Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет

На правах рукописи

КУТУЗОВА ИРИНА АЛЕКСЕЕВНА

ВНУТРИВИДОВАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ *COLLETOTRICHUM COCCODES* И *HELMINTHOSPORIUM SOLANI*

Специальность 03.02.03 - микробиология
03.02.12 - микология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель -
доктор биологических наук
Еланский С.Н

Москва, 2018

Содержание

Введение 4

Часть 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11

1.1. Болезни картофеля 11

1.2. *Colletotrichum coccodes* 12

1.3. *Helminthosporium solani* 19

1.4. Борьба с клубневыми инфекциями 23

ЧАСТЬ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 30

2.1. Выделение и анализ изолятов *H. solani* и *C. coccodes* 30

2.2. Выделение ДНК 41

2.3. Проведение ПЦР и секвенирование маркерных последовательностей ДНК 42

2.4. Устойчивость к фунгицидам 46

2.5. Изучение морфологических признаков *C. coccodes* 53

2.6. Статистическая обработка данных 56

ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 57

3.1. Внутривидовое разнообразие *C. coccodes* 57

3.1.2. Морфология и скорость роста 57

3.1.2. Внутривидовое разнообразие по структуре маркерных последовательностей ДНК 69

3.2. Внутривидовое разнообразие *H. solani* 78

3.3. Устойчивость к фунгицидам 79

3.3.1. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к фунгицидам 79

3.3.2. Устойчивость штаммов *H. solani* к фунгицидам 85

3.3.3. Сравнение эффективности исследованных фунгицидов в отношении *C. coccodes* и *H. solani* 88

3.3.4. Механизмы устойчивости штаммов *H. solani* к тиабендазолу 89

Заключение 93

Выводы 95

Практические рекомендации 96

Благодарности 97

Список публикаций по теме диссертации 98

Список цитированной литературы 101

Приложение к пункту 2.4 114

Приложение к пункту 3.1. 117

Приложение к пункту 3.3.1. 132

Приложение к пункту 3.3.2. 137

Введение

Картофель – одна из самых важных и распространенных сельскохозяйственных культур России, является одним из основных продуктов питания. Российская Федерация является третьим (после Китая и Индии) производителем картофеля в мире. Доля России в мировом производстве по валовому сбору в 2013 году составляла около 8%, картофель выращивали на площади 2,14 млн. га, было собрано 30,2 млн. тонн клубней. Однако средняя урожайность (по всем хозяйствам) в России остается довольно низкой – около 14,5 т/га, в то время как в 10 крупнейших российских картофелеводческих хозяйствах она существенно выше – 30,7 т/га.

Одной из основных причин низкого урожая (наряду с низким качеством семенного материала, недостаточным внесением удобрений и развитием сорняков) является поражение растений фитопатогенными микроорганизмами. Основным методом борьбы с ними является химическая защита растений с помощью разнообразных пестицидов, которые применяются для обработки семенных клубней при посадке, растений в вегетационный период, перед закладкой на хранение и при хранении. Для грамотного планирования защитных мероприятий необходима не только диагностика пораженности участка, но и детальное определение видового и внутривидового состава фитопатогенного комплекса, выявление устойчивых к фунгицидам штаммов.

Серебристая парша, вызываемая грибом *Helminthosporium solani* Dur. et Mont. и антракноз, возбудителем которого является гриб *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes – опасные заболевания картофеля. Эти заболевания, вызывающие существенное снижение качества столового и семенного картофеля и потери при хранении, в последние годы получили широкое распространение.

Жизненный цикл практически всех возбудителей клубневых и проростковых инфекций тесно связан с почвой. Возбудитель серебристой парши *H. solani* поражает клубни в период вегетации и при хранении. Кожура клубней покрывается легко стирающимся темным налетом, расслаивается, что приводит к иссушиванию клубней. При сильном поражении почки клубня отмирают и всходы не образуются. *H. solani* может перезимовывать на зараженных клубнях при хранении, конидии могут длительное время сохраняться в почве. Одна из важнейших проблем в защите картофеля от серебристой парши – отсутствие сортов с высокой устойчивостью к этому заболеванию (Konéa et al., 2010).

Заболевание «черная пятнистость», вызываемое *C. coccodes*, характеризуются серебристыми поражениями поверхности клубней, которые приводят к ухудшению качества кожуры и изменению их структуры. В этом случае симптомы заболевания очень похожи на серебристую паршу. *C. coccodes* также может вызывать появление язв, часто мокрых, на клубнях и других частях растений («антракноз»). Отличительным признаком всех поражений антракнозом является наличие мелких точечных черных склероциев на пораженных частях растения. До недавнего времени частота встречаемости и урон от черной пятнистости, возможно, были занижены, так как симптомы на клубнях ошибочно принимали за серебристую паршу, вызываемую *H. solani*. Заболевание сложно поддается контролю, поскольку коммерческие сорта картофеля обладают низким уровнем устойчивости. Основными методами борьбы с серебристой паршой и черной пятнистостью является обработка клубней фунгицидными препаратами перед посадкой и перед закладкой на хранение, а также поддержание температурно-влажностных режимов во время хранения.

Инокулюм *C. coccodes* и *H. solani* может содержаться как в семенных клубнях, так и в почве. В связи с этим особую значимость приобретает использование химических фунгицидов для предпосадочной обработки семенных клубней. Эффективность химических средств защиты растений

против этих грибов слабо исследована, о наличии устойчивых изолятов в российских популяциях данных нет.

C. coccodes, в отличие от *H. solani,* поражает не только клубни, но и листья, стебли и другие органы растения картофеля. Он может встречаться и на других растениях, например, на томате. Поражение плодов томата антракнозом также приводит к высоким потерям урожая. В конце 20 века поражение антракнозом рассматривали как одну из основных причин потерь урожая томата, предназначенных для промышленной переработки (Dillard and Cobb, 1997). Данных о генотипической структуре популяций *C. coccodes* на листьях и стеблях картофеля и томата крайне мало; информации о проведенных сравнительных исследованиях штаммов, выделенных с разных органов картофеля и с разных растений-хозяев, нам найти не удалось.

Таким образом, хотя возбудители серебристой парши и черной пятнистости широко распространены на территории России, они практически не изучены. Очень мало данных о структуре популяций, устойчивости к фунгицидам, возможности перезаражения между близлежащими посадками картофеля и томата.

Целью работы являлось изучение внутривидового разнообразия фитопатогенных грибов *H. solani* и *C. coccodes.*

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Выделение изолятов *H. solani* и *C. coccodes* из пораженных органов картофеля и томата из различных регионов России и из импортированного семенного картофеля.

2. Оценка разнообразия выделенных с картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и томата (*Solanum lycopersicum* L.) штаммов *C. coccodes* различного географического происхождения и разной органотропной специализации по структуре участков ДНК и морфологическим признакам.

3. Оценка внутривидового разнообразия *H. solani* по участку ДНК ITS1-5,8S-ITS2.

4. Сравнительное изучение роста и микроморфологии штаммов *C. coccodes* разного происхождения при разных температурных режимах.

5. Изучение устойчивости коллекционных изолятов *H. solani* и *C. coccodes* к фунгицидам, применяемым для обработки клубней картофеля.

Научная новизна исследований.

Впервые на основании определения структуры четырех участков ДНК (ITS1-5,8S-ITS2, глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидро-геназы, актина) и анализа биологических свойств (скорость роста на разных средах и при разных температурах, устойчивость к некоторым фунгицидам) проведено исследование внутривидового разнообразия штаммов *C. coccodes*, выделенных из клубней картофеля, привезенных из разных регионов России и импорти-рованных из Германии и Нидерландов. Впервые в мире на основании анализа участков ДНК (см. выше) проведен сравнительный анализ штаммов, выделенных из клубней, листьев, стеблей картофеля и плодов томата.

Впервые исследовано внутривидовое разнообразие *H. solani* на примере штаммов, собранных в разных регионах России и выделенных из импортированных семенных клубней. Показано отсутствие вариабельности по участку ДНК ITS1-5,8S-ITS2.

Практическая значимость работы.

Впервые в России проведен анализ устойчивости штаммов *H. solani* и *C. coccodes* к некоторым популярным фунгицидам, используемым для обработки клубней при закладке на хранение, во время хранения и перед посадкой. Выявлены высокоустойчивые к тиабендазолу штаммы *H. solani*; показано, что устойчивость вызывается теми же мутациями гена β-тубулина, что и у европейских и североамериканских штаммов. Показано, что

идентификация устойчивых к тиабендазолу штаммов может проводиться по структуре участков генома. Отработана методика быстрой идентификации *H. solani* и *C. coccodes* с помощью видоспецифичных ПЦР-праймеров.

Результаты работы могут быть использованы в планировании мероприятий по защите картофеля и томата от фитопатогенных грибов при посадке (обработка семенного материала), во время вегетации, хранения и при предреализационной подготовке. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов по фитопатологии, защите растений, технологии хранения плодов и овощей в учебных организациях биологического и сельскохозяйственного профиля.

Положения, выносимые на защиту.

1. Исследования четырех последовательностей ДНК (ITS1-5,8S-ITS2, глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, актина) показали низкую вариабельность среди выделенных с картофеля штаммов *C. coccodes.* Не выявлено дивергенции популяций ни по регионам выделения, ни по органам картофеля (листья, стебли, клубни).
2. Штаммы, выделенные с томата, отличались от выделенных с картофеля по структуре проанализированных участков глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и актина, но не отличались по последовательностям ITS1-5,8S-ITS2.
3. Штаммы *H. solani* отличались крайне низкой вариабельностью: последовательности ITS1-5,8S-ITS2 были абсолютно одинаковыми и типичными для вида у всех исследованных штаммов.
4. Результаты изучения скоростей роста штаммов *C. coccodes* показывают, что лучше всего все изоляты росли при температуре +24ºС, несколько медленнее – при +15ºС. Существенной разницы в скоростях роста между штаммами не выявлено. В экстремальных условиях (+5 и +33ºС) штаммы росли значительно медленнее, при этом отмечена высокая разница в скоростях роста между ними.

5. Высокой фунгицидной или фунгистатической эффективностью в отношении обоих исследованных видов грибов при тесте на агаризованной питательной среде отличались фунгициды дифеноконазол и коллоидное серебро. Не было выявлено штаммов, устойчивых к этим фунгицидам. Тиабендазол также отличался высокой эффективностью, однако среди *H. solani* были выявлены устойчивые штаммы. Флудиоксонил сильно ингибировал рост *C. coccodes* на начальном этапе, но при длительном культивировании на среде с флудиоксонилом гриб образовывал устойчивые сектора, причем при дальнейших пассажах на питательной среде с этим фунгицидом устойчивость сохранялась. Пенцикурон оказался неэффективным в отношении обоих исследованных видов. Азоксистробин показал достаточно хорошую эффективность в отношении всех исследованных штаммов *C. coccodes*; штаммы *H. solani* отличались вариабельностью в отношении этого фунгицида, был выявлен ряд устойчивых штаммов.

6. Обнаружены устойчивые к тиабендазолу штаммы *H. solani.* Все высокоустойчивые штаммы имели однонуклеотидные мутации в гене β-тубулина. Те же мутации ранее были отмечены у европейских и североамериканских устойчивых к тиабендазолу штаммов.

Связь работы с государственными программами

Работа по сбору, выделению и анализу образцов *C. coccodes* частично была поддержана грантом РФФИ № 15-29-02512 офи_м; секвенирование образцов выполнялось при частичной поддержке гранта РНФ №14-50-00029.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были доложены на 7 научных мероприятиях: Шестой межрегиональной научно-практической конференции "Современная индустрия картофеля: состояние и перспективы развития" (Чебоксары, 2014); Третьем Международном Микологическом Форуме

(Москва, 2015); 2 Всероссийской научной конференции с международным участием "Современное состояние, проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса" (Крым, г. Симферополь, 2016); Четвёртом съезде микологов России (Москва, 2017, три сообщения), на Совещании экспертов Евросоюза по листовым болезням картофеля Euroblight 2017 (Орхус, Дания), Международной научно-практической конференции "Современные проблемы и достижения в защите картофеля от болезней, вредителей и сорняков" (Московская обл., 2018) и на 22 международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2015" (Москва, 2015).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в базы WoS и Scopus, 2 статьи в журналах, входящих в ядро РИНЦ (RSCI), 8 – в других периодических изданиях и сборниках.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (разделы материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Материал изложен на 140 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 121 источник, в том числе 85 печатных работ иностранных авторов.

ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Болезни картофеля

Картофель возделывают в 130 странах мира; ежегодно собирают около 300 млн. т клубней. Доля России в мировом производстве картофеля составляет около 8 %, а его посадки у нас в стране занимают более 3,2 млн. га. Средняя урожайность картофеля в секторе ЛПХ и в большинстве мелких хозяйств не превышает 12 т/га. Одной из причин такого низкого урожая является ущерб, наносимый вредителями, сорняками и особенно — болезнями. В настоящее время насчитывают около 30 наиболее распространенных грибных болезней картофеля, среди которых фитофтороз, альтернариоз, фузариоз, ризоктониоз, серебристая парша, черная пятнистость и др., ежегодные потери урожая от которых составляют 10—60 % (Иванюк и др., 2005). Вследствие вегетативного размножения картофеля большинство поражающих культуру болезней передается через семенные клубни, которые и являются основным первичным источником инфекции для последующего заражения посадок (Анисимов и др., 2009). Картофель может поражаться возбудителями заболеваний до появления всходов, во время вегетации и в период хранения. Многие возбудители способны накапливаться и длительное время сохранять жизнеспособность в почве.

Из более 50 видов вредителей, повреждающих картофель, наиболее вредоносными и распространенными в России являются колорадский жук, тли, проволочники, а также картофельная и стеблевая нематоды. Вредители переносят ряд фитопатогенных микроорганизмов, среди которых вирусы, бактерии, оомицеты, грибы.

Причиной низкой урожайности культуры является и засоренность полей сорняками. Многие виды сорняков, особенно на ранних стадиях развития картофеля, конкурируют с ним за питательные вещества, свет и воду. Сорняки могут быть резерватами некоторых инфекций, а также создавать условия для поражения растений грибными и бактериальными болезнями.

Защитные мероприятия, предупреждающие развитие патогеных объектов на картофеле, должны быть дифференцированными, в зависимости от региона возделывания. При этом ведущая роль должна принадлежать профилактическим, агротехническим и организационно-семеноводческим мероприятиям, направленным на получение здорового посадочного материала (Анисимов и др., 2009). Как правило, необходима и химическая защита во время посадки, вегетации и хранения.

1.2. *Colletotrichum coccodes*

Несовершенный гриб *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes – один из опасных фитопатогенов, способный поражать не менее 35 растений-хозяев из 13 семейств, в том числе тыквенных, бобовых и пасленовых (Dillard, 1992; Chesters, Hornby, 1965). *C. coccodes* вызывает симптомы антракноза – появление язв на корнях, столонах, стеблях, плодах. Поражает также и листья, вызывая некрозы, окруженные желтой каймой. На клубнях он, как правило, вызывает симптомы серебристой парши – расслоение кожуры клубня, спорождающееся серебристым оттенком на поверхности пораженной ткани. Отличительным признаком поражения *C. coccodes* является наличие мелких точечных черных склероциев на пораженных частях, в связи с чем это заболевание клубней называют «черная пятнистость», или «black dot» (рис. 1.1).

Рис. 1.1. Поражение антракнозом клубня и стебля картофеля, плода томата (http://ephytia.inra.fr/en/C/21179/Potato-Symptoms, http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Article%20Images/anthracnose.jpg)

1.2.1. Источники первичной инфекции

Источниками первичной инфекции *C. coccodes* являются почва, растительные остатки и семенные клубни. Гриб способен перезимовывать в почве в виде склероциев, а в хранилище сохраняться на семенных клубнях и в растительных остатках в виде склероциев и мицелия (Farley,1976; Blakeman, Hornby, 1966; Hornby, 1968; Pantidou, Schroeder, 1955).

Пораженные клубни семенного картофеля являются важным фактором внедрения возбудителя в неинфицированные поля. Как только почва становится зараженной, она может действовать как эффективный источник инокулюма патогена. Изоляты *C. coccodes*, выделенные из искусственно зараженной почвы, вызывали симптомы антракноза на листьях картофеля, подтверждая значительную роль почвенной инфекции в заболеваемости черной пятнистостью (Barkdoll, Davis, 1992). Способность семенных клубней, пораженных *C. coccodes*, выступать в качестве источника заражения, была впервые показана в Канаде (Dickson, 1926). Когда инфицированные клубни были высажены в поле, растения росли значительно медленнее контрольных, а стебли и дочерние клубни имели симптомы антракноза. Исследование почвы и клубней, проведенное в штате Айдахо (США), показало, что *C. coccodes* был выделен со всех картофельных полей, обследованных в 1988 году, но не был найден в зонах естественной вегетации (Barkdoll, Davis, 1992). Другое исследование показало, что когда чистые семена были посеяны в поле, искусственно зараженное *C. coccodes*, дочерние клубни имели значительно большую степень пораженности, чем контрольные растения, выращенные в почве без искусственного заражения грибом (Read & Hide, 1988). Аналогичным образом, когда клубни были отобраны по степени пораженности антракнозом, а затем посеяны на поле, дочерние клубни от сильно зараженных семенных клубней оказались значительно более пораженными, чем растения, выращенные из здоровых клубней (Read, Hide, 1995a). Dashwood et al. (1992) обнаружили, что общая частота проявления инфекции *C. coccodes* в корнях растений, выращенных из

семенных клубней, была в два раза выше, чем в корнях микроклонально размноженных растений, что указывает на значительный вклад инокулюма клубневого происхождения в степень развития инфекции. Данные обследований семенного материала показывают наличие инокулюма *C. coccodes* в значительной доле семенных клубней. Так, пораженность антракнозом в большинстве сертифицированных семенных хранилищ картофеля из девяти штатов США и двух провинций Канады составила от 0 до 90% в 1994, и от 0 до 53% в 1995 году (Johnson et al., 1997). *C. coccodes* легко выделялся из запасов сертифицированного семенного картофеля сорта Superior в Индиане, США, когда участки клубня высевали на картофельно-декстрозном агаре (Komm, Stevenson, 1978).

Склероции *C. coccodes* способны сохраняться в почве в течение длительного периода времени (Farley, 1976; Blakeman, Hornby, 1966). Пятьдесят три процента микросклероциев *C. coccodes*, погруженных на глубину 2,5 см в суглинистую почву в теплице и поддерживаемых во влажном состоянии, остаются жизнеспособными в течение 83 недель. В противоположность этому, ни одна конидия не выжила более 3 недель, когда суспензию спор наносили на клейкую сетку и погружали в садовую почву (Blakeman & Hornby, 1966). Dillard & Cobb (1998) провели полевое исследование в Нью-Йорке, США, в ходе которого проводилось размещение микросклероциев *C.coccodes*, полученных из томата, на поверхности почвы и на глубине 10 и 20 см ниже поверхности. По истечении 8 лет оказались жизнеспособными 55, 91 и 92% микросклероциев на поверхности, глубине 10 см и 20 см соответственно. Cullen et al. (2002), используя метод обнаружения на основе ПЦР, обнаружили *C. coccodes* в естественно зараженных полевых почвах, собранных в трех различных участках Великобритании, на которых не выращивался картофель в течение 5, 8 и 13 лет. Жизнеспособность инокулюма патогена из всех трех участков была подтверждена посредством высадки здоровых растений картофеля.

Оптимальная температура для прорастания конидий составляет 22°C, менее 70% прорастает при 10 или 31°C, при температуре ниже 7°C прорастание не наблюдается. Наибольшей скорости роста культура достигала при 25 – 31°C, а оптимальные условия роста наблюдали при 28°C и pH 6 (Dillard, 1988).

В полупустынных регионах частые ураганы в начале вегетационного периода обладают большим потенциалом для широкого распространения *C. coccodes* (Johnson, 1994). Ряд исследований (Mohan et al., 1992; Johnson & Miliczky, 1993a; Tsror (Lahkim) et al., 1999b) показывает, что *C. coccodes* также следует считать патогеном, распространяемым воздухом. К другим потенциальным источникам инокулюма гриба относят растительные остатки (ботву) и альтернативные растения-хозяева. Когда поле засеивали здоровыми клубнями, а высушенные участки старых стеблей, инфицированных *C. coccodes*, касались свежевыращенных растений, это приводило к появлению микросклероциев на стеблях и преждевременной смерти растений (Dickson, 1926). Хотя этот эксперимент показал способность склероциев выживать на растительных остатках и вызывать заражение, остается неясным, как долго они могут сохранять жизнеспособность и вирулентность и будут ли такие растительные остатки являться источником болезни при севообороте.

Выявлено несколько альтернативных хозяев, которые могут стать источником инокулюма *C. coccodes* (Raid & Pennypacker, 1987; Eberlein et al., 1991). Рэйд и Пеннипаркер определили 15 видов сорных растений, которые выступали в качестве альтернативных хозяев для *C. coccodes* при проведении корневых и листовых инокуляций на томатных полях в Пенсильвании, США. Однако более 50% зараженных растений не несли симптомов болезни, в тех же случаях, когда симптомы возникали, они, как правило, проявлялись в виде неприметных хлоротичных или некротических пятен (Raid, Pennypacker, 1987). Это согласуется с работой Bremer (1954). Четыре изолята *C. coccodes*, вызвавшие поражения на листве картофеля, также колонизировали паслен черный (*Solanum nígrum*) и паслен волосистый (*Solanum villosum*), хотя

некоторые не вызвали никаких симптомов (Eberlein et al., 1991). Однако полный спектр хозяев *C. coccodes* пока остается неизвестным. Необходимы дальнейшие исследования для определения роли сорных растений в качестве хозяев и источников заражения в естественной среде.

Ввиду способности *C. coccodes* инфицировать альтернативных хозяев была проведена значительная работа (Wymore et al., 1988; Yu et al., 1997) для изучения возможности использования этого патогена в качестве селективного послевсходового биогербицида для контроля канатника Теофраста (*Abutilon theophrasti*), главного однолетнего сорняка пшеницы и сои в Северной Америке.

1.2.2. Культурально-морфологические характеристики

Изучение как макро- так и микроморфологических признаков входило в состав комплексных исследований ряда иностранных авторов (Zornitsa et al, 2013; Maziah, Bailey, 2000). Однако, работ по морфологическому описанию российских изолятов *C. coccodes*, выделенных с различных частей растения картофеля, пока нет.

Колонии *C. coccodes*, выращенные на искусственных средах, представлены преимущественно белым рассеянным воздушным мицелием и обильными черными микросклероциями, которые равномерно распределены по поверхности агара (Davis, Johnson, 2002).

Морфологической особенностью гриба *C. coccodes* является такой тип спороношения как ложе (ацервула) розового либо лососевого цвета, на котором образуются микросклероции. Еще одна примечательная морфологическая особенность данного гриба заключается в происхождении склероциев. В отличие от большинства образующих склероции грибов, склероции *C.coccodes* образуются из ложа, дифференцированного из стромы (Tu, 1989), и имеют придатки в виде щетинок.

Микросклероции представляют собой плотное сплетение меланизированных гиф и щетинок. Размер микросклероциев варьирует от

150 до 230 мкм (Blakeman, Hornby, 1966; Griffiths, Campbell, 1972; Sutton, 1992). По данным Zornitsa с соавторами (2013), размер склероциев *C. coccodes* на среде картофельно-декстрозный агар варьировал от 58 до 307 мкм (Zornitsa et al, 2013). Морфология микросклероциев может меняться в зависимости от конкретного изолята и субстрата. Возможно непосредственное прорастание микросклероциев для проникновения в тело хозяина посредством мицелия, либо формируется палисадный слой конидиеносцев, на которых образуются конидии (Sanogo, Pennypacker, 1997). Конидиеносцы септированные и разветвленные (McIntyre & Rusanowski, 1975). Конидиеносное ложе, полученное в культуре, а также на стеблях, корнях, плодах томата и клубнях картофеля, обычно ассоциированное с микросклероциями, имеет круглую или удлиненную форму и достигает 200-300 мкм в диаметре (McIntyre & Rusanowski, 1975).

Конидии гиалиновые, без перегородок, веретенообразные, резко сужающиеся к каждому концу, формируются в медово-оранжевых слизистых массах и имеют 16-24 мкм в длину и 3-4 мкм в ширину (Sutton, 1992). Типичным признаком для всех видов *Colletotrichum* является образование аппрессориев при прорастании конидий, которые могут развиваться на ростковой трубке (Котова, Кунгурцева, 2014). Конидии прорастают в течение 2-х часов, а меланизированные аппрессории могут образовываться через 22 часа (Byrne et al., 1997).

1.2.3. Симптомы и распространенность

Заболевания, вызываемые *C. coccodes*, встречается практически во всех регионах возделывания картофеля. Заражение растений может происходить в поле, в период формирования клубней, при уборке и во время хранения (Котова, Кунгурцева, 2014; Полуэктова и др., 2017). Развитию заболеваний способствуют такие факторы, как высокая температура и грубая текстурированная природа почвы, а также чрезмерное внесение удобрений. *C. coccodes* может поражать все подземные части (дочерние клубни, столоны

и корни), базальные стебли (Andrivon et al., 1997; Andrivon et al., 1998) и листья (Mohan et al., 1992; Johnson & Miliczky, 1993a; Johnson, 1994) растения картофеля. Заражение клубней картофеля *C. coccodes* вызывает развитие серебристых повреждений на поверхности клубней, сопровождающихся появлением характерных черных микросклероциев (Dillard, 1992). В этом случае симптомы заболевания очень похожи на серебристую паршу. Для идентификации и разделения серебристой парши и черной пятнистости требуется рассмотрение клубней с помощью лупы или микроскопа для обнаружения характерных для *C. coccodes* черных микросклероциев, или конидиеносцев *H. solani* (Errampalli et al., 2001a). До недавнего времени частота встречаемости и урон от черной пятнистости, возможно, были занижены, так как симптомы на клубнях часто ошибочно принимали за серебристую паршу, вызываемую *H. solani*. *C. coccodes* также может вызывать появление язв, часто мокрых, на клубнях и других частях растений. Оптимальная для развития болезни температура – +18…+22ºС.

Черная пятнистость картофеля широко распространена во всех регионах мира, где выращивается картофель, в том числе в Африке, Азии, Австралии, Северной и Южной Америке, Европе (Mordue, 1967). Большинство сообщений о болезни приходит из Северной Америки (Raid, Pennypacker, 1987), Европы (Andrivon et al., 1997), Австралии (Harrison, 1963), и Южной Африки, где заболевание преобладает из-за восприимчивости местных сортов (Denner, Marais, 1989). В Израиле в ходе исследования бактериальных и грибных заболеваний семенного картофеля импортного и отечественного происхождения было установлено, что до 34% партий, импортируемых из Голландии в 1998 году, были заражены антракнозом (Tsror (Lahkim) et al., 1999a). Согласно исследованию, проведенному в Великобритании в 1989-90 гг., антракноз, серебристая парша и черная парша встречались среди урожая картофеля в 75, 86 и 85% случаях соответственно (Read, Hide, 1995). На территории Великобритании были обнаружены различия в ареале распространения антракноза в зависимости от региона (Bradshaw et al., 2002).

Инспектирование урожая в Англии и Уэльсе в 1999 и 2000 гг. показало, что относительная частота встречаемости черной пятнистости картофеля варьировалось от 70 до 100% на юго-востоке и в среднегорье, до 18% на юго-западе и 8% на севере. Кроме того, авторы сообщают, что в Шотландии заболеваемость антракнозом встречается реже, чем, по крайней мере, на юго-востоке Англии.

Симптомы, вызванные *C. coccodes* на листве картофеля, обычно связаны с листовыми ранами, вызванными частичками почвы, в частности песком, принесенными порывами ветра. Они появляются сначала в виде «мокрых» повреждений, которые впоследствии приобретают оттенок от темно-коричневого до черного. Зараженные растения иногда увядают, а нижние и средние листья становятся хлоротичными (Mohan et al., 1992; Johnson, 1994).

Помимо поражения картофеля, *C. coccodes* также вызывает антракноз томата, характеризующийся впалыми увлажненными круглыми поражениями плодов (Dillard, 1989).

1.3. *Helminthosporium solani*

Helminthosporium solani Dur. et Mont. – возбудитель серебристой парши клубней картофеля (рис. 1.2). К роду *Helminthosporium* относят несовершенные грибы, у которых конидии образуются одновременно на вершине и по бокам конидиеносца.

Развитие серебристой парши опасно на семенных клубнях. При сильном поражении клубня почки отмирают и всходы не образуются, что приводит к изреживанию посадок.

Рис. 1.2. Поражение клубня картофеля серебристой паршой.

1.3.1. Источники первичной инфекции и жизненный цикл

Согласно имеющимся на данный момент литературным данным, источники первичной инфекции серебристой парши – мицелий и споры, сохраняющиеся на пораженных клубнях, в почве, растительных остатках, изоляции хранилища. В случае, если на поле ранее выращивали пораженный картофель, *H. solani* может сохраняться в почве в значительных количествах и служить на будущий год первичным инокулюмом, заражая клубни в почве (Merida, Loria, 1994; Rodriguez et al., 1996; Frazier et al., 1998).

Основным источником инокулюма *H. solani* считаются зараженные серебристой паршой семенные клубни (Burke, 1938; Santerre, 1972; Jellis, Taylor, 1977b; Hide, Adams, 1980); однако механизм передачи болезни от материнского семенного клубня дочерним недостаточно изучен. Косвенные данные свидетельствуют о том, что перенос инокулята может произойти, когда семенной клубень либо находится в непосредственном контакте с клубнями потомства, либо в непосредственной близости от них (Jellis & Taylor, 1977b). Первичная инфекция, которая возникает вскоре после прорастания семенных клубней, находится, как правило, на столонном конце клубня (Jellis & Taylor, 1977b). Первоначально поражаются несколько дочерних клубней, расположенные близко к семенному клубню. Ограничивающим фактором дальнейшей передачи болезни является пространственное разделение (Firman & Allen, 1995b).

Способность *H. solani* перезимовывать в почве была оценена в процессе полевых исследований в двух районах штата Нью-Йорк (США) в 1992 году. Полевые участки были заложены на тех полях, где урожай инфицированного патогеном картофеля был получен в 1991 году. Растения, полученные из свободных от патогенов клубней четырех сортов, дали клубни, зараженные паршой серебристой. На некоторых участках были заражены до 61% клубней (Merida, Loria, 1994).

Предпосадочная обработка эффективными фунгицидными препаратами или даже посадка здоровых клубней не гарантируют отсутствия серебристой парши на клубнях нового урожая. Так, конидии *H. solani* обнаруживались в почве, содержащей остатки урожая картофеля (Rodriguez et al., 1996). В эксперименте, проведенном Bains с соавторами (1996), неинфицированные *H. solani* миниклубни были высажены на поле, где никогда не выращивали картофель, а также на полях, где выращивали картофель один, два, три года назад. В результате во всех случаях часть клубней нового урожая была поражена серебристой паршой. Исследования Еланский, Иванова, Пуздри (неопубликованные данные) также показали, что потомство здоровых миниклубней, высаженных на лесной делянке (серая лесная почва, тяжелый суглинок), где никогда не выращивали картофель, поразилось серебристой паршой (поразились отдельные клубни 5 кустов из 30 высаженных). С другой стороны, потомство тех же миниклубней, высаженных на аналогичной делянке с легкой песчаной торфянистой почвой, не поразилось серебристой паршой (Кутузова и др., 2016).

Burke (1938) в своих работах показал, что батат, репа, свекла, пастернак и морковь не являлись растениями-хозяевами для *H. solani*. Kamara и Huguelet (1972) проводили испытания с 22 видами растений из девяти семейств, которые также не заражались *H. solani*. Эксперименты Merida и Loria (1994), проведённые в лабораторных условиях *in vitro*, показали возможность колонизации *H. solani* стареющей ткани листьев ряда культур. Отдельно взятые листья десяти культур опрыскивали суспензией спор *H.*

solani и инкубировали в течение 20 дней. *H. solani* колонизировал и спорулировал на стареющей ткани листьев люцерны, сорго, ржи, овса, кукурузы и пшеницы, и только колонизировал отмирающую ткань семян рапса, красного клевера и гречихи. Никакого роста не наблюдалось на листьях картофеля. Эти результаты показывают способность *H. solani* к сапротрофному росту на растительных остатках.

Для эпидемиологии *H. solani* важно и то, что клубни могут заражаться не только в процессе вегетации, но и в процессе хранения. Инокулюм *H. solani* может сохраняться и в пустом хранилище. Эксперименты показали, что споры *H. solani* оставались жизнеспособными в хранилище не только в остатках почвы, но и в пеноизоляции в течение 9 месяцев (Frazier et al., 1998). После загрузки хранилища споры перемещаются с воздушными потоками, создаваемыми работой системы вентиляции, и заражают здоровые клубни (Rodriguez et al., 1993). Пораженные клубни, привезенные с поля или заразившиеся в хранилище, сами служат источником инфекции и увеличивают вероятность заражения здоровых клубней в процессе хранения.

Основным методом борьбы с серебристой паршой является обработка клубней фунгицидными препаратами, а также поддержание температурно-влажностных режимов во время хранения (Кутузова и др., 2016). Однако, грибам родам *Helminthosporium* свойственна большая изменчивость и быстрое приспособление к новым сортам растений-хозяев. Изучение вариабельности культуральных и микроморфологических признаков, также как и молекулярной гетерогенности фитопатогенных видов грибов, важно для оценки эволюционного потенциала патогена, его способности образовывать агрессивные и устойчивые к фунгицидам расы.

1.3.2. Культурально-морфологические характеристики

Колонии от темно-коричневых до черных, воздушный мицелий слабо развитый, темноокрашенный. Конидиеносцы одиночные, простые, прямые или извилистые, темно-коричневые, цилиндрические или шиловидные,

гладкие или мелкобородавчатые с порой на верхушке и сбоку, до 600 мкм в длину, 9–15 мкм в толщину. Конидии одиночные, прямые или согнутые, обратно-булавовидные, от бесцветных до коричневых, гладкие, с 2–8 ложными поперечными перегородками, размером 24–85 х 7–11 мкм (в среднем 39 х 9,4 мкм), суживающиеся до 2–4 мкм у вершины, расположенные в несколько ярусов мутовками по 2–4, верхушечные и боковые. Боковые часто образуются в мутовках сквозь очень мелкие поры под перегородками, пока верхушка активно растет, а рост конидиеносца прекращается. У основания конидий часто выступает темно-коричневый рубчик (Lutrell, 1964; Hunger, McIntyre, 1979).

Конидии способны прорастать в капельно-жидкой влаге при температуре от 6 до 32°С (оптимум 18-20°С при pH воды 7,0-8,0). Максимальное спорообразование происходит при температуре +18…+20°С и влажности 85-100%. Конидии быстро теряют жизнеспособность после отчленения от конидиеносцев: через 1 час при 20°С и 90% влажности сохраняются живыми около трети всех конидий, через 24 часа – только 10% (Lutrell, 1964).

1.4. Борьба с клубневыми инфекциями

Методы защиты растений

В борьбе с болезнями и вредителями растений используют различные методы защиты:

профилактические – направлены на предупреждение, подавление или уничтожение первичной инфекции, от которой начинается развитие болезней;

агротехнические – основаны на создании оптимальных условий для роста и развития сельскохозяйственных растений; важные компоненты данного метода: севооборот, выбор участка и обработка почвы, сроки посадки, защитные обработки, пространственная изоляция;

селекционные – выращивание устойчивых сортов растений, они являются экономически эффективным, экологически безопасным элементом интегрированной защиты (Мыца, 2015);

биологические – предполагают внедрение антагонистических для фитопатогенов микроорганизмов и использование активаторов устойчивости растений к болезням (Анисимов и др., 2009);

химические – заключаются в проведении истребительных мероприятий перед посадкой, во время вегетации и хранения.

Последние являются главным оружием борьбы человека с возбудителями эпифитотий. Современная химическая промышленность предлагает широкий ассортимент различных препаратов для борьбы с фитопатогенами, однако для достижения нужного эффекта и сохранения урожая необходимо знать свойства и особенности препаратов, соблюдать сроки и регламенты их применения.

Химический метод защиты растений

Бурное развитие химии во второй половине прошлого века привело к тому, что химический метод борьбы с вредителями, патогенами и сорняками в защите растений вышел на ведущее место. Основой химического метода являеся использование пестицидов.

Пестицид – вещество (или смесь веществ) химического или биологического происхождения, предназначенное для уничтожения нежелательных организмов – насекомых, грызунов, сорняков, возбудителей болезней растений и животных; а также используемое в качестве дефолианта, десиканта и регулятора роста (Клисенко, 1984).

Современные пестициды классифицируют в зависимости от характера действия на возбудителей болезней, химической природы и способов применения, иногда по степени сродства с водой, которое определяется физико-химическими свойствами вещества, а также по химическому составу, объектам применения, и способу проникновения в организм и характеру

(специфике) действия (Kleczewski, Egel, 2012, Груздев, 1987). Любая классификация носит условный характер.

Один и тот же пестицид может действовать по-разному в зависимости от вида растения, возбудителя, дозы, способов и сроков применения и иметь при этом побочный эффект.

По химическому составу выделяют три основные группы пестицидов:

1. Неорганические соединения (соединения ртути, фтора, бария, серы, меди, серебра, а также хлораты и бораты).
2. Препараты растительного, бактериального и грибного происхождения (пиретрины, бактериальные и грибные препараты, антибиотики и фитонциды) (Груздев, 1987).
3. Органические соединения – наиболее обширная группа, к которой относятся пестициды высокой физиологической активности (Груздев, 1987).

В зависимости от назначения пестицидов различают: **инсектициды** – вещества для уничтожения насекомых-вредителей; **фунгициды –** средства борьбы с грибными патогенами растений; **гербициды** – средства для уничтожения сорных растений; **акарициды** – препараты, уничтожающие клещей; **бактерициды** – средства, применяемые для борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений; **зооциды** – вещества, используемые для уничтожения грызунов; **нематоциды** – препараты для уничтожения круглых червей (нематод); **лимациды** – средства для уничтожения моллюсков. К сельскохозяйственным ядохимикатам относят также **дефолианты** – вещества, предназначенные для удаления листьев растений перед механизированной уборкой; **десикканты** – средства для предуборочного подсушивания растений; **дефлоранты** – вещества, уничтожающие избыточное количество завязей и соцветий на растениях, и др. (Мартыненко, 1992).

По подвижности в растении пестициды делятся на:

Контактные – вызывающие гибель вредного объекта при контакте препарата с любой его частью. В растение не проникают, но могут длительно находиться на поверхности, уничтожая прорастающие споры и вредных насекомых.

Системные – способные перемещаться по сосудистой системе растения и, таким образом, воздействовать на вредоносные организмы во всех частях растения.

Трансламинарные – распространяющиеся в пределах одной листовой пластинки (Анисимов и др., 2009).

По характеру действия на возбудителей болезней фунгициды подразделяют на два типа:

Защитные (профилактические). Защитные фунгициды уничтожают прорастающие споры и мицелий, находящиеся на поверхности листа или другого органа. Защитными фунгицидами могут быть контактные, трансламинарные и системные препараты.

Лечащие (терапевтические, куративные, искореняющие, истребительные). Уничтожают органы гриба, находящиеся внутри растения. Лечащим эффектом могут обладать только системные препараты, проникающие внутрь растения.

Классификация по механизму действия

Еще одной, но не менее важной является классификация фунгицидов по биохимическому механизму действия, показывающая, каким образом фунгициды подавляют гриб-мишень, на какие специфические биохимические процессы этого гриба влияет фунгицид. Примерами воздействия является повреждение клеточных мембран, инактивация ряда ферментов, взаимодействие с ключевыми процессами, происходящими в клетке.

Фунгициды подразделяют на две большие группы по спектру метаболической активности. Различают сайт-специфические и мультисайтовые фунгициды.

Сайт-специфические (моносайтовые) фунгициды

Активность фунгицида направлена только против одного из метаболических путей гриба или против единичного фермента, необходимого грибу и т.д. Фунгициды такого типа влияют на синтез липидов, стеролов, белков, аминокислот и мРНК, дыхание, осморегуляцию и митотическое деление клеток и другие процессы. Поскольку влияние оказывается только на один ген, в нем достаточно легко может возникнуть мутация, приводящая к появлению устойчивости у патогена (мутация устойчивости). На практике с целью антирезистентной стратегии такие фунгициды применяют только в смеси с другими, олиго- или полисайтовыми фунгицидами.

Мультисайтовые фунгициды

Мультисайтовые фунгициды являются контактными и применяются на поверхности листьев и стеблей, рассматриваются как защитные и профилактические фунгициды (Mueller, Bradley, 2008). Они имеют широкий спектр контролируемых заболеваний. Эта группа фунгицидов включает неорганические элементы (соединения меди, серы, серебра), дитиокарбаматы (манкоцеб) и хлоронитрилы (хлороталонил) и применяется для обработки полевых культур. Контактные фунгициды влияют на многие биохимические центры гриба, что приводит к гибели гриба и не развивает устойчивости к фунгицидам. Риск возникновения устойчивости к контактным фунгицидам очень низкий. Как правило, контактные мультисайтовые фунгициды обладают непродолжительным защитным эффектом – 5-7 дней.

Классификация пестицидов по токсичности

Важным источником возможного загрязнения окружающей среды могут являться химические пестициды, которые используют для борьбы с различными вредными организмами в сельском хозяйстве и в промышленности.

Из-за того, что пестициды являются биологически активными веществами, к их поведению в окружающей среде предъявляются определенные требования, обеспечивающие наибольшую эффективность их использования и наименьшую токсичность для человека и полезных животных и растений (http://www.pesticidy.ru/dictionary/pesticide).

Все современные пестициды распределяются на 4 группы по воздействию на организм человека (рис. 1.3).

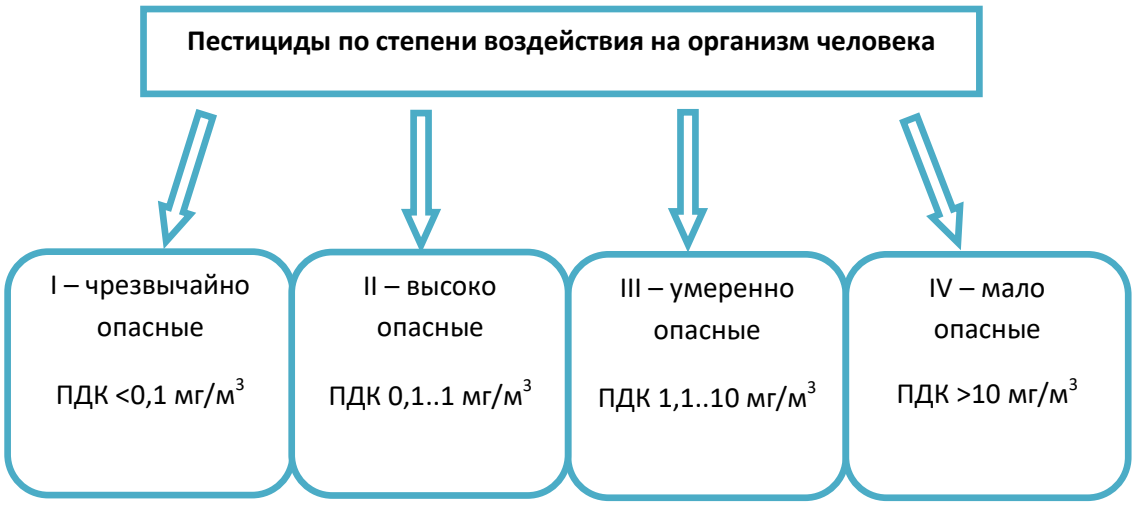

Рис. 1.3. Классификация фунгицидов по токсичности
(http://www.pesticidy.ru/dictionary/pesticide)

Класс опасности пестицидов необходимо учитывать при выборе препаратов для защиты сельскохозяйственных культур, при установлении длительности рабочей смены, при выборе средств индивидуальной защиты.

Пестициды **1 класса** опасности не рекомендуются для применения в народном хозяйстве, их использование возможно только специалистами в исключительных случаях. Их розничная продажа запрещена.

Пестициды **2 класса** опасности в случае необходимости применяются только специалистами по защите растений или под их контролем лицами, имеющими специальную профессиональную подготовку. Розничная продажа препаратов разрешена только лицам с профессиональной подготовкой.

Пестициды **3 и 4 классов** опасности используются в соответствии с установленными регламентами. Запрещена продажа пестицидов 3 класса опасности в неспециализированных торговых точках.

Часть 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Выделение и анализ изолятов *H. solani* и *C. coccodes*

Для выделения чистых культур фитопатогенных микроорганизмов пораженные части растений закладывали во влажные камеры. После появления спороношения на поверхности пораженного органа его микроскопировали под бинокулярным микроскопом и остро заточенной стерильной препаровальной иглой переносили конидии, характерные для *H. solani*, или микросклероции (при выделении *C. coccodes*) на агаризованную среду на основе пивного сусла или агаризованную овсяную среду с добавлением пенициллина (бензилпенициллина натриевая соль 1000 ед/мл) и инкубировали до тех пор, пока диаметр колонии не достигал 4-5 см (3-4 для *H. solani*), после чего кусочек активно растущего мицелия с края колонии переносили на другую чашку Петри со средой. Процедуру повторяли до получения микробиологически чистой колонии, после чего с края колонии очищенной культуры брали агаровый блок с мицелием и переносили его на скошенную агаризованную среду в пробирке (агаризованная среда на основе пивного сусла или агаризованная овсяная среда). После инкубации в течение 7 – 10 дней (для *H. solani*) и 3 – 4 дней (для *C. coccodes*) пробирку переносили в холодильник (+4°С) для хранения.

Приготовление питательных сред

Агаризованная среда на основе пивного сусла

Для выделения чистых культур, определения устойчивости к фунгицидам и хранения коллекционного материала использовали агаризованную среду на основе пивного сусла (сусло-агар).

Для приготовления 1 литра сусло-агара 150 мл 7% пивного сусла разводили в 850 мл дистиллированной воды. На литр среды добавляли 12-15 г агар-агара, все тщательно перемешивали. Среду стерилизовали, автоклавируя при 1 атмосфере в течение 30 минут.

Агаризованная овсяная среда

Для выделения *H. solani* и тестирования скорости роста *C. coccodes* при разных температурах, а также для хранения коллекционного материала использовали овсяную агаризованную среду.

Овсяную агаризованную среду готовили из овсяных хлопьев: 120 г хлопьев заливали 1л дистиллированной воды и кипятили на водяной бане. Отвар фильтровали через марлю, доводили до 1 л дистиллированной водой, после чего добавляли агар-агар из расчета 12-15 г/л, все тщательно перемешивали. Среду стерилизовали, автоклавируя при 1 атмосфере в течение 30 минут.

Жидкая гороховая среда

На жидкой гороховой среде наращивали биомассу для выделения ДНК. Жидкую гороховую среду готовили из замороженного горошка: 250 г горошка варили в течение 5 минут в 1 л кипящей воды, затем отвар фильтровали через марлю, доводили до литра дистиллированной водой. Среду стерилизовали, автоклавируя их при 1 атмосфере в течение 30 минут.

Картофельно-декстрозный агар (PDA)

Данную среду использовали для оценки роста, а также макро- и микроморфологии колоний *C. coccodes*. Твердую картофельно-декстрозную среду готовили из замороженного картофеля: 200 г ломтиков картофеля варили в течение 10 минут в 1 л кипящей воды, затем отвар фильтровали через марлю, доводили до литра дистиллированной водой. Среду стерилизовали, автоклавируя при 1 атмосфере в течение 30 минут.

2.1.1. Происхождение изолятов *H. solani* и их анализ

Одной из задач настоящей работы был сбор коллекции штаммов *H. solani* и *C. coccodes*. В период с 2012 по 2018 годы коллекция *H. solani* ежегодно пополнялась изолятами, выделенными из образцов пораженных

клубней картофеля из различных регионов России и Европы. В результате, на данный момент собрана коллекция, содержащая 225 штаммов данного фитопатогена. Штаммы были выделены автором и сотрудниками кафедры Микологии и Альгологии с клубней картофеля, привезенных в разные года из Московской, Костромской, Брянской и Владимирской областей, а также из республики Чувашия. Кроме того, в коллекции присутствуют изоляты, выделенные из пораженных семенных клубней сортов Дельфине, Эстрелла, Альвара, Сафия, привезенных из двух районов Германии и из Голландии. Места сбора образцов приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1.

Общий список коллекции изолятов *H. solani*

Место сбора образцов	**Количество выделенных штаммов**	**Год сбора и выделения**
Российские штаммы		
Московская область, Шатурский район	47	2013
Костромская область, с. Стрельниково	40	2013
Брянская область	16	2013
Костромская область, Сусанинский район	22	2014
Владимирская область, Гусь-Хрустальный район	2	2014
Московская область, Солнечногорский район	19	2014
Республика Чувашия	7	2014
Костромская область, Сусанинский район	24	2015
Магадан, Сусуманский район	4	2017
Штаммы из импортированного семенного картофеля		
Германия, пос. Брезен	29	2013
Германия, г. Бад Швартау	13	2013
Голландия	2	2013
Итого	**225**	2013-2017

В работе по изучению внутривидового разнообразия и оценке устойчивости к фунгицидам были протестированы 27 штаммов *H. solani*, выделенных из пораженных клубней, собранных в Московской, Брянской, Костромской областях, в республике Чувашия, а также из импортированных из Нидерландов и Германии семенных клубней. Для всех участвовавших в исследовании штаммов была потверждена видовая принадлежность (рис. 2.1) с использованием видоспецифичных праймеров Hs1NF1/ Hs2NR1 (Таблица 2.6). У 26 штаммов определены последовательности нуклеотидов участка ДНК ITS1-5,8S-ITS2; у 17 штаммов – гена β-тубулина; 22 изолята протестированы на устойчивость к фунгицидам тиабендазол (препарат Текто), дифеноконазол (Скор), азоксистробин (Квадрис), коллоидное серебро (Зерокс) (таблица 2.2).

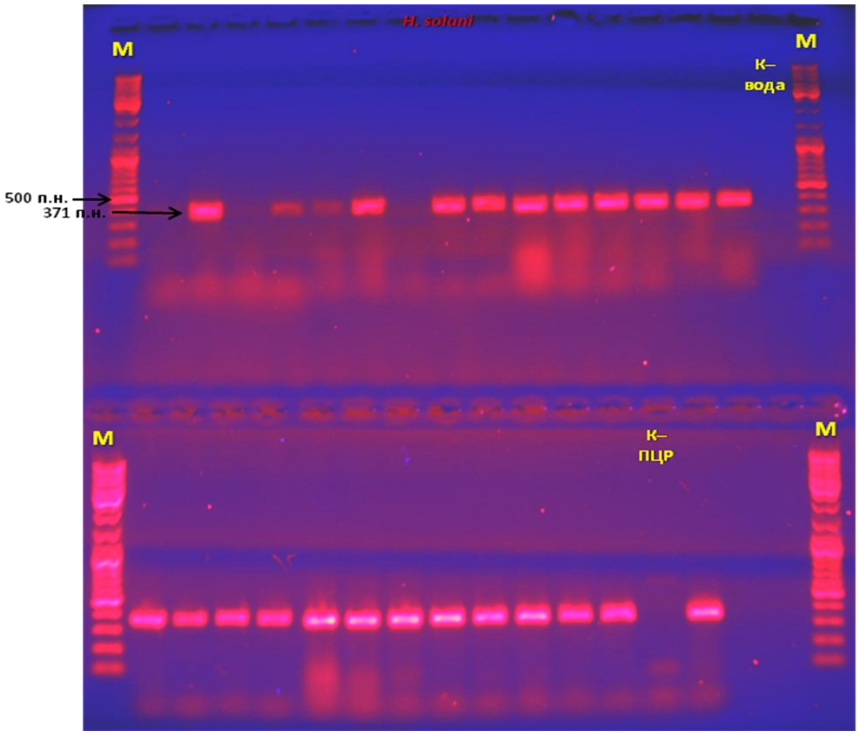

Рис. 2.1. Амплификация штаммов *H. solani* с видоспецифичными праймерами Hs1NF1/ Hs2NR1

Таблица 2.2.

Происхождение и анализ использованных в работе штаммов *H. solani*

Штамм	**Место сбора, сорт картофеля, год выделения**	**Секвени-рование участка ITS1-5,8S-ITS2**	**Секвениро-вание гена β-тубулина**	**Оценка устойчивости к фунгицидам***
H13RB5	Брянская обл., Погарский р-н, Розара, 2013	–	–	**З**
H13RB7		+	+	**З,Т,С,К**
H13RB11		+	+	**З,Т,С,К**
H14RMC2	Московская обл., Солнечногорский р-н, Невский, 2014	+	+	**З,Т,С,К**
H14RMC5		+	–	**З,Т,С,К**
H14RMC24		+	+	**З,Т,С,К**
H13RML4d	Московская обл., Люберецкий р-н, Жуковский ранний, 2013	+	+	**З,Т,С,К**
H13 RM 10		+	–	**З**
H13 RM 23		+	–	**З**
H13RML32d		+	–	**З,Т,С,К**
H13RML42		+	–	**З,Т,С,К**
H13RK39	Костромская обл., Костромской р-н, Удача, 2013	+	–	**З,Т,С,К**
H13RK68		+	+	**З,Т,С,К**
H14RKS2/2	Костромская обл., Сусанинский р-н, Альвара, 2014	+	+	**З,Т,С,К**
H13RKS7	Костромская обл., Сусанинский р-н, Дельфине, 2014	+	–	**З,Т,С,К**
H14RKS10	Костромская обл., Сусанинский р-н, Сафия, 2014	+	+	**З,Т,С,К**
H14RKS18		+	–	**З,Т,С,К**
H14RCh1	Чувашия, Комсомольский р-н, Удача, 2014	+	+	**Т**
H14RCh8		+	+	**З,Т,С,К**
H13H16	Нидерланды, Астерикс, 2013	+	+	**З,Т,С,К**
H13H28		+	–	**З,Т,С,К**
H13GAl3	Германия, Альвара, 2013	+	+	**З,Т,С,К**
H13GDe11	Германия, Дельфине, 2013	+	+	**З,Т,С,К**
H13GEs12	Германия, Эстрелла, 2013	+	+	**Т**
H13GSa18	Германия, Сафия, 2013	+	+	**З,Т,С,К**
H13GSa20		+	+	**З,Т,С,К**
H13GSa21		+	+	**З,Т,С,К**

Прим.: * – *аббревиатуры названий препаратов: Т – Текто (ДВ – тиабендазол), С – Скор (дифеноконазол), К – Квадрис (азоксистробин), З –Зерокс (коллоидное серебро).*

2.1.2. Происхождение изолятов *C. coccodes* и их анализ

Клубни с симптомами поражения черной пятнистостью были отобраны из семенного и продовольственного картофеля в Костромской области, Гусь-Хрустальном районе Владимирской области, а также Люберецком и Солнечногорском районах Московской области. Кроме того, пораженные клубни были взяты из семенного материала сортов Дельфине, Эстрелла, Альвара, Сафия, привезенного из двух регионов Германии (Брезен и Бад Швартау) (таблица 2.3).

Таблица 2.3.

Общий список коллекции изолятов *C. coccodes*

Регион	**Количество штаммов**
Российские штаммы	
Московская область, Солнечногорский район	2
Московская область, Люберецкий район	8
Московская область, Голицино	6
Костромская область	20
Владимирская область	4
Республика Марий-Эл (лист картофеля)	3
Краснодарский край, Крымский р-н (плод томата)	2
Европейские штаммы	
Германия, Брезен	15
Германия, Бад Швартау	3
Голландия	1
Итого	**64**

C. coccodes, в отличие от возбудителя серебристой парши *H. solani*, способен поражать не только клубни, но и другие части растений картофеля, а также томат. В 2014 и 2016 годах были выделены изоляты из листьев картофеля, привезенных из Марий Эл; в 2015 – из стеблей необрабатываемого фунгицидами картофеля, выросшего на тестовом поле ВНИИ фитопатологии. В 2017 году нам удалось выделить изоляты из пораженных плодов томата, выросших на поле в Краснодарском крае.

На данный момент коллекция представлена 64 изолятами *C. coccodes*, выделенными с клубней, стеблей и листьев картофеля, а также из плодов томата. Для уточнения видовой принадлежности все исследованные штаммы амплифицировали с видоспецифичными праймерами Cc1NF1/Cc2NR1 (Таблица 2.6, рис. 2.2.).

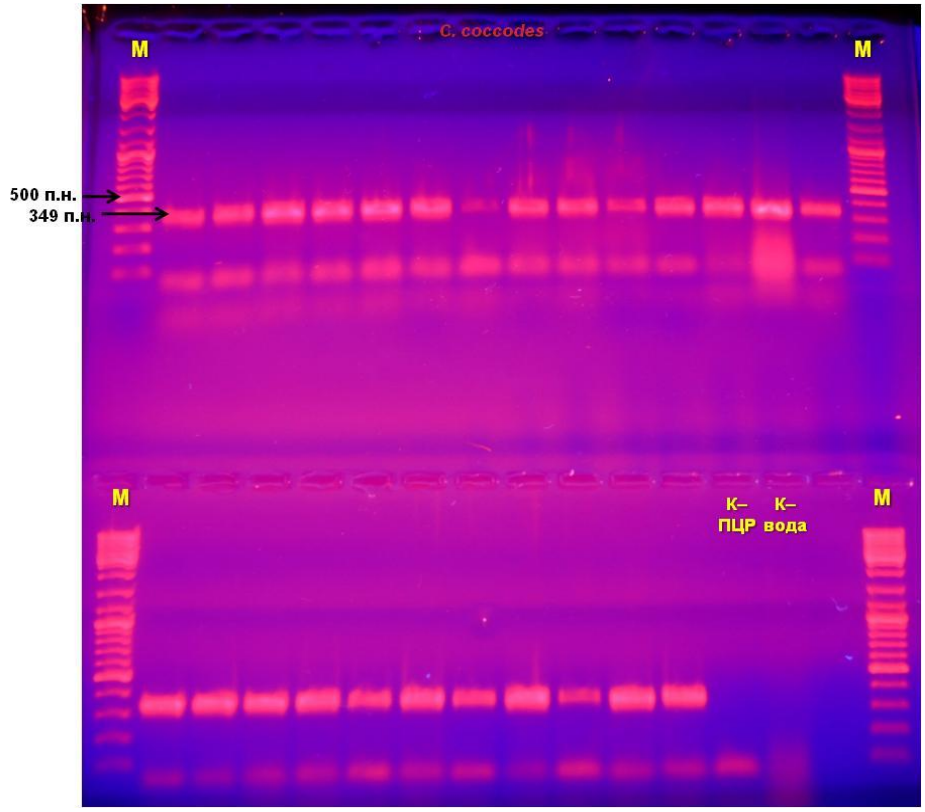

Рис. 2.2. Амплификация штаммов *C. coccodes* с видоспецифичными праймерами Cc1NF1/Cc2NR1.

Коллекционные изоляты исследованы по разным показателям: устойчивость к фунгицидам, микроморфология, скорость роста при разных температурах, структура последовательностей ДНК. Всего на устойчивость к фунгицидам протестированы 44 изолята, оценка скорости роста при разных температурах проведена у 17 изолятов, исследована микроморфология у 11, структура специфичных последовательностей ДНК определена у 51 штамма (таблица 2.4).

Таблица 2.4.

Происхождение коллекционных изолятов *C. coccodes*, использованных в работе и их проанализированные свойства

Штамм	Происхождение штаммов	Микро-морфология на среде PDA	Скорость роста на сусло-агаре при разных температурах	Фунгициды*	Отсеквенированные последовательности ДНК**
C13 VT 1/1	Владимирская обл, Гусь-Хрустальный р-н, пос. Мезиновский. Сорт Удача, 2013 г.	–***	+	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 VT ½		–	–	Т, П,	ITS, GD, ACT
C13 VT 1/2 C1		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 VT 2/1		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 KT 4	Костромская обл., Стрельниково. Сорт Удача, 2013 г.	–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 KT 4/2		–	–	Т, П, К, С	–
C13 KT 7b		–	–	Т, П, К, С	ITS, GD, ACT
C13 KT 11		+	+	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 13		–	–	Т, П, К	ITS, GD,
C13 KT 14		–	–	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 15		+	+	З, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 16		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 KT 17		–	–	З, Т, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 21		–	–	Т, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 29		–	–	Т, П, К, С	–
C13 KT 33		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 KT 34		–	–	Т, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 KT 36		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 KT 37		–	–	Т, П, К, С	ITS, GD, ACT

C13 КТ 47a		–	–	Т, П, К, С	GD
C13 КТ 47b		–	–	Т, П, К, С	GS, ACT
C13 КТ 58/1		–	–	З, Т, П, К, С	–
C13 КТ 58b		–	+	З, Т, М, П, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 КТ 65		–	–	Т, П, С	–
C13 НРТ 29/2	Семенной картофель из Голландии, 2013 год.Сорт Астерикс	+	+	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gde 8/2	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен (51.88.00 сш, 12.22.00 вд). Сорт Дельфине. 2013 г.	+	+	З	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gde 9		–	–	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gde 12		–	–	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gde 20		–	+	З, Т, М, П, К, С	ITS, GD, ACT
C13 Gde 23		–	–	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Ges 6	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен. Сорт Эстрелла. 2013 г.	–	+	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Ges 18		–	–	З, Т, М, П, К, С	ITS
C13 Ges 19		+	+	З, Т, М, П, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gal 15	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен. Сорт Альвара 2013 г.	–	–	З, Т, М, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gal 19		–	–	З, Т, М, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gal 20		–	–	З, Т, М, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gal 22		–	–	З, Т, М, П, К,	–
C13 Gal 23		+	+	З, Т, М, П, К,	GS, ITS,GD, ACT
C13 Gal 24		–	+	З, Т, М, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gsa 5	Семенной картофель из Германии, г. Бад Швартау (53.55.10 сш, 10.41.51 вд). Сорт Сафия 2013 г.	+	+	–	GS, ITS, GD, ACT
C13 Gsa 21		–	–	З, Т, М, П,	ITS, GD, ACT
C13 Gsa 29		+	+	З, Т, М, П, К,	GS, ITS, GD, ACT
C14 МСТ 6	Московская обл., Солнечногорский р-н,	+	+	З, К, С	GS, ITS, GD, ACT

C14 MCT 18/2	пос. Чашниково. Сорт Невский, 2014 г.	–	+	З, К, С	GS, ITS, GD, ACT
C14 MEL 11	Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола. Лист картофеля, 2014 г.	+	+	З, М, П, С	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 1	Московская обл., Люберецкий р-н, ВНИИ картофельного хозяйства, клубни картофеля. 2015 г.	–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 1/2		–	–	–	**GS, ITS, GD, ACT**
C15 MLT 4a		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 4b		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 5		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 6		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C15 MLT 7		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C16 MGS 9	Московская обл., пос. Большие Вяземы, ВНИИ фитопатологии. Стебли картофеля. Сорт Ред Скарлет. 2016 г.	–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C16 MGS 10a		–	–	–	GS, GD, ACT
C16 MGS 10b		–	–	–	GS,
C16 MGS 15		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C16 MGS 16a		–	–	–	GS,
C16 MGS 16b		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C16 MEL 3	Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола. Лист картофеля, 2016 г.	–	–	–	GS, GD,
C16 MEL 7		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT
C17 KTF 5/14	Краснодарский край, Крымский р-н, плод крупноплодного томата, 2017 г.	+	+	–	GS, ITS, GD, ACT
C17 KTF 5/2		–	–	–	GS, ITS, GD, ACT

Прим.: * - *фунгициды: З - Зерокс, Т - Текто, М - Максим, П - Престиж, К - Квадрис, С - Скор;*

** - *последовательности ДНК: GS - ген глутамин-синтетазы, ITS - ITS1-5,8S-ITS2, GD - ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, ACT - ген актина.*

*** *«–» - не исследовали.*

2.2. Выделение ДНК.

Выделение ДНК проводили по модифицированной методике Гриффитса и Шоу (Griffith, Shaw, 1998, Kutuzova et al., 2017). На жидкой гороховой среде наращивали мицелиальные маты *C. coccodes* и *H. solani*, маты подсушивали на фильтровальной бумаге, после чего замораживали при –18°С. Для выделения ДНК из кожуры клубней картофеля стерильным скальпелем срезали кусочек кожуры, помещали его в стерильную микропробирку на 1,5 мл и также замораживали при –18°С. Дальнейшие манипуляции по выделению ДНК как из растительных материалов, так и из мицелия чистой культуры гриба были одинаковы. Часть замороженного образца (примерно 0,25 мл) растирали с жидким азотом в ступке, предварительно промороженной. Растертый материал переносили в микропробирку на 1,5 мл. В нее добавляли 800 мкл лизирующего CTAB-буфера и все перемешивали на вортексе.

CTAB-буфер (на 1 литр):	TRIS Ph 8,0	100mM
	NaCl	1,4M
	EDTA Ph 8,0	20mM
	CTAB solid	2% (W/V)

После перемешивания смесь инкубировали в течение часа на водяной бане при температуре 65^{o}C; каждые 20 минут перемешивали на вортексе. После инкубации центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин, полученный супернатант переносили в чистую микропробирку. К нему добавляли 500 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе и центрифугировали 10 минут при той же скорости. После центрифугирования опять отбирали супернатант и переносили в чистую микропробирку. На этом этапе добавляли 400 мкл изопропанола + CH_3COOK (1/10 объема, 5М, pH=4,6), аккуратно перемешивали (вручную) и центрифугировали 10 минут при той же скорости. Супернатант сливали, а полученный осадок промывали охлажденным 70% этанолом. Ценрифугировали в течение 5 минут при 7000 об/мин, спирт сливали, процедуру повторяли несколько раз, остатки спирта

удаляли фильтровальной бумагой, осадок высушивали в течение 2-3 часов. Затем осадок ресуспендировали в 50 мкл ТЕ-буфера или деионизованной воды (Kutuzova et al., 2017).

2.3. Проведение ПЦР и секвенирование маркерных последовательностей ДНК.

Амплификацию проводили при помощи амплификатора «Biometra T1». Для проведения ПЦР использовали микропробирки на 250 мкл; реакционная смесь представлена в таблице 2.5.

Таблица 2.5.

Состав ПЦР-смеси.

Компонент смеси	**Количество на одну пробирку (мкл)**	**Финальная концентрация**
10x PCR buffer (поставляется в наборе с Taq-полимеразой «Helicon»	2,5	1x
25mM Mg^2 (входит в состав буфера)	2	2,0 mM
Taq-полимераза, 5U/ml	0,5	
dNTP mix	0,5	0,2 mM каждого dNTP
Праймер 1	0,4	1 μM
Праймер 2	0,4	1 μM
Деионизированная вода	19,5	
Раствор ДНК	1	4 нг/мкл
Общий объем реакционной смеси	25	

Объем реакционной смеси во всех случаях составлял 25 мкл. Все праймеры, использованные в работе, были изготовлены на заказ в компании «Евроген».

Для оценки внутривидовой изменчивости и дополнительного подтверждения видовой принадлежности коллекционные изоляты грибов амплифицировали с парой праймеров ITS 4 и ITS 5 (табл. 2.6). Данная пара пріймеров ограничивает участок ядерных рибосомных генов: часть малой (18S), большой (26S) и 5,8S субъединиц рДНК, а также межгенные транскрибируемые спэйсеры (ITS1 и ITS2) (рис. 2.3).

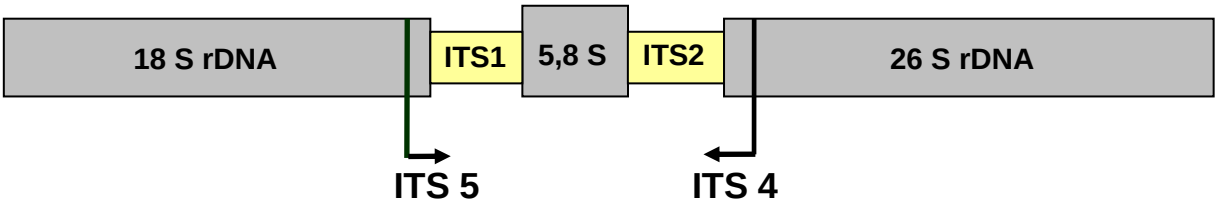

Рис. 2.3. Схема строения ядерных рибосомных генов (стрелками обозначена локализация ITS5- ITS4 праймеров).

Таблица 2.6.

Праймеры, использованные в работе с *H. solani* и *C. coccodes*.

Название	**Сиквенс праймера**	**Температура плавления**	**Амплифицируемый участок**	**Продукт, п.н.**	**Ссылка**
Праймеры, использованные в работе с обоими видами грибов					
ITS5	5’-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	58	Участок ядерных рибосомных генов	600	White et al., 1990
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC				
Праймеры, использованные в работе с *H. solani*					
Hs1NF1	5'- GAACCCTCTGTCTACCTGTA	62	Участок ядерных рибосомных генов	371	Errampali et al, 2001a
Hs2NR1	5'- ACGAGAAGCTGGCACGACCG				
SS-f	5'-AGCATAGGCTGATGCTCGT	57	Ген β-тубулина	1138	McKay, Cooke, 1997
SS-r	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA				
Праймеры, использованные в работе с *C. coccodes*					
Cc1NF1	5'- TGCCGCCTGCGGACCCCCCT	67	Участок ядерных рибосомных генов	349	Cullen et al., 2002
Cc2NR1	5'- GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA				
GDF-1	5’- GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	59	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	310	Guerber et al., 2003
GDR-1	5’- GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT				
GSF1	5’-ATGGCCGAGTACATCTGG	55	Glutamine synthetase	960	Stephenson et al., 1997
GSR1	5’- GAACCGTCGAAGTTCCAC				
ACT-512F	5’- ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	54	Actine	270	Carbone and Kohn, 1999
ACT-783R	5’- TACGAGTCCTTCTGGCCCAT				

Для праймеров ITS 4 и ITS 5 оптимальная температура отжига 58ºС. Размер специфического продукта для обоих объектов, использованных в работе, составлял около 600 пар нуклеотидов. Амплификация проводилась по программе:

1) денатурация - нагрев до 94°С в течение 3 мин.;

2) 30 циклов –

2.1) денатурация при 94°С в течение 40 сек.,

2.2) отжиг при 58ºС в течение 40 сек.,

2.3) элонгация при 72°С в течение 60 сек.;

3) элонгация – 72 °С в течение 3 мин.

Амплификация с видоспецифичными праймерами Cc1NF1/ Cc2NR1, Hs1NF1/Hs2NR1, а также ПЦР для определения последовательностей генов глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (праймеры GDF-1/GDR-1), актина (ACT-512F /ACT-783R), глутамин-синтетазы (GSF1 / GSR1), β-тубулина (SS-f и SS-r) проводили по следующей программе:

4) денатурация - нагрев до 94°С в течение 2 мин.;

5) 30 циклов –

2.1) денатурация при 94°С в течение 30 сек.,

2.2) отжиг при 67ºС в течение 30 сек.,

2.3) элонгация при 71°С в течение 45 сек.;

6) элонгация – 72°С в течение 4 мин.

Все полученные ПЦР-продукты (фрагменты ДНК) разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле. Агарозный гель готовили из агарозы (Research Organic), на 1 г агарозы добавляли 100 мл Tris-борат-ЭДТА-буфер (TBE), агарозу плавили в на водяной бане, к расплавленной агарозе добавляли 3 мкл раствора бромистого этидия. Гели анализировали на трансиллюминаторе при УФ свете.

Подготовка проб к анализу нуклеотидных последовательностей (секвенированию)

Из геля, полученного после электрофореза, вырезали и очищали нужные ампликоны. Фрагмент очищали наборами компаний «Евроген» (Cleanup standart) и «Цитокин» согласно инструкции производителя (www.evrogen.ru; cytokine.ru) с соблюдением следующих этапов:

1. В микроцентрифужную пробирку помещали вырезанный фрагмент, к нему добавляли связывающий буфер в равном объеме.

2. На водяной бане инкубировали в течение 10 минут при температуре 60°С, содержимое микропробирки периодически перемешивали, пока гель не расплавится полностью

3. Расплавленный гель переносили в спин-колонку и выдерживали при комнатной температуре 2 минуты

4. Центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин

5. В колонку вносили 500 мкл отмывочного раствора

6. Центрифугировали 15 секунд при 13000 об/мин, процедуру проводили 2 раза

7. В чистую пробирку переносили колонку и добавляли 30-50 мкл буфера для элюции, затем опять центрифугировали 30 секунд при 13000 об/мин

Анализ нуклеотидной последовательности проводили методом секвенирования. Секвенирование проводила компания «Евроген». Для выполнения метода использовали набор реактивов BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing, при помощи автоматического сиквенатора ДНК AppliedBiosystems 3730 xl (www.evrogen.ru). В процессе выполнения секвенирования были использованы те же праймеры, которые использовались для ПЦР амплификации исследуемого участка. Каждую последовательность читали 2 раза – с прямого и обратного праймеров.

2.4. Устойчивость к фунгицидам

Описание использованных в работе фунгицидов

В нашей работе мы использовали фунгициды: дифеноконазол (препарат Скор), азоксистробин (Квадрис), флудиоксанил (Максим), пенцикурон + имидаклоприд (Престиж) и тиабендазол (Текто). Также в нашей работе было исследовано влияние нового фунгицида Зерокс, действующим веществом которого является модифицированное коллоидное серебро (табл. 2.7).

Таблица 2.7.

Использованные в работе фунгицидные препараты

Название препарата	**Действующее вещество (ДВ)**	**Концентрация ДВ в препарате, г/л**
Скор	Дифеноконазол	250
Зерокс	Коллоидное серебро	3
Квадрис	Азоксистробин	250
Текто	Тиабендазол	400
Максим	Флудиоксонил	25
Престиж	Пенцикурон	150

Скор

Действующим веществом фунгицида Скор является дифеноконазол (250г/л, рис. 1.4). Производитель – Syngenta (Швейцария).

Дифеноконазол: *cis, trans*-3-хлор-4[4-метил-2-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил-метил)-1,3-диоксолан-2-ил-] фенил-4-хлорфенилэфир. Химический класс – триазолы. Класс опасности – 3 (2 класс опасности по стойкости в почве). Химическая формула – $C_{19}H_{17}C_{l2}N_3O_3$. Молярная масса – 406,26 г/моль. Кристаллическое вещество от белого до светло-бежевого цвета.

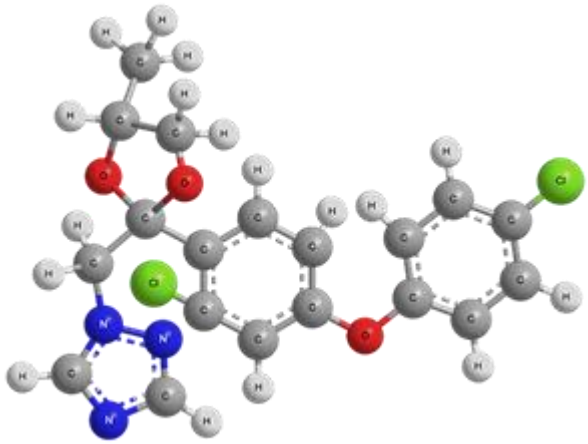

Рис. 2.4. Трехмерная структура молекулы дифеноконазола (http://www.pesticidy.ru/active_substance/difenoconazole)

Скор – системный фунгицид и протравитель семян из класса триазолов. Обладает длительным защитным и лечебным действием против широкого круга растительных патогенов, относящихся к аскомицетам, базидиомицетам, дейтеромицетам, включая возбудителей альтернариоза (Dahmen, Staub, 1992; Ziyao et al., 2012; Issiakhem, Bouznad, 2010), септориоза, церкоспороза, парши, антракноза (Gopinath, 2006), ржавчины, мучнистой росы, а также некоторых патогенов, присутствующих на семенах пшеницы, сахарной свеклы, картофеля, семечковых плодовых и овощных культур (Юдина, 2007).

Скор ингибируют фермент С14-деметилазу, которая играет роль в синтезе стеролов. Стеролы, такие как эргостерол, необходимы для обеспечения структуры и функционирования мембран, т.е. они существенны для развития клеточной стенки. Каждый DMI фунгицид действует на разные части пути синтеза стеролов. Результат действия данного препарата на разные грибы схож – ненормальный рост и гибель гриба, однако имеются существенные различия в механизме ингибирования (Gisi et al., 2000). В природных популяциях известны штаммы грибов, устойчивые к триазолам (Leroux et al., 2007).

Квадрис

Азоксистробин (рис.1.5) – действующее вещество фунгицида Квадрис (250 г/л), фирма производитель Syngenta (Швейцария).

Азоксистробин: метил(Е)-2-{2-[6-(2-цианофенокси)пиримидин-4-илокси]фенил}-3 метоксиакрилат. Химический класс – стробилурины. Класс опасности – 2 (для человека).Химическая формула – $C_{22}H_{17}N_{33}O$. Молярная масса – 403,4 г/моль. Бесцветные кристаллы без запаха.

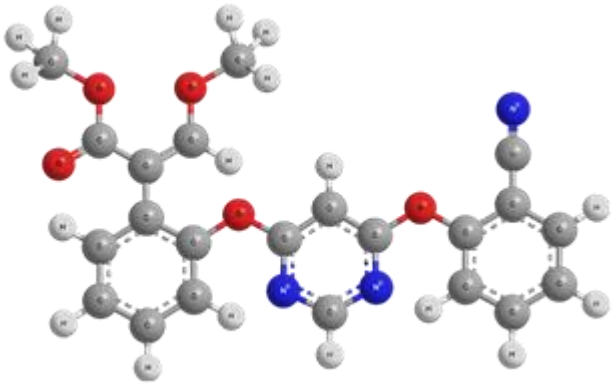

Рис. 2.5. Трехмерная структура молекулы азоксистробина (http://www.pesticidy.ru/active_substance/azoxystrobin)

Стробилурины являются производными соединений, найденных в дерево-разрушающих грибах рода *Strobilurus*. Вещества данного класса эффективны против широкого спектра патогенов. Механизм действия стробилуринов связан с нарушением электронного транспорта в комплексе III митоходриальной мембраны, что приводит к угнетению клеточного дыхания. Азоксистробин действует на наружный хинон-связывающий центр цитохром bc1 комплекса (Gisi et al., 2002), т.е. ингибирует митохондриальное дыхание гриба и прекращает вырабатывание энергии, что ведет к гибели организма (Fernández-Ortuño et al., 2008). Он является моносайтовым фунгицидом, поэтому высок риск появления устойчивых штаммов (Becker et al., 1981).

Азоксистробин наиболее эффективен при применении в ранние стадии развития инфекции, поскольку он подавляет прорастание конидий,

первоначальный рост мицелия и предупреждает спорообразование. Азоксистробин используется для защиты овощных культур открытого и защищенного грунта (томаты, огурцы), а также виноградной лозы от основных болезней, таких как настоящая и ложная мучнистая роса, фитофтороз, милдью и оидиум (Государственный реестр..., 2017, Табл. П. 1).

Максим

Флудиоксонил (рис. 1.6) – действующее вещество фунгицида Максим (25 г/л), фирма производитель Syngenta (Швейцария).

Флудиоксонил: 4-(2,2-дифтор-1,3-бензодиоксол-4-ил)-пиррол-3-карбоновой кислоты. Химический класс – фенилпирролы. Класс опасности – 3.

Химическая формула – $C_{12}H_6F_2N_2O_2$. Молярная масса – 248,2 г/моль. Бесцветные кристаллы без запаха.

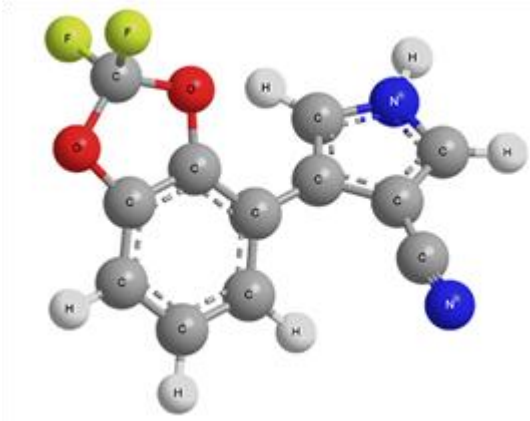

Рис. 2.6. Трехмерная структура молекулы флудиоксонила (http://www.pesticidy.ru/active_substance/fludioxonyl)

Флудиоксонил (аналог природных антимикотических веществ) – вещество из класса фенилпирроловов, которое является фунгицидом широкого спектра действия, ингибирующим рост мицелия (Белов, 2003; Березина, 2008). В работе Россленбройха и Штюблера (Rosslenbroich, Stuebler, 2000) выявлено ингибирование прорастания спор, элонгации ростовых трубок и роста мицелия. Охиаи с соавт. (Ochiai et al., 2002)

показали, что флудиоксонил может нарушать путь сигнальной трансдукции. Хагивара с соавторами (Hagiwara et al., 2009) сообщали об ингибирующем эффекте флудиоксонила на большое число генов, включенных в систему двухкомпонентной трансдукции у мицелиальных грибов. Флудиоксонил эффективно подавляет развитие патогенов из родов *Fusarium и Tilletia*, вызывающих болезни проростков зерновых культур, а также из рода *Alternaria, Ascochyta, Aspergillus, Helminthosporium, Rhizoctonia и Pinicillium* ssp. (Попов и др., 2003).

Флудиоксонил – относительно стойкое вещество, однако оно может быстро разрушаться в процессе фотолиза. Срок защитного действия определяется стойкостью вещества в конкретной почве и достигает 30 дней (Попов и др, 2003). Применяется в России в качестве фунгицида для предпосевного протравливания семян зерновых культур, гороха, подсолнечника и сахарной свеклы, а также для обработки клубней картофеля перед посадкой и перед закладкой на хранение с нормой расхода от 5 до 125 г д.в./га (Государственный реестр..., 2017, Табл. П. 1).

Престиж

Фунгицид пенцикурон (рис. 1.7) и инсектицид имидаклоприд – действующие вещества фунгицида Престиж (имидаклоприд 140 г/л, пенцикурон 150 г/л), фирма производитель BayerCropScience, (Германия).

Пенцикурон: 3-фенил-1-(4-хлорбензил)-1-циклопентилмочевина. Класс опасности – 3. Химическая формула – $C_{19}H_{21}ClN_2O$. Молярная масса – 328,84 г/моль. Бесцветные кристаллы без запаха.

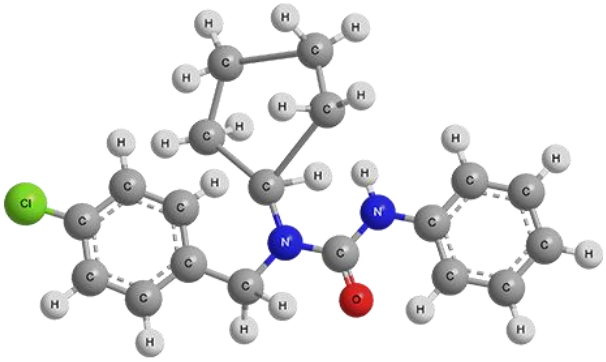

Рис. 2.7. Трехмерная структура молекулы пенцикурона (http://www.pesticidy.ru/active_substance/pencikuron)

Пенцикурон является контактным фунгицидом с длительным защитным действием. Вещество проникает в кутикулу растения, ингибируя прорастание мицелия. Пенцикурон влияет на функциональное развитие ядра и клетки, значительно сокращает содержание транспортных форм глюкозы, тормозит биосинтез стерина и свободных жирных кислот внутри гриба (Голышин, 1993), но не влияет на дыхательные и ядерные функции.

Второй компонент Престижа – инсектицид имидаклоприд. Отдельно проведенные нами эксперименты показали, что имидаклоприд не оказывает никакого влияния на рост колонии исследуемых видов грибов и не ингибирует прорастание спор, поэтому в дальнейшем мы не учитывали действие имидаклоприда и рассматривали Престиж как препарат, содержащий единственное ингибирующее рост грибов соединение пенцикурон (Мыца, 2015; Еланский, Кутузова, неопубликовано).

Текто

Тиабендазол (рис. 2.7) – действующее вещество фунгицида Текто (400 г/л), фирма производитель Syngenta (Швейцария).

Тиабендазол: 2-(4-тиазолил)-бензимидазол. Химический класс – бензимидазолы. Класс опасности – 3. Химическая формула – $C_{10}H_7N_3S$. Молярная масса – 201,3 г/моль. Белое кристаллическое вещество без запаха.

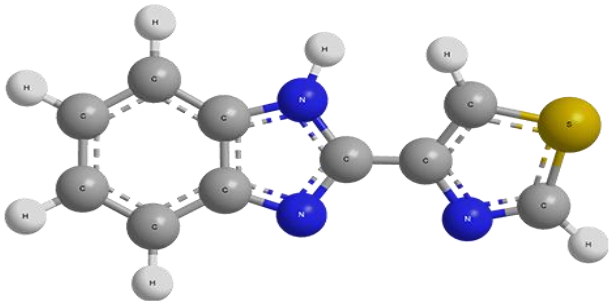

Рис. 2.8. Трехмерная структура молекулы пенцикурона (http://www.pesticidy.ru/active_substance/thiabendazole)

Бензимидазольные фунгициды одними из первых предложены в качестве системных препаратов широкого спектра действия. Тиабендазол – бензимидазольный фунгицид, который связывается с грибным белком β-тубулином и ингибирует деятельность микротрубочек. При мутациях в гене β-тубулина (как правило, это однонуклеотидные замены в кодонах 198 или 200) штамм становится высокоустойчивым к фунгицидам бензимидазольной группы. Устойчивые изоляты отмечены среди разных видов грибов в разных странах мира (Davidse, Flach, 1978; Koenraadt et al., 1992). Из-за высокого риска появления устойчивых штаммов бензимидазолы применяют в сочетании с фунгицидами, к которым нет перекрестной устойчивости и низка вероятность появления устойчивых штаммов.

Зерокс

Зерокс – новый фунгицидный препарат широкого спектра действия против фитопатогенных грибов и оомицетов, действующим веществом которого являются наноразмерные частицы коллоидного серебра, поверхностно модифицированные экологически безопасным биоразлагаемым амфотерным поверхностно-активным веществом.

Препарат Зерокс является новым фунгицидом, разработанным совместно специалистами МГУ имени М.В. Ломоносова, компании «Grand Harvest Research» и группы компаний «Агрохимпром». Препарат эффективен против широкого круга грибных и бактериальных патогенов, находится в стадии регистрации. Используется для предпосадочной обработки семян и опрыскивания вегетирующих растений.

Определение устойчивости к фунгицидам

Для определения устойчивости к фунгицидам использовали агаризованную среду на основе пивного сусла с добавлением фунгицида в концентрациях 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 мг/ л по действующему веществу. Штаммы *H. solani*, показавшие устойчивость к тиабендазолу, тестировали также и при концентрации последнего в среде 1000 мг/л. Посев производили агаровым блоком (4х4 мм), содержащим мицелий, в середину чашки. Агаровый блок брали с нарощенного мицелиального газона (другой чашки Петри). Посев проводили на среду без фунгицида (в качестве контроля) и на среду с фунгицидом, причем каждую концентрацию и контроль сажали в трех повторностях. Далее инкубировали при комнатной температуре. Учет диаметров колоний проводили в момент, когда диаметр контроля достигал 75% чашки Петри (для *C. coccodes*) или 50% (для *H. solani*). Данные повторностей для каждого изолята усредняли. Показатели EC_{50} и EC_{90} определяли для каждого изолята в отдельности. EC_{50} – (50% эффективной концентрации) это та концентрация фунгицида, которая замедляет скорость радиального роста колонии в 2 раза по сравнению с контролем; EC_{90} – концентрация, подавляющая рост фитопатогена на 90%.

2.5. Изучение морфологических признаков *C. coccodes*.

Исследования скорости роста и морфологических признаков выбранных из нашей коллекции штаммов *C. coccodes* проводили на двух средах: сусло-агар и картофельно-декстрозный агар (PDA). Обе среды широко

используются для лабораторных исследований; среда PDA является основной для исследования фитопатогенных грибов в Европе (Zornitsa et al, 2013).

Изучение скорости роста и морфологии штаммов *C. coccodes* на PDA.

Для анализа на картофельно-декстрозном агаре (PDA) были отобраны 55 штаммов из нашей коллекции *C. coccodes*, среди которых присутствовали не только изоляты из клубней картофеля из России и Европы, но также листовые и стеблевые изоляты. Стоит отметить, что штаммы данного патогена с листьев и стеблей картофеля были выделены в России впервые, и их детальное описание ранее не проводилось.

Все исследуемые штаммы высевали в чашки Петри на агаризованную питательную среду PDA в трех повторностях, далее инкубировали в термостате при температуре 24^{o}C. Для учета скорости роста производили замер взаимно перпендикулярных диаметров всех исследуемых колоний на 5, 7 и 9 сутки, данные трех повторностей на каждом сроке усредняли. Измерения заканчивали, когда диаметр самого быстрорастущего штамма достигал достигал 75 % чашки Петри – чтобы избежать краевого эффекта. По состоянию колоний на 12 сутки роста все проанализированные штаммы были разделены на 4 морфологические группы исходя из внешнего вида и особенностей роста колоний.

Далее, из 55 протестированных штаммов, разделённых на 4 морфологические группы, было отобрано 27 штаммов – примерно равное количество из каждой группы, но с обязательным включением всех листовых и стеблевых штаммов, а также полной представленностью по регионам. Данный анализ проводился по завершению измерений диаметров колоний, и в нем учитывались следующие параметры: были измерены длина и ширина склероциев, длина щетинок (придатки склероциев), а также длина и ширина конидий, сформированных в конидиомах (основной тип спор), а также наличие и размеры дополнительного типа спор, формирующихся на мицелии.

Измерения проводили с помощью светового микроскопа Микмед-6 фирмы Ломо, визуализация осуществлялась с помощью камер Digital camera for microscope DCM500.

Изучение скорости роста и морфологии на сусло-агаре

Из штаммов *C. coccodes*, проанализированных на среде PDA, были отобраны 17 с целью изучения скорости их роста при разных температурах на среде сусло-агар. Из этих 17 штаммов у 11 были изучены микроморфологические характеристики (табл. 2.4).

Для выполнения обеих задач выбранные штаммы высевали в чашки Петри на агаризованную питательную среду сусло- агар в двенадцати повторностях: по три повторности каждого из десяти штаммов на каждую из 4 температур. Далее, каждую группу из 10 штаммов инкубировали в термостатах при различных температурах: 5^{o}C, 15^{o}C, 24^{o}C и 33^{o}C. Последняя высокая температура была выбрана для проверки потенциальной патогенности штаммов *C. cocodes*. Для учета скорости роста производили замер взаимно перпендикулярных диаметров всех исследуемых колоний, начиная с 5 суток, через каждые три дня. Для стандартных температур (15^{o}C и 24^{o}C) измерения были закончены на 12 сутки, по достижении несколькими штаммами 75% чашки Петри. При экстремальных температурах (5^{o}C и 33^{o}C) для достижения результата имерения продолжали вплоть до 21 суток.

Для анализа микроморфологических характеристик были также выбраны параметры: длина и ширина склероциев, длина щетинок, а также длина и ширина конидий, сформированных в конидиомах (основной тип спор). Анализ микроморфлогии также проводился по завершению анализа скорости роста, с использованием тех же приборов, что и в анализе на среде PDA.

2.6. Статистическая обработка данных

Полученные данные были обработаны стандартными статистическими методами в программе Excel. Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы Mega 5.

ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Внутривидовое разнообразие *C. coccodes*

3.1.1. Морфология и скорость роста

Были полученные данные о скорости роста, морфологии колоний и микроморфологии штаммов *C. coccodes* на двух типах стандартизованных сред – сусло-агар и PDA. На среде сусло-агар была также исследована скорость роста выбранных штаммов в зависимости от температуры.

Морфология на картофельно-глюкозном агаре (PDA)

Всего нами было проанализировано 55 штаммов *C. coccodes*, выделенных из различных регионов России и из Германии. На 12 сутки роста все проанализированные штаммы были разделены на 4 морфологические группы исходя из внешнего вида и особенностей роста колоний. К группе А относили черные колонии, сморщенные почти по всей площади (высокая плотность склероциев) или с концентрическими чередованиями склероциев разной плотности, для которых был характерен быстрый рост. К группе В – черные колонии с равномерным распределением склероциев или с уплотнением в центре (средняя плотность склероциев заметно меньше, чем в А), для которых также характерен быстрый рост. Группа С была представлена серыми колониями (преобладание воздушного мицелия), практически не образующими склероциев, со средней скоростью роста. И, наконец, группа D – черные колонии, с плотностью склероциев как в группе В, но образующие сектора с меньшей плотностью склероциев, со средней скоростью роста.

Как видно из таблицы 3.1, преобладающей морфологической группой для штаммов Московской и Костромской областей является группа А (Кутузова и др., 2017). Штаммы из Владимирской области и Республики Марий Эл наряду со штаммами из Германии преимущественно принадлежали к морфологической группе В. Все четыре морфологические группы были представлены только в Московской области и Германии, тогда

как набор различных морфогрупп среди штаммов других изученных регионов ограничен одной-двумя группами. Во Владимирской области и Республике Мари-Эл это может быть связано с небольшой выборкой, но в Костромской области количество изученных штаммов было самым большим.

Таблица 3.1.

Морфология штаммов *C. coccodes* на PDA.

Регион	Количество штаммов у которых описана макроморфология	Количество штаммов у которых описана микроморфология	Морфогруппы			
			A	B	C	D
Московская область	8	8	**4***	1	1	2
Костромская область	21	3	**19***	2	0	0
Владимирская область	4	2	0	**3***	0	1
Республика Марий-Эл	3	3	0	**3***	0	0
Германия	19	11	3	**10***	3	3
Итого	**55**	**27**	**26**	**19**	**4**	**6**

Прим.: ***** *- выделена доминирующая морфологическая группа для каждого региона*

В трех морфологических группах склероции всех штаммов имели примерно одинаковые размеры (с учетом стандартного отклонения), тогда как штаммы группы С отличались достоверно (с учетом стандартного отклонения) меньшими размерами склероциев (Кутузова и др., 2017). Также практически у всех (за исключением одного) штаммов группы С отсутствовали щетинки склероциев.

Для 27 штаммов (отбирали, по возможности, равное количество из каждой группы с учетом происхождения) было проведено исследование микроморфологии (Табл. 3.2). В данном анализе учитывали следующие параметры: были измерены длина и ширина склероциев, длина щетинок (придатки склероциев), а также длина и ширина конидий, сформированных в конидиомах (основной тип спор), а также наличие и размеры

дополнительного типа спор, формирующихся на мицелии. Все размеры приведены в микронах (мкм).

Различия между штаммами разных групп прослеживается в размерах как основного, так и дополнительного типов спор (Рис. 3.1, табл. 3.2). Штаммы групп A и C имеют средние размеры основных спор 17,6x4,4 мкм и 17,3x4,3 мкм, а дополнительных – 11,3x4,7 мкм и 11,6x4,2 мкм соответственно. Группы B и D представлены штаммами, имеющими средние размеры основных спор – 19,1x4,4 мкм и 19,7x4,2 мкм, а дополнительных – 13,4x4,7 мкм и 13,2x4,5 мкм соответственно. Однако, с учетом стандартного отклонения, все четыре морфологические группы следует считать однородными по микроморфологическим характеристикам обоих типов спор.

Полученные данные по размерам спор соответствуют опубликованным в ряде статей только для дополнительного типа спор, формирующихся на мицелии. Средняя длина основных спор и размеры склероциев находились на верхней границе, либо превышали значения, полученные другими исследователями (Zornitsa et al, 2013; Maziah, Bailey, 2000, Aqeel et al, 2008).

Штаммы, выделенные с листьев и стеблей, обладали большей макро- и микроморфологической однородностью по сравнению с изолятами из кожуры клубней (Кутузова и др., 2017). Среди данных штаммов не было выявлено принадлежности к морфологической группе C, которая характеризуется преобладанием воздушного мицелия и слабой тенденцией к образованию склероциев.

Средние для каждого штамма размеры основного типа спор листовых и стеблевых штаммов составляли (длина минимум-среднее-максимум x ширина минимум-среднее-максимум) 19,7-(20.4±0.7)-21,6 x 3,7-(4.1±0.2)-4,6 мкм, тогда как размеры основного типа спор клубневых изолятов имели значительный разброс и составляли 11,5-(17.6±3.3)-22,0 мкм в длину и 3,6-(4,4±0,4)-5,6 мкм в ширину (табл. 3.3; 3.4). Более высокая вариабельность спор клубневых изолятов объясняется, возможно, значительно большим объемом выборки.

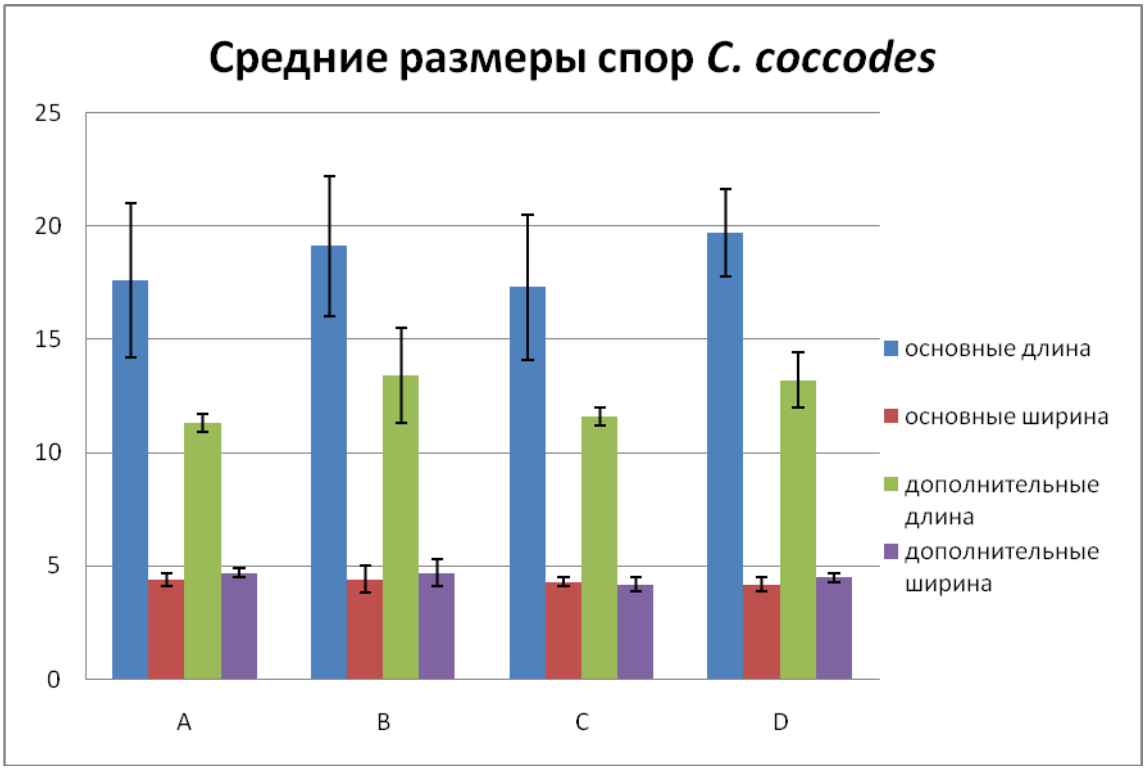

Рис. 3.1. Средние размеры спор *C. coccodes* по морфогруппам.

Таблица 3.2.

Микроморфология коллекционных штаммов *C. coccodes*

Морфо-группа	Коли-чество штаммов	Оценка микро-морфо-логии	Склероции, мкм		Щетинки, мкм		Споры основные, мкм		Споры дополнительные, мкм			Средние диаметры колоний на 10 сутки, мм
			Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Ширина	
A	26	8	292,0±32,3	192,2±25,7	7	130,4±30,2	17,6±3,4	4,4±0,3	3	11,3±0,4	4,7±0,2	80,7±1,9
B	19	9	289,2±51,5	204,2±36,4	9	172,5±134,6	19,1±3,1	4,4±0,6	5	13,4±2,1	4,7±0,6	77,3±4,9
C	4	4	178,3±43,7	125,8±37,2	1	**208,5**	17,3±3,2	4,3±0,2	3	11,6±0,4	4,2±0,3	80,4±2,4
D	6	6	256,9±25,9	176,2±45,8	6	119,6±21,4	19,7±1,9	4,2±0,3	5	13,2±1,2	4,5±0,2	78,6±2,8

Таблица 3.3.

Микроморфология штаммов *C. coccodes* из кожуры клубней картофеля.

Морфо-группа	Коли-чество штаммов	Оценка микроморф-фологии	Склероции		Щетинки		Споры основные		Споры дополнительные			Средние диаметры колоний на 10 сутки
			Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Ширина	
A	23	5	278,4±29,4	182,2±26,2	4	107,4±12,2	16,0±3,4	4,6±0,3	3	11,3±0,4	4,7±0,2	80,9±1,8
B	15	5	292,4±46,4	198,7±32,5	5	195,2±186	18,0±3,9	4,5±0,7	3	12,0±1,0	4,9±0,8	79,0±1,9
C	4	4	178,3±43,7	125,8±37,2	1	208,5	17,3±3,2	4,3±0,2	3	11,6±0,4	4,2±0,3	80,4±2,4
D	4	4	246,8±24,5	169,5±56	4	108,8±16,1	19,3±2,2	4,2±0,4	4	12,9±1,2	4,5±0,3	79,5±2,8

Таблица 3.4.

Микроморфология штаммов *C. coccodes* из листьев и стеблей картофеля.

Морфо-группа	Коли-чество штаммов	Оценка микромор фологии	Склероции		Щетинки		Споры основные		Споры дополнительные			Средние диаметры колоний на 10 сутки
			Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Длина	Ширина	Нали-чие	Длина	Ширина	
A	3	3	314,5±26,5	208,9±16,0	3	161,2±4,9	20,2±0,5	4,1±0,01	0	—	—	79,3±2,4
B	4	4	285,1±64,4	211,1±44,9	4	144,2±12,0	20,5±0,8	4,2±0,4	2	15,5±0,7	4,4±0,2	71,1±7,7
D	2	2	277,2±0,8	189,6±23,3	2	141,1±11,3	20,6±1,0	4,0±0,04	1	14,4	4,6	76,7±2,1

Как видно из таблиц 3.3 и 3.4, среди изолятов из клубней картофеля более 70% имели склонность к образованию дополнительного типа спор (формирующихся на мицелии). Среди стеблевых и листовых штаммов доля образующих дополнительный тип спор была значительно ниже. Практически все стеблевые штаммы образовывали только один тип спор, тогда как при микроскопировании штаммов, выделенных с листа, обнаруживалось два типа спороношения – что, в свою очередь, было свойственно подавляющему большинству клубневых изолятов. Диаметры колоний на 10 сутки с учетом стандартного отклонения, оказались одинаковыми для клубневых, стеблевых и листовых штаммов (рис. 3.2).

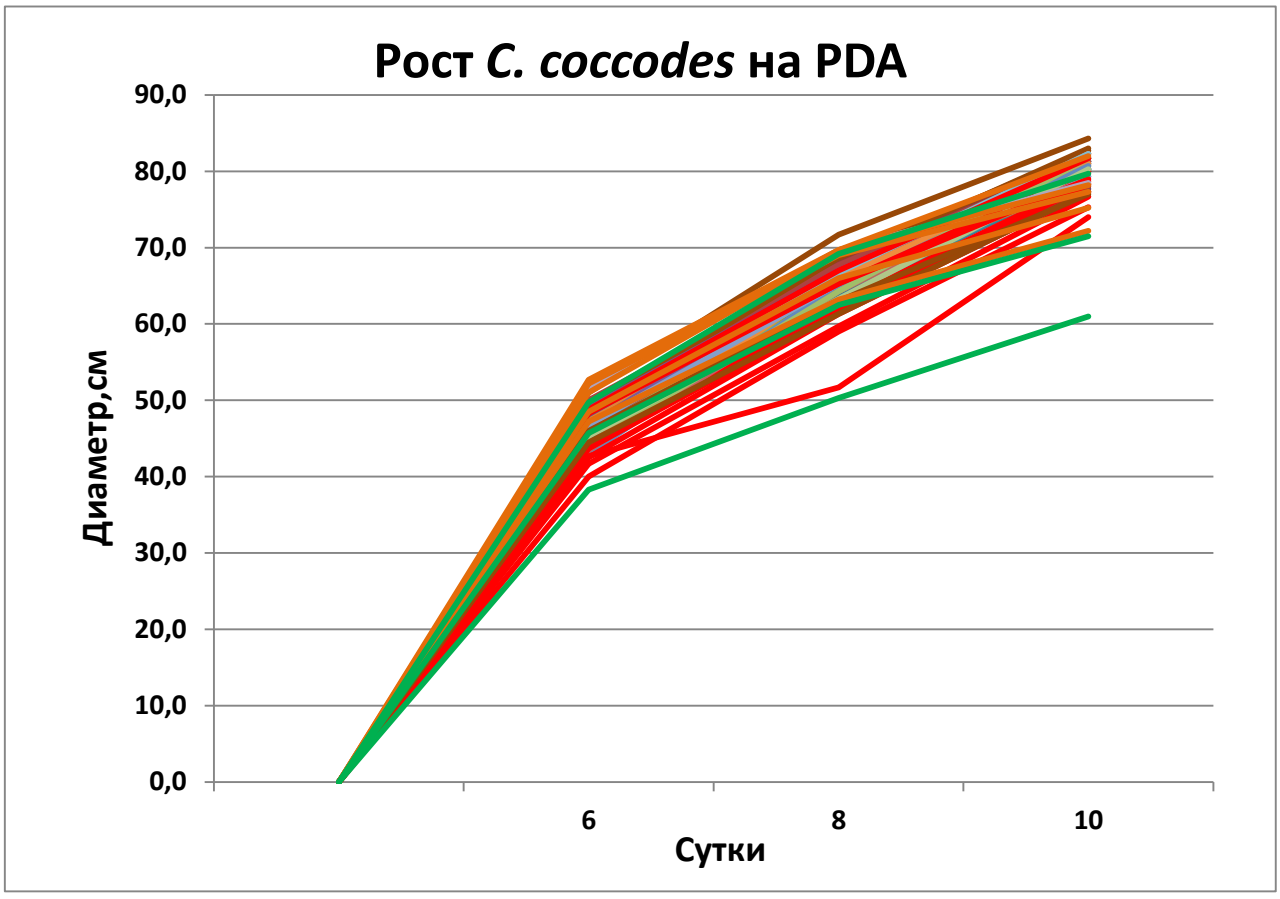

Рис. 3.2. Рост штаммов *C. coccodes* на среде PDA при +24°C.

Сравнительный анализ скоростей роста штаммов *C. coccodes* на среде сусло-агар.

Скорость роста 17 штаммов была исследована при температурах 5, 15, 24 и 33 ºС.

Рост при температуре +5ºС.

Рост при +5ºС имеет большое практическое значение, т.к. при близких температурах происходит хранение клубней картофеля. При температуре 5°С рост большинства штаммов начинался только на 7 сутки, однако мицелий некоторых штаммов не переходил на среду вплоть до 12 суток изучения. Как видно из рисунка 3.3, диаметры колоний всех штаммов не превышали 10 мм на 21 сутки измерений. Однако важно отметить значительные различия радиального прироста среди изолятов: разброс значений итоговых диаметров составлял от 1,7 до 9,5 мм. Изолят, выделенный с листа, показал средние значения скорости роста.

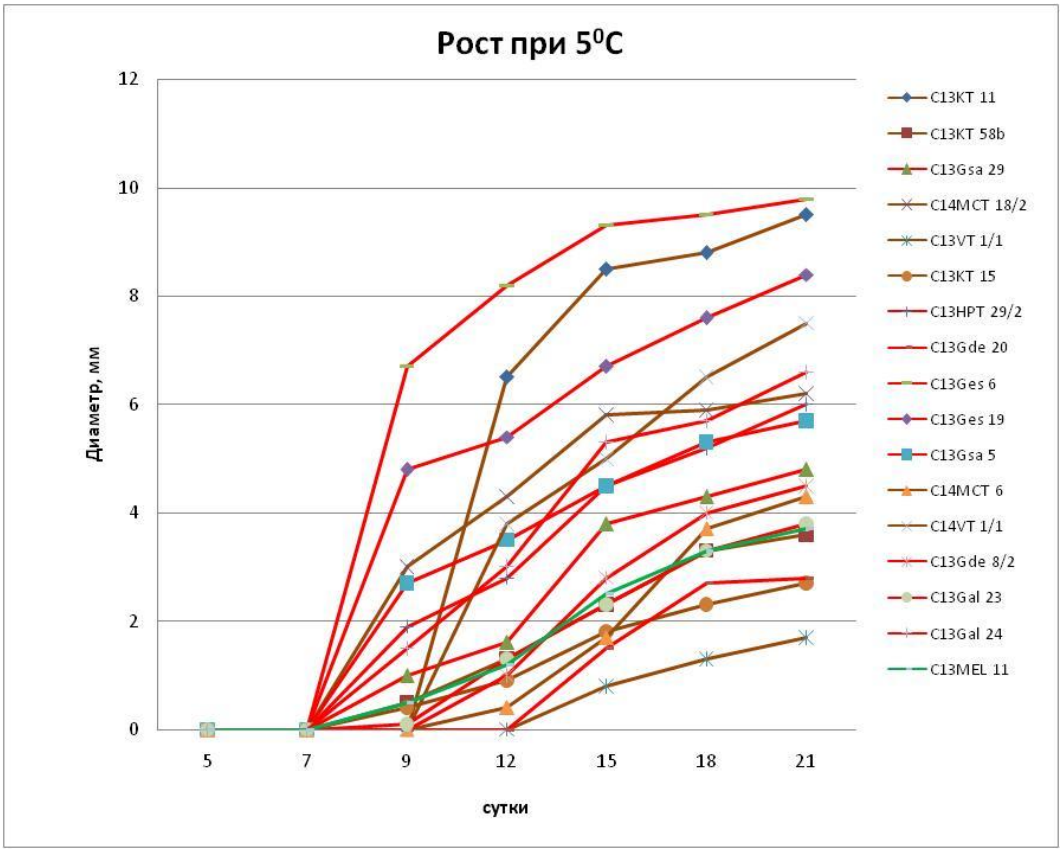

Рис. 3.3. Рост штаммов *C. coccodes* при +5°С.

Рост при температуре +15ºС.

Уже на 5 сутки (1 измерение) диаметры колоний всех исследуемых штаммов превышали 12 мм (рис. 3.4). На 12-е сутки диаметры колоний составили от 40 до 55 мм. Примечательно, что наибольшим диаметром и скоростью роста отличался листовой штамм (на графике обозначен зеленым). Все клубневые изоляты имели близкие исследуемые показатели, вне зависимости от региона выделения.

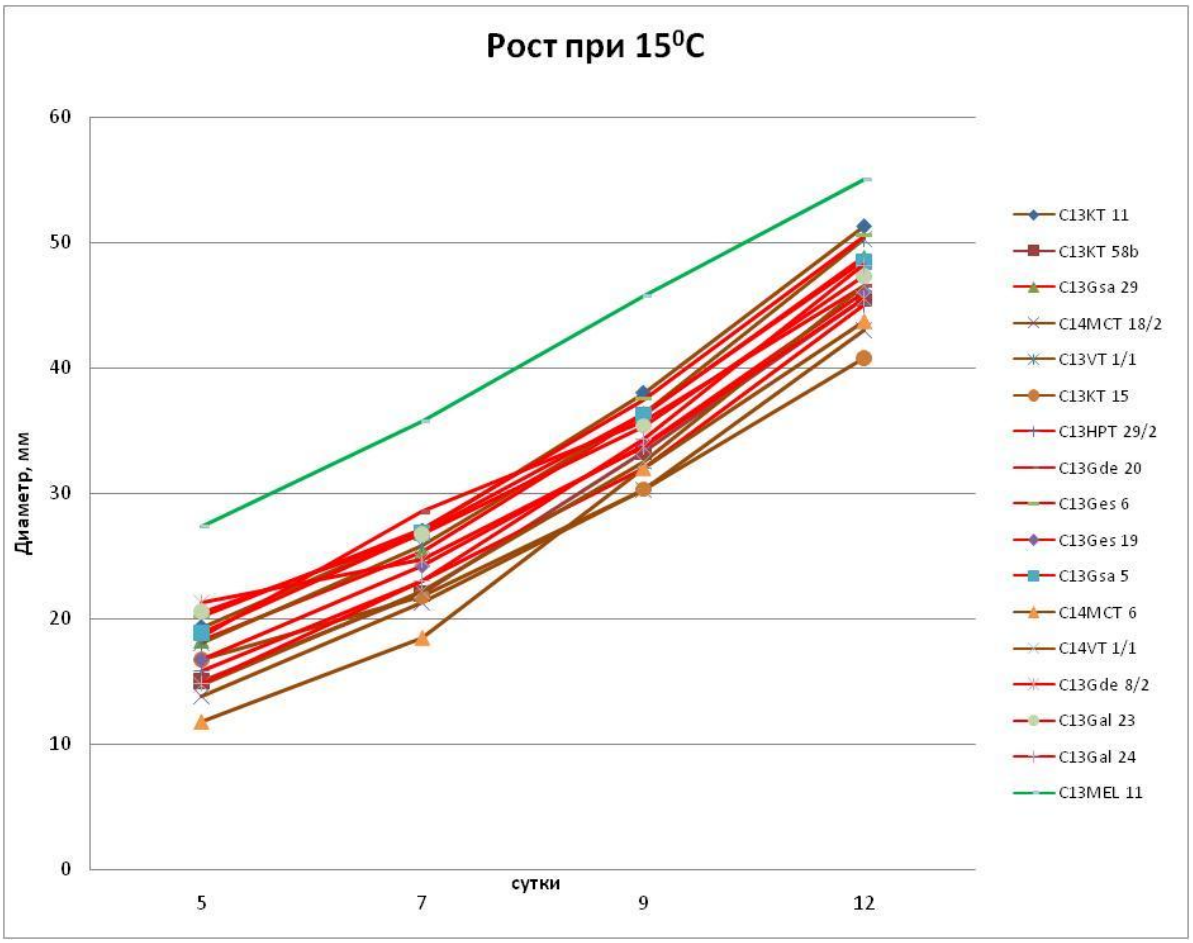

Рис. 3.4. Рост штаммов *C. coccodes* при +15°С

Рост при температуре +24ºС.

При температуре 24°С наблюдалась максимальная скорость роста всех штаммов (рис. 3.5). На 5 сутки (1 измерение) диаметры колоний всех исследуемых штаммов превышали 22 мм. На 12 сутки диаметры колоний составили от 65 до 78 мм. При этой температуре рост изолята из листа, хоть и занимал положение выше среднего, уже не выделялся на фоне клубневых изолятов.

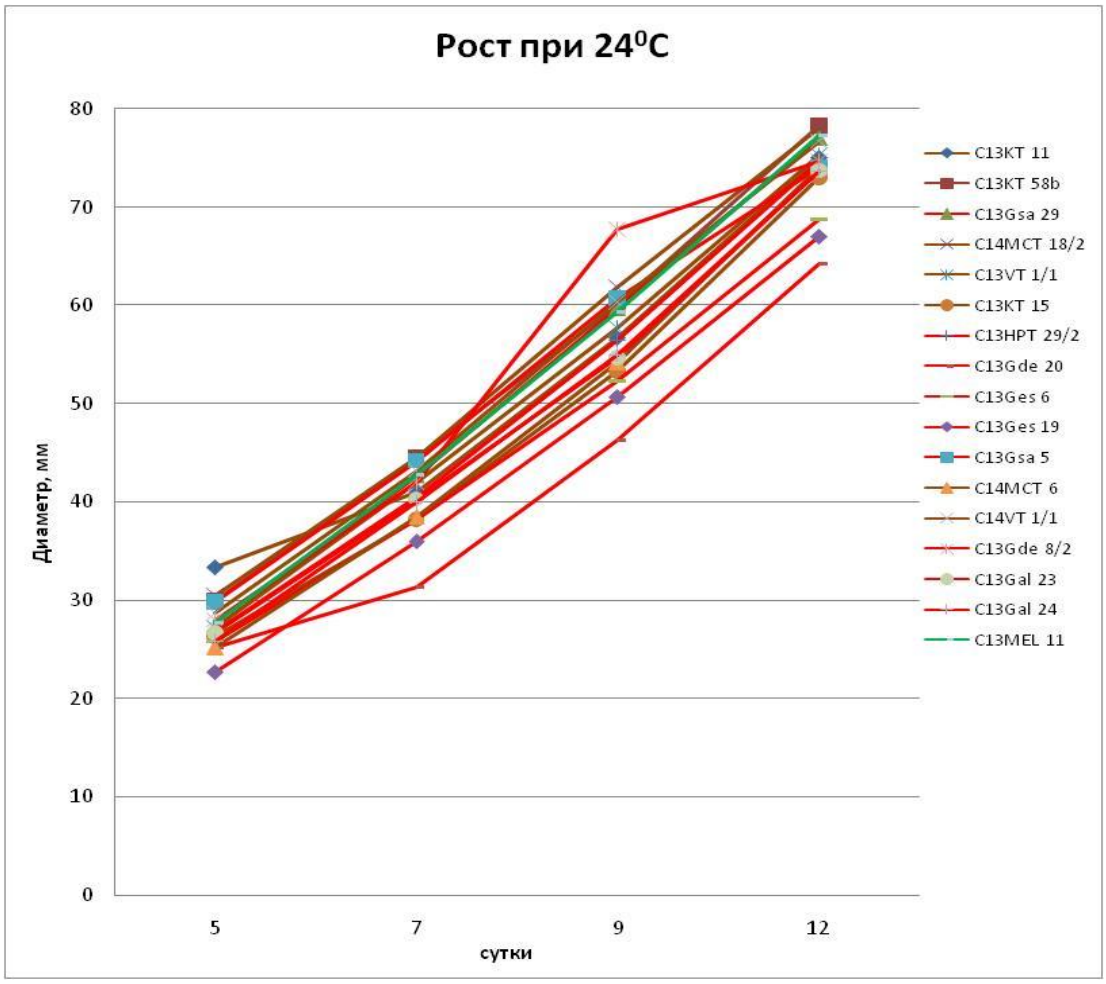

Рис. 3.5. Рост штаммов *C. coccodes* при +24°С

Рост при температуре +33ºС.

При температуре 33°С, являющейся экстремально высокой для данного фитопатогена, скорость роста и диаметры колоний всё же были больше, чем при экстремально низкой температуре 5°С (рис. 3.6). Как можно видеть, штамм листа снова заметно выделяется на фоне клубневых изолятов, делая резкий скачок в росте и достигая максимального среди других штаммов диаметра к 15-м суткам измерений. Однако при +33°С, как и при 5°С, изоляты имели значительный разброс значений – итоговые диаметры составили от 4,8 до 35 мм.

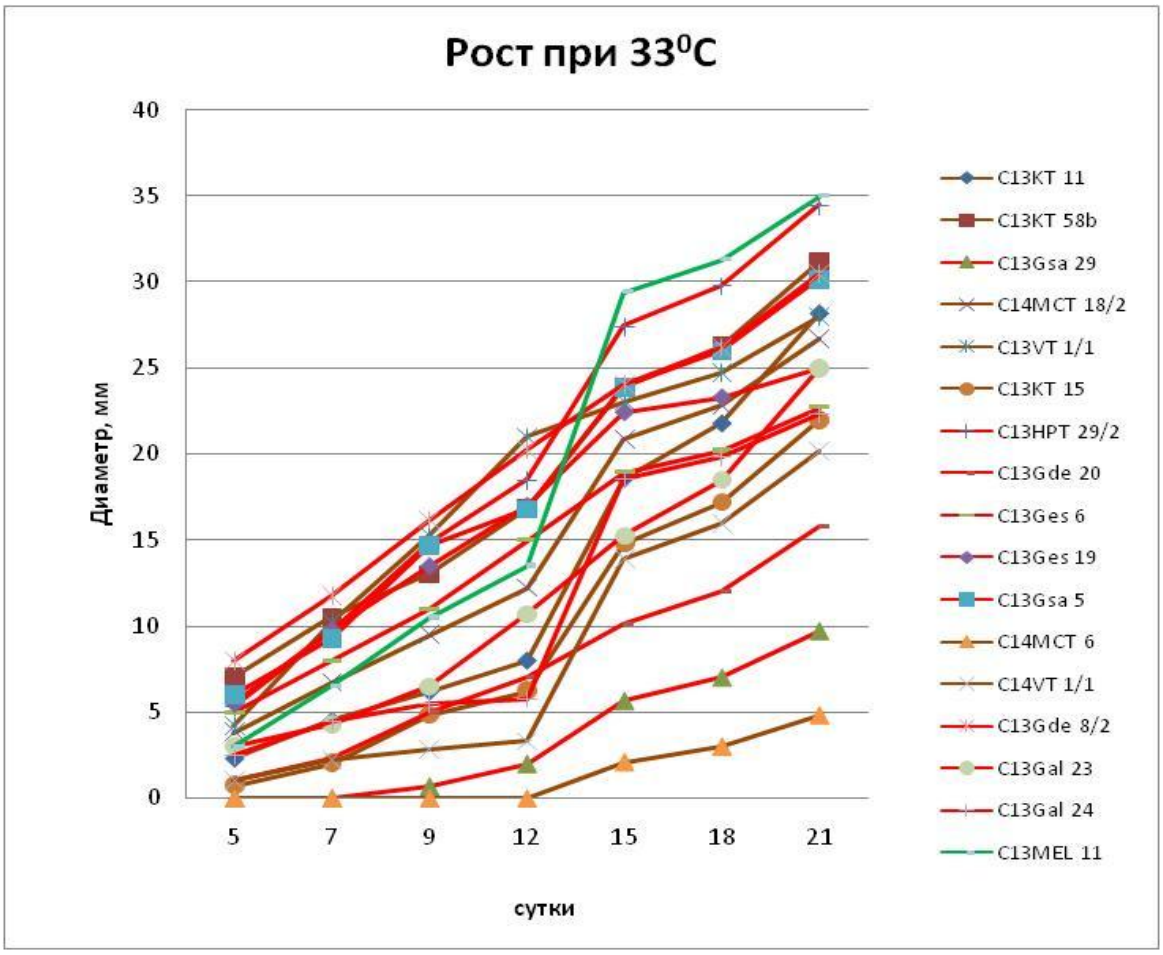

Рис. 3.6. Рост *C. coccodes* при +33°С

Результаты изучения скоростей роста показывают, что лучше всего все изоляты росли при температуре +24ºС, несколько медленнее – при +15ºС.

При обеих температурах существенной разницы в скоростях роста у разных штаммов не было выявлено. В экстремальных условиях (+5 и +33ºС) штаммы росли значительно медленнее и при этом среди них была отмечена высокая разница в скоростях роста.

3.1.2. Внутривидовое разнообразие по структуре маркерных последовательностей ДНК

В работе изучены последовательности нуклеотидов участков ДНК, используемых для выявления видовой принадлежности и внутривидовой вариабельности *C. coccodes*: ITS1-5,8S-ITS2 (далее – ITS), генов актина (Actin), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GD), глутамин-синтетазы (GS). Последовательности изучены у 42-48 штаммов, среди которых выделенные из разных регионов России и из семенного картофеля, импортированного из Германии и Нидерландов.

Актин

Последовательности актина определены у 44 штаммов, выделенных из картофеля (2 из листьев, 4 из стеблей, остальные – из клубней) и 2 штаммов из плода томата. По результатам секвенирования внутривидовой вариабельности у исследованных штаммов *C. coccodes*, выделенных из картофеля, обнаружено не было: все последовательности 44 выбранных штаммов по гену актина были одинаковыми (сиквенс депонирован в Genbank под номером KY496631) и совпали с имеющимся в Genbank сиквенсом HM171667 (изолят CBS 369.75, Liu et al., 2013). Штаммы, выделенные из плода томата, были одинаковыми между собой, но отличались от картофельных двумя нуклеотидными заменами (рис. 3.7).

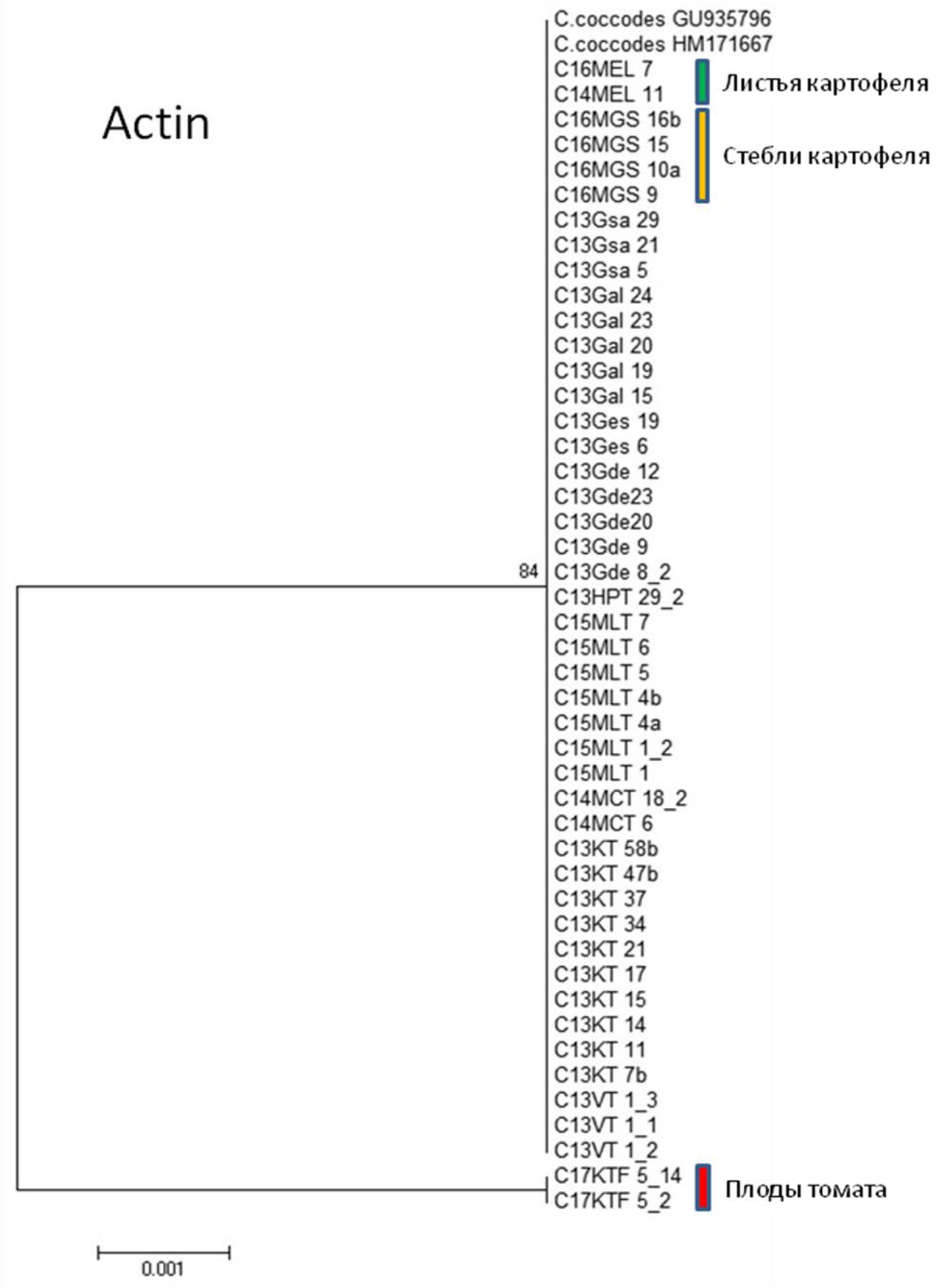

Рис. 3.7. Последовательности гена актина.

ITS

По последовательности региона ITS1-5,8S-ITS2 44 исследованных штаммов разделились на две группы: одна группа включала штаммы, выделенные со всех трех типов субстрата (клубневые, листовые и стеблевые), а также изоляты из томата, тогда как вторая группа содержала только клубневые изоляты из Германии. Разница между кластерами составляла один нуклеотид (Рис. 3.8). Штаммы одной из групп (сиквенс изолята C16MEL7 депонирован в Genbank под номером KY496632) полностью совпадали с сиквенсом HM171678 (изолят CBS 164.49, Liu et al., 2013), сиквенс штамма представителя другой группы (C13Gde20) депонирован под номером KY496633.

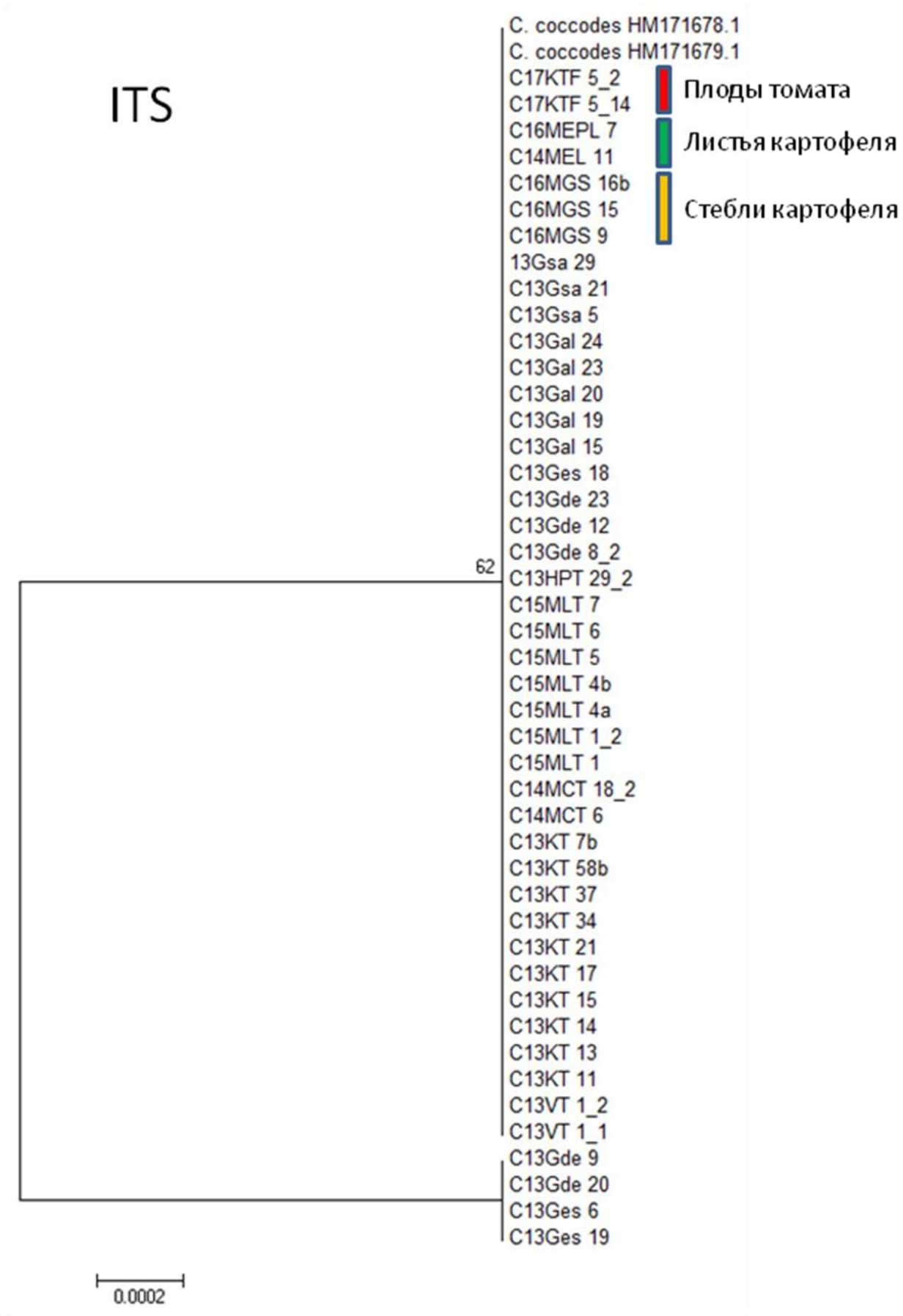

Рис. 3.8. Последовательности региона ITS.

Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

Исследованные последовательности нуклеотидов гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы 47 штаммов с картофеля (5-стебли, 3 – листья, остальные – клубни) разделились на 2 группы, различающиеся 2-мя нуклеотидами. В Genbank депонированы сиквенсы представителей обеих групп: KY496634 (изолят C16MEL3) и KY496635 (изолят C16MEL7). Каждая группа включала в себя как изоляты из России и Германии, так и штаммы, выделенные с листьев и стеблей картофеля. Оба сиквенса полностью совпали с имеющимися в Genbank: один – с последовательностью JX546727 (изолят CBS 125.57) (Liu et al., 2013), а второй – с HM171672 (изолят CBS 164.49) (Liu et al., 2013).

Томатные штаммы отличались от картофельных заменой 6-ти нуклеотидов; они оказались идентичны ранее выделенным в Корее изолятам из женьшеня (GU935856) (Рис. 3.9).

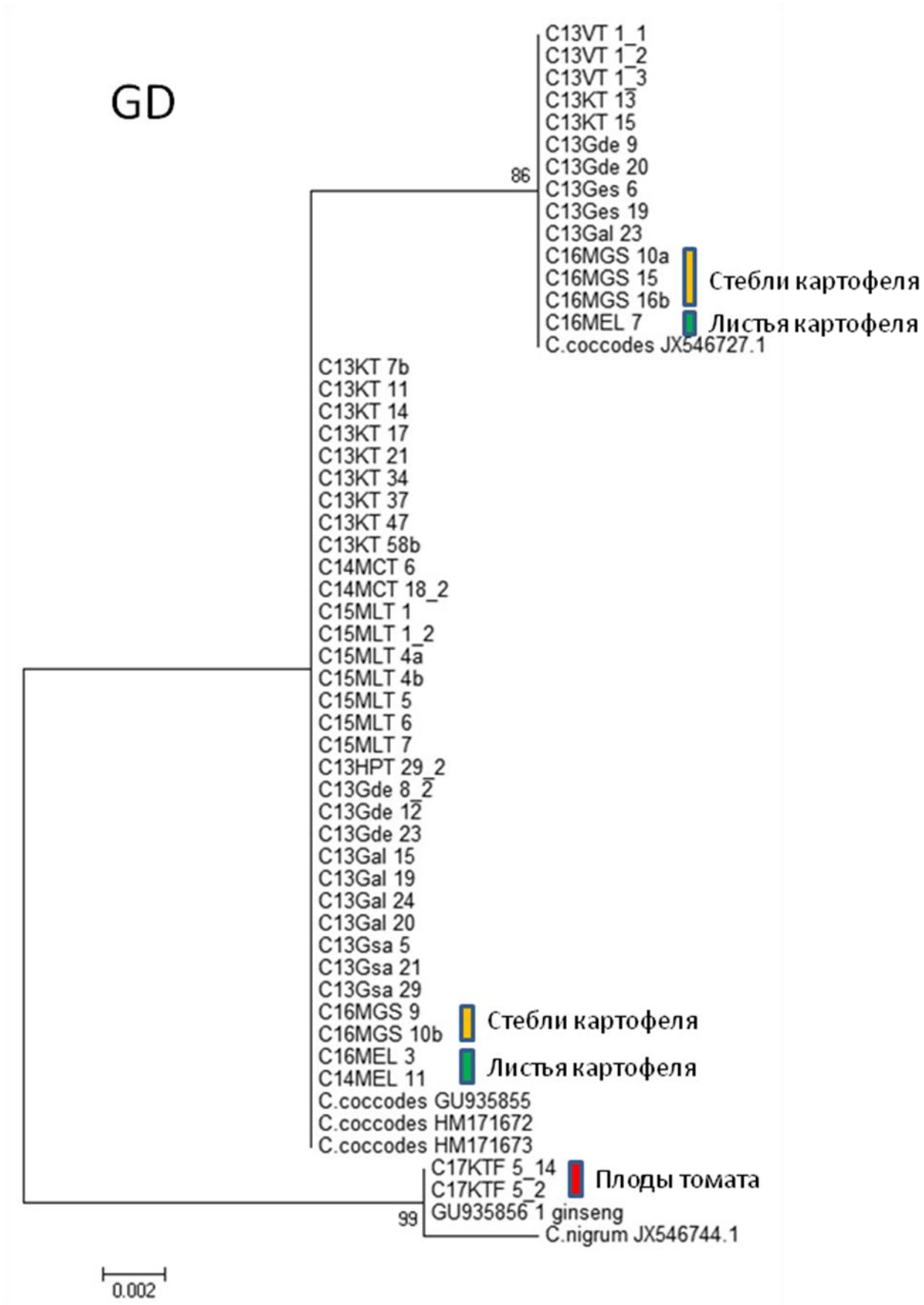

Рис. 3.9. Последовательности гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GD)

Глутамин-синтетаза

Последовательности нуклеотидов гена глутамин-синтетазы у 42 штаммов с картофеля (6 выделены из пораженных стеблей, 3 – из пораженных листьев, остальные из клубней). Исследуемые изоляты с картофеля разделились на две группы, отличающиеся 2-мя нуклеотидами. В обе группы попали как штаммы, выделенные из образцов, собранных в разных регионах РФ, так и выделенные из немецких семенных клубней. Штаммы, выделенные из стеблей картофеля, попали в обе группы, выделенные из листьев – оказались в одной группе (Рис. 3.9). В Genbank депонированы сиквенсы KY524295 (изолят C16MEL3 из первой группы) и KY524296 (изолят C16MGS9 из второй группы).

Штаммы, выделенные с плода томата (2 изолята), попали в отдельную кладу. Они отличались от картофельных 25-ти нуклеотидной делецией, заменами 15 нуклеотидов, вставкой 1 нуклеотида Последовательности глутамин-синтетазы томатных штаммов оказались идентичны последовательности изолята, выделенного из лука в США (JQ682645) и близки последовательностям изолятов, выделенных из женьшеня в Корее (GU935816 и GU935817, рис. 3.10).

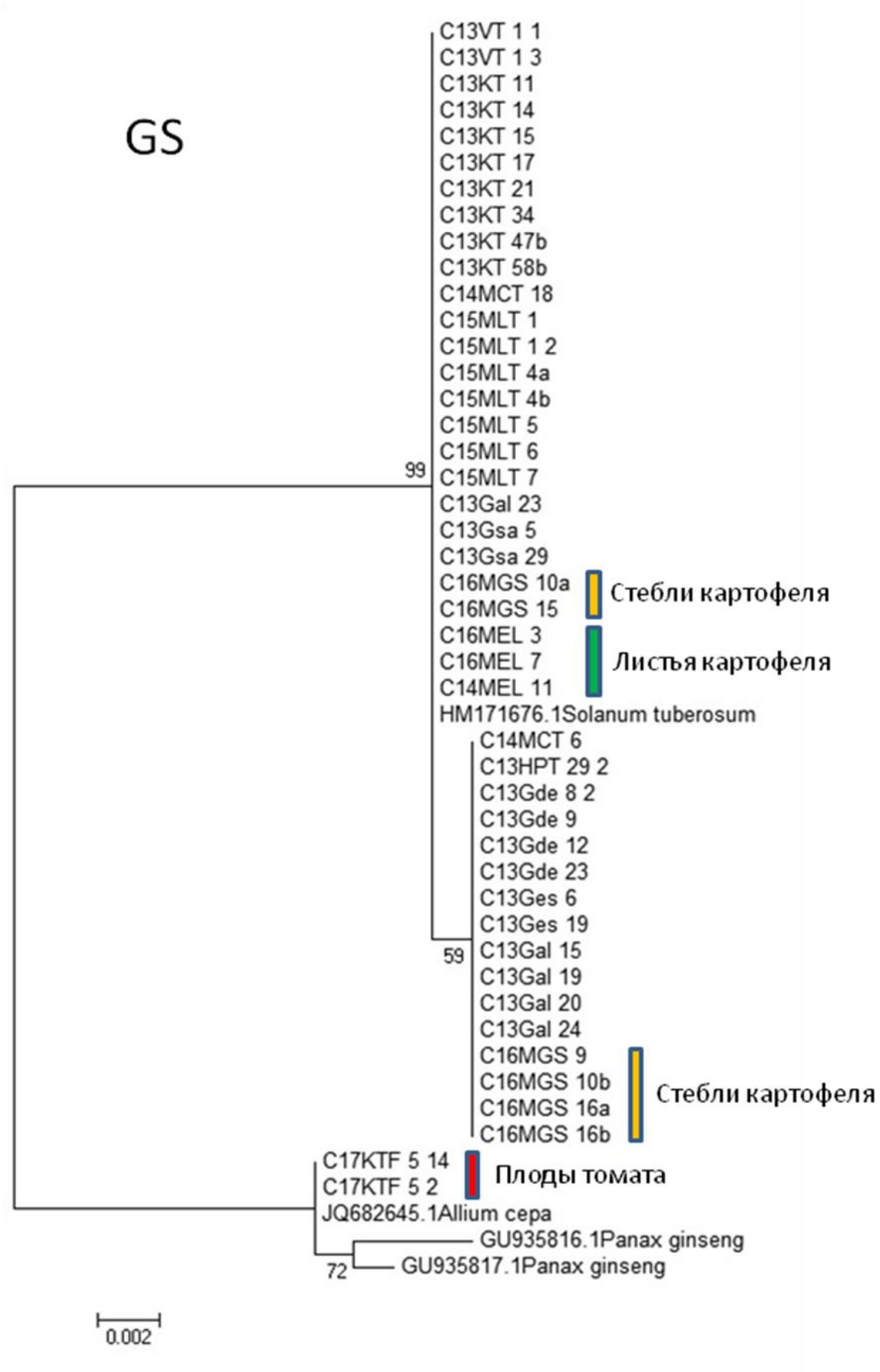

Рис. 3.10. Последовательности гена глутамин-синтетазы (GS)

Таким образом, результаты исследования четырех последовательностей ДНК показали низкую вариабельностьсреди выделенных с картофеля штаммов *C. coccodes*. Анализ достаточно большой выборки штаммов не выявил дивергенции популяций исследуемого гриба ни по регионам выделения, ни по органам картофеля. Штаммы, выделенные из пораженных листьев и стеблей картофеля, попали в те же группы, что и выделенные из клубней. При этом различия между группами штаммов с картофеля были не более 1-2 нуклеотидов.

Штаммы, выделенные с томата, отличались от выделенных с картофеля по структуре проанализированных участков глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, актина. Только по структуре участка ITS не были выявлены различия между картофельными и томатными штаммами. Анализ последовательностей глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы показал близость томатных штаммов и выделенных из лука и женьшеня.

3.2. Внутривидовое разнообразие *H. solani*

Определение последовательностей нуклеотидов ядерных рибосомных генов и межгенных спейсеров (ITS1–5,8S–ITS2) использованных в работе коллекционных изолятов *H. solani*

Последовательность нуклеотидов участка ITS1–5,8S–ITS2 была исследована у всех использованных в работе 27 штаммов, выделенных из пораженных клубней, собранных в Московской, Брянской, Костромской областях, в республике Чувашия (табл. 2.2), из импортированных из Нидерландов и Германии семенных клубней. Внутривидового разнообразия по структуре участка ITS1–5,8S–ITS2, амплифицируемого с праймерами ITS5-ITS4, не выявлено. Последовательности всех исследованных штаммов были абсолютно одинаковыми и типичными для вида *H. solani*. Все они имели 100%-ю идентичность с депонированными в базе Genbank последовательностями KC106739 (Al-Mughrabi et al., 2013) и AF073904 (Olivier and Loria, 1998).

Исходя из полученных данных можно говорить о высокой гомогенности вида *H. solani* по исследованному участку генома.

3.3. Устойчивость к фунгицидам

3.3.1. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к фунгицидам

Исследования устойчивости штаммов *C. coccodes* к фунгицидам (табл. 3.5, 3.6, 3.7) показали, что эффективным фунгицидным действием обладали дифеноконазол (препарат Скор) (EC_{90} не превышал 1,37 мг/л) и коллоидное серебро (Зерокс) (EC_{90} < 37 мг/л). На средах с другими препаратами изоляты *C. coccodes* медленно продолжали свой рост; к моменту измерений (когда диаметр колонии на контроле достигал 2/3 от диаметра чашки) диаметр колонии на среде с фунгицидом (100 мг/л по действующему веществу) превышал 10% от контроля. Поскольку тестирования на средах с большими концентрациями фунгицидов не проводились, точного значения EC_{90} установить не удалось.

Оценка показателя EC_{50} (табл. 3.6, 3.7) показала, что хорошее ограничение роста отмечалось у всех препаратов за исключением пенцикурона. Крайне низкая эффективность пенцикурона в отношении *C. coccodes* была отмечена и в работе французских исследователей (Andrivon et al., 1997). Штаммы, сильно отличающиеся по уровням устойчивости (EC_{50}), были выявлены в отношении тиабендазола и азоксистробина. Причем высокая вариабельность в отношении тиабендазола выявлена у изолятов из Германии, а более высокой вариабельностью в отношении азоксистробина отличались российские изоляты (табл. 3.6). Вариабельность по устойчивости к тиабендазолу отмечалась также и при анализе французских изолятов *C. coccodes* (Andrivon et al., 1997). В целом, уровни устойчивости германских изолятов в отношении всех фунгицидов, кроме тиабендазола, отличались низкой вариабельностью. Возможно, это связано с интенсивными химическими обработками и правильным чередованием фунгицидов в Германии, что не позволило появиться устойчивым изолятам.

Отдельно стоит отметить устойчивость к флудиоксонилу. Все исследованные изоляты отличались очень низким EC_{50} (< 1 мг/л) при высоком (>100 мг/л) EC_{90}. При этом внутривидовая вариабельность

практически отсутствовала. В исследованиях это проявлялось в том, что при длительном культивировании на среде с флудиоксонилом изоляты гриба не погибали, а продолжали очень медленно расти. Через 15-20 суток роста более половины исследованных изолятов образовывали быстро растущие сектора (рис. 3.11).

Рис. 3.11. Образование штаммом *C. coccodes* устойчивого к флудиоксонилу сектора

Мицелий, взятый из устойчивого сектора и перенесенный на чашку с вновь разлитой средой с фунгицидом, рос намного быстрее, чем исходный изолят. Так, на 9-е сутки исходный изолят еще не перешел на агаризованную среду с фунгицидом, в то время как изолят из устойчивого сектора активно на ней рос (рис. 3.11). Вероятно, в мицелиях исходных изолятов при культивировании на среде с флудиоксонилом произошли мутации устойчивости. Аналогичное явление резкого повышения устойчивости к флудиоксонилу было отмечено при исследованиях, проведенных с грибом *Neurospora crassa*. Флудиоксонил активировал фосфорилирование MAP-киназ генов осморегуляции *N. crassa*, в результате чего гриб начинал накапливать глицерин, который, в свою очередь, увеличивал внутриклеточное давление (Zhang et al., 2002). Избыточная концентрация глицерина приводила к тому, что мембраны сильно раздувались и, в дальнейшем, разрывались, вызывая гибель гриба. В случае мутаций гена осморегуляции Os-2 *N. crassa* приобретал устойчивость к фунгициду, однако терял способность к осморегуляции (скорость роста на среде, содержащей 5 г/л NaCl резко замедлялась, рис. 3.12). Kojima (2004) показал, что флудиоксонил запускает фосфорилирование MAP-киназ родственного для *N. crassa* гена Os2p у *Colletotrichum lagenarium, Colletotrichum heterostrophus* и

Botrytis cinerea, вызывая аналогичное проявление устойчивости к фунгициду. Наши исследования показали, что штаммы *C. coccodes* с приобретенной устойчивостью к флудиоксонилу заметно хуже растут в условиях осмотического стресса (рис. 3.12) (Кутузова и др., 2015).

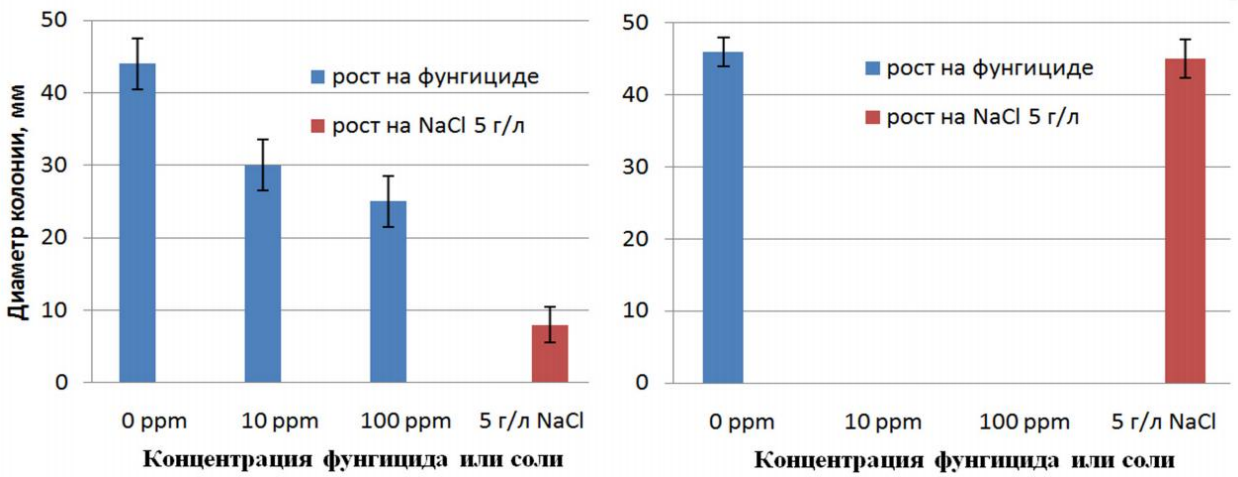

Рис. 3.12. Диаметры колоний мутантного (слева) и исходного (справа) штаммов *C. coccodes* на средах с флудиоксонилом и с NaCl на 9 сутки роста. Планки погрешностей – доверительный интервал для уровня значимости 0,05.

Таким образом, наибольшей фунгицидной эффективностью в отношении штаммов фитопатогенного гриба *C. coccodes* обладали препараты на основе дифеноконазола (препарат Скор) и коллоидного серебра (препарат Зерокс). Препараты на основе азоксистробина (Квадрис), флудиоксонила (Максим) и тиабендазола (Текто) оказывали фунгистатический эффект на штаммы данного патогена. Препарат Престиж (на основе пенцикурона) оказался неэффективен в отношении гриба *C. coccodes*.

Таблица 3.5.

Устойчивость коллекционных изолятов *C. coccodes* к некоторым фунгицидам (данные приведены в мг/л по ДВ)

Штамм	Происхождение штаммов	Тиабендазол		Пенцикурон		Флудиоксонил		Дифено-коназол		Азокси-стробин		Коллоидное серебро	
		EC_{50}*	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}
C13 VT 1/1	Владимирская обл, Гусь-Хрустальный р-н, пос. Мезиновский. Сорт Удача, 2013 г.	4,2	>100	>100	>100	0,9	>100	< 0,1	0,94	< 0,1	>100	4,8	40,6
C13 VT 1/2		1,5	>100	>100	>100	0,9	>100					6,9	66,5
C13 VT 1/2 C1													
C13 VT 2/1		1,8	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	0,9	< 0,1	>100		
C13 KT 4	Костромская обл., Стрельниково. Сорт Удача, 2013 г.	5,2	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	3,8	6,2	>100	5,6	62,9
C13 KT 4/2		9,1	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,7	3	>100		
C13 KT 7b		11,6	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,5	1	>100		
C13 KT 11		5,1	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	2,9	7,8	>100	6,3	65
C13 KT 13		4,9	>100	>100	>100	0,7	>100			0,8	>100		
C13 KT 14		7,8	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	0,7	< 0,1	>100	4,5	10,1
C13 KT 15		4,5	>100	>100	>100	0,9	>100	< 0,1	4,1	0,3	>100	7	75,3
C13 KT 16		8,3	>100	>100	>100	0,6	>100	< 0,1	0,9	< 0,1	>100	2,7	8
C13 KT 17		9	>100	>100	>100	0,9	>100	< 0,1	3,3	5,8	>100	6,8	75,3
C13 KT 21		7,9	>100	>100	>100	0,8	>100			3,7	>100		
C13 KT 29		8,8	>100	>100	>100			< 0,1	0,9	8,4	>100		
C13 KT 33		7,8	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,9	< 0,1	>100	2,1	9,5
C13 KT 34		9,1	>100	>100	>100	0,9	>100	< 0,1	0,8	10,3	>100		
C13 KT 36		2,1	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	3,4	< 0,1	>100	4,7	25,6
C13 KT 37		8,7	>100	>100	>100	0,9	99	< 0,1	0,9	19	>100		
C13 KT 47a		7,4	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	1	5,2	>100		
C13 KT 47b		12,3	>100	>100	>100	0,8	>100	< 0,1	1	6	>100		
C13 KT 58/1		11,2	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,9	< 0,1	>100	2,3	7
C13 KT 58b		3,5	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,9			6,5	70,9
C13 KT 65		8,8	>100	>100	>100	0,6	>100	< 0,1	0,9				
C13 HPT 29/2	Семенной картофель из Голландии, 2013 год.Сорт Астерикс	0,9	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,1	< 0,1	0,1	5,4	9,1

C13 Gde 8/2	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен (51.88.00 сш, 12.22.00 вд). Сорт Дельфине. 2013 г.												
C13 Gde 9		50,3	>100	>100	>100	0,6	9,6	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	5	9
C13 Gde 12		0,85	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	5,2	9
C13 Gde 20		47,7	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	5,4	9,1
C13 Gde 23		0,9	>100	>100	>100	0,6	46	< 0,1	0,5	< 0,1	>100	5,1	9
C13 Ges 6	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен. Сорт Эстрелла. 2013 г.	33,4	>100	>100	>100	0,6	37,2	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	5,3	9,1
C13 Ges 18		1	>100	>100	>100	0,6	33,1	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	4,7	8,9
C13 Ges 19		8,8	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,5	< 0,1	>100	5,4	9,1
C13 Gal 15	Семенной картофель из Германии, пос. Брезен. Сорт Альвара 2013 г.	0,9	>100	>100	>100	0,7	60	< 0,1	0,5	< 0,1	>100	5,3	9,1
C13 Gal 19		0,9	>100	>100	>100	0,6	43,9	< 0,1	0,2	< 0,1	>100	5,5	9,1
C13 Gal 20		1	>100	>100	>100	0,6	9,5	< 0,1	0,3	< 0,1	>100	5,2	9,1
C13 Gal 22		4,7	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	1	< 0,1		5,2	9
C13 Gal 23		6,1	>100	>100	>100	0,7	41	< 0,1	0,8	< 0,1	>100	5,6	9,1
C13 Gal 24		0,9	>100	>100	>100	0,7	>100	< 0,1	0,1	< 0,1	0,9	5,4	9,1
C13 Gsa 5	Семенной картофель из Германии, г. Бад Швартау (53.55.10 сш, 10.41.51 вд). Сорт Сафия 2013 г.												
C13 Gsa 21		4,3	>100	>100	>100	0,6	32,5					5,2	9
C13 Gsa 29		1	>100	>100	>100	0,6	14,5	< 0,1	0,2	< 0,1	>100	5,4	9
C14 MCT 6	Московская обл., Солнечногорский р-н, пос. Чашниково. Сорт Невский, 2014 г.					0,7	>100	< 0,1	0,5	< 0,1	>100	3,3	9,9
C14 MCT 18/2						0,9	>100	< 0,1	0,1	< 0,1	>100	4,3	21,6
C14 MEL 11	Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола. Лист картофеля, 2014 г.			>100	>100	0,6	80	< 0,1	0,1			3,7	19,9

*Прим.: * – Показатели EC_{50} и EC_{90} определяли для каждого изолята в отдельности. EC_{50} – (50% эффективной концентрации) это та концентрация фунгицида, которая замедляет скорость радиального роста колонии в 2 раза по сравнению с контролем; EC_{90} – концентрация, подавляющая рост фитопатогена на 90%.-*

.

Таблица 3.6.

Сводные данные по устойчивости *C. coccodes* к фунгицидам. Показатель EC_{50}.

Фунгицид	Страна	Кол–во протести-рованных изолятов	Вариабель-ность EC_{50}, мг/л	Среднее EC_{50}, мг/л	Дисперсия среднего	Число штаммов с EC_{50}, попадающими в интервал:			
						<1	1-10	10-100	>100
Пенцикурон (Престиж)	РФ	25	—	>100	—	0	0	0	25
	ФРГ	15	—	>100	—	0	0	0	15
Коллоидное серебро (Зерокс)	РФ	16	2,09-6,97	4,8	2,73	0	16	0	0
	ФРГ	16	4,68-5,55	5,26	0,046	0	16	0	0
Азоксистробин (Квадрис)	РФ	23	0,07 - 19	3,7	23,42	13	8	2	0
	ФРГ	15	0,05-0,1	0,08	0,0002	16	0	0	0
Флудиоксонил (Максим)	РФ	26	0,6-0,9	0,8	0,01	25	0	0	0
	ФРГ	16	0,6-0,7	0,6	0,002	15	0	0	0
Дифеноконазол (Скор)	РФ	24	0,06 - 0,12	0,07	0,0002	24	0	0	0
	ФРГ	15	0,05-0,07	0,06	0,00004	15	0	0	0
Тиабендазол (Текто, Вист)	РФ	24	1,52 - 12,31	7,0	9,23	0	21	3	0
	ФРГ	16	0,91-50,3	10,8	308,56	8	5	3	0

Прим.: * — *не удалось посчитать.*

Таблица 3.7.

Сводные данные по устойчивости *C. coccodes* к фунгицидам. Показатель EC_{90}.

Фунгицид	Страна	Кол–во протести-рованных изолятов	Вариабель-ность EC_{90}, мг/л	Среднее EC_{90}, мг/л	Дисперсия среднего	Число штаммов с EC_{90}, попадающими в интервал:			
						<1	1-10	10-100	>100
Пенцикурон (Престиж)	РФ	25	—	>100	—	0	0	0	25
	ФРГ	15	—	>100	—	0	0	0	15
Коллоидное серебро (Зерокс)	РФ	16	2,12-75,25	37,48	750,97	0	4	12	0
	ФРГ	16	8,94-9,11	9,05	0,002	0	16	0	0
Азоксистробин (Квадрис)	РФ	23	—	>100	—	0	0	0	23
	ФРГ	15	—	>100	—	2	0	0	13
Флудиоксонил (Максим)	РФ	26	—	>100	—	0	0	1	24
	ФРГ	16	—	>100	—	0	2	8	5
Дифеноконазол (Скор)	РФ	24	0,06-4,1	1,32	1,42	19	5	0	0
	ФРГ	15	0,09-1	0,32	0,085	14	1	0	0
Тиабендазол (Текто, Вист)	РФ	24	—	>100	—	0	0	0	24
	ФРГ	15	—	>100	—	0	0	0	15

3.3.2. Устойчивость штаммов *H. solani* к фунгицидам

Наиболее эффективным из испытанных препаратов был дифеноконазол ($EC_{50} \leq 0{,}12$ мг/л; $EC_{90} \leq 24$ мг/л) (таблица 3.8). Другим эффективным препаратом было коллоидное серебро ($EC_{50} \leq 76$ мг/л; $EC_{90} \leq 178$ мг/л). В отношении обоих вышеуказанных препаратов не было выявлено высокоустойчивых изолятов.

Таблица 3.8.

Устойчивость разных штаммов *H. solani* к выбранным фунгицидам.

Штаимм	Тиабендазол		Дифеноконазол		Азоксистробин		Коллоидное серебро	
	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}
Российские штаммы								
H13 RB 5	–	–	–	–	–	–	10,1	94,1
H13 RB 7	5.4	9.1	0,06	11,5	> 100	> 100	10,0	93,6
H13 RB 11	6.6	41.5	0,06	8,9	0,08	> 100	40,9	> 100
H14 RMCh 2	>1000	>1000	0,06	4,2	1,45	> 100	40,0	98,7
H14 RMCh 5	738	>1000	0,09	24	0,08	> 100	23,2	> 100
H14 RMCh 24	>1000	>1000	0,06	4,8	> 100	> 100	47,5	96,6
H13 MSh 4d	0.5	0.9	0,08	9,0	0,09	> 100	59,7	> 100
H13 RM 32d	6.1	9.2	0,06	3,7	5,50	> 100	46,7	> 100
H13 RM 10	–	–	–	–	–	–	14,1	92,2
H13 RM 23	–	–	–	–	–	–	8,4	81,9
H13 RM 42	7.3	64.5	0,05	0,1	0,07	> 100	7,0	86,4
H13 RKSt 39	5.9	9.2	0,06	1,0	> 100	> 100	41,7	> 100
H13 RKSt 68	5.7	9.1	0,06	0,7	0,78	> 100	19,0	87,4
H14 RKSu 18	0.7	6.4	0,06	1,5	0,10	> 100	7,1	86,2
H14 RKSu 2/2	0.7	6.4	0,06	7,5	7,00	77,5	61,6	> 100
H14 RKSu 7	5.8	9.2	0,07	18	0,10	> 100	76,7	> 100
H14 RCh 8	1.7	8.3	0,06	0,6	0,08	> 100	21,7	95
Штаммы из импортированного семенного картофеля								
H13 H 16	>1000	>1000	0,07	6,1	0,09	> 100	48,6	> 100
H13 H 28	818	>1000	0,06	3,6	> 100	> 100	62,2	> 100
H13 Gal 3/2	1.0	8.2	0,07	12,3	0,10	> 100	43,5	95,5
H13 Gde 11	0.5	0.9	0,09	8,2	85,00	> 100	69,4	> 100
H13 Gsa 18	0.5	0.9	0,06	0,4	0,10	96,1	26,5	> 100
H13 Gde 20	5.8	9.2	0,12	1,0	> 100	> 100	55,0	94,2
H13 Ges 21	5.3	9.1	0,06	5,5	> 100	> 100	72,7	> 100

Азоксистробин был эффективен в отношении большинства исследованных штаммов ($EC_{50} \leq 7$ мг/л). В то же время, как среди российских, так и западноевропейских были выявлены штаммы с очень

высокой устойчивостью (EC_{50} > 100 мг/л). Штамм H14RMCh24 был одновременно устойчив и к тиабендазолу, и к азоксистробину.

Дифеноконазол, коллоидное серебро и азоксистробин показали сильный фунгистатический эффект в отношении *H. solani*. После 25-30 дней инкубирования мицелий переходил на среду с фунгицидом и начинал очень медленно расти. Возможно, это связано со снижением эффективности фунгицида в среде при хранении.

Тиабендазол эффективно ингибировал рост большинства тестируемых штаммов. На рис. 3.13 показан рост чувствительного и устойчивого штаммов на агаризованной среде с различными концентрациями фунгицида. Рост чувствительных штаммов ограничивался сравнительно низкой концентрацией тиабендазола ($EC_{50} \leq 7{,}3$ мг/л). Мицелий не переходил на агаризованную среду с фунгицидом даже после 40 суток инкубации – по-видимому, он погибал на инокулировочном блоке. Все штаммы, выделенные из германских семенных клубней, были восприимчивы к тиабендазолу ($EC_{50} \leq 5{,}8$ мг/л). Среди российских и голландских штаммов были выявлены изоляты, уровень устойчивости которых отличался от чувствительных более, чем в 1000 раз.

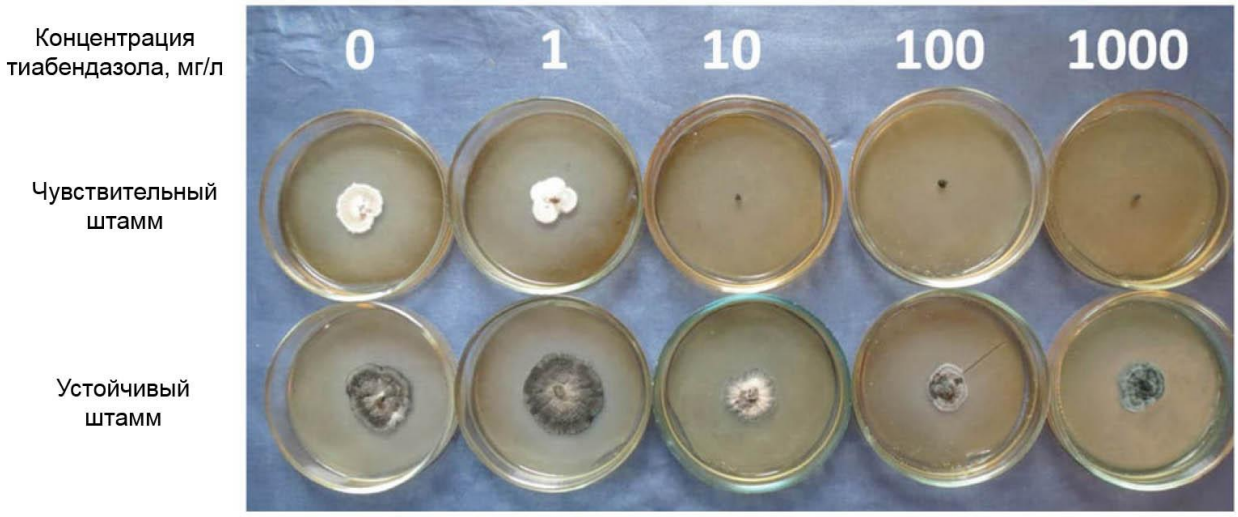

Рис. 3.13. Рост чувствительного и устойчивого к тиабендазолу штаммов *H. solani* на агаризованной среде с разными концентрациями тиабендазола (42-е сутки инкубации)

Контроль развития *H. solani* на клубнях достаточно труден из-за того, что гриб распространяется и заражает новые клубни как в поле, так и в хранилище. Показано, что применение эффективных средств защиты растений для обработки семенных клубней перед посадкой, а также перед закладкой на хранение, может существенно снизить поражение серебристой паршой. В России для обработки клубней разрешены фунгициды пенфлуфен, тиабендазол, тирам, флудиоксонил, дифеноконазол, азоксистробин, беномил, пенцикурон, причем в состав препаратов они могут входить как по отдельности, так и в смесях. Как известно, качественная защита может быть обеспечена только при условии применения высокоэффективных препаратов. Поэтому изучение присутствия устойчивых штаммов в региональных популяциях представляется крайне важной задачей.

Особую сложность вызывает защита клубней при хранении. Согласно результатам исследований Frazier et al. (1998), споры *H. solani* в течение 9 месяцев сохраняли жизнеспособность в почве, находящейся среди клубней во время хранения, и в термоизоляции хранилища. Инфицированные клубни, поступающие с поля, также могут служить источниками первичной инфекции. В связи с этим крайне важным представляется использование фунгицидов перед закладкой на хранение и во время хранения.

В России (и в других странах мира) для обработки клубней перед закладкой на хранение разрешен очень ограниченный спектр препаратов. В России разрешены только 3 фунгицида: бензойная кислота, тиабендазол и флудиоксонил. Наиболее широко из них применяется тиабендазол. В виде пирогенных шашек Вист он используется для обработки клубней сразу после закладки на хранение, для обработок во время хранения, обработке перед выгрузкой семенного картофеля из хранилища. Кроме того, тиабендазол входит в состав препарата Имикар (КС), используемого для предпосадочной обработки клубней (Государственный реестр..., 2017).

Препараты на основе азоксистробина и дифеноконазола широко известны и используются во многих странах мира для предпосадочной

обработки клубней картофеля. В некоторых странах мира, например в США, эти фунгициды разрешены также для обработки клубней картофеля при закладке на хранение. В отдельных регионах мира уже выявлены устойчивые к этим фунгицидам штаммы грибов (www.frac.info). Высокая доля устойчивых к азоксистробину штаммов *H. solani* показана и в нашей работе. В связи с этим необходим постоянный поиск новых высокоэффективных и безвредных для человека, животных и окружающей среды пестицидов, потенциально пригодных для использования в защите картофеля, и, в частности, для обработки клубней.

Одним из новых препаратов, способных обеспечить качественную защиту клубней от широкого комплекса грибных и бактериальных болезней, является препарат Зерокс на основе коллоидного серебра, модифицированного биоразлагаемым и безвредным для человека и животных амфотерным поверхностно-активным веществом. Многочисленные эксперименты, проведенные в центре токсикологии Перу (Centro Toxicologico S.A.C. 2017a, 2017b), показали безвредность препарата для человека и животных. В наших экспериментах показана высокая эффективность Зерокса в отношении возбудителя серебристой парши картофеля. В ближайшее время Зерокс будет зарегистрирован и в России.

3.3.3. Сравнение эффективности исследованных фунгицидов в отношении *H. solani* и *C. coccodes*

Как видно из таблицы 3.9, эффективностью в отношении обоих исследованных видов грибов при тесте на агаризованной питательной среде отличались фунгициды дифеноконазол и коллоидное серебро. Не было выявлено штаммов, устойчивых к этим фунгицидам. Тиабендазол также отличался высокой эффективностью, однако среди *H. solani* были выявлены устойчивые штаммы. Флудиоксонил сильно ингибировал рост *C. coccodes* на начальном этапе, но при длительном культивировании на среде с флудиоксонилом гриб образовывал устойчивые сектора, причем при

дальнейших пассажах на питательной среде с этим фунгицидом устойчивость сохранялась. *H. solani* на устойчивость к флудиоксонилу не проверяли. Пенцикурон оказался неэффективным в отношении обоих исследованных видов. Азоксистробин показал достаточно хорошую эффективность в отношении исследованных штаммов *C. coccodes*, но среди штаммов *H. solani* были отмечены высокоустойчивые. Различия в устойчивости к азоксистробину связаны, вероятно, с работой альтернативных дыхательных путей при росте на питательной среде. В полевых условиях продуктов альтернативного дыхания может не хватить для заражения и конкурентоспособной утилизации тканей растения, в связи с чем эффективность азоксистробина может быть существенно выше. С другой стороны, азоксистробин является эффективным стимулятором роста и иммунного ответа растений, что также может способствовать высокой эффективности азоксистробина в полевых условиях.

Таблица 3.9.

Эффективность фунгицидов в отношении исследованных грибов.

Фунгицид	**Вариабельность EC_{50}, мг/л**	
	H. solani	*C. coccodes*
Пенцикурон	>100	>100
Коллоидное серебро	7,0 – 72,7	1,2 – 7,0
Азоксистробин	0,07 – >100	0,06 – 19
Флудиоксонил	—*	0,6 – 0,9
Дифеноконазол	0,05 – 0,13	0,05 – 0,12
Тиабендазол	0,9 – >100	0,9 – 50,3

*Прим. * — не проверяли.*

3.3.4. Механизмы устойчивости штаммов *H. solani* к тиабендазолу

Тиабендазол – бензимидазольный фунгицид, действие которого обусловлено связыванием грибного белка бета-тубулина и ингибированием функции микротрубочек. Появление устойчивости к тиабендазолу отмечено

у многих видов грибов, включая *H. solani*. Известны мутации в гене бета-тубулина, приводящие к резкому повышению устойчивости к тиабендазолу, например, однонуклеотидные замены в кодонах 198 или 200 (Koenraadt et al., 1992).

В нашей работе структура гена β-тубулина определена у 17 различающихся по устойчивости к тиабендазолу российских и европейских штаммов (табл. 3.10). Все исследованные последовательности, принадлежащие чувствительным штаммам, оказались одинаковыми и полностью совпали с последовательностью Genbank Y10670 (McKay, Cooke, 1997), характерной для чувствительных к тиабендазолу штаммов. Высокоустойчивые штаммы H14RMCh24 (выделен в Московской области из клубня картофеля сорта Невский, выросшего из местного семенного материала), H13H16 (выделен из клубня картофеля сорта Астерикс, импортированного из Нидерландов), H14RKSu10 (выделен в Костромской области из картофеля сорта Сафия, семенной материал которого был привезен из Германии) содержали однонуклеотидную замену в позиции, соответствующей 198 кодону, что приводило к замене Glu (GAG) на Gln (CAG) при трансляции (Хуснетдинова и др., 2017; Kutuzova et al., 2017; Еланский и др., 2018). В партии клубней с того же поля, что и H14RMCh24, был обнаружен устойчивый к тиабендазолу штамм H14RMCh2. Штамм H14RMCh2 не имел мутации в 198 кодоне, но имел мутацию в 200 кодоне, выражавшуюся в замене Phe (TTC) на Tyr (TAC) (табл. 3.10). Эта мутация устойчивости также описана в литературе (Koenraadt et al., 1992; McKay, Cooke 1997) как вызывающая устойчивость к бензимидазолам.

Таблица 3.10.

Структура гена β-тубулина штаммов *H. solani*, различающихся по устойчивости к тиабендазолу. Кодоны с мутацией подчеркнуты.

Штамм	**Место и год сбора пораженного клубня, сорт картофеля**	**Устойчивость к тиабендазолу, EC_{50}, mg/l**	**Сиквенс кодонов 197-200 гена β-тубулина**
Штаммы выделены из клубней, выращенных в России из отечественного семенного материала			
H13 RB7	Брянская обл., 2013, Розара	5,4	GACGAGACCTTC
H13 RB11	Брянская обл., 2013, Винета	6,5	GACGAGACCTTC
H13 RMCh2*	Московская обл., 2014, Невский	>1000	GACGAGACC**TAC**
H13 RMCh24**	Московская обл., 2014, Невский	>1000	GAC**CAG**ACCTTC
H13 RMSh4d	Московская обл., 2013, Жуковский ранний	0,5	GACGAGACCTTC
H13 RKSt68	Костромская обл., 2013, Удача	5,7	GACGAGACCTTC
H13 RCh1	Чувашия, 2014, Удача	0,8	GACGAGACCTTC
H13 RCh8	Чувашия, 2014, Удача	1,7	GACGAGACCTTC
Штаммы выделены из клубней, выращенных в России из импортированного из Германии семенного материала			
H13 RKSu2/2	Костромская обл., 2014, Альвара	0,7	GACGAGACCTTC
H13 RKSu10**	Костромская обл., 2015, Сафия	>1000	GAC**CAG**ACCTTC
Штаммы выделены из импортированного семенного картофеля			
H13 H16**	Нидерланды, 2013, Астерикс	>1000	GAC**CAG**ACCTTC
H13 Gal 3	Германия, 2013, Альвара	1,0	GACGAGACCTTC
H13 Gde 11	Германия, 2013, Дельфине	0,5	GACGAGACCTTC
H13 Ges 12	Германия, 2013, Эстрелла	3,2	GACGAGACCTTC
H13 Gsa 18	Германия, 2013, Сафия	0,5	GACGAGACCTTC
H13 Gsa 20	Германия, 2013, Сафия	5,8	GACGAGACCTTC
G21	Германия, 2013, Сафия	5,3	GACGAGACCTTC

** – штамм RMCh2 имеет мутацию в 200 кодоне, выражающуюся в замене Phe (TTC) на Tyr (TAC),*

*** – штаммы RMCh24, RKSu10, H16 имеют мутацию в 198 кодоне, выражающуюся в замене Glu (GAG) на Gln(CAG) при трансляции,*

Результаты проведенной работы показывают, что в России, как и в других странах мира, встречаются устойчивые к тиабендазолу штаммы. В России тиабендазол является самым популярным препаратом для защиты клубней во время хранения. Для эффективной защиты клубней с помощью тиабендазола необходим мониторинг встречаемости устойчивых штаммов в популяциях *H. solani* из разных регионов России и в семенном картофеле, в том числе импортированном.

Анализ устойчивости штаммов *H. solani* к фунгицидам сложен из-за очень малой скорости роста этого гриба. Даже на среде без добавления фунгицида (контроль) колония достигает пригодного для учета диаметра в 40-50 мм на 20-25 сутки, а у некоторых штаммов и позже (Kutuzova et al., 2017). В таких условиях методы молекулярной диагностики устойчивости являются очень удобными. Как показали наши исследования, устойчивость российских штаммов обусловлена теми же мутациями, что и устойчивость европейских и американских штаммов. В этом случае для молекулярной диагностики устойчивости к тиабендазолу можно использовать хорошо зарекомендовавший себя метод McKay and Cooke (1997), позволяющий с помощью ПЦР выявлять нуклеотидные замены в кодоне 198. Тесты на основе ПЦР могут выявить устойчивый штамм в пораженном материале в течение нескольких часов без выделения чистой культуры гриба, что позволит оперативно разработать стратегию защиты клубней от серебристой парши и подобрать эффективные фунгициды.

Заключение

Главным условием конкурентоспособности растениеводческого предприятия является возможность производства востребованной рынком продукции, отличающейся хорошим внешним видом, не имеющей внешних признаков поражения патогенами и вредителями, не содержащей грибных или бактериальных токсинов. При этом технология производства должна обеспечивать и низкую себестоимость продукции.

Идущие в настоящее время глобальные климатические изменения, интенсивный обмен семенным материалом, применение новых пестицидов узконаправленного действия, а также рыночно ориентированных, но восприимчивых к патогенам сортов, приводят к появлению в регионах России ранее неизвестных фитопатогенных микроорганизмов и вредителей и изменению ареалов существующих. Появляются особо опасные штаммы фитопатогенов, отличающиеся высокой агрессивностью и устойчивостью к фунгицидным препаратам.

Основным элементом защиты растений от болезней до настоящего времени остается применение химических пестицидов. В производстве картофеля химические средства защиты растений применяют на всех этапах: для предпосадочной обработки семенных клубней, опрыскивания вегетирующих растений, обработки клубней перед закладкой на хранение и во время хранения. Проведенная работа показала сильные отличия эффективности фунгицидов в отношении видов и даже штаммов возбудителей грибных заболеваний. Выявлены мутации, приводящие к резкому повышению устойчивости. Следовательно, при практическом использовании следует уделять особое внимание подбору препаратов, учитывая потенциальную возможность развития тех или иных заболеваний.

Конкурентоспособное производство с/х продукции требует постоянного мониторинга изменений, происходящих в популяциях фитопатогенных микроорганизмов, разработки новых средств защиты растений,

сортоадаптированных технологий производства, защиты и хранения. Активно внедряемая в настоящее время система точного земледелия позволяет свести воедино данные об особенностях выращиваемых сортов, структуре популяций фитопатогенных микроорганизмов, уровнях их устойчивости к тем или иным патогенам, и увязать это с прогнозом погоды, данными дистанционного мониторинга состояния растений, внесением удобрений и т.д. В результате работы подобной платформы управления земледелием существенно снижаются риски развития эпифиотий, загрязнение среды пестицидами, повышается урожай и качество продукции, появляется возможность достаточно точного прогноза объема урожая. Разработкой платформ управления земледелием в настоящее время активно занимаются крупнейшие мировые корпорации, такие как Байер, Монсанто, Даком. Однако наполнением платформы информационным содержанием могут заниматься только научные учреждения, которые должны вести постоянный мониторинг популяций фитопатогенных микроорганизмов и, особенно, их устойчивых форм в разных регионах России и в импортируемом семенном материале.

В нашей работе впервые на современном уровне исследованы российские популяции таких опасных фитопатогенных грибов, как *C. coccodes* и *H. solani*, показаны отличия между томатными и картофельными штаммами *C. coccodes*, изучена устойчивость к фунгицидам, выявлены мутации, приводящие к устойчивости *H. solani* к популярному фунгициду тиабендазол. Полученные нами данные, опубликованные в открытой печати, несомненно, будут использованы в платформах управления земледелием и в разработке систем комплексной защиты картофеля и томата от болезней.

Выводы

1. При оценке разнообразия выделенных с картофеля штаммов *C. coccodes* по четырем независимым генетическим маркерным признакам и по данным культурально-морфологического анализа не было обнаружено различий между штаммами различной органотропной специализации и различного географического происхождения.

2. Обнаружены различия между штаммами *C. coccodes*, выделенными из картофеля и томата, по трем независимым генетическим маркерным признакам, которые показывают расхождение вида *C. coccodes* по эколого-трофическим нишам и, возможно, начальный этап симпатрического видообразования.

3. При оценке разнообразия штаммов *H. solani* по последовательности ядерных рибосомных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-5,8S-ITS2 различий выявлено не было.

4. Изучение роста *C. coccodes* при разных температурных режимах показало, что максимальная скорость роста наблюдалась при +24ºС. Существенные различия по скорости роста между штаммами были выявлены при экстремальных температурах +5ºС и +33ºС; при +15ºС и +24ºС различия отсутствовали.

5. При изучении действия фунгицидов на *C. coccodes* и *H. solani* наиболее высокую эффективность показали дифеноконазол и коллоидное серебро; штаммов, устойчивых к этим фунгицидам, выявлено не было. Обнаружена высокая вариабельность в уровнях устойчивости штаммов *H. solani* к фунгицидам азоксистробин и тиабендазол.

6. Обнаружены мутации гена β-тубулина, приводящие к резкому повышению устойчивости *H. solani* к тиабендазолу, сходные с таковыми у европейских и североамериканских устойчивых штаммов.

Практические рекомендации

1. Исследованные в работе фунгициды отличались по эффективности в отношении разных штаммов исследуемых грибов. Из литературных источников известно, что *C. coccodes* и *H. solani* накапливаются в почве в высокой концентрации после выращивания восприимчивых сортов картофеля (Merida, Loria, 1994; Rodriguez et al., 1996; Frazier et al., 1998). Применение во время хранения и при посадке фунгицидов с высоким риском возникновения устойчивых штаммов, например тиабендазола, может привести к накоплению устойчивых штаммов в поле, что сделает защиту неэффективной. Поэтому при обработках во время хранения и перед посадкой следует проводить ротацию препаратов, используя препараты с разными действующими веществами. Для определения потенциальной эффективности защитных мероприятий необходимо проводить оценку долей устойчивых штаммов в семенном материале.

2. Исследование участков генома выделенных с картофеля штаммов обоих исследуемых видов грибов показало их очень низкую внутривидовую вариабельность. Это позволяет надеяться на то, что устойчивые сорта не будут поражаться *C. coccodes* и *H. solani* продолжительное время, и усилия селекционеров имеет смысл сконцентрировать на селекции устойчивых сортов.

Благодарности

— Научному руководителю **Еланскому С.Н.** за идейное вдохновение, постоянную поддержку, консультации и помощь в работе;

— **Чудиновой Е.М.** за помощь в анализе результатов молекулярно-генетических исследований;

— **Кокаевой Л.Ю.** за помощь в освоении методов молекулярной диагностики; **Побединской М.А**. за советы и помощь в проведении лабораторных экспериментов; **Александровой А.В**. за советы и помощь в морфологических исследованиях;

— сотрудникам кафедры Микологии и Альгологии за моральную поддержку и помощь в работе.

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus

1. **Kutuzova I.A.**, Kokaeva L.Y., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Scolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment // Journal of Plant Pathology. — 2017. — V. 99(3). — P.635–642. DOI: 10.4454/jpp.v99i3.3950.

2. Belov G.L., Belosokhov A.F., **Kutuzova I.A.**, Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves in Russia // Journal of Plant Diseases and Protection. — 2018. — V. 125. – P. 311–317. DOI: 10.1007/s41348-017-0138-0.

3. Кудрявцева Н.Н., Побединская М.А., Балабко П.Н., Кокаева Л.Ю., Зайчик Б.Ц., **Кутузова И.А.**, Азаркович М.И., Еланский С.Н., Валуева Т.А. Протеолитическая активность и вирулентность штаммов *Alternaria alternata*, выделенных из томата // Микология и фитопатология. — 2017. — Т. 51(2). — С.110–116.

Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ (RSCI)

4. Хуснетдинова Т.И., **Кутузова И.А.**, Проничева И.С., Кокаева Л.Ю., Побединская М.А., Чудинова Е.М., Еланский С.Н. Устойчивость штаммов *Helminthosporium solani* к тиабендазолу // Агрохимический вестник.— 2017.— В.1. .— С. 40–43.

5. Еланский С.Н., Побединская М.А., **Кутузова И.А.**, Ярмеева М.М, Гуркина Т.А., Кокаева Л.Ю. Устойчивость *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes* и *Rhizoctonia solani* к фунгицидам, используемым для обработки клубней картофеля // Достижения науки и техники АПК. — 2018. — Т. 32(3). — С. 50–53.

Прочие публикации

6. Белосохов А. Ф., Белов Г. Л., **Кутузова И. А.**, Кокаева Л. Ю., Еланский С. Н. Встречаемость *Colletotrichum coccodes* в пораженных листьях картофеля и томата в России. // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 16–18.

7. Полуэктова Е. В. , Берестецкий А. О. , **Кутузова И. А.** , Еланский С. Н. Влияние состава питательных субстратов на хроматографические профили и фитотоксическую активность 4-х штаммов *Colletotrichum coccodes* различного географического происхождения // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 152–153.

8. **Кутузова И. А.**, Александрова А. В., Еланский С. Н. Вариабельность штаммов *Colletotrichum coccodes*, выделенных из различных регионов // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 62–64.

9. **Кутузова И. А.** , Побединская М. А. , Кокаева Л. Ю. , Еланский С. Н. Устойчивость штаммов *Helminthosporium solani* к некоторым фунгицидам, применяемым для обработки клубней картофеля // Защита картофеля. — 2016. — № 2. — С. 18–23.

10. **Кутузова И. А.**, Григорович И. А., Побединская М. А., Белов Г. Л., Еланский С. Н. Устойчивость российских и европейских штаммов *Colletotrichum coccodes* к некоторым фунгицидам // Защита картофеля. — 2015. — Т.1. — С. 30–34.

11. **Кутузова И.А.**, Кокаева Л.Ю. Использование экспресс-диагностики и оценки устойчивости к фунгицидам в защите картофеля от серебристой парши // Сборник тезисов XXII Международная научная конференция

студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Секция "Биология", М.: МАКС Пресс, 2015 — С. 199-200.

12**. Кутузова И.А.**, Григорович И.А., Побединская М.А., Фарукшина К.Т., Еланский С.Н. Эффективность химических фунгицидов в отношении возбудителей грибных инфекций клубней картофеля// Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др.. М.:Нац.акад.микологии, 2015. — Т.5. — С. 190–192.

13. Pobedinskaya M.A., Elansky S.N., Kokaeva L.Yu., **Kutuzova I.A.**, Pronicheva I.S., Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Ignatov A.N., Zherebin P.M., Denisov A.N., Krutyakov Y.A.. New fungicide and bactericide Zeroxxe®: in vitro assessment of fungicidal and bactericidal activity // Wageningen university, PPO-Special Report no. 17. — 2015. — P. 103-108.

Список цитированной литературы

1. Анисимов Б. В., Белов Г. Л,. Варицев Ю. А, Еланский С. Н., Журомский Г. К., Завриев С. К., Зейрук В. Н., Иванюк В. Г., Кузнецова М. А., Пляхневич М. П., Пшеченков К. А., Симаков Е. А., Склярова Н. П., Сташевски З., Усков А. И., Яшина И. М. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.
2. Белов Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов. – М.: МГУЛ, 2003. – 128 с.
3. Березина Н.В., Мешков Ю.И. Защита выгоночной культуры тюльпана. // Журнал «Теплицы России». – 2008. – №1.
4. Голышин Н.М. Фунгициды. – М. – 1993. – С. 319.
5. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации и дополнения к нему 2017 г. http://www.pesticidy.ru/ps-content/literature/files/Государственный_каталог_2017_3070_instructions.pdf
6. Груздев Г.С. Химическая защита растений // Под редакцией Г.С. Груздева - 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат. – 1987. – С. 415.
7. Еланский С. Н., Побединская М. А., Кутузова И. А. и др. Устойчивость *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes* и *Rhizoctonia solani* к фунгицидам, используемым для обработки клубней картофеля // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 3. – С. 50-53.
8. Ермаков И. П. Физиология растений. – М.: Академия, 2005. – 634 с.
9. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. – М.: «КолосС», 2012. – 127 с.
10. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Мн.: Белпринт. – 2005. — 696 с.
11. Калинин В.А., Довгилевич Е.В., Довгилевич А.В., Устименко Н.В. Определение остаточных количеств азоксистробина (ICIA 5504) и его геометрического изомера (R 230310) в зеленом луке и луке-репке

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // МУК 4.1.2269-07. – Москва. – 2007.

12. Клисенко М.А. Методы определения микроколичеств пестицидов. / Под ред. М. А. Клисенко. Совместное издание СССР – НРБ – ГДР – ВНР – ЧССР – СФРЮ. – М.: Медицина. – 1984. – С. 256.
13. Котова В.В., Кунгурцева О.В. Антракноз сельскохозяйственных растений. – СПб.: ВИЗР. – 2014. – Приложения к журналу «Вестник защиты растений», №11– 132 с.
14. Кутузова И. А., Александрова А. В., Еланский С. Н. Вариабельность штаммов *Colletotrichum coccodes*, выделенных из различных регионов. // Современная микология в России. / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Воронина, Ю. Т. Дьяков и др. – Т. 7. – Национальная академия микологии М, 2017. – С. 62-64.
15. Кутузова И. А., Григорович И. А., Побединская М. А. и др. Устойчивость российских и европейских штаммов *Colletotrichum coccodes* к некоторым фунгицидам. // Защита картофеля. – 2015. – № 1. – С. 30-34.
16. Кутузова И. А., Побединская М. А., Кокаева Л. Ю., Еланский С. Н. Устойчивость штаммов *Helminthosporium solani* к некоторым фунгицидам, применяемым для обработки клубней картофеля. // Защита картофеля. – 2016. – № 2. – С. 18-23.
17. Мартыненко В.И., Промоненков В.К., Кукаленко С.С., Володкович С.Д., Каспаров В.А. Пестициды: Справочник. – М.: Агропромиздат – 1992. – С. 368.
18. Мыца Е.Д. Влияние некоторых пестицидов на рост и образование ооспор фитопатогенного оомицета *Phytophthora infestans*. // Диссертация на соискания ученой степени кандидата биологических наук. – М. – 2015. – 113 с.
19. Полуэктова Е.В., Кутузова И.А., Берестецкий А.О., Еланский С.Н. Идентификация и некоторые физиолого-биохимические свойства штаммов возбудителя антракноза картофеля / Под ред. Е. Н. Биланенко,

Е. Ю. Воронина, Ю. Т. Дьяков и др. – Т. 7. – Национальная академия микологии М. – 2017. – С. 152-153.

20. Попов С.Я., Дорожкина Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений. Учебное пособие. / Под ред. проф. С.Я. Попова. – М.: Арт-Лион, 2003. – 208 с.
21. Ракитский В.Н., Юдина Т.В. Определение остаточных количеств метрибузина в клубнях картофеля методом газожидкостной хроматографии Сборник методических указании // МУК 4.1.1223-03. – М., 2003.
22. Хуснетдинова Т. И., Кутузова И. А., Проничева И. С., Кокаева Л.Ю., Побединская М.А., Чудинова Е.М., Еланский С.Н. Устойчивость штаммов возбудителя серебристой парши картофеля (*Helminthosporium solani*) к тиабендазолу // Агрохимический вестник. – 2017. – № 1. – С. 40-43.
23. Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волкова В.Н., Рогачева С.К. Измерение концентраций дифеноконазола в атмосферном воздухе населенных мест методом капиллярной газожидкостной хроматографии // МУК 4.1.2208-07. – М., 2007.
24. Al-Mughrabi K.I., Vikram A., Peters R.D., Howard R.J., Grant L., Barasubiye T., Lynch K., Poirier R., Drake K.A., Macdonald I.K., Lisowski S.L., Jayasuriya K.E. Efficacy of Pseudomonas syringae in the management of potato tuber diseases in storage. // Biological Control. – 2013. – V. 64. – P. 315–322.
25. Andrivon D., Ramage K., Guérin C., Lucan M., Jouan B. Distribution and fungicide sensitivity of Colletotrichum coccodes in French potato-producing areas. // Plant Pathology. – 1997. – V. 46. – P. 722–8.
26. Andrivon D., Lucas J.M., Guérin C., Jouan B. Colonization of roots, stolons, tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black dot fungus *Colletotrichum coccodes*. // Plant Pathology. – 1998. – V. 47. – P. 440–5.

27. Aqeel A.M., Pasche J.S., Gudmestad N.C. Variability in morphology and aggressiveness among vegetative compatibility groups of *Colletotrichum coccodes*. // Phytopathology. – 2008. – V. 98 – P. 901–909.
28. Bains P.S., Bisht V.S., Benard D.A. Soil survival and thiobendazole sensitivity of *Helminthosporium solani* isolates from Alberta, Canada // Potato Research. – 1996. – Vol.39. – P. 23-30.
29. Barkdoll A.W., Davis J.R. Distribution of *Colletotrichum coccodes* in Idaho and variation in pathogenicity on potato. // Plant Disease. – 1992. – V. 76 – P. 131–135.
30. Becker W.F., von Jagow G., Anke T., Steglich W. Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the cytochrome bc1 segment of the respiratory chain with an E-β-methoxyacrylate system as a common structural element // FEBS Letters. – 1981. – V. 132. – P. 329–333.
31. Blakeman J.P., Hornby D. The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia. // Transactions of the British Mycological Society. – 1966. – V. 49. – P. 227–240.
32. Bradshaw N.J., Turner J.A., Elcock S.J. Potatoes, a Survey of Diseases, 2000. // ADAS/CSL Research and Development Publication. London: Department for the Environment, Food and Rural Affairs. – 2002.
33. Bremer H. Beobachtungen zur Würzelfäule im Trockenklima. // Zeitschrift für Pflanzenkrankeiten und Pflanzenschutz. – 1954. – V. 61. – P. 575–87.
34. Burke O.D. The silver scurf disease of potatoes. // Bulletin of Cornell University Agricultural Experimental Station. – 1938. – V. 692. – P. 1-30.
35. Byrne J.M., Hausbeck M.K., Hammerschmidt R. Conidial germination and appressorium formation of *Colletotrichum coccodes* on tomato foliage. // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – P. 715- 718.
36. Carbone I., Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. // Mycologia. – 1999. – V. 91. – P. 553-556.

37. Chesters C.G.C., Hornby D. Studies on *Colletotrichum coccodes*. II. Alternative host tests and tomato fruit inoculations using a typical tomato root isolate. // Transaction of the British Mycological Society. – 1965. – V. 48. – P. 583-586.
38. Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – V. 107. – P. 387-98.
39. Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. // Plant Pathology. – 2002. – V. 51. – № 3. – P. 281-292.
40. Dahmen H., Staub T. Protective, curative, and eradicant activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola* and *Alternaria solani* // Plant disease. – 1992. – V. 76. – № 8. – P. 774-776.
41. Dashwood E.P., Fox R.A., Perry D.A. Effect of inoculum source on root and tuber infection by potato blemish disease fungi. // Plant Pathology. – 1992. – V. 41. – P. 215-223.
42. Davidse L.C., Flach W. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. // Biochimica et Biophysica Acta. – 1978. – V. 543. – P. 82-90.
43. Davis J.R., Johnson D.A. Diseases caused by fungi – black dot. // In: Stevenson W.R., Loria R., Franc G.D., Weingartner D.P., eds. Compendium of Potato Diseases. St Paul, MN, USA: APS Press. – 2002. – P. 16-18.
44. Denner F.D.N., Marais L. Silver scurf and anthracnose on potatoes. // South African Journal of Science. – 1989. – V. 85. – p. 673 (abstract).
45. Dickson B.T. The black dot disease of potato. // Phytopathology. – 1926. – V. 16. – P. 23-40.
46. Dillard H.R. Influence of temperature, pH, osmotic potential, and fungicide sensitivity on germination of conidia and growth from sclerotia of *Colletotrichum coccodes* in vitro. // Phytopathology. – 1988. – V.78. – P. 1357-1361.

47. Dillard H.R. Effect of temperature, wetness duration and inoculum density on infection and lesion development of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. // Phytopathology. – 1989. – V. 79. – P. 1063-1066.
48. Dillard H.R. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. // In: Bailey J.A., Jeger M.J., eds. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International. – 1992. – P. 225-236.
49. Dillard H.R., Cobb A.C. Disease progress of black dot on tomato roots and reduction in incidence with foliar applied fungicides. // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – № 12. – P. 1439-1442
50. Dillard H.R., Cobb A.C. Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. // Plant Disease. – 1998. – V. 82. – P. 235–238.
51. Eberlein C.V., Barkdoll A.W., Davis, J.R. Pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* isolates to potato (*Solanum tuberosum*) and two nightshade (*Solanum spp.*) species. // Weed Technology. – 1991. – V.5 – P. 570-574.
52. Errampalli D., Saunders J., Cullen D.W. A PCR-based method for detection of potato pathogen, *Helminthosporium solani*, in silver scurf infected tuber tissue and soils. // Journal of Microbiological Methods. – 2001a. – V. 44. – P. 59-68.
53. Farley J. D. Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil // Phytopathology. – 1976. – V. 66. – P. 640-641.
54. Fernández-Ortuño D., Torés J.A., de Vicente A., Pérez-García A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi // International Microbiology. – 2008. – V. 11. – P. 1-9.
55. Firman D.M., Allen E.J. Effects of seed size, planting density and planting pattern on the severity of silver scurf (*Helminthosporium solani*) and black scurf (*Rhizoctonia solani*) diseases of potatoes // Annals of Applied Biology. Great Britain. – 1995b. – V. 127. – P. 73-85.
56. Frazier M.J., Shetty K.K., Kleinkopf G.E., Nolte P. Management of silver scurf (*Helminthosporium solani*) with fungicide seed treatments and storage practices. // American Journal of Potato Research. – 1998. – V. 75. – P. 129-135.

57. Gisi U., Chin K.M., Knapova G., Küng Färber R., Mohr U., Parisi S., Sierotzki H., Steinfeld U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides // Crop Protection. – 2000. – №. 19. – P. 863-872.
58. Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides // Pest Management Science. – 2002. – №. 58. – P. 859-867.
59. Griffith, G.W., Shaw D.S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64. – №10. – P. 4007-4014.
60. Griffiths D.A., Campbell W.P. The fine structure of resting mycelium of *Verticillium* aibo-atrum R. a. B. // Canadian Journal of Microbiolody. – 1971. – V. 17. – № 12. – P. 1533-1535.
61. Guerber J.C., Liu B., Correll J.C., Johnston P.R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility // Mycologia. — 2003. — V. 95. — №. 5. — P. 872-895.
62. Hagiwara D., Asano Y., Marui J., Yoshimi A., Mizuno T., Abe K. Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress // Fungal Genetics and Biology. – 2009. – V. 46. №. 11. – P. 868-878.
63. Harrison D.E. Black dot disease of potato. // Journal of Agriculture Victoria. – 1963. – V. 61. – P. 573-576.
64. Hide G.A., Adams M.J. Relationships between disease levels on seed tubers, on crops during growth and in stored potatoes. // Silver scurf. Potato Research. – 1980. – V. 3. – № 23. – P. 229-40.
65. Hornby D. Studies on *Colletotrichum coccodes*: some properties of the fungus in soil and in tomato roots. // Transactions of the British Mycological Society. – 1968. – V. 51. – P. 541-553

66. Hunger R.M., McIntyre G.A.. Occurrence, development and losses associated with silver scurf and black dot on Colorado potatoes. // American Potato Journal 1979. – 56. – 289-306.
67. Issiakhem F., Bouznad Z. In vitro evaluation of difenoconazole and chlorothalonil on conidial germination and mycelial growth of *Alternaria alternata* and *A. solani* causal agent of early blight in Algeria // Twelfth EuroBlight workshop Arras. – 2010. – №. 14. – P. 297-302.
68. Jellis G.J., Taylor G.S. The development of silver scurf (*Heimilllhosporium solani*) disease of potato. // Annals of Applied Biology. – 1977b. – V. 86. - № 12. – P. 19-28. 12.
69. Johnson D.A. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russett Burbank potato. // Plant Disease. – 1994. – V. 78. – P. 1075-1078.
70. Johnson D.A, Miliczky E.R. Effects of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum coccodes*. // Plant Disease. – 1993a. – V. 77. – P. 13-17.
71. Kamara A.M., Huguelet J.F. Host range and overwintering of *Helminthosporium solani*. // American Potato Journal. – 1972. – V. 49. – P. 365 (abstract).
72. Kleczewski N.M., Egel D.S. Fungicide Resistance Management for Indiana Vegetables // Purdue extension. Vegetable Diseases. – 2012. – P. 1-5.
73. Koenraadt H., Somerville S.C., Jones A.L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. // Phytopathology. – 1992. – V. 82. – P. 1348-1354.
74. Komm D.A., Stevenson W.R. Tuber-borne infection of *Solanum tuberosum* ‘Superior’ by *Colletotrichum coccodes*. // Plant Disease Reporter. – 1978. – V. 62. – P. 682-687.

75. Konéa S.B., Dionnea A., Russell J.T., Antoun H., Avis T.J. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. // Biological Control. – 2010. – V. 52. – № 2. – P. 167-173.
76. Kutuzova I.A., Kokaeva L.Yu., Pobendinskaya M.A., Krutyakov Yu.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment. // *Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 99. – № 3. – P. 635-642.
77. Leroux O., Albertini C., Gautier A., Gredt M., Walker A. S. Mutation in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 a-demethylation inhibitors in field isolates of Mycosphaerella graminicola // Pest Management Science. – 2007. – V. 63. – P. 688-698.
78. Liu F., Cai L., Crous P.W., Damm U. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. // Mycologia. – 2013. – V. 105. – № 4. – P. 844-860.
79. Luttrell E.S. Systematics of *Helminthosporium* and related genera. // Mycologia. – 1964. – 56. – P. 119-132.
80. Maziah Z., Bailey J. A. Morphology and cultural variation among *Colletotrichum* isolates obtained from tropical forest nurseries. // Journal of Tropical Forest Science. – 2000. – V. 12. – № 1. – P. 1-20.
81. McIntyre G.A., Rusanowski C. Scanning electron microscope observations of the development of sporophores of *Colletotrichum atrementarium* on infected potato periderm. // American Potato Journal. – 1975. – V. 52. – P. 269-275.
82. McKay G.J., Cooke L.R. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. // FEMS Microbiology Letters. – 1997. – V. 152. – P. 371-378.
83. Merida C.L., Loria R. First report of resistance of *Helminthosporium solani* to thiabendazole in the United States. // Plant Disease. – 1990. – V. 74. – p. 614.
84. Merida C.L., Loria R. Survival of *Helminthosporium solani* in soil and in vitro colonization of senescent plant tissue. // American Potato Journal. – 1994. – V. 71. – P. 591-598.

85. Mohan S.K., Davis J.R., Sorensen L.H., Schneider A.T. Infection of aerial parts of potato plants by Colletotrichum coccodes and its effects on premature vine death and yield. // American Potato Journal. – 1992. – V. 69. – P. 547-559.
86. Mordue J.E.M. *Colletotrichum coccodes.* // CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. UK: Commonwealth Agricultural Bureau. – 1967. – № 131.
87. Mueller, D.S., Bradley, C.A. Field Crop Fungicides For the North Central United States. – 2008.
88. Ochiai N., Fujimura M., Oshima M. et al. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2002. – V. 66. – №. 10. – P. 2209-2215.
89. Olivier C., Loria R. Detection of *Helminthosporium solani* from soil and plant tissue with species-specific PCR primers // FEMS Microbiological Letters. – 1998. – V. 168. – №. 2. – P. 235-241.
90. Pantidou M. E., Schroeder, W. T. Foliage as a source of secondary inoculum for tomato anthracnose. // Phytopathology. – 1955. – V. 45. – P. 338-345.
91. Raid R.N., Pennypacker S.P. Weeds as hosts for *Colletotrichum coccodes*. // Plant Disease. – 1987. – V. 71. – P. 643-646.
92. Read P.J., Hide G.A. Effects of inoculum source and irrigation on black dot disease of potatoes (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes) and it's development during storage. // Potato Research. – 1988. – V. 31. – P. 493-500.
93. Read P.J., Hide G.A. Development of black dot disease [*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes] and its effects on the growth and yield of potato plants. // Annals of Applied Biology. - 1995a. – V. 127. – P. 57-72.
94. Rodriguez D., Secor G.A., Gudmestad N.C., Francl L. Production and dispersal of *Helminthosporium solani* conidia in storage. // American Potato Journal. – 1993. – V. 70. – P. 836-837.

95. Rodriguez D.A., Secor G.A., Gudmestad N.C., Francl L.J. Sporulation of *Helminthosporium solani* and infection of potato tubers in seed and commercial storages. // Plant Disease. – 1996. – V. 80. – P. 1063-1070.
96. Rosslenbroich H. J., Stuebler D. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. // Crop Protection. – 2000. – V. 19. – P. 557-561.
97. Sanogo S., Pennypacker S.P. Factors affecting sporogenic and myceliogenic germination of sclerotia of *Colletotrichum coccodes*. // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – P. 333-336.
98. Santerre J. New studies on transmission of silver scurf in potatoes by contaminated seeds. // Canadian Journal of Plant Science. – 1972. – V. 52. – P. 625-632.
99. Stephenson S.A., Green J.R., Manners J.M., Maclean D.J. Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. // Current Genetics – 1997. – V. 31. – P. 447– 454.
100. Sutton B.C. The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum. // In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, ed. MJ Jeger. Wallingford, England: CAB International. – 1992.
101. Tsror (Lahkim) L., Aharon M., Erlich O. Survey of bacterial and fungal seedborne diseases in imported and domestic potato seed tubers. // Phytoparasitica. - 1999a. – V. 27. – P. 215-226.
102. Tsror (Lahkim) L., Erlich O., Hazanovsky M. Effect of *Colletotrichum coccodes* on potato yield, tuber quality, and stem colonization during spring and autumn. // Plant Disease. - 1999b. – V. 83. – P. 561-565.
103. Tu J.C. Modes of primary infection caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in navy bean. // Microbios. – 1989. – V. 57. – P. 85-91.
104. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – 18. – № 1. – P. 315-322.

105. Wymore L.A., Poirier C., Watson A.K., Gotlieb A.R. *Colletotrichum coccodes*, a potential bioherbicide for control of Velvetleaf (Abutilon theophrasti). // Plant Disease. – 1988. – V. 72. – P. 534-538.
106. Yu X., Hallett S.G., Sheppard J., Watson A.K. Application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1997. – V. 47. – P. 301-305.
107. Zhang Y., Lamm R., Pillonel C., Lam S., Xu J.R. Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* os-2 Gene Encodesa HOG1 MitogenActivated Protein Kinase Homologue. // Applied Environmental Microbiology. – 2002. – V.68. – № 2. – P.532-538.
108. Ziyao F., Runji M., Zhiqiang M., Xiuying H., Xiaofeng Z., Wenqiao W., Yingchao L. Joint-toxicity of the mixtures of fludioxonil with coumoxystrobin, pyraclostrobin or difenoconazole against *Alternaria solani* // Plant Protection. – 2012. – p. 15.
109. Zornitsa B. S., Rossitza M. R., Karov I., Kovacevik B., Manova V. I., Ralitsa G. G. 2000 Štip, Macedonia Delcev University – Stip, Macedonia Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum coccodes* isolated from pepper cultivated in Bulgaria and Macedonia. // Journal Natural Science, Matica Srpska Novi Sad. – 2013. – № 124. – P. 249—261.
110. http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Article%20Images/anthracnose.jpg
111. www.cytokine.ru
112. www.evrogen.ru
113. http://ephytia.inra.fr/en/C/21179/Potato-Symptoms
114. http://www.frac.info/
115. http://www.pesticidy.ru/active_substance/difenoconazole
116. http://www.pesticidy.ru/active_substance/pencikuron
117. http://www.pesticidy.ru/active_substance/azoxystrobin
118. http://www.pesticidy.ru/active_substance/fludioxonyl

119. http://www.pesticidy.ru/active_substance/thiamethoxam
120. http://www.pesticidy.ru/active_substance/imidacloprid
121. http://www.pesticidy.ru/active_substance/metribuzin

Приложение к пункту 2.4

Таблица П.1.

Регламенты применения на картофеле использованных в работе пестицидов (согласно «Государственному каталогу пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации», 2017 г).

Название, препаративная форма; содержание д.в.; регистрант, классы опасности, номер государственной регистрации, ограничения, дата окончания срока регистрации	**Норма применения препарата (л/га, кг/га, л/т, кг/т)**	**Культура, обрабатываемый объект**	**Заболевание**	**Способ, время обработки, особенности применения**
Дифеноконазол				
Скор, КЭ (250 г/л) ООО «СИНГЕНТА» 3/3 041-02-171-1 08.12.2023	0,3-0,5	Томат открытого грунта	Альтернариоз	Опрыскивание в период вегетации при появлении первых признаков болезни, последующее- с интервалом 10-14 дней. Расход рабочей жидкости - 200-400 л/га
	0,3-0,5	Картофель	Альтернариоз	Опрыскивание в период вегетации при появлении первых признаков болезни, последующее- с интервалом 10-14 дней. Расход рабочей жидкости - 200-400 л/га
Флудиоксонил				
(О) (Р) **Протект, КС (25 г/л)** ООО «АгроЭксперт Груп» 3/- 178-02-1365-1 08.02.2027	0,4	Картофель	Ризоктониоз, фузариоз, серебристая парша	Обработка клубней до и во время посадки. Расход рабочей жидкости – до 10 л/т.
	0,2		Гнили при хранении: фузариоз, фомоз, мокрая гниль, серебристая парша, антракноз	Обработка клубней перед закладкой на хранение. Расход рабочей жидкости – до 10 л/т.
(Р) **Максим, КС (25 г/л)** ООО «СИНГЕНТА» 3/- 041-02-167-1 02.12.2023	0,2	Картофель семенной	Гнили при хранении: фузариоз, фомоз, альтернариоз, антракноз, мокрая гниль, парша серебристая	Опрыскивание клубней перед закладкой на хранение. Расход рабочей жидкости – до 10 л/т
	0,4		Ризоктониоз,	Опрыскивание клубней

			фузариоз	перед посадкой. Расход рабочей жидкости – до 10 л/т
	20 мл/л воды (Л)	Картофель семенной	Гнили при хранении: фузариоз, фомоз, альтернариоз, антракноз, мокрая гниль, парша серебристая	Обработка клубней перед закладкой на хранение с последующим просушиванием. Расход рабочей жидкости – 1 л/100 кг клубней
	40 мл/л воды (Л)		Ризоктониоз, фузариоз	Обработка клубней перед посадкой. Расход рабочей жидкости – 1 л/100 кг клубней
Азоксистробин				
(Р) **Квадрис, СК (250 г/л)** ООО «СИНГЕНТА» 2/3 041-02-211-1 25.12.2023	0,4-0,6	Томат открытого грунта	Фитофтороз, мучнистая роса, альтернариоз	Опрыскивание в период вегетации после цветения 1-2 кистей, последующее - с интервалом 7-14 дней. Расход рабочей жидкости - до 600 л/га
	0,8-1,0	Томат защищенного грунта		Опрыскивание в период вегетации после цветения 1-2 кистей, последующее - с интервалом 7-14 дней. Расход рабочей жидкости - до 1000 л/га
	3,0	Картофель	Ризоктониоз, серебристая парша	Опрыскивание почвы при посадке клубней. Расход рабочей жидкости - 80-200 л/га
Пенцикурон+имидаклоприд				
Престиж, КС (140 + 150 г/л) Байер КропСайенс АГ 3/- 1756-10-101-010-0-0-0-1 27.01.2020	0,7-1	Картофель	Ризоктониоз, парша обыкновенная	Обработка клубней до или во время посадки. Расход рабочей жидкости - 10 л/т
	70-100 мл/л воды (Л)	Картофель	Ризоктониоз, парша обыкновенная	Обработка клубней до посадки. Расход рабочей жидкости - 1 л/100 кг
Имидаклоприд+Тиабендазол				
(И) (Р) **Имикар, КС (280+80 г/л)** ООО «Агрорус-Альянс»; Панама Агрокемикалс Инк. 3/- 010(011)-01-1223-1 04.09.2026	0,6-0,7	Картофель	Проволочники, колорадский жук, тли. Ризоктониоз, парша обыкновенная.	Обработка клубней до посадки. Расход рабочей жидкости - 10 л/т
Тиабендазол				
(О) (Р) **Вист, шашки насыпные (400 г/кг)** ООО «ФУМИГАНТ-ПЛЮС»	150-200 г/ 1000 $м^3$	Помещение под картофель	Фузариоз, фомоз, ооспороз, сухая гниль	Фумигация после загрузки на хранение
	0,01-0,05	Картофель (семенной)		Фумигация картофеля сразу после загрузки на

3/- 295-02-639-1 15.04.2025	0,005-0,01	Картофель продовольственный		хранение. Высота слоя: в сетках – 0,3 м; насыпью – 0,5 м в хранилищах без вентиляции
	0,01-0,05	Картофель семенной	Ризоктониоз	Фумигация картофеля перед посадкой
	5 г/25 $м^3$ (Л)	Картофель семенной, картофель продовольственный в погребах и подвалах.	Фузариоз, фомоз, ооспороз, сухая гниль	Фумигация после загрузки на хранение

Сокращения: СК – суспензионный концентрат, КС – концентрат суспензии, КЭ – концентрат эмульсии.

Приложение к пункту 3.1.

Таблица П.2.

Микроморфология штаммов *C. coccodes* на среде PDA при 24°C

Общий посев на PDA 24C				
Штамм	**Объект**	**Параметр**	**Среднее**	**Ош. среднего**
C13 Gal 15	Склероции	Длина	262,5	23,2
		Ширина	221,2	12,3
	Щетинки		87,0	5,1
	Споры осн.	Длина	22,6	2,2
		Ширина	3,4	0,3
	Споры доп	Длина	12,7	0,4
		Ширина	4,1	0,1
	Споры общее	Длина	14,4	0,8
		Ширина	4,0	0,1
C13 Gal 23	Склероции	Длина	227,5	21,0
		Ширина	185,1	13,9
	Щетинки		117,7	6,3
	Споры осн.	Длина	18,7	0,9
		Ширина	4,6	0,3
	Споры доп	Длина	12,5	0,5
		Ширина	4,6	0,1
	Споры доп 2	Длина	11,9	0,6
		Ширина	5,0	0,3
	Споры общее	Длина	13,5	0,5
		Ширина	4,7	0,1
C13 Gal 24	Склероции	Длина	258,9	33,6
		Ширина	192,7	26,7
	Щетинки		91,8	4,8
	Споры осн.	Длина	12,8	0,3
		Ширина	4,0	0,1
C13 Gde 8/2	Склероции	Длина	275,3	29,6
		Ширина	212,7	23,4
	Щетинки		126,6	7,3

	Споры осн.	Длина	22,1	0,2
		Ширина	4,0	0,1
	Споры доп	Длина	13,3	0,4
		Ширина	4,2	0,1
	Споры общее	Длина	18,3	0,6
		Ширина	4,1	0,1
C13 Gde 9	Склероции	Длина	237,2	32,9
		Ширина	151,6	17,7
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	18,2	0,5
		Ширина	4,5	0,1
	Споры доп	Длина	11,8	0,4
		Ширина	4,7	0,1
	Споры общее	Длина	14,5	0,6
		Ширина	4,6	0,1
C13 Gde 20	Склероции	Длина	263,0	22,9
		Ширина	202,7	13,7
	Щетинки		126,8	8,3
	Споры осн.	Длина	12,3	0,4
		Ширина	4,8	0,2
	Споры доп	Длина	13,2	1,2
		Ширина	7,4	0,7
	Споры общее	Длина	12,5	0,4
		Ширина	5,3	0,3
C13 Ges 6	Склероции	Длина	167,1	32,9
		Ширина	116,5	22,8
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	19,5	0,3
		Ширина	4,4	0,1
	Споры доп	Длина	11,6	0,3
		Ширина	4,0	0,1
	Споры общее	Длина	15,6	0,6
		Ширина	4,2	0,1
C13 Ges 19	Склероции	Длина	141,3	29,6
		Ширина	90,8	17,8
	Щетинки		-	-

	Споры осн.	Длина	18,4	0,2
		Ширина	4,1	0,1
C13 Gsa 5	Склероции	Длина	163,1	20,9
		Ширина	117,4	13,1
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	19,2	0,7
		Ширина	4,4	0,2
	Споры доп	Длина	11,8	0,5
		Ширина	4,4	0,1
	Споры общее	Длина	13,7	0,7
		Ширина	4,4	0,1
C13 Gsa 29	Склероции	Длина	305,6	41,0
		Ширина	201,4	28,5
	Щетинки		91,8	4,6
	Споры осн.	Длина	13,5	0,4
		Ширина	4,3	0,1
C13 VT 1/1	Склероции	Длина	309,3	45,2
		Ширина	203,9	24,8
	Щетинки		527,3	34,6
	Споры осн.	Длина	14,4	0,7
		Ширина	5,6	0,2
C14 VT 1/1	Склероции	Длина	225,3	28,5
		Ширина	76,5	45,9
	Щетинки		99,2	4,9
	Споры осн.	Длина	16,1	0,3
		Ширина	4,4	0,1
	Споры доп	Длина	12,2	0,4
		Ширина	4,3	0,1
	Споры общее	Длина	14,2	0,4
		Ширина	4,3	0,1
C13 KT 11	Склероции	Длина	294,5	26,0
		Ширина	205,2	21,0
	Щетинки		119,9	6,2
	Споры осн.	Длина	19,7	0,3
		Ширина	4,3	0,1
	Споры доп	Длина	11,2	0,3

		Ширина	4,5	0,1
	Споры общее	Длина	15,7	0,6
		Ширина	4,4	0,1
C13 KT 15	Склероции	Длина	366,9	35,6
		Ширина	233,7	20,1
	Щетинки		113,7	6,0
	Споры осн.	Длина	19,3	0,2
		Ширина	4,5	0,1
C13 KT 58b	Склероции	Длина	258,0	31,9
		Ширина	155,7	18,5
	Щетинки		104,2	3,6
	Споры осн.	Длина	16,9	0,8
		Ширина	4,5	0,2
	Споры доп	Длина	11,3	0,4
		Ширина	4,9	0,1
	Споры общее	Длина	13,3	0,5
		Ширина	4,8	0,1
C14 MCT 6	Склероции	Длина	241,5	29,4
		Ширина	178,4	19,8
	Щетинки		208,5	12,2
	Споры осн.	Длина	12,5	0,6
		Ширина	4,5	0,1
C14 MCT 18/2	Склероции	Длина	296,8	34,4
		Ширина	196,8	14,1
	Щетинки		113,5	4,5
	Споры осн.	Длина	11,5	0,4
		Ширина	5,0	0,1
C13 HPT 29/2	Склероции	Длина	260,5	34,8
		Ширина	182,9	15,3
	Щетинки		121,3	5,5
	Споры осн.	Длина	13,0	0,4
		Ширина	4,2	0,1
Стебли и листья				
C16 MGS 9	Склероции	Длина	328,4	38,8
		Ширина	213,1	24,9
	Щетинки		159,0	5,8

	Споры осн.	Длина	19,7	0,2
		Ширина	4,1	0,1
C16 MGS 10a	Склероции	Длина	289,6	20,8
		Ширина	237,0	13,1
	Щетинки		155,3	6,0
	Споры осн.	Длина	19,9	0,2
		Ширина	3,7	0,1
C16 MGS 10b	Склероции	Длина	331,1	31,0
		Ширина	222,5	17,3
	Щетинки		166,8	5,0
	Споры осн.	Длина	20,7	0,2
		Ширина	4,1	0,1
C16 MGS 15	Склероции	Длина	290,2	24,5
		Ширина	206,0	18,8
	Щетинки		133,1	6,6
	Споры осн.	Длина	19,9	0,2
		Ширина	4,0	0,1
C16 MGS 16a	Склероции	Длина	284,0	31,8
		Ширина	191,3	12,9
	Щетинки		157,7	5,5
	Споры осн.	Длина	20,1	0,2
		Ширина	4,1	0,1
C16 MGS 16b	Склероции	Длина	264,2	23,3
		Ширина	173,1	14,4
	Щетинки		149,1	5,9
	Споры осн.	Длина	21,3	0,2
		Ширина	4,0	0,1
	Споры доп	Длина	14,4	0,7
		Ширина	4,6	0,2
	Споры общее	Длина	18,9	0,6
		Ширина	4,2	0,1
C16 MEL 3	Склероции	Длина	365,4	33,1
		Ширина	250,4	11,6
	Щетинки		128,8	3,7
	Споры осн.	Длина	20,1	0,3
		Ширина	4,1	0,1

	Споры доп	Длина	16,0	0,3
		Ширина	4,3	0,1
	Споры общее	Длина	18,6	0,4
		Ширина	4,2	0,1
C16 MEL 7	Склероции	Длина	277,1	27,5
		Ширина	207,4	11,3
	Щетинки		140,9	4,2
	Споры осн.	Длина	20,3	0,3
		Ширина	4,3	0,1
	Споры доп	Длина	15,0	1,2
		Ширина	4,6	0,5
	Споры общее	Длина	19,7	0,4
		Ширина	4,3	0,1
C15 MEL 11	Склероции	Длина	208,2	11,9
		Ширина	149,3	8,2
	Щетинки		151,8	9,3
	Споры осн.	Длина	21,6	0,3
		Ширина	4,6	0,1

Таблица П.3.

Микроморфология штаммов *C. coccodes* на среде сусло-агар при различных температурах.

5°C				
Штамм	**Объект**	**Параметр**	**Среднее**	**Ош. среднего**
C13KT 11	Склероции	Длина	165,3	21,5
		Ширина	108,6	14,8
	Щетинки		129,5	6,7
	Споры осн.	Длина	11,9	1,7
		Ширина	4,6	0,5
C13KT 15	Склероции	Длина	194,7	17,2
		Ширина	129,5	14,7
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-
C14MCT 6	Склероции	Длина	135,8	13,0
		Ширина	104,5	12,2
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-
C13Gde 8/2	Склероции	Длина	144,9	17,3
		Ширина	87,9	8,5
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	13,9	3,4
		Ширина	4,8	2,4
C13Ges 19	Склероции	Длина	-	-
		Ширина	-	-
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	11,5	0,5
		Ширина	4,3	0,2
C13Gsa 5	Склероции	Длина	-	-
		Ширина	-	-
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	14,0	0,4
		Ширина	4,2	0,1
C13Gsa 29	Склероции	Длина	-	-

		Ширина	-	-
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	12,3	1,5
		Ширина	4,1	0,5
C13HPT 29/2	Склероции	Длина	275,2	41,3
		Ширина	204,0	42,6
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	13,3	0,6
		Ширина	4,2	0,2
C13MEL 11	Склероции	Длина	257,5	30,5
		Ширина	182,7	19,5
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	17,6	10,3
		Ширина	4,1	1,0
C13Gal 23	Склероции	Длина	-	-
		Ширина	-	-
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-

15°C

Штамм	**Объект**		**Среднее**	**Ош. среднего**
C13KT 11	Склероции	Длина	309,7	38,7
		Ширина	237,0	28,0
	Щетинки		145,1	10,5
	Споры осн.	Длина	18,8	0,5
		Ширина	4,2	0,1
C13KT 15	Склероции	Длина	407,3	30,0
		Ширина	311,2	28,3
	Щетинки		132,5	14,0
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-
C14MCT 6	Склероции	Длина	468,7	25,8
		Ширина	378,3	26,4
	Щетинки		204,0	12,5
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-
C13Gde 8/2	Склероции	Длина	444,9	30,9

		Ширина	338,7	18,5
	Щетинки		156,4	7,5
	Споры осн.	Длина	14,7	0,5
		Ширина	4,8	0,1
C13Ges 19	Склероции	Длина	107,8	11,4
		Ширина	81,8	10,6
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	13,0	0,6
		Ширина	5,0	0,2
C13Gsa 5	Склероции	Длина	59,5	5,2
		Ширина	42,7	3,6
	Щетинки		101,3	5,9
	Споры осн.	Длина	17,0	0,3
		Ширина	4,5	0,1
C13Gsa 29	Склероции	Длина	465,5	34,4
		Ширина	370,5	26,0
	Щетинки		117,5	6,6
	Споры осн.	Длина	17,4	0,8
		Ширина	4,6	0,1
C13HPT 29/2	Склероции	Длина	382,9	31,7
		Ширина	300,6	26,6
	Щетинки		164,5	15,0
	Споры осн.	Длина	15,6	0,6
		Ширина	5,0	0,1
C13MEL 11	Склероции	Длина	320,0	33,6
		Ширина	234,1	29,1
	Щетинки		139,8	7,1
	Споры осн.	Длина	13,1	0,6
		Ширина	4,5	0,1
C13Gal 23	Склероции	Длина	362,1	20,8
		Ширина	294,1	18,1
	Щетинки		130,1	5,7
	Споры осн.	Длина	-	-
		Ширина	-	-
24°C				
Штамм	**Объект**		**Среднее**	**Ош. среднего**
C13KT 11	Склероции	Длина	400,4	38,8

		Ширина	280,1	26,2
	Щетинки		140,3	7,4
	Споры осн.	Длина	20,0	0,3
		Ширина	3,9	0,1
C13KT 15	Склероции	Длина	344,4	25,7
		Ширина	257,3	17,6
	Щетинки		122,1	14,0
	Споры осн.	Длина	15,8	0,6
		Ширина	4,5	0,1
C14MCT 6	Склероции	Длина	318,1	26,4
		Ширина	226,3	12,0
	Щетинки		162,0	10,2
	Споры осн.	Длина	12,1	0,4
		Ширина	4,8	0,2
C13Gde 8/2	Склероции	Длина	274,7	38,9
		Ширина	190,8	26,3
	Щетинки		188,4	9,8
	Споры осн.	Длина	21,1	0,3
		Ширина	4,2	0,1
	Споры доп.	Длина	14,5	0,7
		Ширина	5,7	0,3
C13Ges 19	Склероции	Длина	130,0	16,4
		Ширина	94,5	10,9
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	14,0	0,6
		Ширина	5,1	0,2
C13Gsa 5	Склероции	Длина	321,6	28,8
		Ширина	259,2	26,7
	Щетинки		145,8	9,7
	Споры осн.	Длина	12,6	0,4
		Ширина	5,3	0,2
C13Gsa 29	Склероции	Длина	364,8	34,6
		Ширина	260,3	30,0
	Щетинки		108,5	8,7
	Споры осн.	Длина	16,2	0,3
		Ширина	4,3	0,1
C13HPT 29/2	Склероции	Длина	293,3	16,0

		Ширина	222,3	14,3
	Щетинки		171,0	7,7
	Споры осн.	Длина	18,1	0,5
		Ширина	4,4	0,1
C13MEL 11	Склероции	Длина	326,9	25,1
		Ширина	243,2	12,4
	Щетинки		134,2	8,1
	Споры осн.	Длина	12,4	0,4
		Ширина	5,0	0,1
C13Gal 23	Склероции	Длина	348,2	23,3
		Ширина	263,4	16,7
	Щетинки		106,2	6,4
	Споры осн.	Длина	16,4	0,4
		Ширина	4,6	0,1
33°C				
Штамм	**Объект**		**Среднее**	**Ош. среднего**
C13KT 11	Склероции	Длина	286,6	33,0
		Ширина	219,7	20,0
	Щетинки		119,0	18,5
	Споры осн.	Длина	15,7	0,7
		Ширина	3,9	0,2
C13KT 15	Склероции	Длина	321,4	18,0
		Ширина	259,9	16,6
	Щетинки		90,5	5,9
	Споры осн.	Длина	16,4	0,9
		Ширина	4,6	0,2
C14MCT 6	Склероции	Длина	-	-
		Ширина	-	-
	Щетинки		-	-
	Споры осн.	Длина	17,6	2,1
		Ширина	3,9	1,0
C13Gde 8/2	Склероции	Длина	244,8	25,0
		Ширина	194,6	23,3
	Щетинки		94,1	11,7
	Споры осн.	Длина	16,1	0,8
		Ширина	4,4	0,1
C13Ges 19	Склероции	Длина	203,5	31,2

		Ширина	146,0	21,4
	Щетинки		67,3	6,3
	Споры осн.	Длина	17,4	0,4
		Ширина	4,1	0,1
C13Gsa 5	Склероции	Длина	117,6	9,5
		Ширина	95,1	8,1
	Щетинки		72,7	5,2
	Споры осн.	Длина	18,8	0,2
		Ширина	4,0	0,1
C13Gsa 29	Склероции	Длина	255,1	38,9
		Ширина	206,4	31,2
	Щетинки		114,9	10,0
	Споры осн.	Длина	17,0	0,3
		Ширина	4,0	0,1
C13HPT 29/2	Склероции	Длина	369,1	59,1
		Ширина	226,9	35,7
	Щетинки		78,2	7,3
	Споры осн.	Длина	16,7	0,5
		Ширина	4,3	0,2
C13MEL 11	Склероции	Длина	371,0	40,2
		Ширина	287,7	35,3
	Щетинки		73,9	15,0
	Споры осн.	Длина	17,4	0,9
		Ширина	4,4	0,2
C13Gal 23	Склероции	Длина	211,1	37,8
		Ширина	154,3	23,8
	Щетинки		91,6	34,4
	Споры осн.	Длина	16,0	0,5
		Ширина	4,4	0,1

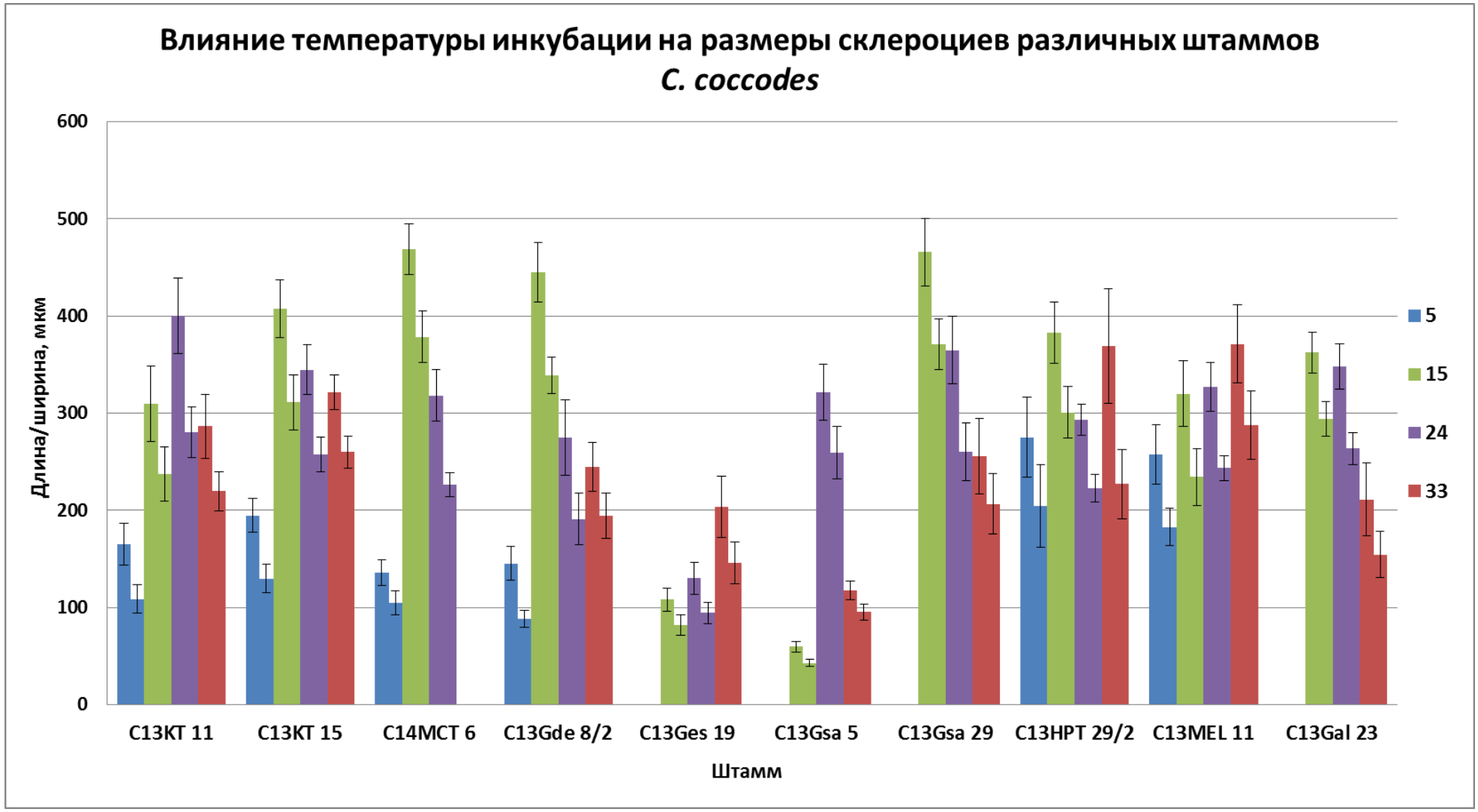

Рисунок П.1. Размеры склероциев различных штаммов *C. coccodes* при разных температурах роста.

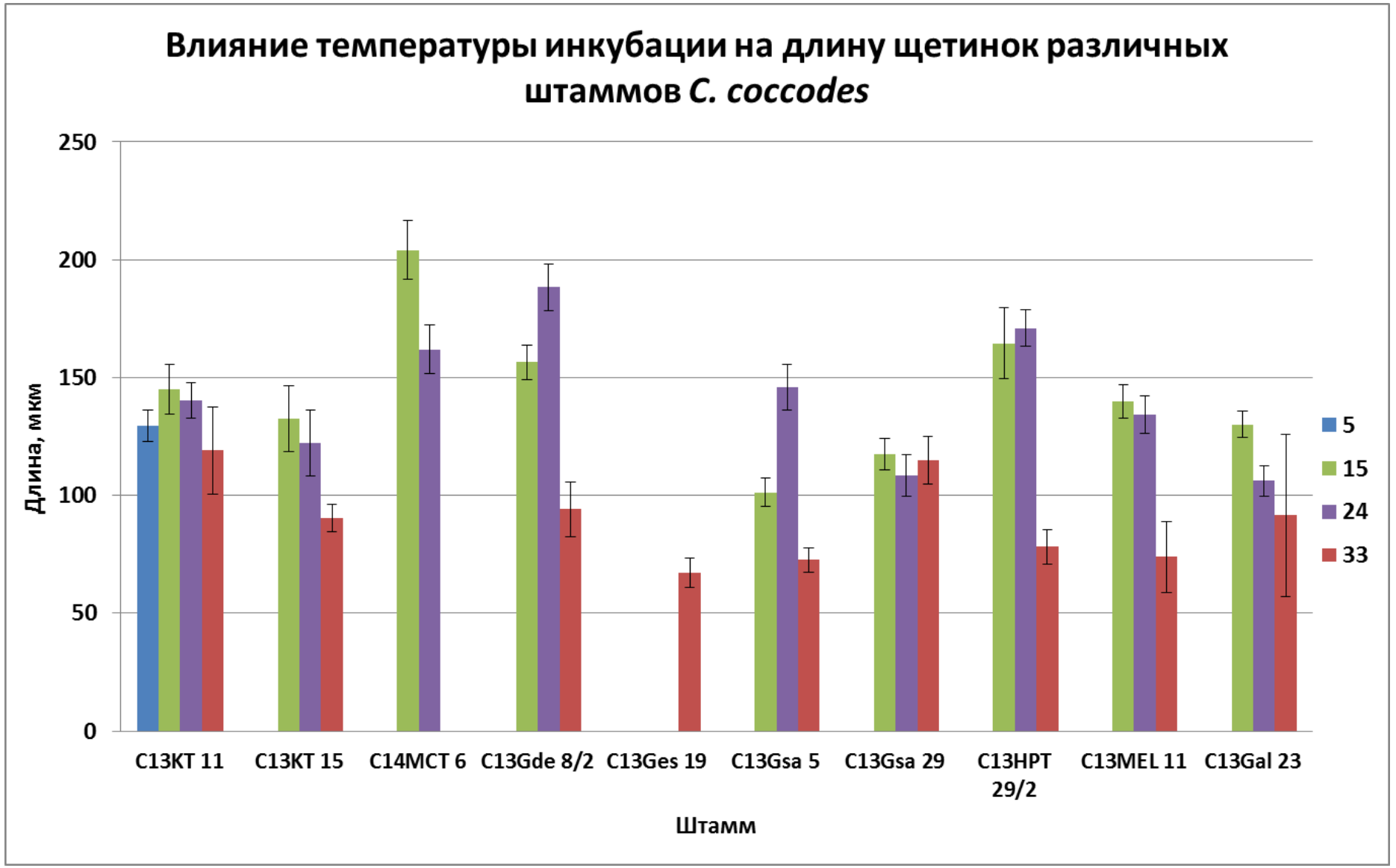

Рисунок П.2. Размеры щетинок различных штаммов *C. coccodes* при разных температурах роста.

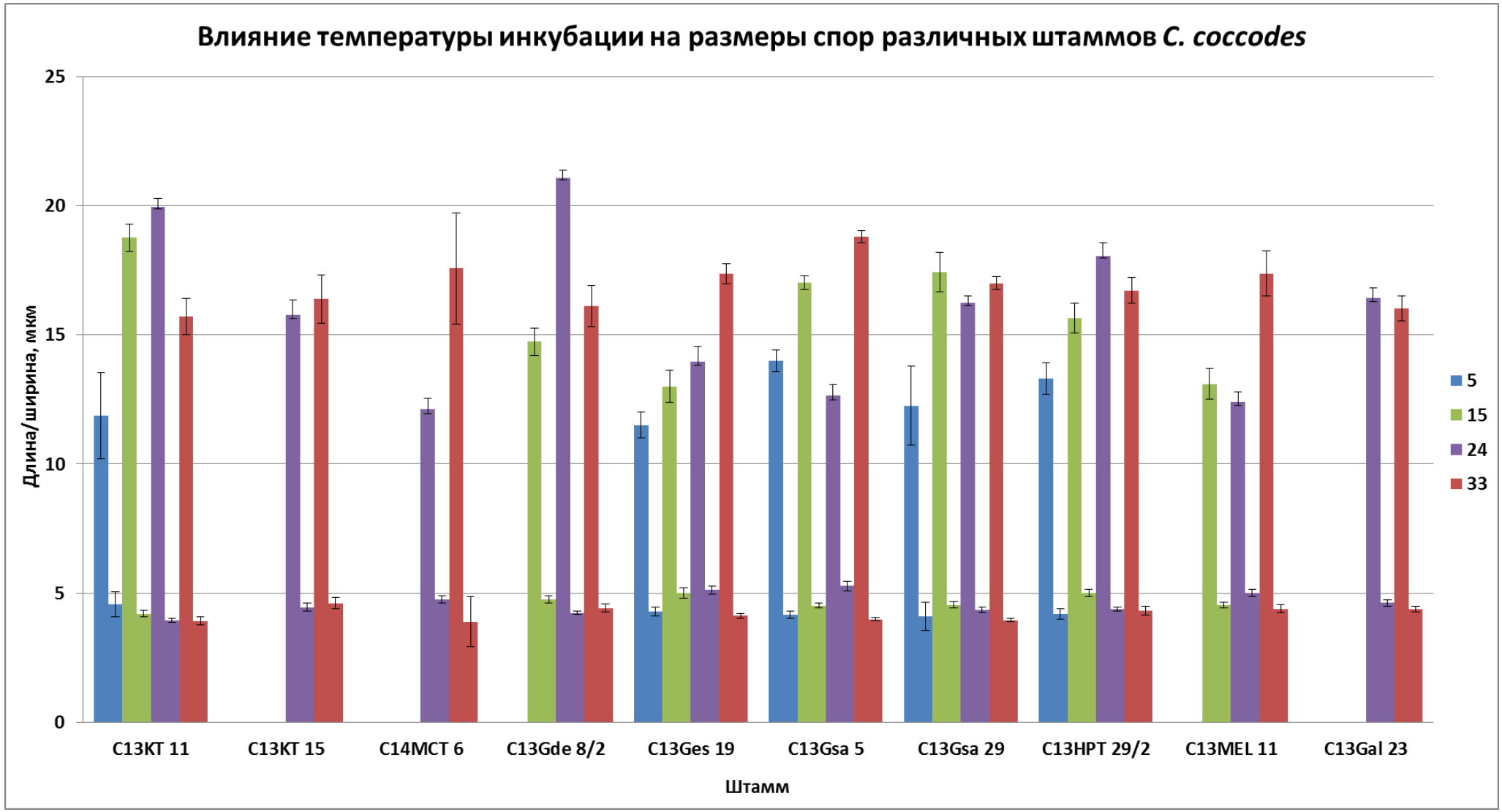

Рисунок П.3. Размеры спор различных штаммов *C. coccodes* при разных температурах роста.

Приложение к пункту 3.3.1.

Устойчивость *C. coccodes* к фунгицидам.

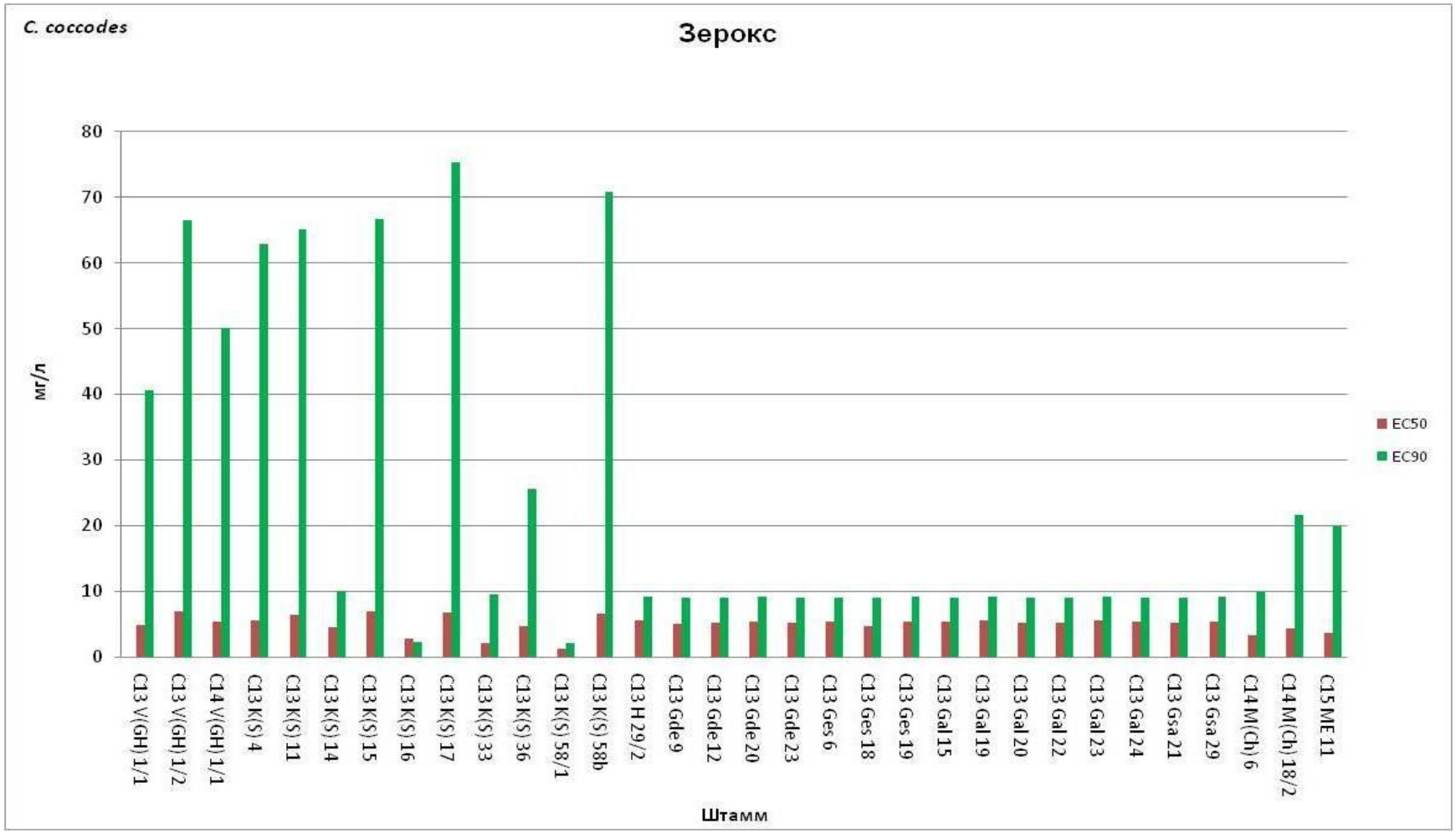

Рисунок П.4. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к коллоидному серебру.

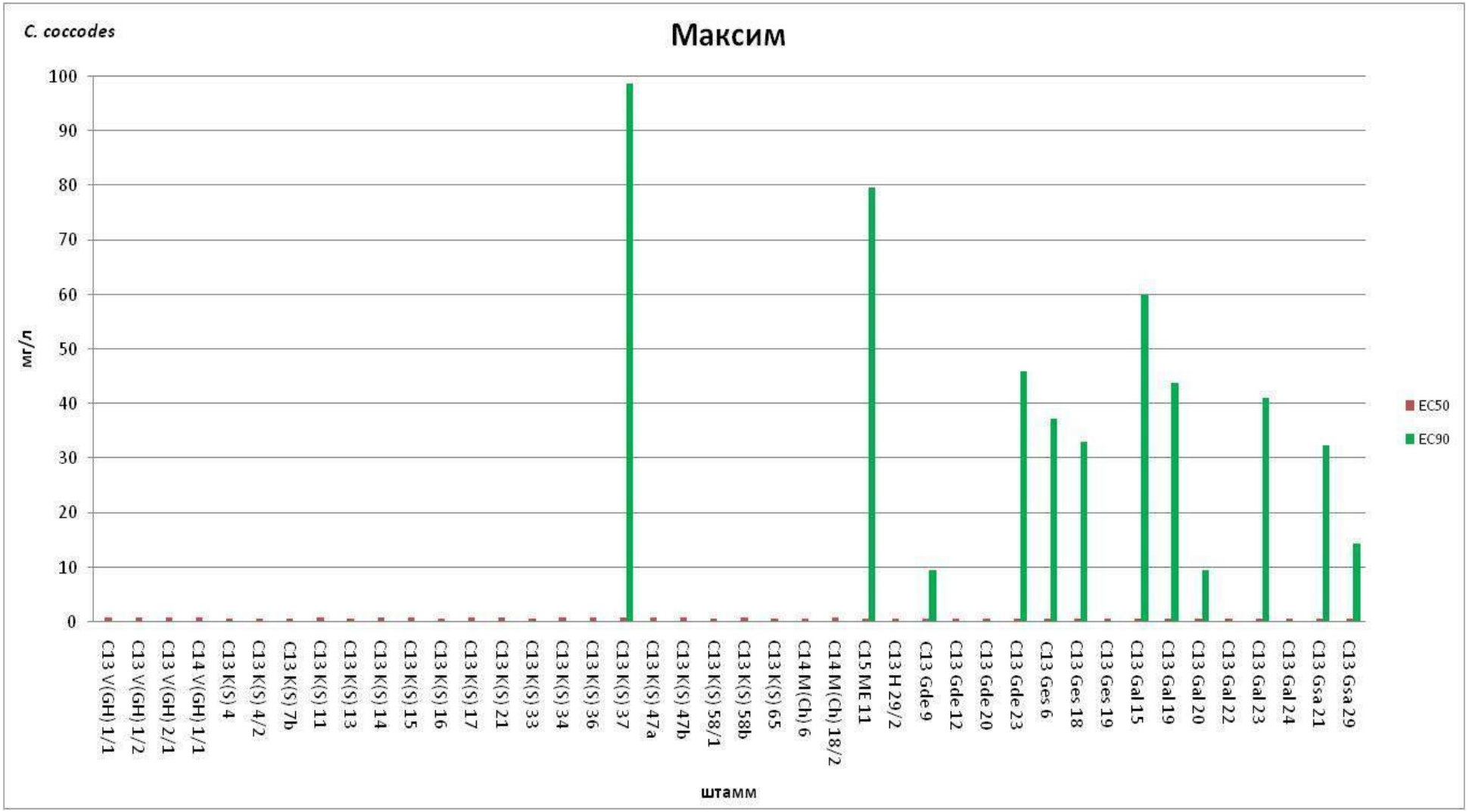

Рисунок П.5. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к флудиоксонилу.

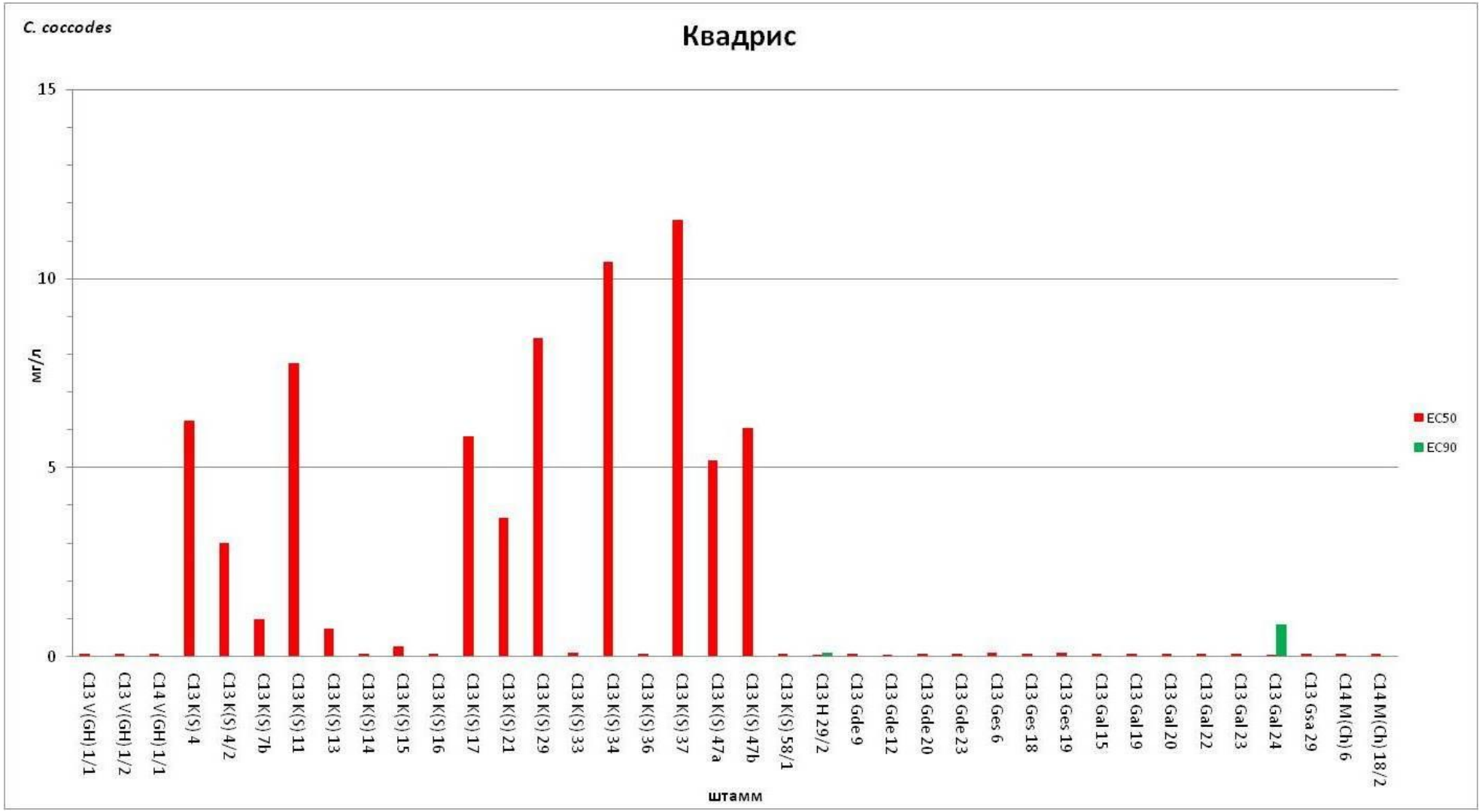

Рисунок П.6. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к азоксистробину.

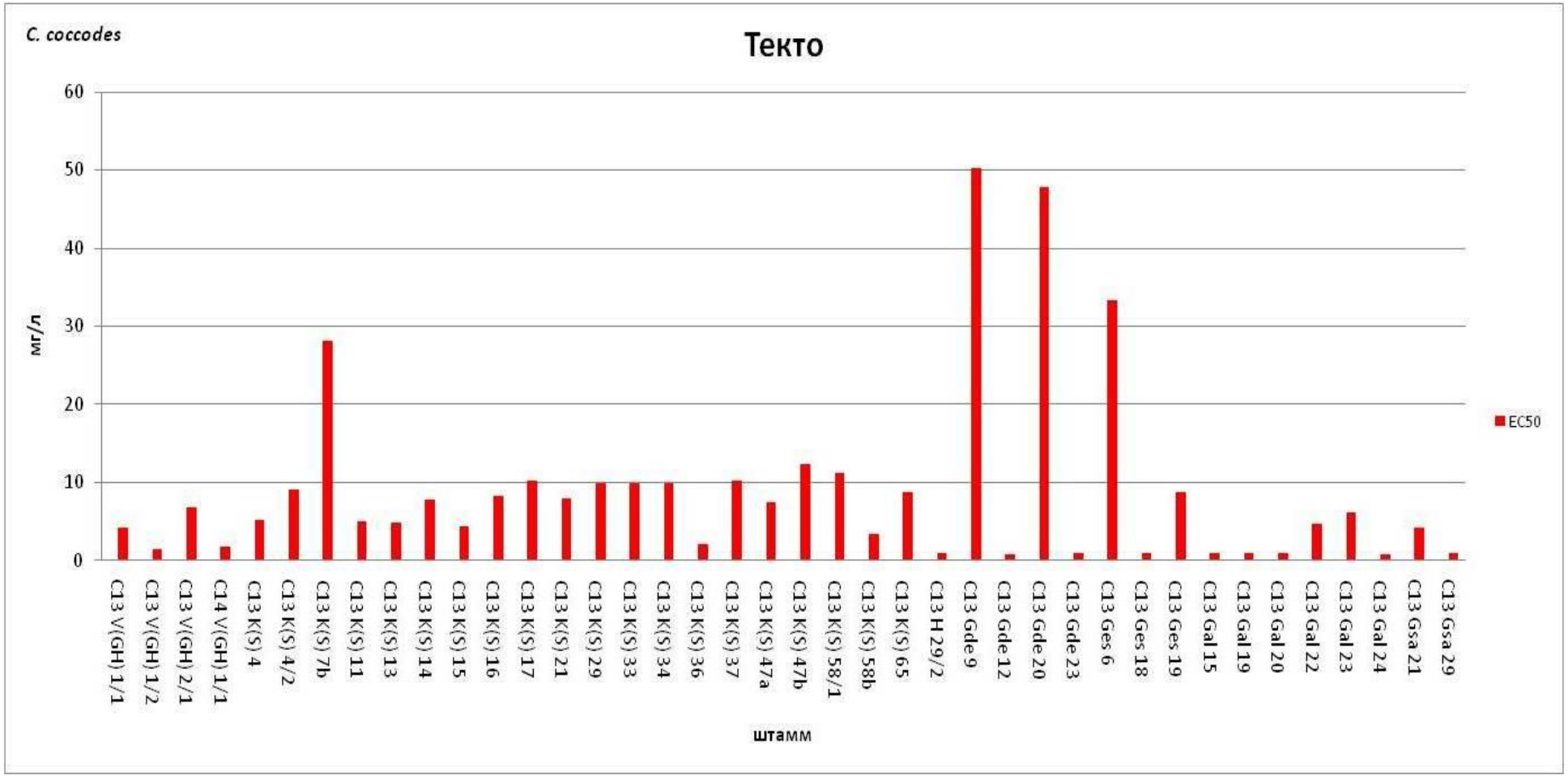

Рисунок П.7. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к тиабендазолу.

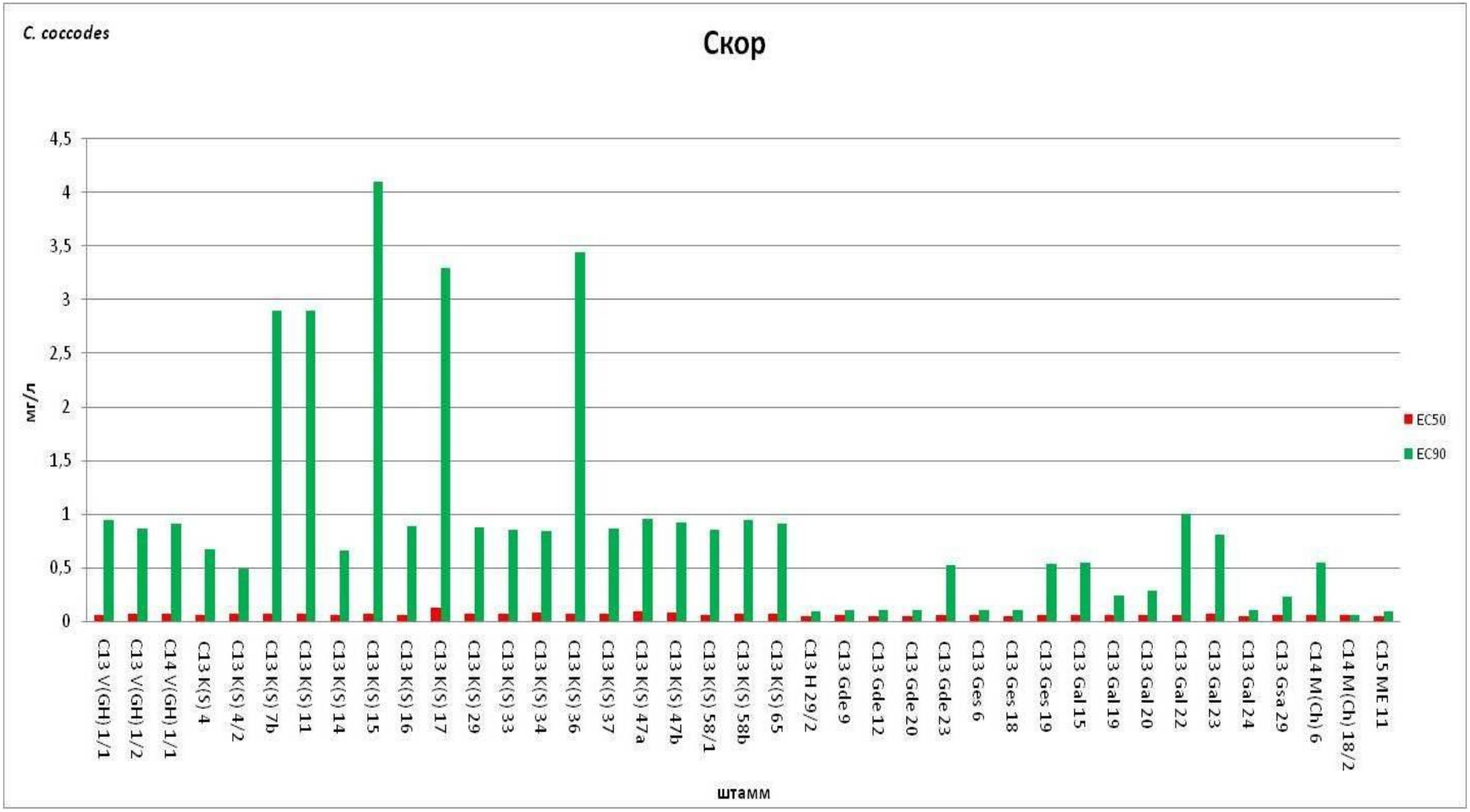

Рисунок П.8. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к дифеноконазолу.

Приложение к пункту 3.3.2.

Устойчивость к фунгицидам штаммов *H. solani*

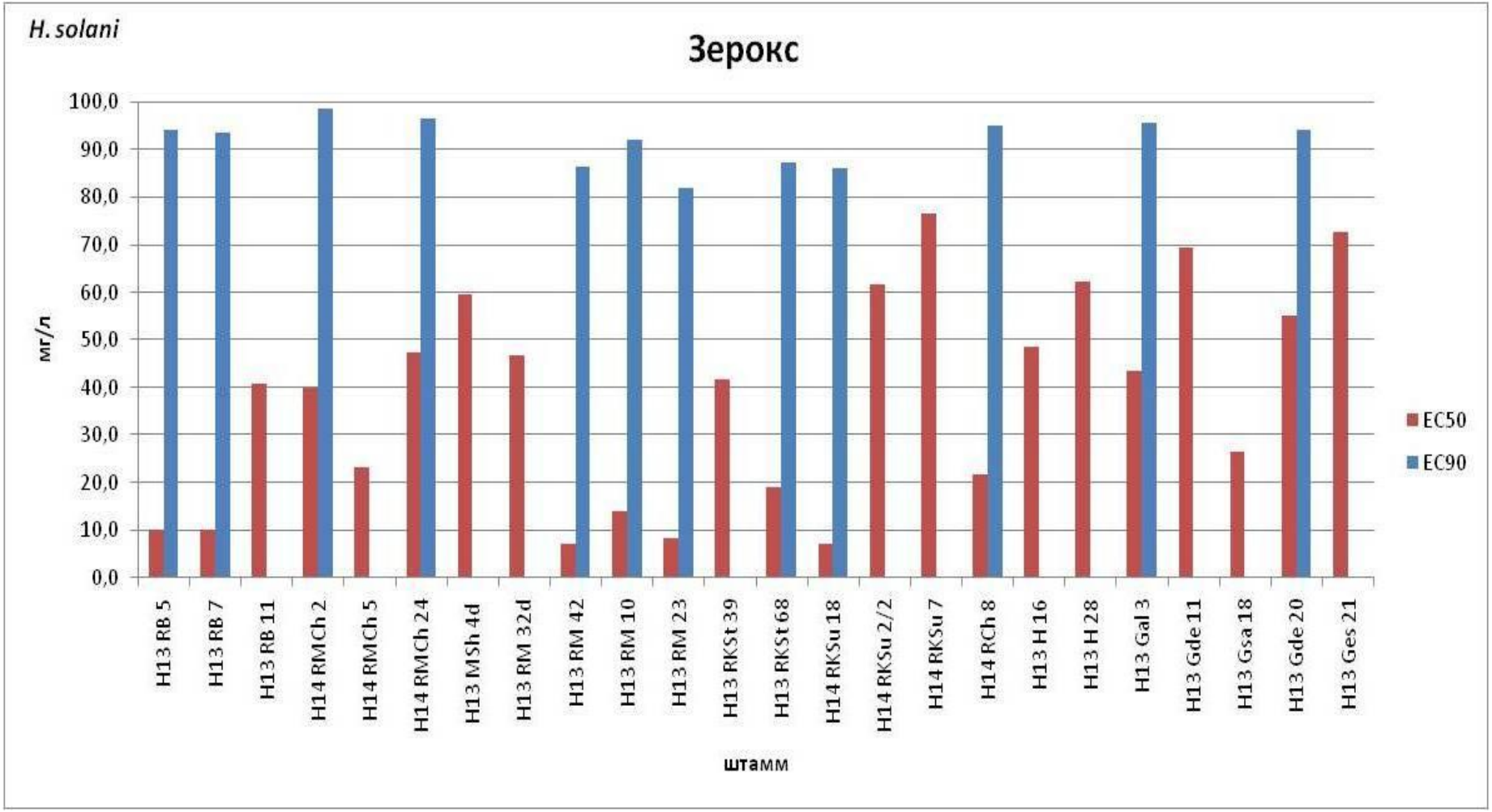

Рисунок П.9. Устойчивость штаммов *H. solani* к коллоидному серебру.

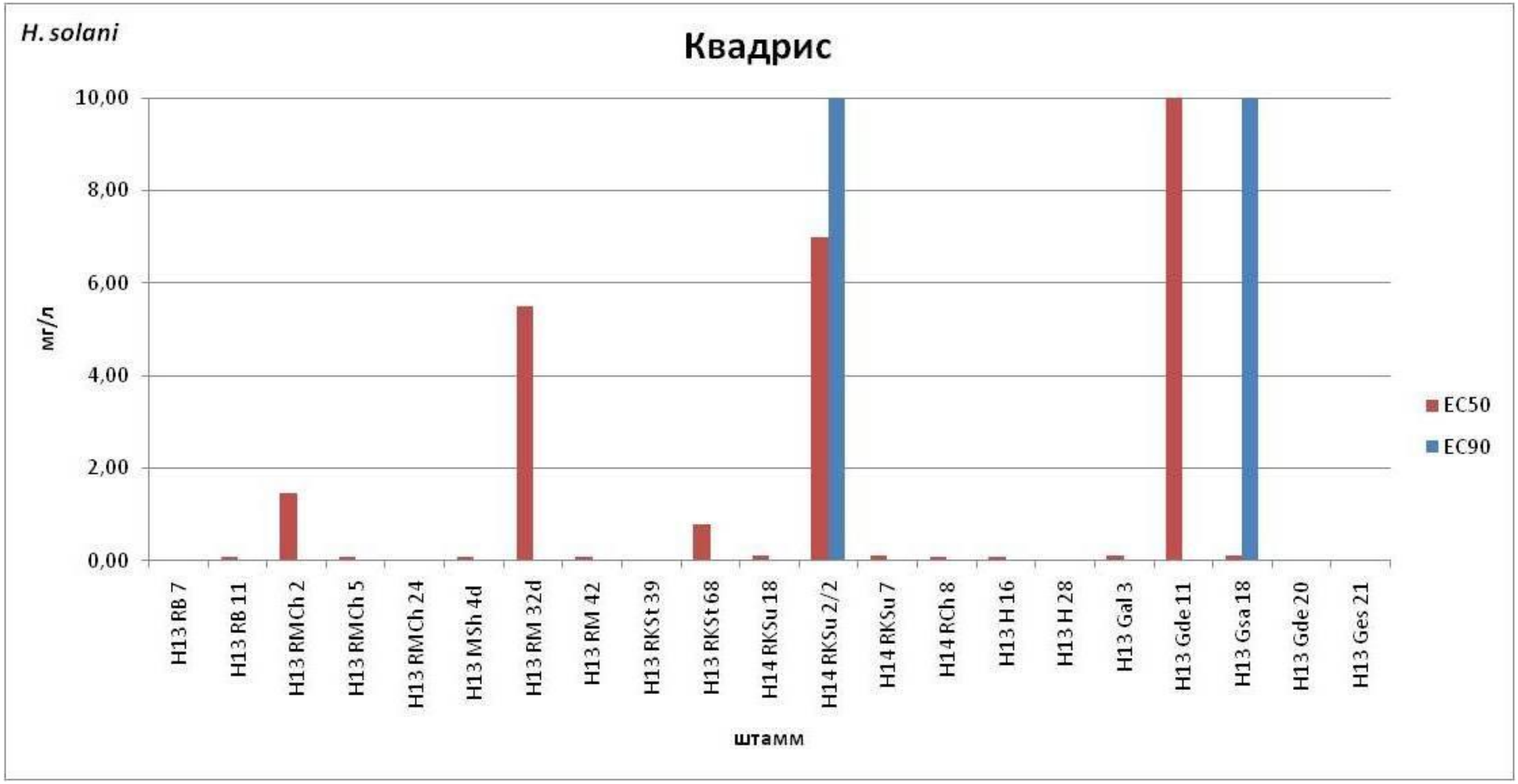

Рисунок П.10. Устойчивость штаммов *H. solani* к азоксистробину.

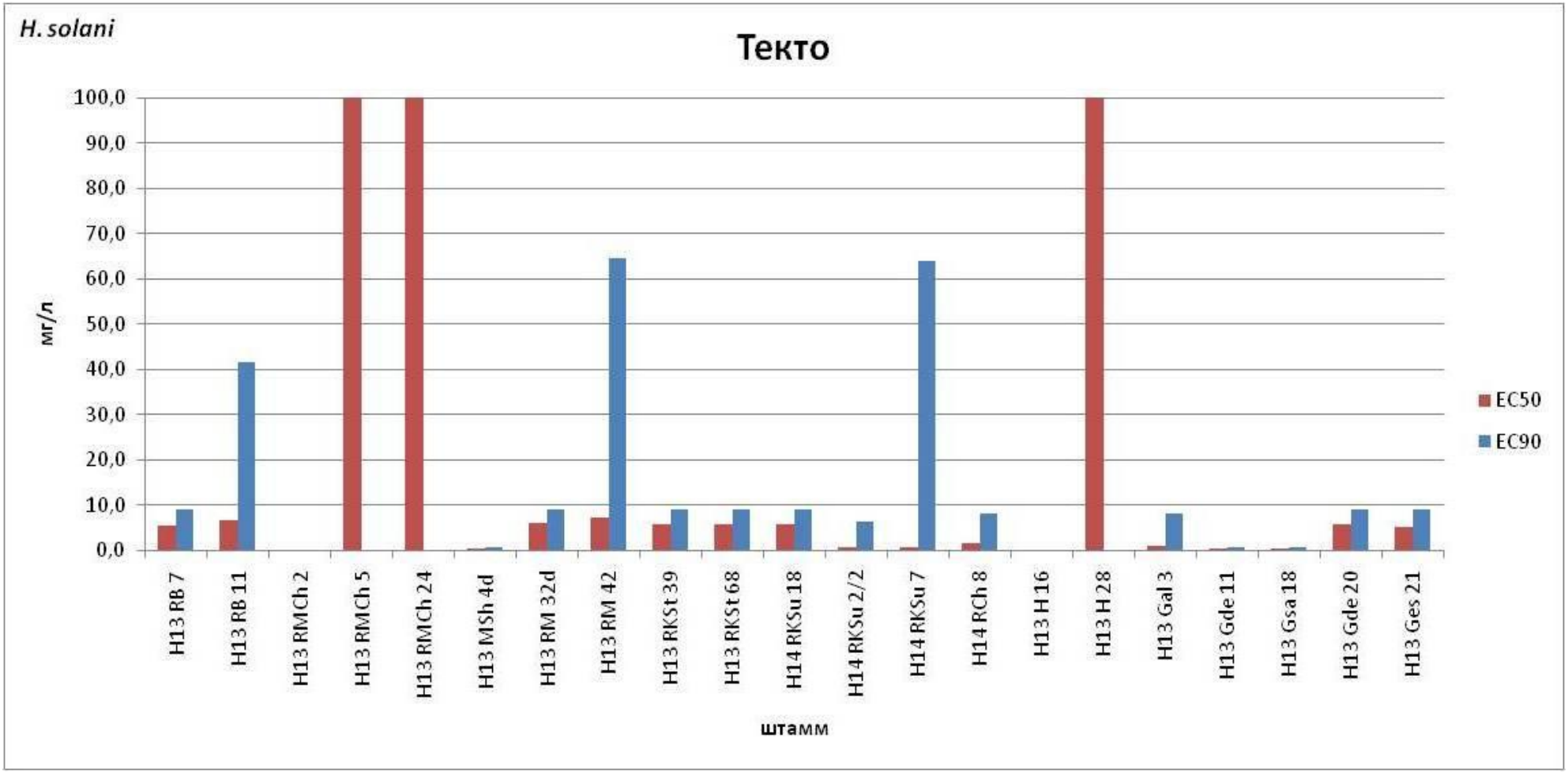

Рисунок П.11. Устойчивость выбранных штаммов *H. solani* к тиабендазолу.

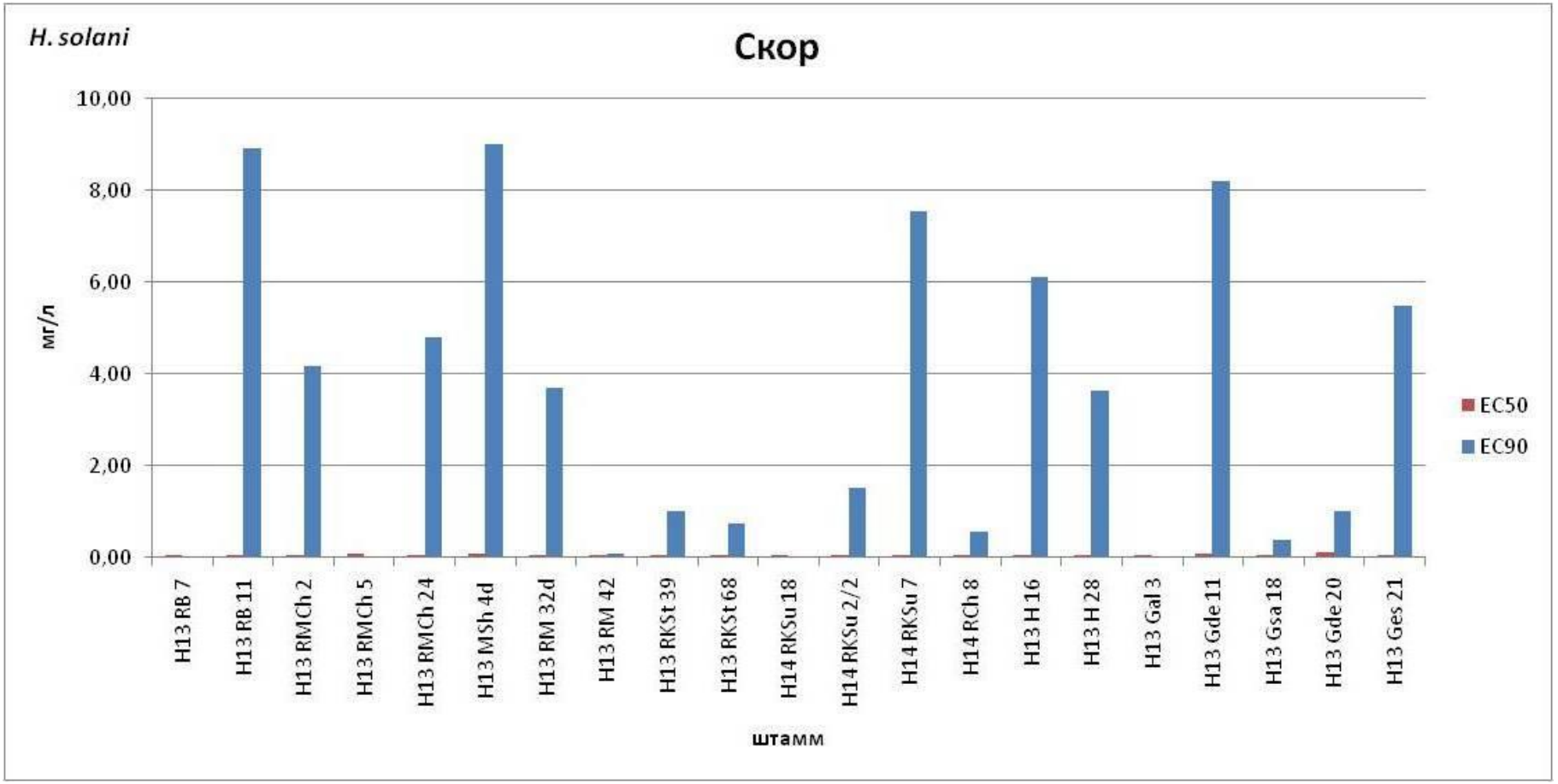

Рисунок П.12. Устойчивость выбранных штаммов *H. solani* к дифеноконазолу.