

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 75 – 81

E. T. Ismailova, A. K. Cadanov, O. N. Shemshura,
A. I. Seitbattalova, C. T. Daugalieva, R. J. Kaptagai.

RSE «Institute Microbiology and Virology», SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: elya7506@mail.ru

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR AND
GENETIC CHARACTERISTICS OF CAUSATIVE AGENTS
OF THE MAIN FUNGAL DISEASES OF TOMATOES GROWING
IN ALMATY REGION**

Abstract. Results of phytosanitary monitoring of landings of tomatoes in Almaty region on a prevalence by diseases of a fungal etiology are presented in article. It is established that the most harmful and widespread disease is late blight. Spread of this disease has made 60%, and development of 45%. Indexes of display of such diseases as fusarial wilt and *Alternaria spot* were ranging from 5 to 10%, and development of a disease from 3 to 30% respectively. Minimum fireplace display was the causative agent of gray mold (*Botrytis*) – 3% with the degree of damage of 1.5%.

The microbiological analysis of the struck samples of tomatoes is carried out, causative agents of diseases *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* are allocated and their morphologic-microscopic characteristic is given. The PCR methods of the analysis have confirmed specific accessory of the allocated causative agents of diseases of tomatoes of a fungal etiology.

Keywords: tomatoes, fungal diseases, morphological cultural signs, universal primers, PCR analysis

УДК 632.93

Э. Т. Исмаилова, А. К. Саданов, О. Н. Шемшура,
А. И. Сейтбатталова, С. Т. Даугалиева, Р. Ж. Каптагай

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСНОВНЫХ
ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ТОМАТОВ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ
В АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

Аннотация. Представлены результаты фитосанитарного мониторинга посадок томатов в Алматинской области на пораженность болезнями грибной этиологии. Установлено, что наиболее вредоносным и широко распространенным заболеванием является фитофтороз. Распространение данной болезни составило 60%, а развитие 45%. Индексы проявления таких болезней, как фузариоз и альтернариоз были в пределах от 5 до 10%, а развитие болезни от 3% до 30% соответственно. Минимальное очажное проявление было у возбудителя серой гнили – *Botrytis* – 3% со степенью поражения – 1,5%.

Проведен микробиологический анализ пораженных образцов томатов, выделены возбудители болезней *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* и дана их морфолого-микроскопическая характеристика. Методами ПЦР анализа была подтверждена видовая принадлежность выделенных возбудителей болезней томатов грибной этиологии.

Ключевые слова: томаты, грибные болезни, морфолого-культуральные признаки, универсальные праймеры, ПЦР анализ.

Одной из самой распространенной овощной культурой в Республике является томат. Это объясняется его высокой урожайностью, многообразием использования, высокой биологической ценностью и высокими вкусовыми качествами плодов [1-3]. В настоящее время в Республике возделыванием их в основном занимаются фермерские хозяйства и арендаторы. Многие из них из-за слабого уровня подготовки повсеместно нарушают фитосанитарные нормы и требования: не соблюдают севооборот, не обеззараживают семена перед посевом. Все это способствует накоплению инфекций и широкому распространению болезней, вредителей и сорняков. Среди многочисленных болезней томата значительной вредоносностью обладают грибные болезни. Наиболее распространенными и вредоносными из них являются возбудители фитофтороза, альтернариоза, фузариоза и ботритиоза. Развитие этих болезней существенно влияет на качество выращенных плодов, в них снижается содержание легкорастворимых углеводов, минеральных веществ, а также происходит накопление нежелательных органических соединений, некоторые из них являются вредными для здоровья человека. Потери урожая томатов вследствие их поражения могут достигать 50–60 % [3, 4].

Как известно течение многих инфекционных болезней имеет свои особенности. Состав патогенных комплексов, уровень вреда, причиняемого томатам в условиях открытого грунта, неодинаковы даже в пределах одного агроэкологического района. Успех защитных мероприятий в значительной степени зависит от знания видового состава и биологических особенностей возбудителей болезней, факторов внешней среды, оказывающих влияние на их развитие [5].

В связи с этим следует хорошо усвоить диагностические признаки болезней, биоэкологические особенности их возбудителей, что позволит своевременно и эффективно проводить защитные мероприятия, получать высокие урожаи томата отличного качества согласно требованиям действующих международных стандартов.

Целью исследований явилось выявление видового состава возбудителей болезней томата, произрастающих в условиях Алматинской области, их морфолого-микроскопическая и молекулярно-генетическая характеристика.

Материалы и методы исследования. Выявление болезней томатов, степень их развития осуществляли путем систематических учетов, проводимых на стационарных участках и в процессе маршрутных обследований. Обследованием были охвачены посадки томатов, произрастающих в Енбекшиказахском районе Алматинской области (КХ «Айдарбаева» и «Болек») на общей площади 16,2 га. Возделываемые сорта томатов – «Новичок», «Буденовка». В процессе мониторинга произведен отбор образцов томатов и сои с признаками заболеваний по методу Чумакова [6].

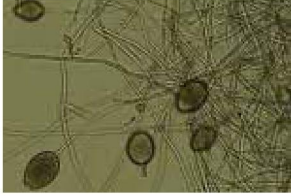
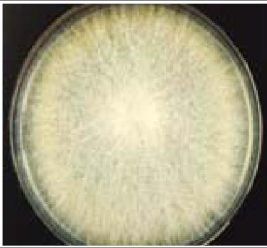
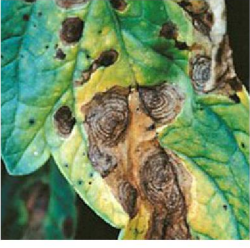
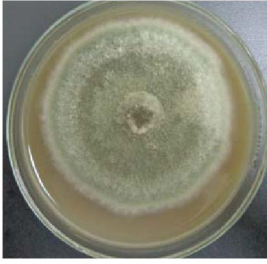
Далее, в лабораторных условиях, проведен микробиологический анализ пораженных растительных образцов, общеизвестными в микробиологии методами [7].

Культуры возбудителей болезней идентифицировали по их морфолого-микроскопическим признакам с использованием определителя [8]. Для подтверждения видовой принадлежности фитопатогенов проведен ПЦР анализ с видеоспецифичными праймерами (*ITS-region – ITS1-ITS4*). Определение нуклеотидной последовательности фитопатогенов проводили методом секвенирования с применением BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, США [9]. Полученные нуклеотидные последовательности *ITS*-региона ДНК грибов были сравнены с данными базы Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), с помощью программы *BLAST*. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MEGA6.

Результаты исследований. В ходе проведенного фитосанитарного мониторинга в хозяйствах Алматинской области установлено, что томаты поражаются в основном фитофторозом, альтернариозом, фузариозом и серой гнилью. Установлено, что наиболее вредоносным и чаще всего встречающимся заболеванием является фитофтороз. Распространение данной болезни составило 60%, а развитие 45%. Индексы проявления таких болезней, как фузариоз и альтернариоз были в пределах от 5 до 10%, а развитие болезни от 3 до 30% соответственно. Минимальное очажное проявление было у возбудителя серой гнили – *Botrytis* – 3% со степенью поражения – 1,5.

Выделенные из пораженных растений томатов возбудители грибных заболеваний, были идентифицированы по макро- и микро-морфологическим признакам и отнесены к видам: *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* (таблица).

Морфолого-микроскопические особенности основных возбудителей болезней томатов

Признаки поражения		Рост колоний на среде	Микроскопическое строение (увеличение x400)
на плодах	на листьях		
			
<i>Phytophthora infestans:</i>			
			
<i>Fusarium oxysporum</i>			
			
<i>Alternaria alternata</i>			
			
<i>Botrytis cinerea</i>			

Признаки поражения томатов фитофторозом: нижняя сторона листьев пожелтевшая и высохшая, на плодах твердые пятна различной формы и расцветки: бурые, зеленые, расплывчатые.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий гриба на среде КГА белый, паутинистый, спорангии лимонovidной формы, которые формируются на специализированных ветвях – спорангиеносцах и содержат зооспоры с двумя жгутиками, данный возбудитель идентифицирован как *Phytophthora infestans*.

Признаки поражения томатов альтернариозом: на листьях и стеблях обнаруживаются сухие, округлые, с ярко выраженной зональностью пятна размером от нескольких миллиметров до сантиметров. На плодах вдавленные округлые темно-бурые пятна с черным налетом – конидиальным спороношением возбудителя болезни.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: колонии гриба при росте на среде КГА шерстистые, цвет светло-оливковый чередуется с серым. Гифы гриба бесцветные,

конидиеносцы одиночные или в маленьких группах, простые или ветвистые, извилистые. Конидии обратно булабовидные с короткой шейкой, гладкие с апикальным носиком, с 3-8 поперечными и 1-2 продольными перегородками. Возбудитель идентифицирован как *Alternaria alternata*.

Признаки поражения томатов фузариозом: увядание стебля, выше корневой шейки, нижних листьев, которые при этом приобретают бледно-зеленый и желтый, цвет и образованием белого налета на плодах.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий гриба при росте на среде КГА пушистый белого или бело-розового цвета. Макроконидии – серповидные, эллиптически изогнутые, с 3-5 перегородками, суженные к основанию, с конусовидной верхней клеткой. Микроконидии многочисленные большей частью яйцевидные, эллиптические, слегка изогнутые. Возбудитель идентифицирован как *Fusarium solani*.

Признаки поражения томатов серой гнилью: на стеблях, листьях и плодах образуется серый налет – спороношение гриба, кроме налета, на плодах встречаются серовато-коричневые пятна.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий на поверхности питательной среды КГА густой распростертый, серо-коричневого цвета. Гифы серо-оливковые. Конидиеносцы с толстой оболочкой, внизу буроватой на верхней части почти бесцветные, прямостоячие, разветвленные, с веточками, которые в свою очередь тоже разветвлены, с короткими конечными ответвлениями, на которых расположены тесно скученные яйцевидные конидии. Конидии в массе дымчатые, встречаются бесцветные, иногда с ножками. Возбудитель идентифицирован как *Botrytis cinerea*.

Известно, что не всегда классические методы идентификации по определителям бывают точными. В связи с этим, проведено подтверждение видовой принадлежности выявленных фитопатогенных грибов молекулярно-генетическими методами.

Методом секвенирования была определена нуклеотидная последовательность возбудителя фитофтороза томатов штамма *Phytophthora infestans*:

AAACCCTTTACTTAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGAT
AGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT
ACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTCCG
GGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCTGACAAACAACTTGGCTTTCTTCCCTTCCG
TGTAGTCGGTGGAGGAGATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTGGTTTTCGGACCGACTGC
GAGTCCTTTTAAATGTACTAACTGTACTTCTCTTTGCTCCAAAAGTGGTGGCATTGCTGGTT
GTGGACGCTGCTATTGTAGCGAGTTGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAGAAA
TGCTCGATTCTGTGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGGTGATTTTCTCTGCT
GTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATGGCTCTTTAGCTTGGCATTGGAATCGGCTTTGCTGTTG
CGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGCCGAGGGTCGATCCATTTGGGAAATG

По филогенетическому дереву, представленному на рисунке 1, возбудитель фитофтороза томатов по степени гомологии на 100% соответствует виду *Phytophthora infestans* – это подтверждает проведенную ранее идентификацию, основанную на макро и микро-морфологическим признакам.

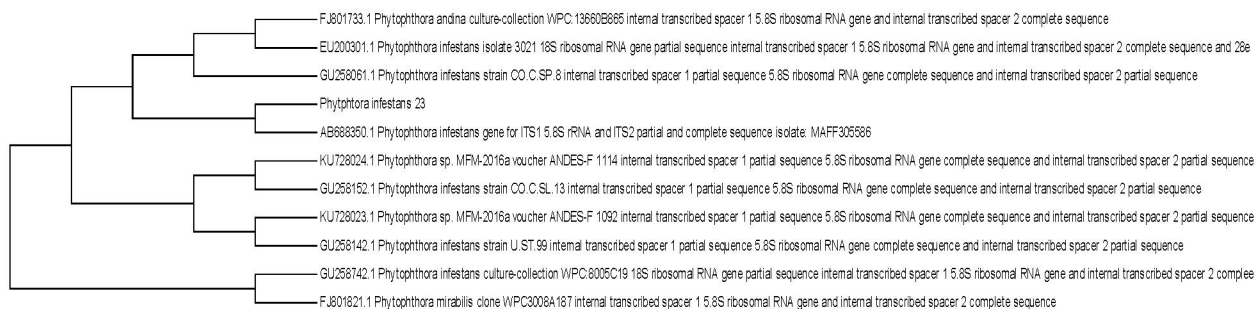


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево возбудителя фитофтороза томата *Phytophthora infestans*

Нуклеотидная последовательность возбудителя альтернариоза томатов штамма *Alternaria alternata*:

TGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGC
AAAGCTAGAGACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAAC
AGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGA
ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG
ATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTT
TATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGG
GTGAATAATTACAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCCGCTTCATATTTGTGTAAT
GATCCCTCCGCAGGTTACCTACG

Как видно из филогенетического дерева, штамм *Alternariaalternata* относится к кластеру *Alternariaalternata* и *Alternariatenuissima*. Степень гомологии составила 100%. Ближайшим штаммом является *Alternariaalternata* 172CR-520.1 (рисунок 2). Идентификация, проведенная ранее по макро и микро-морфологическим признакам полностью подтверждена идентификацией, проведенной молекулярно генетическим методом.

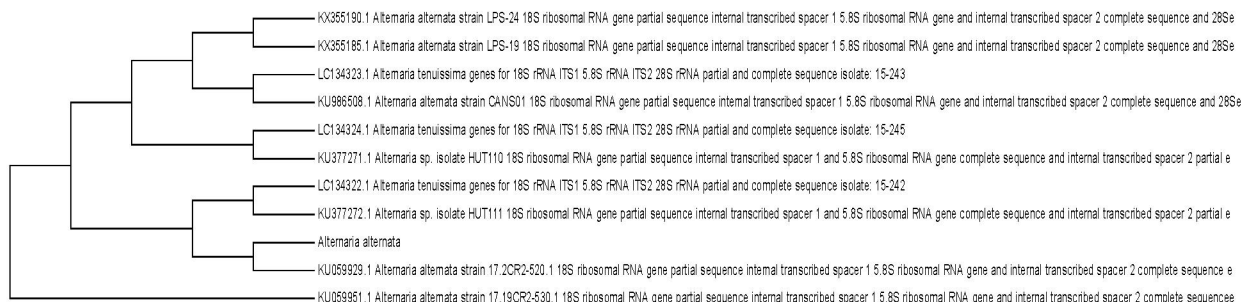


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево возбудителя альтернариоза томата *Alternariaalternata*

Нуклеотидная последовательность возбудителя серой гнили томатов штамма *Botritis cinerea*:

TTGGGTTTTGGCAGAAGCACACCGAGAACCTGTAACGAGAGATATTACTACGTTTCAGGA
CCCAGCGGCGCCGCACTGATTTTAGAGCCTGCCATTACTGACATAGACTCAATACCAAGCT
AAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTACATTACTTATCGCATTTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTATATAGT
ACTCAGACGACATTAATAAAAAGAGTTTTGGTATTCTCTGGCGAGCATAACAAGGCCCGAAGG
CAGCTCGCCAAAGCAACAAAGTAATAACACAAGGGTGGGAGGTCTACCCTTTTCGGGCAT
GAACTCTGTAATGATCCTTCCGCAGGTTTCACCTACGGAAGGATCATTACAGAGTTTCATGCCC
GAAAGGGTAGACCTCCCACCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGG
CCTTGATGCTCGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAA
TAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC

Как видно из филогенетического дерева, представленного на рисунке 3, ближайшим соседом по филогенетической ветви является штамм *Botritis cinerea* DAOM231372 что указывает на родство нашего штамма к этому виду. Степень гомологии между штаммами составила 100%.



Рисунок 3– Филогенетическое дерево возбудителя серой плесени томата *Botritis cinerea*

Молекулярно-генетическую идентификацию возбудителя фузариоза томатов отнесенного макро и микро-морфологическим признакам к *Fusarium oxysporum* провели с видоспецифичными праймерами Fc-1(5'САТАССАСТТГТТГССТС 3') и Fc-2(5'АТТААСГСАГТСССАСС3'), (315 п.н).

В результате ПЦР анализ подтвердил видовую принадлежность возбудителя фузариоза *Fusarium oxysporum*.

Таким образом, даны морфолого-микроскопические и молекулярно-генетические характеристики основных возбудителей грибных болезней томата, произрастающих в Алматинской области.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ахатов А.К. Мир томата глазами фитопатолога. – М.: Изд-во КМК, 2010. – 288 с.
- [2] Джаймурзина А.А., Есжанов Т.К., Низамдинова Г.К. Фитосанитарное состояние томата в условиях Алматинской области // Тр. междунар. научно-практ. конф. «Перспективные направления альтернативной энергетики и энергосберегающие технологии». – Т. 1. – Шымкент, 2010.
- [3] Джаймурзина А.А., Карбозова Р.Д., Есжанов Т.К., Умиралиева Ж.З. Система защиты томата от болезней на Юго-Востоке Казахстана // Земледелие, агрохимия, кормопроизводство, агроэкология, лесное хозяйство // Известия. – 2012. – № 3. – С. 21-24.
- [4] Дусмуратова С.И. Совершенствование технологии выращивания плодов и семян томата в Узбекистане: Дис. д. с.-х. н.: 06.01.06 / Ташкентский государственный аграрный университет. – Ташкент, 2014. – 263 с.
- [5] Еланский С.Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата: Автореф. д.б.н.: 03.02.12 / Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – М., 2012. – 46 с.
- [6] Чумаков А.Е. Основные методы фитопатологических проведения обследования сельскохозяйственной культуры на выявление заболеваний. – М.: Колос, 1974. – 192 с.
- [7] Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во Москва, 1976. – 307 с.
- [8] Пидопличко Н. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель. В 2-х томах. – Киев: Наукова думка, 1977. – 300 с.
- [9] Edwards R., Johnstone C., Tompson C.A. Asimpleandrapid metod for prewparation of plant genomicDNA for PCR analisis // Nucl. AcidsRes. – 1991. – Vol. 19, N 6. – P. 1349.

REFERENCES

- [1] Ahatov A.K. Mir tomata glazami fitopatologa. M.: Izd-vo KMK, 2010. 288 p.
- [2] Dzhajmurzina A.A., Eszhanov T.K., Nizamdinova G.K. Fitosanitarnoe sostojanie tomata v uslovijah Almatinskoj oblasti // Tr. mezhdun. nauchno-prakt. konf. «Perspektivnye napravlenija al'ternativnoj jenergetiki i jenergosberegajushhie tehnologii». Vol. 1. Shymkent, 2010.
- [3] Dzhajmurzina A.A., Karbozova R.D., Eszhanov T.K., Umiralieva Zh.Z. Sistema zashhity tomata ot boleznej na Jugo-Vostoke Kazahstana // Zemledelie, agrohimija, kormoproizvodstvo, agrojekologija, lesnoe hozjajstvo // Izvestija. 2012. N 3. P. 21-24.
- [4] Dusmuratova S.I. Sovershenstvovanie tehnologii vyrashhivaniya plodov i semjan tomata v Uzbekistane: Dis. d. s.-h. n.: 06.01.06 / Tashkentskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. Tashkent, 2014. 263 p.
- [5] Elanskij S.N. Vidovoj sostav i struktura populjaczij vozbuditelej fitofthorozo i al'ternarioza kartofelja i tomata: Avtoref. d.b.n.: 03.02.12 / Moskovskij gosudarstvennyj universitet im. M. V. Lomonosova. M., 02012. 46 p.
- [6] Chumakov A.E. Osnovnye metody fitopatologicheskikh provenenija obsledovanija sel'skohozjajstvennoj kul'tury na vyjavlenie zabolevanij. M.: Kolos, 1974. 192 p.
- [7] Egorov N.S. Praktikum po mikrobiologii. M.: Izd-vo Moskva, 1976. 307 p.
- [8] Pidoplichko N. Griby-parazity kul'turnyh rastenij. Opredelitel'. V 2-h tomah. Kiev: Naukova dumka, 1977. 300 p.
- [9] Edwards R., Johnstone C., Tompson C.A. Asimpleandrapid metod for prewparation of plant genomicDNA for PCR analisis // Nucl. AcidsRes. 1991. Vol. 19, N 6. P. 1349.

Э. Т. Исмаилова, А. К. Саданов, О. Н. Шемпура,
А. И. Сейтбатталова, С. Т. Даугалиева, Р. Ж. Каптагай

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДА ӨСЕТІН ҚЫЗАНАҚ ӨСІМДІГІНІҢ
НЕГІЗГІ САҢЫРАУҚҰЛАҚ АУРУЛАРЫНЫҢ ҚОЗДЫРҒЫШТАРЫНЫҢ
МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ СИПАТТАМАЛАРЫ**

Аннотация. Мақалада Алматы облысында қызанақты өсіру кезіндегі саңырауқұлақ ауруларымен зақымдалуларының фитосанитарлық мониторинг нәтижелері көрсетілген. Неғұрлым зиянды және кең тараған ауру түрі болып фитофтороз ауруы екендігі анықталды. Бұл аурудың таралуы 60%, ал дамуы 45%-ды құрады. Фузариоз және альтернариоз секілді, осындай аурулардың пайда болу көрсеткіштері, 5 тен 10 %, ал аурудың дамуы 3% дан – 30%-ға дейінгі сәйкес аралықта болды. Ең төменгі ошақтық пайда болу *Botrytis* – сұр шірік ауруының қоздырғышы 3%, зақымдалу дәрежесі - 1,5% болды.

Қызанақтың зақымдалған белгілерінен микробиологиялық анализ жүргізілді, *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* ауру қоздырғыштары бөлініп алынды және морфологиялық-микроскопиялық сипаттамасы берілді. ПТР тәсілінің нәтижесінде саңырауқұлақтық ауру белгілері бар, бөлініп алынған қызанақ қоздырғыштарының түрлері анықталды.

Түйін сөздер: қызанақ, саңырауқұлақ аурулары, морфологиялы-культуралды белгілері, эмбебап праймерлер, ПТР талдаулар.