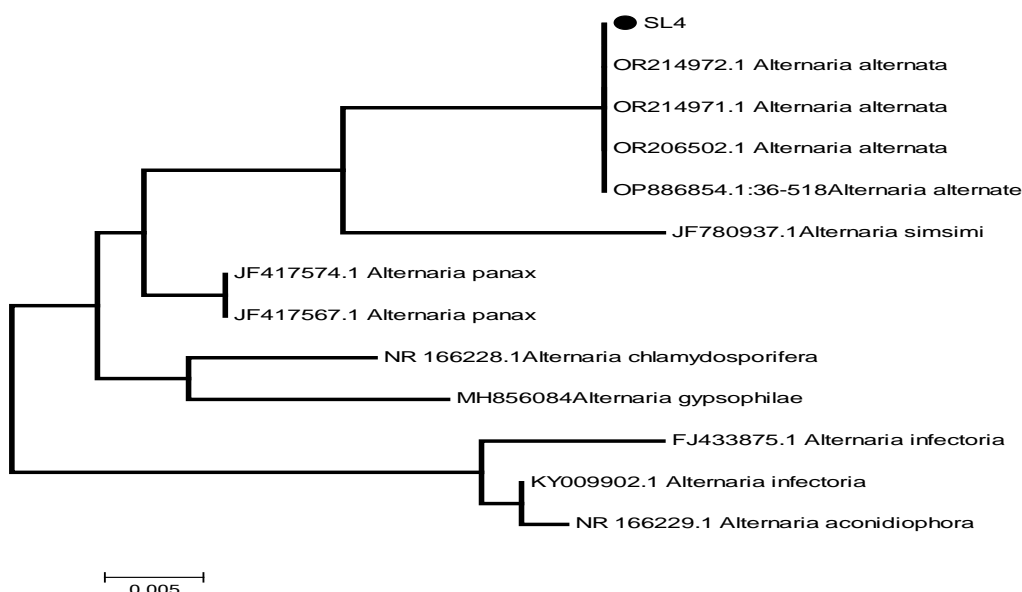


Figure 5-a phylogenetic tree built on the basis of the ITS site for the SL3 strain. The analysis included 6 Typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (A). A phylogenetic tree built on the SL4 strain based on ITS region. The analysis included 13 typical strain sequences with NCBI stored in GenBank (B)

So, the phylogenetic tree was compiled on the basis of the ITS site using the Neighbor-Joining (NJ) method. According to the results of molecular genetic analysis, strains were identified as follows: SL1-*Fusarium equiseti*, SL2 - *Aspergillus flavus*, SL3 - *Fusarium oxysporum*, SL4 - *Alternaria alternata*.

**Conclusion**

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is the most widely used vegetable in the world. With a moisture content of 94.5%, that is, higher, this type of vegetable is infected with various pathogens. Many pathogenic fungi are the main object of study, as they are the main source of diseases that negatively affect the yield and quality of tomato fruits.



To carry out measures to combat diseases of tomato crops caused by pathogenic fungi, first of all, the correct identification of the pathogen is the most important event. In this regard, in our research work, we conducted a study of tomato crops with signs of the disease, combining traditional mycological and molecular genetic methods.

Tomato crops were carried out on tomato crops of the "Lamador" variety, grown in the Karasai District of the Almaty region. According to the conducted research, pure fungal cultures were isolated from tomato crops with signs of the disease and morphological and cultural properties of isolated isolates were described using traditional mycological methods. However, due to the fact that some diseases have similar external symptoms, it is difficult to accurately identify the pathogen. For this reason, it is currently considered effective to identify pathogens before the species through the use of molecular genetic methods. As a result of the study, two *Fusarium* species were identified among the isolates of the tomato crop: *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*.

### Funding

The research was carried out in accordance with the work plan of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan 2021-2023. 267 under subprogram 101 "Program-targeted financing of subjects of scientific research and activities" of the budget program "Development of accessibility of science and scientific research" PTF "Development and improvement of integrated protection systems for fruit, vegetable, grain, fodder, legumes and plant quarantine". The authors thank their colleagues for their help in conducting these studies.

### References:

- 1 Dominique Blanchard. *Tomato Diseases Identification, Biology and Control*. Second Edition, 2013. – 415 P. ([https://books.google.kz/books?id=\\_Sc6\\_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs\\_ViewAPI&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.kz/books?id=_Sc6_OjjXUC&printsec=frontcover&hl=ru&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false))
- 2 O. A. Palastrova. *Bolezni tomata i obosnovanie mer bor'by s nimi v usloviyah Kurganskoy oblasti*: dissertacija / - Kurgan : KGSHA, 2006. - 153 s. (<https://cyberleninka.ru/article/n/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti/viewer>)
- 3 O. A. Palastrova, A. S. Stepanovskih. *Zashhita tomata ot boleznej v Zaural'e* : monogr. / - Kurtamysh : Kurtamyshskaja tipografija, 2007. - 136 s. - ISBN 978-5-98271-079-6:99.8 (<http://www.dslib.net/fito-patologia/bolezni-tomata-i-obosnovanie-mer-borby-s-nimi-v-usloviyah-kurganskoy-oblasti.html>)
- 4 Ismailova Je. T. i dr. Morfologicheskie i molekulyarno-geneticheskie karakteristiki vzbuditelej osnovnyh gribnyh boleznej tomatov, proizrastajushih v Almatinskoy oblasti //Vestnik KazNU, serija biologicheskaja. –2017.S.75 ([chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wpcontent/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya\\_2017-1-70.pdf](chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://elibrary.kaznu.kz/wpcontent/uploads/2021/06/vestnik-kaznu.-seriya-biologicheskaya_2017-1-70.pdf))
- 5 Smoljanaja N.M. i dr. *Vidovoj sostav osnovnyh vzbuditelej boleznej tomata*. Sbornik materialov Vserossijskoj (nacional'noj) nauchno-prakticheskoy konferencii [Jelektronnyj resurs] : materialy Vseross. (nacional'noj) nauch.-praktich. konf., posvjashh. 100-letiju so dnja rozhdenija S. I. Leont'eva 2019 / – 488 s (<https://agro.omgau.ru/nauka/sborniki-nauchnykh-statej/item/138-materialy-vserossijskoj-natsionalnoj-nauchno-prakticheskoy-konferentsii-posvyashchennoj-100-letiyu-so-dnya-rozhdeniya-s-i-leonteva.html>)
- 6 Dzhajmurzina A.A., Karbozova R.D., Eszhanov T.K., Umiraliyeva Zh.Z. *Sistema zashhity tomata ot boleznej na Jugo-Vostoke Kazahstana* // Zemledelie, agrohimiya, kormoproizvodstvo, agrojekologija, lesnoe hozjajstvo // Izvestija. – 2012. – № 3. – S. 21-24 (doi: 10.37884/1-2022/08)
- 7 Egorov N.S. *Praktikum po mikrobiologii*. – M.: Izd-vo Moskva, 1976. – 307 s (<https://studizba.com/files/show/djvu/2947-1-a-i-netrusov-m-a-egorov--praktikum-po.html>)
- 8 White T.J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics* / T.J. White, T. Bruns, S.B. Lee, J.W. Taylor // PCR Protocol a Guide to Methods and Applications.- Academic Press.- 1990.- N.Y.- P.315-322 ([https://www.researchgate.net/publication/223397588\\_White\\_T\\_J\\_T\\_D\\_Bruns\\_S\\_B\\_Lee\\_and\\_J\\_W\\_Taylor\\_Amplification\\_and\\_direct\\_sequencing\\_of\\_fungal\\_ribosomal\\_RNA\\_Genes\\_for\\_phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics))

9 National Center for Biotechnology Information [Elektronnyj resurs].-URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (data obrashhenija 30.11.22)

10 Barcode of life data system [Elektronnyj resurs].-URL: <https://www.boldsystems.org>(data obrashhenija 30.11.22)

11 *Fusarium\_solani*. Elektronnyj resurs: ([https://www.pesticidy.ru/pathogens/Fusarium\\_solani](https://www.pesticidy.ru/pathogens/Fusarium_solani))

12 A. Patriarca, G. Vaamonde, V.F. Pinto. *Alternaria*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2017, Pages 14 (doi:10.1007/978-1-4939-6707-0\_2)

13 *Aspergillus: Habitat, reproduction and importance*. Elektronnyj resurs: (<https://www.biologydiscussion.com/fungi/aspergillus-habitat-reproduction-and-importance-ascomycotina/24000>)