

УДК 632.4.01/.08:632.952:632.95.025.8

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ПАРШИ ЯБЛОНИ
VENTURIA INAEQUALIS К ДИФЕНОКОНАЗОЛУ¹**

Лободина Е.В., м.н.с., Астапчук И.Л., м.н.с., Насонов А.И., канд. биол. наук, с.н.с.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
Федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар),
nasoon@mail.ru

Реферат. Показаны результаты изучения чувствительность 33 изолятов *Venturia inaequalis*, выделенных из контрольного участка (необрабатываемого фунгицидами) промышленного насаждения сорта Ренет Симиренко, к дифеноконазолу. Значения ЭД₅₀ варьировали от 0,03 до 0,81 мг/л, значения коэффициента резистентности (RF) колебались от 2,0 до 27,0. Четыре изолята характеризовались значительным снижением чувствительности к фунгициду (ЭД₅₀ 0,5-0,81, RF выше 20,0). Полученные результаты указывают на необходимость тщательного контроля над изменением чувствительности доминирующего микоза яблони к триазолам в регионе.

Ключевые слова: парша яблони, резистентность, дифеноконазол, *Venturia inaequalis*, ЭД₅₀, коэффициент резистентности

Summary. The development of resistance to broad-spectrum fungicides in the causative agent of apple scab is an important problem in the chemical method of disease control. The sensitivity of 33 isolates *Venturia inaequalis* isolated from the control plot (untreated with fungicides) of the commercial orchard of the Renet Simirenko cultivar to diphenconazole was studied. EC₅₀ values ranged from 0.03 to 0.81 mg / L⁻¹, and resistance factor (RF) values ranged from 2.0 to 27.0. Four isolates were characterized by a significant decrease in sensitivity to fungicide (EC₅₀ 0.5-0.81, RF above 20.0). The results indicate the need for careful monitoring of changes in the sensitivity of the dominant mycosis of the apple tree to triazoles in the region.

Key words: apple scab, resistance, diphenconazole, *Venturia inaequalis*, EC₅₀, RF

Введение. Парша яблони, возбудителем которой является микроскопический гриб *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint., одно из наиболее экономически важных заболеваний яблони домашней (*Malus × domestica*) Краснодарского края. Для региона характерны дождливые весенние периоды, способствующие развитию болезни. Деревья с существенным инфицированием могут преждевременно сбросить листья и не образовать цветковых почек. Однако наиболее экономически важными являются поражения, которые появляются на плодах, что делает их непригодными для потребления в свежем виде [1].

Основными стратегиями контроля возбудителя парши яблони являются, с одной стороны, создание устойчивых сортов, а с другой химический метод. В связи с недостатком на сельскохозяйственном рынке сортового материала, сочетающего в себе иммунитет к патогену и высокие потребительские характеристики получаемых плодов, химический метод остаётся ведущим в технологии промышленного получения плодов яблони [2].

Защита от парши осуществляется, начиная с распускания почек и до сбора урожая, что совпадает с наличием инокулята *V. inaequalis* в виде аскоспор и конидий. Количество

¹Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-416-230070p_a

обработок химическими препаратами варьирует в зависимости уровня сортоспецифической устойчивости к патогену, обусловленной малыми генами, продолжительности периодов увлажнения листьев и количества периодов в течение вегетации, возраста насаждений [3].

Существует два принципиально различных типа фунгицидов против парши яблони: контактные и системные, контролирующие возбудителя. Контактные фунгициды, такие как дитиокарбаматы и каптан, останавливают рост патогенного гриба, воздействуя на многочисленные процессы, важные для его роста и выживания, имея неспецифический, мультисайтовый характер действия. Их действующие вещества не способны проникать в растение и поэтому работают на его поверхности, воздействуя на начальные этапы развития инфекционного процесса, такие, как закрепление спор патогена, образование аппрессориев и проникновение через кутикулу хозяина. Однако эти фунгициды низкоэффективны на дальнейших этапах развития патогена: после проникновения в ткани растения, вплоть до спороношения. Системные фунгициды способны проникать в ткани растения и останавливать развитие патогена уже после заражения. Они имеют узконаправленный механизм действия на гриб в связи с чем их называют ещё моносайтовыми. Это свойство обуславливает их высокую эффективность при малых, как правило, нормах расхода, что позволяет снизить негативные последствия воздействия фунгицидов на окружающую среду [4, 5].

Однако общей чертой применения системных (моносайтовых) фунгицидов является развитие резистентности к ним у патогена. Важность проблемы резистентности подтверждается фактом существования на международном уровне такой организации как FRAC – Комитета противодействия развитию резистентности к фунгицидам (FungicideResistanceActionCommitee), целью которого является разработка тактики и стратегии предотвращения резистентности к фунгицидам повышенных групп риска в глобальном масштабе.

Дифеноконазол – системный фунгицид, один из самых эффективных в классе триазолов, обладающий специфической активностью против возбудителя парши яблони, обусловленной ингибированием синтеза эргостерина гриба. Хотя для многих ингибиторов синтеза стеринов было зафиксировано развитие практической резистентности, например, для миклобутанила, дифеноконазол продолжает обеспечивать эффективную защиту сада от парши яблони. Было отмечено, что устойчивость триазолов является количественной или дозозависимой; так, дифеноконазол и фенбуконазол обладают более высокой внутренней активностью в отношении *V. inaequalis*, чем флутриафол и миклобутанил [6]. Между тем, в некоторых исследованиях было показано *in vitro* о сдвиге базовой чувствительности к дифеноконазолу в сторону нарастания количества изолятов со сниженной чувствительностью [7, 8]. Учитывая развитие практической резистентности ко многим фунгицидам этого класса, целью нашего исследования являлась оценка чувствительности местных популяций парши яблони к дифеноконазолу *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования служили моноспоровые изоляты *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint., выделенные из контрольного участка сада (не обрабатывался фунгицидами в течение нескольких лет) промышленного насаждения сорта Ренет Симиренко, высоковосприимчивого к болезни. Местоположение точки отбора образцов – Динской район Краснодарского края. Выделение патогена проводили из аскоспоровой стадии по оригинальной методике [9]. Оценку чувствительности к фунгициду проводили на основе степени роста культуры на среде КГА (картофельно-глюкозный агар) с различными концентрациями фунгицида: 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1 мг/л [10]. Повторность трёхкратная. Измеряли диаметр колонии (за вычетом диаметра посевного блока), вычисляли его среднее значение и выражали в процентах от среднего диаметра контрольного образца. Значения ЭД₅₀,

эффективные дозы, определяемые как концентрация (доза) фунгицида в ppm, при которой происходило ингибирование радиального роста на 50 %, были рассчитаны с использованием пробит-анализа [11]. Коэффициент резистентности (RF, resistancefactor) каждого изолята рассчитывали путем деления значения ЭД₅₀ изолята на значение ЭД₅₀ наиболее чувствительного изолята. Расчёты массива данных проводили с использованием статистических инструментов приложения ExcelOffice.

Обсуждение результатов. Из популяции патогена было выделено 33 моноспоровых изолята. Анализ чувствительности изолятов возбудителя парши яблони к различным концентрациям дифеноконазола показал широкое варьирование показателя ЭД₅₀ и коэффициента резистентности (таблица). Так, для наиболее чувствительного изолята 13-2 значение ЭД₅₀ составило 0,03, тогда как изолят 3-5 имел ЭД₅₀ – 0,81. При этом значение коэффициента резистентности для этих изолятов составило 1,0 и 27,0 соответственно. Среднее значение ЭД₅₀ по всей популяции патогена – 0,25, среднее RF – 8,4.

Таблица – Чувствительность к дифеноконазолу различных изолятов *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint. из контрольного участка яблони сорта Ренет Симиренко.

№	Код изолята	ЭД ₅₀ , мг/л*	RF**
1	13-2	0,03	1,0
2	14-4	0,06	2,0
3	8-2	0,07	2,3
4	16-1	0,08	2,7
5	5-2	0,09	3,0
6	24-1	0,09	3,0
7	5-1	0,1	3,3
8	16-4	0,1	3,3
9	3-2	0,11	3,7
10	27-2	0,11	3,7
11	2-1	0,12	4,0
12	10-3	0,12	4,0
13	1-1	0,15	5,0
14	4-5	0,16	5,3
15	4-2	0,17	5,7
16	11-2	0,18	6,0
17	12-3	0,19	6,3
18	23-3	0,19	6,3
19	11-4	0,2	6,7
20	15-4	0,2	6,7
21	12-1	0,22	7,3
22	22-2	0,24	8,0
23	26-2	0,24	8,0
24	15-1	0,27	9,0
25	2-3	0,32	10,7
26	6-3	0,33	11,0
27	7-1	0,33	11,0
28	25-1	0,5	16,7
29	21-2	0,5	16,7
30	25-2	0,65	21,7
31	8-3	0,68	22,7
32	13-1	0,7	23,3
33	3-5	0,81	27,0

Примечания к таблице: *- ЭД₅₀ – концентрация фунгицида ингибирующая радиальный рост изолята на 50 %. Чем больше показатель ЭД₅₀ тем меньше чувствительность изолята; ** - коэффициент резистентности, показывает степень увеличения устойчивости к фунгициду любого изолята относительно самого чувствительного.

Значения ЭД₅₀ свыше 0,5 мг/л и RF выше 20 может указывать на значительное смещение чувствительности изолятов: 25-2, 8-3, 13-1 и 3-2 и их возможную резистентности к дифеноконазолу.

В настоящее время не выработано четкой системы ранжирования степени резистентности патогенов к фунгицидам *in vitro*. Но чаще всего используют два подхода: оценка ЭД₅₀ изолятов при различных концентрациях фунгицида и тестирование изолятов при определенной дискриминационной дозе действующего вещества. Сравнение ЭД₅₀ популяции патогена из сада с контролем фунгицидами с ЭД₅₀ базовой популяции, не испытывавшей воздействия фунгицидов, позволяет выявить сдвиг чувствительности первой. Так, в исследованиях Stevic et al. было показано, что для популяции *V. inaequalis* из коммерческого сада в Сербии значения ЭД₅₀ для дифеноконазола были в диапазоне от 0,016 до 0,362 мг/л. При этом в экспериментах *in vivo* изолят ViBC1 возбудителя парши яблони с RF равным 22,6 (по данным *in vitro*), показал практическую устойчивость к дифеноконазолу в рабочих концентрациях. Контроль этого изолята был достигнут только при двукратном увеличении концентрации фунгицида до 100 мг/л, что, однако привело к развитию фитотоксического эффекта у саженцев яблони. Для девяти изолятов *V. inaequalis* ими было зафиксировано развитие умеренной устойчивости (RF 5,1-16,1) [10]. Уругвайскими исследователями, изучавшими чувствительность изолятов *V. inaequalis* к дифеноконазолу на пяти концентрациях фунгицида в двух коммерческих садах, имеющих различную историю использования дифеноконазола, было отмечено снижение чувствительности к нему, по сравнению с изолятами из базовой популяции. Значения коэффициента устойчивости (RF) в садах с количеством опрыскиваний дифеноконазолом 4 и 5 за сезон составили 6,6 и 11,74 соответственно [12]. Между тем наличие отдельных резистентных изолятов, до определенного момента, может никак не влиять на эффективность защиты сада. Как указывает Fiaccadori популяция *V. inaequalis* может считаться резистентной, когда 70% изолятов имеют ЭД₅₀ ≥ 0,3 мг/л [13].

Хотя изученная нами популяция патогена была выделена из контрольного участка сада, который не обрабатывался фунгицидами, в ней были найдены изоляты со сниженной чувствительностью к дифеноконазолу. Вероятно, это связано с тем, что этот участок пространственно не изолирован от основной части сада и является своеобразной ловушкой для резистентных форм патогена, селективированных под действием фунгицида в обрабатываемой части промышленного насаждения. Наличие четырех изолятов с высокими значениями ЭД₅₀ и RF может указывать на их практическую устойчивость к фунгициду, что требует дальнейшей оценки чувствительности к дифеноконазолу в этом саду. Для более точного расчёта коэффициента резистентности необходимо, с одной стороны, изучение местной базовой популяции *V. inaequalis*, которая никогда не испытывала действие фунгицидов, а с другой увеличение выборки изучаемых изолятов патогена.

Выводы. Изучение чувствительности 33 изолятов возбудителя парши яблони *V. inaequalis*, выделенных из контрольного участка (необрабатываемого фунгицидами) промышленного насаждения сорта Ренет Симиренкок дифеноконазолу показало значительное варьирование ЭД₅₀ – от 0,03 до 0,81 мг/л. Значения коэффициента резистентности (RF) также колебались: от 2,0 до 27,0. Четыре изолята характеризовались значительным снижением чувствительности к фунгициду: ЭД₅₀ 0,5-0,81, RF выше 20,0. Полученные результаты могут указывать на практическую устойчивость отдельных

изолятов популяции к дифеноконазолу. Из этого следует необходимость тщательного контроля над изменением чувствительности возбудителя доминирующего микоза яблони к дифеноконазолу в связи с опасностью значительного снижения его эффективности или развития практической резистентности.

Литература

1. Насонов, А. И. Парша яблони: особенности возбудителя и патогенеза / А.И. Насонов, И.И. Супрун // Микология и фитопатология. – 2015. – Т. 49. – №. 5. – С. 275-285.
2. Якуба, Г.В. Перспективные микробиологические препараты для защиты яблони от парши / Г.В. Якуба, Л.В. Маслиенко, Д.Н. Гусин // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2013. – № 22 (4). – С. 81-88.
3. MacHardy, W. E. Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies / W. E. MacHardy, D. M. Gadoury, C. Gessler // Plant disease. – 2001. – V. 85, №. 10. – P. 1036-1051.
4. Chapman, K. S. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis* / K. S. Chapman, G. W. Sundin, J. L. Beckerman // Plant disease. – 2011. – V. 95, №. 8. – P. 921-926.
5. Lesniak, K. E. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis* / K. E. Lesniak, T. J. Proffer, J. L. Beckerman, G. W. Sundin, // Plant disease. – 2011. – V. 95, №. 8. – P. 927-934.
6. Cox, K. D. Fungicide resistance in *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, in the United States // Fungicide Resistance in Plant Pathogens. – Tokyo: Springer, 2015. – P. 433-447.
7. Villani, S. M. Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis* / S. M. Villani, A. R. Biggs, D. R. Cooley, J. J. Raes, K. D. Cox // Plant disease. – 2015. – V. 99, №. 11. – P. 1526-1536.
8. Henríquez, J. L. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean Isolates to Difenoconazole, Fenarimol, Mancozeb, and Pyrimethanil / J.L. Henríquez, V. Samiento, P. Alarcón // Chilean Journal of Agricultural Research. – 2011. – V. 71. – P. 39-44.
9. Насонов, А. И. Новый способ получения культуры *Venturia inaequalis* из аскоспор // Микология и фитопатология. – 2019. – Т. 53, №. 1. – С. 46-48.
10. Stević, M. Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides / M. Stević, P. Vukša, I. Elezović // Žemdirbystė=Agriculture. – 2010. – P. 65-72.
11. Finney, D. J. Probit analysis / D. J. Finney. – Cambridge:UK, 1971. – 383 p.
12. Mondino, P. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to Trifloxystrobin and Difenoconazole in Uruguay / P. Mondino, L. Casanova, A. Celio, O. Bentancur, C. Leoni, S. Alaniz // Journal of Phytopathology. – 2015. – V. 163, №. 1. – P. 1-10.
13. Fiaccadori, R. Researches on Methodologies to Verify Reduced Sensitivities of *Venturia inaequalis* in Field to Difenoconazole and First Indications of a Survey in Italy // American Journal of Plant Sciences. – 2017. – V. 8, №. 09. – P. 2056.