

ФИТОПАТОЛОГИЯ

УДК 634.11:632.421.927

В.С. Комардина, Е.В. Васеха, Р.И. Плескацевич

РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки, Минский р-н

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ ЯБЛОНИ – ГРИБА *VENTURIA INAEQUALIS* К КРЕЗОКСИМ-МЕТИЛУ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Рецензент: канд. биол. наук Войтка Д.В.

Аннотация. Проведены исследования по оценке чувствительности гриба *V. inaequalis* к препарату крезоксим-метилу из группы стробилуринов методом проращивания конидий и молекулярно-генетическим методом (детекция мутации G143A). Выявлено снижение чувствительности возбудителя парши яблони к крезоксим-метилу в промышленных садах с ежегодным одно-двукратным применением препаратов из группы стробилуринов в системе защиты сада. Установлено, что 4-кратное последовательное применение в саду фунгицида Строби, 500 г/кг в.г. приводит к потере чувствительности гриба *V. inaequalis* к крезоксим-метилу в 8,9 раз по сравнению с контролем. В популяциях гриба *V. inaequalis* методом PCR-RFLP выявлены изоляты с G143A мутацией, определяющей их как резистентные к крезоксим-метилу.

Ключевые слова: яблоня, парша, стробилурины, резистентность.

Введение. В последнее десятилетие в Беларуси интенсивно развивается промышленное садоводство в хозяйствах всех форм собственности. Несмотря на то, что производство плодов в республике увеличивается, средняя урожайность плодовых культур (доля яблони превышает 95 %) в сельскохозяйственных предприятиях относительно не высокая – 41,6 ц/га [3]. Основными факторами, лимитирующими получение высоких урожаев, являются болезни, из которых доминирующая роль принадлежит парше яблони (возбудитель болезни – гриб *Venturia inaequalis* Wint.) [16]. Развитие болезни на восприимчивых сортах за последние десять лет почти ежегодно достигает эпифитотии, что приводит к потере общего урожая до 60 % и снижению выхода первосортной продукции до 90 % [2]. В последние годы в насаждениях яблони фитосанитарная ситуация ухудшается за счет появления новых агрессивных

рас возбудителя парши, поражающих сорта с *Rvi* генами устойчивости [1]. В связи с этим, защита от парши требует проведения большого количества фунгицидных обработок, что приводит к потере эффективности препаратов, а у фитопатогена – развитию резистентности.

Проблема резистентности гриба *V. inaequalis* в саду обострилась после широкого внедрения в практику системных фунгицидов с избирательным механизмом действия, так как подавляются чувствительные формы популяции, и выживают устойчивые штаммы фитопатогена, которые обладают примерно равной патогенностью с исходными природными формами [10].

Появление резистентных форм гриба *V. inaequalis* впервые было отмечено после регистрации и широкого распространения препарата Додин из группы гуанидинов [9]. После применения системных препаратов из класса бензимидазолов уже через 2 года было зафиксировано появление устойчивых форм гриба к действующим веществам беномил и тиофанат-метил [15]. В настоящее время по данным FRAC данные фунгициды относятся к группе с высоким риском резистентности с уже установленной к ним устойчивостью у ряда фитопатогенов плодовых культур – *V. inaequalis*, *Monilinia fructicola*, *Neofabraea* spp. [5, 7].

К группе с высоким фактором резистентности также относятся фунгициды из класса стробилуринов. В работах европейских и американских исследователей отмечается о снижении биологической эффективности препаратов данной группы, при этом уже после 4-х лет активного их применения отмечено появление устойчивых штаммов гриба *V. inaequalis* [5, 6, 8, 12].

Доказано, что развитие резистентности у грибов определяется сочетанием, как биологических, так и генетических факторов [19]. В настоящее время установлено, что высокая степень устойчивости фитопатогенов к стробилуринам обусловлена точковой мутацией G143A аллеля в части молекулы цитохрома b, которая определяет связывание этого фермента с фунгицидами [4, 13, 14].

В условиях Беларуси в 2000-2006 гг. проводились исследования по изучению чувствительности гриба *V. inaequalis* к крезоксим-метилу, в которых было доказано о прогрессирующей потере чувствительности к данному препарату, однако оценка с помощью молекулярных методов не проводилась [11].

В настоящее время в республике для защиты яблони от парши разрешено к применению 5 фунгицидов из группы стробилуринов, из них 2 – монокомпонентные, 3 – двухкомпонентные и 1 – трехкомпонентный.

В связи с этим оценка чувствительности возбудителя парши яблони к крезоксим-метилу из группы стробилуринов различными методами является актуальной.

Материалы и методика проведения исследований. Маршрутные обследования с целью отбора биологического материала проводились в промышленных садах и коллекционных насаждениях республики Гродненской и Минской областей.

Изучение чувствительности методом проращивания конидий гриба *V. inaequalis* к крезоксим-метилу проводили по методике FRAC [18]. Образцы пораженных паршой листьев и плодов (30-50 штук) отбирали в мае-июне из каждого сада отдельно. Из отобранных образцов вырезали 40-60 дисков с пятнами парши, которые помещали в колбу с 50 мл стерильной дистиллированной воды. После тщательного перемешивания суспензию отфильтровывали и разводили до конечной концентрации 5×10^5 спор/мл. Фунгицид предварительно растворяли в стерильной дистиллированной воде, затем добавляли в колбы с 2 %-м водным агаром, предварительно охлажденным до 45 °С. Гомогенизированную питательную среду разливали в чашки Петри $d=60$ мм. Финальная концентрация крезоксим-метила составила: 0; 2; 10; 50; 100 мкг/мл. Через 24 часа в чашки Петри с разными концентрациями фунгицидов помещали 10 мкл свежеприготовленной суспензии конидий гриба *V. inaequalis* и инкубировали при температуре 20 °С в термостате. Через 24 часа после инокуляции подсчитывали количество проросших спор из 100 просмотренных в 4-кратной повторности.

Исследования по выявлению у изолятов гриба *V. inaequalis* G143A мутации в цитохроме *b*, отвечающей за устойчивость патогена к Qo-Inhibitors (стробилуринам), проводили с применением молекулярно-генетических методов (PCR-RFLP) согласно методике FRAC [17].

Выделение ДНК гриба осуществляли с использованием коммерческого набора Jena Bioscience согласно инструкции производителя. Амплификацию фрагмента гена *cyt b* проводили в финальном объеме реакционной смеси 100 мкл, содержащей 1X ПЦР-буфер, 200 μ M каждого dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M каждого праймера (ANK 10 5'CTGTTGTTAGGCTCTTCAATG 3', ANK 283 5'CTGTAGTTGAAAGGCTATTAG 3, 0,25 U Taq-полимеразы, 5 мкл ДНК. PCR-анализ проводили в термоциклере Mastercycler Eppendorf по следующей программе: предварительная денатурация – 3 мин при 94 °С, далее 35 циклов по 45 с при 95 °С, 30 с при 58 °С, 90 с при 72 °С, и финальная элонгация – 10 мин при 72 °С. Для рестрикционного анализа ПЦР-продукт очищали с использованием набора для очистки ДНК и растворяли в 20 мкл элюирующего буфера. Дальнейшее растворение продукта проводили в финальном объеме смеси 30 мкл, содержащем 10 мкл очищенного ПЦР-продукта, 0,5 мкл рестриктазы *TseI*, 3 мкл соответствующего буфера и 16,5 мкл стерильной дистиллированной

воды. Полученную смесь инкубировали при 65 °С в течение 2 часов до полного растворения. Разделение продуктов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. После электрофореза гель анализировали при помощи трансиллюминатора и видеосистемы (Vilber Lourmat) с программным обеспечением Vision-sart по количеству и размеру продуктов:

- 1 фрагмент (размер 413 bp): чувствительный (дикий тип);
- 2 фрагмента (размер 112 bp и 301 bp): резистентный (G143A);
- 3 фрагмента (размер 112 bp, 301 bp и 413 bp): смесь чувствительного (дикий тип) и резистентного (G143A).

Результаты и их обсуждение. В результате оценки чувствительности гриба *V. inaequalis* к крезоксим-метилу методом проросших конидий установлено, что в садах, где препарат из этой группы в системе защиты сада применяют до 2-х раз ежегодно, количество проросших конидий патогена в максимальной концентрации (100 мкг/мл) составляет 71,3 – 82,3 %, что соответствует контрольным показателям 78,7–90 % (таблица 1).

Таблица 1 – Чувствительность конидий гриба *V. inaequalis*, выделенных из садов с различным уровнем пестицидной нагрузки, к крезоксим-метилу (лабораторный опыт, 2019 г.)

Место отбора образцов	Количество проросших конидий, % на среде	
	с крезоксим-метилом, 100 мкг/мл	без крезоксим-метила (контроль)
<i>Ежегодное одно-двукратное применение стробилурина в системе защиты</i>		
СПК имени Деньщикова, Гродненский р-н	82,0	85,4
СПК имени И.П. Сенько, Гродненский р-н	76,5	83,5
ПК имени В.И. Кремко, Гродненский р-н	82,3	87,5
СПК «Прогресс-Вертелишки», Гродненский р-н	83,0	90,0
КСУП «Племзавод-Россь», Волковысский р-н	71,3	78,7
<i>Без применения стробилурина в течение 3 лет</i>		
СХФ «Правда-Агро» ОАО «Агрокомбинат Дзержинский», Дзержинский р-н	18,5	88,3
РУЭОСХП «Восход», Минский р-н	3,0	83,0

В садах, где в системе защиты стробилурины не применяли 2 и более года, конидии *V. inaequalis* при максимальной концентрации препарата прорастали только на 3,0 – 18,5 %.

В результате оценки влияния количества обработок крезоксим-метила в течение вегетационного периода на устойчивость возбудителя

парши яблони на стационарных участках в РУЭОСХП «Восход» проводили последовательные 4-кратные обработки препаратом Строби, 500 г/кг, в.г. (0,2 кг/га). Анализ полученных данных показал, что количество проросших конидий патогена при концентрации 100 мкг/мл, применяемой в саду, составило 24,9 %, что 9 раз выше по сравнению с контролем (таблица 2).

Таблица 2 – Чувствительность конидий гриба *V. inaequalis*, выделенных из стационарного участка после 4-кратного применения препарата, к крезоксим-метилу (лабораторно-полевой опыт, РУЭОСХП «Восход» Минская область, сорт Белорусское сладкое, 2019 г.)

Вариант	Количество проросших конидий, % при концентрации препарата (мкг/мл)				
	0	2	10	50	100
Строби, 500 г/кг в.г. (крезоксим-метил, 500 г/кг), 0,2 кг/га – 4-кратно	75,0	24,4	21,4	26,6	24,9
Контроль (без обработок)	85,5	10,8	17,3	4,5	2,8

При этом не отмечено существенных различий в ингибировании прорастания конидий, как при низкой концентрации препарата (2,0 мкг/мл), так и высокой (50-100 мкг/мл). В то же время в контрольном варианте без обработки препаратом отмечена тенденция снижения количества прорастающих конидий при увеличении концентрации фунгицида – при максимальной концентрации крезоксим - метила количество прорастающих конидий патогена не превышало 2,8 %.

В результате молекулярно-генетического определения G143A мутации в цитохроме b, отвечающей за устойчивость к Qo-Inhibitors (стробилуринам), у 5 изолятов гриба, установлено, что резистентными (G143A положительными) являются изоляты, выделенные из садов СПК «Прогресс-Вертелишки» Гродненского района и СХФ «Правда-Агро» ОАО «Агрокомбинат Дзержинский» Дзержинского района (рисунок).

Изолят, выделенный из стационарного участка с 4-кратным применением Строби в РУЭОСХП «Восход» (2), принадлежит к смешанному типу, а из сада отдела селекции РУП «Институт плодоводства» (1) – чувствительный («дикий тип»).

Изоляты, выделенные из сада СХФ «Правда-Агро» ОАО «Агрокомбинат Дзержинский», где препараты из группы стробилуринов не применялись в течение последних 3-х лет, были отнесены как к чувствительному типу (3), так и к резистентному (6). В то же время изолят из сада СПК «Прогресс-Вертелишки» (4) показал наличие мутации и, соответственно, отнесен к резистентному.

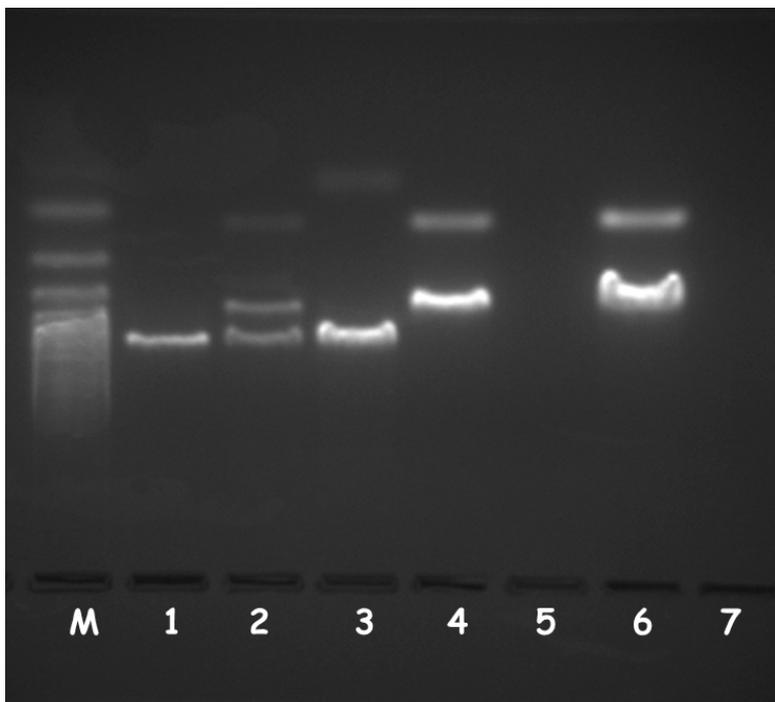


Рисунок – Разделение амплифицированных фрагментов ДНК *V. inaequalis* рестриктазой *TseI* для определения G143A мутации в цитохроме b, отвечающей за устойчивость к Qo-Inhibitors – стробилуринам (лабораторный опыт, 2019 г.)

М – маркер молекулярного веса;

1, 3 – чувствительный (дикий тип): 1 фрагмент (размер: 413 bp);

2 – смесь чувствительного (дикий тип) и резистентного (G143A): 3 фрагмента (размер: 112 bp, 301 bp и 413 bp) ;

4, 6 – резистентный (G143A): 2 фрагмента (размер: 112 bp и 301 bp).

Таким образом, в лабораторных опытах установлено значительное снижение чувствительности возбудителя парши яблони гриба *V. inaequalis* к фунгициду из группы стробилуринов с д.в. крезоксим-метил, что необходимо учитывать при разработке антирезистентной системы защиты яблони от болезней.

Закключение. В результате оценки чувствительности возбудителя парши яблони к Qo-фунгицидам методом проращивания конидий, установлено, что в садах, с ежегодным 1-2-кратным применением фунгицидов из группы стробилуринов в системе защиты сада, отмечается

значительное снижение чувствительности гриба *V. inaequalis* к крезоксим-метилу. В садах, где в системе защиты стробилурины не применяли 3 и более года, конидии патогена при концентрации крезоксим-метила, применяемой в саду, прорастают на 3,0-18,5 %.

Установлено, что в насаждениях яблони с чувствительной к крезоксим-метилу популяцией возбудителя парши яблони последовательное четырехкратное применение фунгицида Строби, 500 г/кг в.г. привело к снижению чувствительности гриба *V. inaequalis* в 8,9 раз по сравнению с контролем. Молекулярно-генетическим методом подтверждено, что формирование смешанной популяции (чувствительный и резистентный тип) отмечается уже после 3-кратного применения препарата.

В результате PCR-RFLP анализа в обследованных насаждениях яблони подтверждено наличие, как чувствительных, так и резистентных к Qo-фунгицидам изолятов гриба *V. inaequalis*, что требует проведения дополнительных исследований по мониторингу чувствительности патогена к стробилуринам.

Полученные данные по чувствительности возбудителя парши яблони к крезоксим-метилу необходимо учитывать при разработке стратегии применения препаратов из группы стробилуринов в системе защиты яблони от болезней.

Список литературы

1. Жданов, В. В. К проблеме расспецифической устойчивости яблони к парше / В. В. Жданов // Микология и фитопатология. – 2006. – № 40. – С. 314–317.
2. Интегрированные системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков: рекомендации / НАН Беларуси; Ин-т защиты растений НАН Беларуси; под ред. С. В. Сороки. – Минск, 2005. – С. 435–449.
3. Сельское хозяйство Республики Беларусь. Статистический сборник / Национальный статистический комитет Республики Беларусь; редкол.: И. В. Медведева [и др.]. – Минск, 2016. – 230 с.
4. Тютюрев, С. Л. Проблемы устойчивости фитопатогенов к новым фунгицидам / С. Л. Тютюрев // Вестник защиты растений. – 2001. – № 1. – С. 38–53.
5. A rapid method to quantify fungicide sensitivity in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* / K. D. Cox [et al.] // Plant Dis. – 2009. – Vol. 93. – P. 328–331.
6. The strobilurin fungicides / D. W. Bartlett [et al.] // Pest Manage. Sci. – 2002. – Vol. 58. – P. 649–662.
7. Beckerman, J. L. Detection of fungicide resistance [Electronic resource]. – 2013. – Mode of access: cdn.intechopen.com. – Date of access: 15.07.2018.
8. Broniarek-Niemiec, A. Odporność *Venturia inaequalis* na fungicydy strobilurynowe w sadach jabłoniowych w Polsce / A. Broniarek-Niemiec, A. Bielenin // Progress in Plant Protection. – 2007. – Vol. 47 (2). – P. 62–65.
9. Carisse, O. Apple scab: improving understanding for better management / O. Carisse, T. Jobin; Agriculture and Agri-Food Canada. – Canada, 2006. – 22 p.
10. 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 Dis. – 2011. – № 95. – P. 921–926.

11. Kamardzina, V. Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to the cresoxim-methyl / V. Kamardzina // Sodininkystė ir daržininkystė. – Babtai, 2009. – P. 93–100.
12. Kim, Y. K. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *B. cinerea* populations from apple in Washington State / Y. K. Kim, C. L. Xiao // Phytopathology. – 2009. – Vol. 99 – P. 62.
13. Occurance of QoI Resistance and detection of the G143 mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis* / K.E. Lesniak [et al.] // Plant Dis. – 2011. – Vol. 95, № 8. – P. 927–934.
14. Prevalence and stability of Qualitative QoI Resistance in populations of *Venturia inaequalis* in the Northeastern United States / Z. A. Frederick [et al.] // Plant Dis. – 2014. – Vol. 98, № 8. – P. 1122–1130.
15. Quello, K.L. *In situ* detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana / K.L. Quello, K.S. Chapman, J.L. Beckerman // Plant Dis. – 2010. – Vol. 94, № 6. – P. 744-750.
16. Sestras, R. Response of several apple varieties to apple scab (*Venturia inaequalis*) attack in central Transylvania conditions / R. Sestras // Journal of Central European Agriculture (online). – 2003. – Vol. 4, №4. – P. 356-362.
17. VENTIN PCR-RFLP monitoring method BASF 2015 [Electronic resource] / FRAC. – Mode of access: <http://www.frac.info/monitoring-methods>. – Date of access: 10.01.2019.
18. VENTIN spore germination BASF 2006 V1 [Electronic resource] / FRAC. – Mode of access: <http://www.frac.info/monitoring-methods>. – Date of access: 10.01.2019.
19. Villani, S.M. Molecular characterization of the *sdhB* gene and baseline sensitivity to penthiopyrad, fluopiram, and benzovindiflupir in *Venturia inaequalis* / S.M. Villani, K. Ayer, K.D. Cox // Plant Dis. – 2016. – Vol. 100, № 8. – P. 1709-1716.

V.S. Komardina, E.V. Vasekha, R.I. Pleskatsevich
RUE «Institute of Plant Protection», a/c Priluki, Minsk region

EVALUATION OF THE CAUSING AGENT OF APPLE SCAB- FUNGUS *VENTURIA INAEQUALIS* SENSITIVITY TO CRESOXYM-METHYL BY VARIOUS METHODS

Annotation. Studies have been carried out to assess the sensitivity of the fungus *V. inaequalis* to the preparation cresoxim-methyl from the strobilurin group by the method of conidia germination and the molecular-genetic method (detection of G143A mutation). A decrease of the apple scab causative agent sensitivity to cresoxim-methyl in the industrial gardens with the annual one-two-time application of preparations from strobilurins in the garden protection system has been revealed. It is determined that 4-fold sequential application in the garden of the fungicide Strobi, 500 g / kg w. leads to 8.9 times loss of the fungus *V. inaequalis* sensitivity to cresoxim-methyl compared to the control. In the populations of the fungus *V. inaequalis*, by PCR-RFLP method the isolates with the G143A mutation have been revealed, determining them as resistant to cresoxim-methyl.

Key words: apple tree, scab, strobilurins, resistance.