

DOI: 10.12731/2658-6649-2023-15-3-219-238

УДК 632.4.01/08:632.952:632.95.025.8



Научная статья | Защита растений

## МОРФОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДИФЕНОКОНАЗОЛУ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРШИ ЯБЛОНИ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ИСТОРИЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ ФУНГИЦИДА

*А.И. Насонов, М.В. Бардак*

*Парша – одно из самых вредоносных заболеваний основной семечковой культуры мира – яблони.*

*Цель.* Оценить влияние фунгицида на структуру популяции *Venturia inaequalis* по чувствительности к дифеноконазолу и морфотипическому составу.

*Материалы и методы исследования.* Исследование проведено на 88 моноспорных изолятах, выделенных из двух популяций *V. inaequalis*. Исходная популяция не подвергалась обработкам фунгицидами, отобрана из природных станций *Malus orientalis*. Популяция из коммерческих садов яблони домашней испытывала ежегодные опрыскивания дифеноконазолом. Чувствительность изолятов оценивали в лабораторных условиях по росту мицелия при различных концентрациях фунгицида и выражали как эффективную 50 % концентрацию (ЭК50). Морфотипы выделяли путем сравнения фотоизображений изолятов с изображениями морфотипов в базе данных.

*Результаты.* Популяции различались по чувствительности к дифеноконазолу на высоком уровне значимости ( $p \leq 0,003$ ), их медианные значения ЭК50 составили 0,5 и 2,5 мг д. в./л. Фактор резистентности садовой популяции имел значение 22. Морфологический анализ изолятов также показал неравномерное распределение морфотипов в популяциях. Из 15 выделенных морфотипов 73 % были уникальны для той или иной популяции. Выявлена средняя положительная корреляция между признаками «морфотип» и «чувствительность к фунгициду».

*Заключение.* Впервые показано изменение структуры популяции *Venturia inaequalis* под влиянием фунгицида не только по признаку, находящемуся под давлением отбора (чувствительность), но и по эволюционно нейтральному признаку – морфотипическому составу.

**Ключевые слова:** чувствительность; *Venturia inaequalis*; морфотип; структура популяции; ЭК50; фактор резистентности

**Для цитирования.** Насонов А.И., Бардак М.В. Морфотипический состав и чувствительность к дифеноконазолу популяций возбудителя парши яблони, различающихся историей применения фунгицида // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2023. Т. 15, №3. С. 219-238. DOI: 10.12731/2658-6649-2023-15-3-219-238

Original article | Plant Protection

## MORPHOTYPIC COMPOSITION AND DIFENOCONAZOLE SENSITIVITY OF APPLE SCAB PATHOGEN POPULATIONS THAT DIFFER IN THE HISTORY OF FUNGICIDE APPLICATION

*A.I. Nasonov, M.V. Bardak*

*Scab is one of the most harmful diseases of the world's main fruit crop, the apple tree.*

**Purpose.** To evaluate the fungicide influence on the population structure of *Venturia inaequalis*, by its sensitivity to difenoconazole and morphotypic composition.

**Materials and methods.** The study was conducted on 88 monospore isolates isolated from two populations of *V. inaequalis*. The baseline population, which was not treated with fungicides, was selected from natural populations of *Malus orientalis*. A population of commercial apple orchards was treated with difenoconazole. The sensitivity of isolates was evaluated under laboratory conditions by mycelial growth at different fungicide concentrations and expressed as effective 50% concentration (EC50). Morphotypes were distinguished by comparing photo-images of isolates with morphotype images in a database.

**Results.** The populations differed in their sensitivity to difenoconazole at a high level of significance ( $p \leq 0.003$ ), with median EC50 values of 0.5 and 2.5 mg a.i./l. The resistance factor of the orchard population had a value of 22. Morphological analysis of the isolates also showed an uneven distribution of morphotypes in the populations. Of the 15 morphotypes isolated, 73 % were unique to a particular population. A medium positive correlation between the traits "morphotype" and "fungicide sensitivity" was found.

**Conclusion.** For the first time, a change in the population structure of *Venturia inaequalis* under the influence of a fungicide was shown not only for a trait under selection pressure (sensitivity), but also for an evolutionarily neutral trait, morphotypic composition.

**Keywords:** sensitivity; *Venturia inaequalis*; morphotype; population structure; EC50; resistance factor

**For citation.** Nasonov A.I., Bardak M.V. Morphotypic Composition and Difenoconazole Sensitivity of Apple Scab Pathogen Populations That Differ in the History of Fungicide Application. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 219-238. DOI: 10.12731/2658-6649-2023-15-3-219-238

## Введение

Парша – одно из самых вредоносных заболеваний основной семечковой культуры мира – яблони. Микотическим агентом болезни является *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, который также инфицирует ряд растений из семейства розоцветных (*Rosaceae*), близких к роду *Malus*. Жизненный цикл патогена характеризуется двухстадийностью. На одной из стадий, конидиальной, происходит его распространение и мультипликация, а на другой, аскоспоровой, рекомбинация генетического материала. Наличие ежегодной половой стадии обеспечивает высокий приспособительный потенциал гриба и определяет его высокую внутрипопуляционную изменчивость [14]. Частое эпифитотийное развитие парши яблони отмечается в северо-западных областях РФ, а также на Северном Кавказе. В связи с климатическими изменениями в течение последних двадцати лет отмечается увеличение вирулентности и агрессивности популяции патогена в регионе [13]. Потери от заболевания в сезоны, благоприятствующие её развитию на слабоустойчивых сортах, составляют 8-12 т/га [13].

Получения урожая, отвечающего качественным и количественным требованиям производства плодов, обусловлено тщательным контролем за развитием патогена. Важнейшим компонентом интегральной системы защиты яблони от парши является химический метод, заключающийся в применении высокотоксичных веществ против возбудителя болезни. Его эффективность во многом определяется правильным использованием фунгицидов с соблюдением всех регламентов: нормы расхода препарата, сроков, кратности применения, чередования действующих веществ и др. Между тем со временем даже при строгом соблюдении правил их применения эффективность программ защиты может снижаться, либо они полностью перестают контролировать развитие патогена. Причиной этого является развитие у патогенного гриба резистентности к действующему веществу препарата [13, 14, 15, 16]. Развитие резистентности у фитопатогенов к пестицидам требует постоянный поиск и создание новых средств защиты против них [4].

Резистентность *Venturia inaequalis* к различным классам химических веществ таких, как бензимидазолы, стробилурины и триазолы, в той или иной степени была зафиксирована во многих популяциях патогена в мире [5, 24, 25, 26, 27, 28], в том числе и на территории РФ, в Краснодарском крае [8, 9]. Фунгицид класса ингибиторов деметилирования (англ. DMI, Demethylation Inhibitors) дифеноконазол, который начали использовать в регионе с 90-х гг. прошлого столетия, до сих пор применяется при защите против возбудителя парши яблони, однако продолжительность его защитного действия за это время сократилась с 21 дня до 8 суток [13]. В недавних исследованиях показано снижение чувствительности агроценотической популяции *V. inaequalis* и повышение доли резистентных изолятов в ней [8].

Устойчивость к фунгицидам – это эволюционный процесс, основанный на мутациях, потоке генов, генетическом дрейфе и отборе, позволяющем определенным организмам выживать при воздействии химических веществ и увеличивать свою частоту в популяции. Формы, несущие генетические мутации или естественные изменения, дающие сдвиг в чувствительности к действующему веществу, подвергаются отбору фунгицидом. Повторные раунды отбора (обработки) приводят к увеличению доли устойчивых форм в популяции. Когда частота резистентных индивидуумов становится преобладающей, по сравнению с частотой чувствительной части популяции, эффективность препарата снижается [12].

Очевидно, что селективное действие фунгицидов на часть изолятов в популяции будет приводить к изменению частоты встречаемости мутаций, определяющих устойчивость к токсическому действию химических веществ. Однако в настоящее время отсутствуют исследования, свидетельствующие об изменении под их влиянием популяционной структуры патогена в целом. Ранее, с использованием молекулярно-генетических подходов, были показаны высокая степень внутрипопуляционного разнообразия и низкая дифференциация между популяциями [11, 19, 20, 23, 28, 30]. Стабильности достаточно протяжённых популяций *V. inaequalis* способствует свободный поток генов, обусловленный хозяйственной деятельностью человека, связанной с интродукцией зараженного посадочного материала [19, 20]. Также изучение популяционной структуры микромицета проводили с использованием нейтральных фенотипических признаков, показавших высокую внутрипопуляционную подразделённость популяции [1, 2, 10].

Цель работы – оценить влияние фунгицида на структуру популяции *Venturia inaequalis* по чувствительности к дифеноконазолу и морфотипическому составу. Согласно цели, были поставлены следующие задачи:

оценить чувствительность изолятов возбудителя парши яблони к дифеноконазолу; выявить структуру популяции патогена на основе выявления морфотипов его моноспоровых изолятов; сопоставить структуру популяции по признакам чувствительности к фунгициду и морфолого-культуральным типам.

### **Материалы и методы исследования**

**Отбор образцов.** Отбор проводили в весенне-летний период 2020-2021 гг. в Краснодарском крае. Отбирали свежие листья яблони домашней (*Malus domestica* Borkh.) и яблони восточной (*Malus orientalis* Uglitzk) с симптомами поражения паршой или листовой опад тех же растений-хозяев с созревшими псевдотециями патогена. При отборе придерживались следующего алгоритма: с одного дерева брали 1 лист с поражением, а общий объём выборки в одной точке отбора был больше 50 листьев. Свежие листья подсушивали 2 суток и до проведения процедуры выделения чистых культур *V. inaequalis* хранили при +4°C.

**Выделение чистых культур патогена.** Изоляты патогена выделяли из его конидиальных или аскоспоровых поражений. Из аскоспоровых поражений, представляющих собой псевдотеции на листовом опаде яблони, получение изолятов проводили с использованием способа, предложенного Насоновым [7]. Для этого образец обрабатывали минуту 70%-м раствором  $C_2H_5OH$ , а после 3%-м раствором  $H_2O_2$ . Промытый стерильной водой лист помещали в крышку перевернутой чашки Петри, содержащей водный агар и инкубировали 14 ч при 18-20°C. Отдельные споры с ростковой трубкой находили под микроскопом при 40-кратном увеличении и переносили на картофельно-глюкозный агар, содержащий 50 мг/л антибиотика (тетрациклина гидрохлорид, PanRec-AppliChem). Картофельно-глюкозный агар (КГА) на литр воды содержал: картофельный отвар (200 г картофеля) и по 20 г глюкозы и агара-агара.

Моноконидиальные изоляты из свежих листьев получали по общепринятой методике [22].

Полученный с использованием различных методик посев одной спорой инкубировали в течение 30 суток при 20°C в темноте и визуально оценивали на штаммовую чистоту. При выявлении разнородных по цвету и структуре секторов культуры изолят исключали из выборки.

Различающиеся по морфолого-культуральным характеристикам изоляты маркировали, пересекали на свежую среду и фотографировали фотоаппаратом Canon ixus 175 при дневном освещении в отражённом свете.

*Оценка чувствительности чистых культур патогена.* Чувствительность определяли в чашках Петри диаметром 90 мм (Plastilab, Ливан) на КГА. В опытные варианты питательной среды добавляли дифеноконазол (препарат СКОР, КЭ, 250 мг/л, «Сингента», Швейцария) в концентрации 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,5 и 1 мг д. в./л. В контрольный вариант среды вместо фунгицида добавляли тот же объём стерильной воды. Фунгицид добавляли в среду, имеющую температуру около 50°C, сразу после стерилизации. Контрольные и опытные чашки инокулировали блоком мицелия диаметром 5 мм, который вырезали пробковым сверлом из активно растущей зоны моноспорового изолята. Повторность эксперимента двукратная. Посевы инкубировали при 20°C. Через 30 суток измеряли диаметр роста мицелия культуры и выражали его в процентах от среднего диаметра контрольного образца [22].

Чувствительность изолята выражали как ЭК<sub>50</sub> (50% эффективная концентрация) с использованием метода пробит-анализа [18]. ЭК<sub>50</sub> – концентрация действующего вещества, которая ингибирует радиальный рост чистой культуры в два раза. Фактор резистентности (RF, resistance factor) рассчитывали путем деления средних значений ЭК<sub>50</sub> популяции, подвергавшейся влиянию фунгицида, на среднее значение ЭК<sub>50</sub> популяции, не испытывавшей такого влияния. Рассчитываемый показатель определяет уровень развития устойчивости (резистентности) к фунгициду.

*Морфотипический анализ чистых культур патогена.* Морфотипы выделяли путем сравнения фотоизображений изолятов с изображениями морфотипов в базе данных [6].

*Характеристика популяций.* Для исследования отобраны две популяции возбудителя парши яблони, различавшихся местом отбора, видом растения-хозяина, типом экосистемы и историей применения пестицидов. Всего в каждой из популяций было выделено по 44 моноспоровых изолята патогена, таким образом, общий объём выборки чистых культур составил 88 изолятов. Популяция 1 выделена с яблони восточной в естественных экосистемах её произрастания: на опушках и вырубках леса в предгорной части в районе ст. Натухаевской. Она являлась исходной популяцией, так как никогда не подвергалась воздействию пестицидов. Популяция 2 – в садовых хозяйствах Красноармейского района. В хозяйствах проводятся плановые защитные мероприятия с применением пестицидов; фунгициды из химической группы ингибиторов деметилирования использовали 3 раза за сезон.

*Статистическая обработка результатов.* Для оценки различий между популяциями по морфотипическому составу использовали популяционные показатели Л. А. Животовского: фенотипическое разнообразие ( $\mu$ ),

коэффициент сходства ( $r$ ) и коэффициент идентичности ( $I$ ) [3]. При этом достоверность полученных значений учитывали на пятипроцентном уровне значимости. Распределение соответствовало критерию  $\chi^2$  со степенями свободы, равными  $m-1$ . Если полученное значение критерия идентичности превышало табличное значение  $\chi^2$  для однопроцентного уровня значимости, то различия между популяциями считались достоверными.

Для оценки разницы между значениями  $ЭК_{50}$ , характеризовавших чувствительность исследуемых популяций к дифеноконазолу, был применён непараметрический критерий Манна-Уитни, так как распределение значений было не нормальным. Взаимосвязь между признаками «морфотип» и «чувствительность» оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Расчёты проводились в программе Statistica 10 и Microsoft Excel. Полученное эмпирическое значение было статистически достоверным на пятипроцентном уровне значимости.

### Результаты и обсуждение

*Чувствительность популяций к фунгициду.* Проведённый анализ 88 моноспоровых изолятов показал, что чувствительность изученных популяций изменялась в широком диапазоне значений  $ЭК_{50}$ . Чувствительность исходной популяции к дифеноконазолу варьировала от 0,00002 до 0,085 мг/л (таблица 1).

Таблица 1.

**Чувствительность популяций *Venturia inaequalis* к дифеноконазолу,  $ЭК_{50}$ , мг д. в./л**

Популяция	Среднее $ЭК_{50}$	Диапазон $ЭК_{50}$	Фактор разделения	Фактор резистентности
1	0,015	0,00002–0,085	4250,0	–
2	0,330	0,002–3,321	1660,5	22

**Примечания:** популяция 1 – исходная популяция, не подвергавшаяся ранее воздействию фунгицидов; популяция 2 – популяция промышленного насаждения, обрабатываемая дифеноконазолом 3 раза за сезон.

Фактор разделения составил 4250 (соотношение между крайними значениями чувствительности в популяции). На основе сравнения полученных средних значений  $ЭК_{50}$  исходных популяций, которые не подвергались ранее воздействию фунгицидов, можно сделать выводы о наличии различий в проявлении чувствительности к дифеноконазолу, показывающих базовое разнообразие популяции по этому признаку.

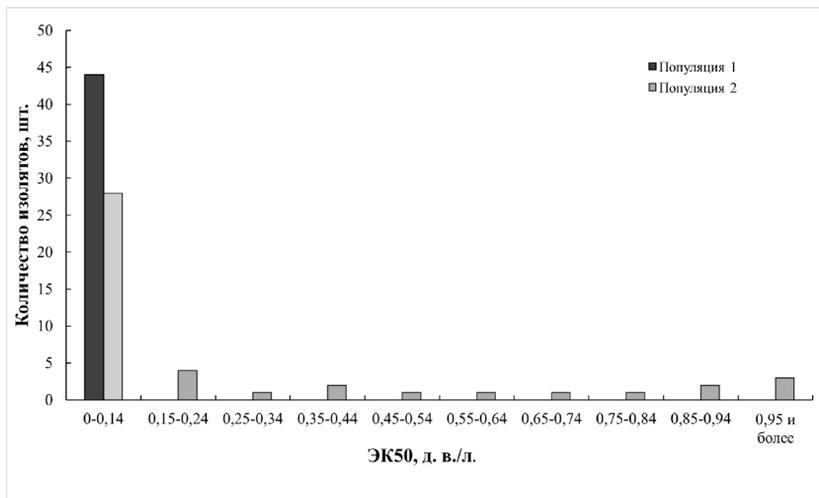
В данном исследовании среднее значение  $ЭК_{50}$  для исходной популяции, отобранной на яблоне восточной (*Malus orientalis*) в станице Натухавеской, составило 0,015 мг/л. Это значение было выше среднего значения  $ЭК_{50}$  исходной популяции Северского района Краснодарского края (0,0078 мг/л), а также средних значений  $ЭК_{50}$  для популяций парши яблони Италии (0,0075 мг/л) и США (0,002 мг/л) [8, 17, 29]. Более высокий показатель среднего  $ЭК_{50}$  был получен в работе, проведённой в Латинской Америке (0,0286 мг/л) [25].

Среднее значение  $ЭК_{50}$  моносортовой популяции, обрабатываемой дифеноконазолом, составило 0,33 мг/л. Чувствительность варьировала в широком диапазоне значений (0,002–3,321 мг/л). Фактор разделения соответствовал 1660,5, это значение в 2,6 раза меньше фактора разделения исходной популяции, что свидетельствует о потере чувствительности у изолятов к дифеноконазолу и отсутствию изолятов менее чувствительных, чем в исходной популяции. Такая же тенденция снижения значения фактора разделения у популяции *V. inaequalis* промышленного насаждения по сравнению с исходной популяцией была отмечена в работе у исследователей из Чили [21].

Для оценки развития у популяций возбудителя парши яблони резистентности к фунгицидам применяют показатель резистентности (RF). Чем выше у популяции значение RF, тем менее чувствительны изоляты популяции к фунгициду. В данном исследовании показатель резистентности составил 22, что значительно выше показателей резистентности, приведенных в работах из Чили (4,7) и Уругвая (6,6; 17,4) [21, 25], однако оказалось близко к значениям RF (32, 16), описанных авторами другого исследования, проведенного в Краснодарском крае [8]. Что может свидетельствовать о тенденции повсеместного развития резистентности у обрабатываемых дифеноконазолом популяций возбудителя парши яблони в агроценозах промышленных насаждений региона.

Распределение значений  $ЭК_{50}$  популяций представлено на рисунке 1.

Значения  $ЭК_{50}$  изолятов *Venturia inaequalis* исходной популяции не превышали 0,1 мг д. в./л. и были сосредоточены в левой части диаграммы (рисунок 1). Для данной популяции была характерна высокая чувствительность изолятов к дифеноконазолу. У популяции промышленного насаждения была отмечена динамика роста резистентности у изолятов к дифеноконазолу. В данной популяции встречались изоляты возбудителя парши яблони, которые превышали значение  $ЭК_{50}$ , равное 0,8 мг д. в./л.



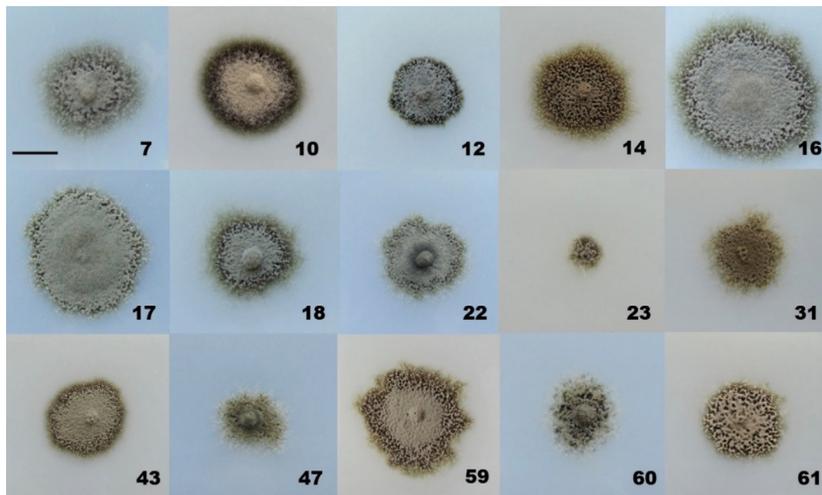
**Примечание:** популяция 1 – исходная популяция, не подвергавшаяся ранее воздействию фунгицидов; популяция 2 – популяция промышленного насаждения, обрабатываемая дифеноконазолом трёхкратно за сезон.

**Рис. 1.** Частота встречаемости изолятов *Venturia inaequalis* из двух популяций с различными значениями ЭК<sub>50</sub> для дифеноконазола

Для оценки статистической разницы между чувствительностью популяций к дифеноконазолу был применён критерий Манна-Уитни, относящийся к непараметрической статистике, так как по результатам теста Шапиро-Уилка распределение выборок было ненормальным ( $W=0,5936$ ,  $P<0,05$  для агропопуляции и  $W=0,4657$ ,  $P<0,05$  для исходной популяции). Согласно данному критерию, случайно выбранное значение популяции 1 считается неравным случайно выбранному значению популяции 2 на высоком уровне значимости ( $p\leq 0,003$ ), что подтверждает предположения о существенных различиях в чувствительности исследуемых популяций *Venturia inaequalis* к дифеноконазолу. Медианные значения двух сравниваемых популяций составили 0,5 и 2,5 мг д. в./л.

Результаты проведенного исследования показали, что у популяции *V. inaequalis* моносортowego промышленного насаждения яблони домашней развивается резистентность к дифеноконазолу, но также было отмечено наличие чувствительных к данному фунгициду изолятов. Для выявления влияния применения фунгицида на популяционную структуру патогена был оценён морфотипический состав популяций.

*Морфотипический состав популяций.* В результате анализа моноспоровых изолятов было выделено 15 морфологических типов патогена. Морфотипы различались комплексом из десяти морфолого-культуральных характеристик, среди которых наиболее важными были размер, форма, профиль, особенности края колонии, а также фактура основного воздушного мицелия и характеристика центрального бугорка (рисунок 2).



**Рис. 2.** Морфотипы возбудителя парши яблони

Размер бара равен 10 мм. Номер морфотипа согласно работам [6, 10].

В популяции 1 (исходная популяция) наиболее распространёнными морфотипами были № 16, 17, 18, 60, при этом три последних из них встречались только в этой выборке. В другой популяции, которая была выделена из садового насаждения и испытывала воздействие фунгицида, количественно преобладали другие морфотипы – № 14, 23, 32 и 61. Морфотипы № 59, 60 и 61 были выделены впервые.

Встречаемость морфотипов в общей изученной выборке патогена, представленной 88 изолятами, была неодинаковой (таблица 2).

Наибольшее количество изолятов было отнесено к морфотипам № 16 и 14, их доля от общего числа изолятов составила 12,5 и 11,4 % соответственно. Морфотипы № 18, 23 и 61 составили 10,2 % для каждой группы. Доля морфотипов № 17 и 60 соответствовала 9,1 %. Наименьшее количество изолятов было представлено в 7, 12, 47, 59, 10 и 31 группах мор-

фологических типов. Ранее при исследовании морфолого-культуральной дифференциации 80 изолятов из различных садовых насаждений Краснодарского края была показана высокая частота встречаемости морфотипов № 11, 14, 16, 18 и 23 [10].

Таблица 2.

**Доля различных морфотипов *Venturia inaequalis*, выделенных из популяции яблони восточной и из популяции яблони домашней сорта Ренет Симиренко**

№	Морфотип, №	Количество изолятов, шт.	Доля морфотипа, %
1	18	9	10,2
2	16	11	12,5
3	60	8	9,1
4	17	8	9,1
5	12	1	1,1
6	7	2	2,3
7	47	3	3,4
8	22	4	4,6
9	14	10	11,4
10	23	9	10,2
11	43	6	6,8
12	59	3	3,4
13	10	3	3,4
14	61	9	10,2
15	31	2	2,3

**Примечание:** Номер морфотипа приводится по публикациям [6, 10].

Также варьировала частота встречаемости морфотипов и их представленность в различных популяциях (рисунок 3).

Расчёт популяционных показателей Животовского выявил вероятное различие между изученными популяциями на уровне значимости  $p \leq 0,01$ . Так, показатель сходства ( $r$ ) между популяциями оказался очень низким, 0,28, при этом коэффициент идентичности ( $I$ ) составил 65,72 при табличном значении  $\chi^2 = 29,1$ . Величина  $r$  может изменяться от 0 до 1, и при значении 0 популяции являются абсолютно не идентичными, тогда как 1 означает отсутствие каких-либо отличий между ними. В работе отечественных авторов [10] изучали морфотипический состав изолятов *V. inaequalis*, выделенных из 4 различных промышленных садов, и показали отсутствие достоверных различий по показателю сходства между изученными популяциями.

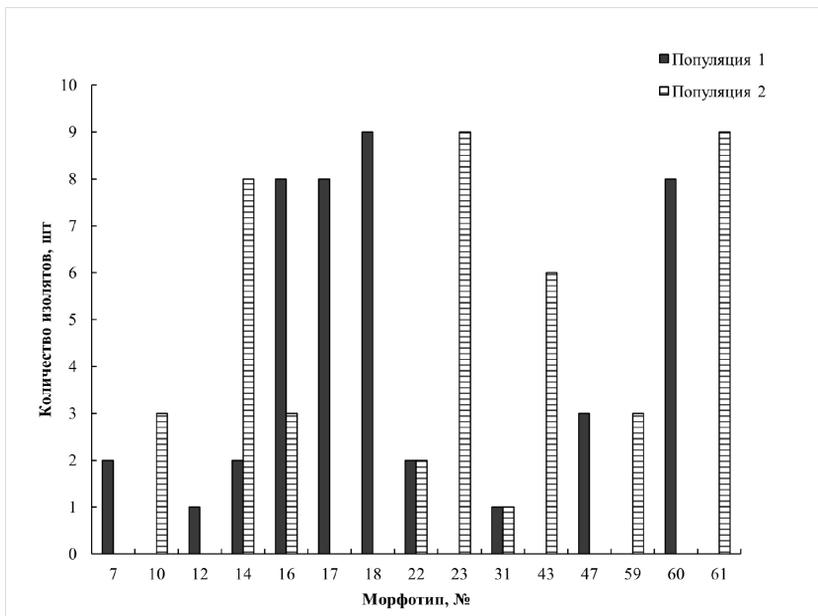


Рис. 3. Частота встречаемости морфотипов в популяциях *Venturia inaequalis*

Различались популяции также ещё одним показателем, а именно средним числом морф ( $\mu$ ). Для исходной популяции он оказался выше, чем у агроценотической, и составил  $8,6 \pm 0,52$  и  $8,1 \pm 0,40$  соответственно.

*Влияние применения фунгицида на структуру популяции.* Полученные данные показывают, что применение фунгицидов, в частности, дифеноконазола, может приводить к изменению популяционной структуры патогена, выражающейся в достоверном изменении морфотипического состава в «фунгицидной» популяции относительно исходной. Так, под воздействием фунгицида, вероятно, происходила элиминация части морфотипов (№ 7, 17, 18, 47 и 60; рисунок 3), характерных для чувствительных изолятов патогена, и развитие другой части морфотипов (№ 10, 23, 32, 59 и 61; рисунок 3), проявивших устойчивость к токсиканту. Также более низкое значение количества средних морф ( $\mu$ ) в популяции, испытывавшей воздействие фунгицида, указывает на обеднение фенотипического разнообразия данной популяции в результате гибели части особей. Средняя положительная связь между морфотипом и значениями ЭК<sub>50</sub> была подтверждена с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s = 0,499$ ;

$p$  (2-tailed) = 0). Можно предположить, что морфотипы, встречающиеся в исходной популяции, должны отсутствовать или быть редки в агроценологических популяциях патогена. Однако в ранее выполненных исследованиях популяций патогена, выделенных из различных промышленных насаждений яблони, в которых проводились ежегодные защитные мероприятия против парши, была показана высокая частота морфотипа № 18, оказавшегося часто встречаемым и уникальным морфотипом для изучаемой в текущей работе исходной популяции гриба [10]. Кроме этого, анализ значений  $ЭК_{50}$  для морфотипов, которые встречались и в «фунгицидной» и в исходной популяциях, показал неоднозначность связи «морфотип» / «уровень чувствительности» (данные не приводятся). Так, морфотип № 16, который был представлен в исходной популяции 8 изолятами, имевшими значения  $ЭК_{50}$  в диапазоне от 0,002 до 0,079 мг д.в./л, в садовой популяции имел 3 изолята с максимальными для всей изученной выборки изолятов показателями  $ЭК_{50}$  – 1,198- 3,321 мг д.в./л.

### Заключение

Проведённые на 88 изолятах исследования показали существенные различия в структуре популяций *Venturia inaequalis*, различавшихся историей применения фунгицидов, как по чувствительности к дифеноконазолу, что ожидаемо, так и по морфотипическому составу. Для популяции, ежегодно обрабатываемой химическими препаратами, в том числе на основе триазолов, отмечено существенное снижение чувствительности, что подтверждает ранее полученные нами результаты. Также существенно изменился признак, морфотипический состав популяций, который не находился непосредственно под давлением отбора, т. е. являющийся эволюционно нейтральным. Из всех выделенных в работе морфотипов 73 % были уникальны для той или иной популяции. Отмечена средняя положительная корреляция между признаками «морфотип» и «чувствительность к дифеноконазолу». Влияние применения фунгицидов на морфотипическую структуру популяции возбудителя парши яблони показана впервые.

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация о спонсорстве.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-416-230070.

### Список литературы

1. Барсукова О.Н. Парша яблони в Европейской части СССР // Микология и фитопатология. 1983. Т. 17. № 5. С. 395-403.
2. Бондарь Л.В. Сравнительное изучение популяций возбудителя парши яблони по морфологическим признакам // Защита растений (сборник науч. трудов). Минск: Ураджай. 1988. Вып. 13. С. 21-25.
3. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
4. Иванова Е.В., Никишина М.Б., Третьякова А.В., Мухторов Л.Г., Переломов Л.В., Атрощенко Ю.М. Изучение фунгицидной активности новых производных 7-R-1,5-динитро-3,7-диазабицикло [3.3.1] нонан-2-она // Siberian Journal of Life Sciences & Agriculture. 2021. Т. 13. № 5. С. 307-320. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2021-13-5-307-320>
5. Комардина В.С., Васеха Е.В., Плескацевич Р.И. Оценка чувствительности возбудителя парши яблони – гриба *Venturia inaequalis* к крезоксим-метилу различными методами // Защита растений. 2022. № 44. С. 96-103.
6. Насонов А.И. База данных «Морфолого-культуральные признаки различных изолятов в популяциях возбудителя парши *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter агроценозов яблони Западного Предкавказья» // Свидетельство о регистрации базы данных 2021622649, 25.11.2021. Заявка № 2021622619 от 19.11.2021.
7. Насонов А.И. Новый способ получения культуры *Venturia inaequalis* из аскоспор // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 1. С. 46-48. <https://doi.org/10.1134/S0026364819010094>
8. Насонов А.И., Якуба Г.В., Астапчук И.Л. Чувствительность краснодарской популяции *Venturia inaequalis* к дифеноконазолу, ингибитору деметилирования стероидов // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 4. С. 297-308. <https://doi.org/10.31857/S0026364821040103>
9. Насонов А.И., Якуба Г.В., Лободина Е.В. Длительное сохранение резистентности к карбендазиму у *Venturia inaequalis* в Краснодарском крае (Россия) // Микология и фитопатология. 2022. Т. 56. № 5. С. 374-378. <https://doi.org/10.31857/S0026364822050087>
10. Насонов А.И., Якуба Г.В., Лободина Е.В. Особенности морфотипного состава популяции *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter на восприимчивых к парше сортах яблони // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 58. С. 151-157. <https://doi.org/10.31676/2073-4948-2019-58-151-157>
11. Супрун И.И., Насонов А.И., Токмаков С.В., Барсукова О.Н., Якуба Г.В. Применение SSR маркеров для изучения генетического разнообразия *Venturia inaequalis* на Северном Кавказе в агрофитоценозах разного типа

- // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 170-178. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.170rus>
12. Тютюрев С.Л. Механизмы действия фунгицидов на фитопатогенные грибы. СПб.: ИПК «Нива», 2001. 172 с.
  13. Якуба Г.В. Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений. Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2013. 213 с.
  14. Belete T., Boyraz N. Critical review on apple scab (*Venturia inaequalis*) biology, epidemiology, economic importance, management and defense mechanisms to the causal agent // J. Plant Physiol. Pathol. 2017. Vol. 5(2). P. 1-11. <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000166>
  15. Chapman K.S., Sundin G.W., Beckerman J.L. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis* // Plant Dis. 2011. Vol. 95. P. 921-926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0899>
  16. Cox K.D. Fungicide resistance in *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, in the United States. Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer: Tokyo, 2015. P. 433-447. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_27)
  17. Fiaccadori R. Researches on methodologies to verify reduced sensitivities of *Venturia inaequalis* in field to difenoconazole and first indications of a survey in Italy // American Journal of Plant Sciences. 2017. Vol. 8(9). P. 2056–2068. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.89138>
  18. Finney D.J. Probit analysis. Cambridge: UK, 1971. 383 p.
  19. Gladieux P., Zhang X.G., Afoufa-Bastien D., Sanhueza R.V., Sbaghi M., Le Cam B. On the origin and spread of the scab disease of apple: out of Central Asia // PLoS ONE. 2008. Vol. 3(1). P. 1455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001455>
  20. Gladieux P., Zhang X.G., Roldan-Ruiz I.R., Caffier V., Leroy T., Devaux M., Glabeke S.V., Coart E., Cam B.L. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host // Mol. Ecol. 2010. Vol. 19(4). P. 658-674. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04498.x>
  21. Henríquez Sáez J., Sarmiento O., Alarcón P. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil // Chilean J. Agric. Res. 2011. Vol. 71 (1). P. 39-44. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000100005>
  22. Koller W., Parker D.M., Turechek W.W., Avila-Adame C., Cronshaw K. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin // Plant Dis. 2004. Vol. 88. P. 537-544. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>
  23. Leroy T., Lemaire C., Dunemann F., Le Cam B. The genetic structure of a *Venturia inaequalis* population in a heterogeneous host population composed of

- different *Malus* species // BMC Evol. Biol. 2013. Vol 13(1). P. 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-64>
24. Li X., Li H., Yu Z., Gao L., Yang J. Investigating the sensitivity of *Venturia inaequalis* isolates to difenoconazole and pyraclostrobin in apple orchards in China // European Journal of Plant Pathology. 2021. Vol. 161(1). P. 207-217. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02316-6>
  25. Mondino P., Casanova L., Celio A., Bentancur O., Leoni C., Alaniz S. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to Trifloxystrobin and Difenconazole in Uruguay // Journal of Phytopathology. 2015. Vol. 163(1). P. 1-10. <https://doi.org/10.1111/jph.12274>
  26. Polat Z., Bayraktar H. Resistance of *Venturia inaequalis* to multiple fungicides in Turkish apple orchards // Journal of Phytopathology. 2021. Vol. 169(6). P. 360-368. <https://doi.org/10.1111/jph.12990>
  27. Quello K.L., Chapman K.S., Beckerman J.L. In situ detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana // Plant disease. 2010. Vol. 94(6). P. 744-750. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0744>
  28. Sitter V., Garrido Haro P.A., Molineros J.E., Garzon C.D., Jiménez-Gasco M.M. Genetic diversity of apple-and crabapple-infecting isolates of *Venturia inaequalis* in Pennsylvania, the United States, determined by microsatellite markers // Forest Pathology. 2018. Vol. 48(2). e12405. <https://doi.org/10.1111/efp.12405>
  29. Villani S.M., Biggs A.R., Cooley D.R. Raes J.J., Cox K.D. Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis* // Plant Dis. 2015. Vol. 99. P. 1526-1536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0002-RE>
  30. Xu X., Yang J., Thakur V., Roberts A., Barbara D.J. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK // Eur. J. Plant Pathol. 2013. Vol. 135(1). P. 97-104. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0068-4>

### References

1. Barsukova O.N. Parsha yabloni v Evropeyskoy chasti SSSR [Apple scab in the affected parts of the USSR]. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and Phytopathology], 1983, vol. 17, no. 5, pp. 395-403.
2. Bondar' L.V. Sravnitel'noe izuchenie populyatsiy vozbuditelya parshi yabloni po morfologicheskim priznakam [Comparative study of apple scab pathogen populations by morphological characters]. *Zashchita rasteniy (sbornik nauch. Trudov)* [Plant protection (collection of scientific papers)]. Minsk: Urajay, 1988, issue 13, pp. 21-25.
3. Zhivotovskiy L.A. *Populyatsionnaya biometriya* [Population biometry]. Moscow: Nauka, 1991, 271 p.

4. Ivanova E.V., Nikishina M.B., Tret'yakova A.V., Mukhtorov L.G., Perelomov L.V., Atroshchenko Yu.M. Izuchenie fungitsidnoy aktivnosti novykh proizvodnykh 7-R-1,5-dinitro-3,7-diazabitsiklo [3.3.1] nonan-2-ona [Investigation of the fungicidal activity of new derivatives of 7-R-1,5-dinitro-3,7-diazabicyclo[3.3.1] nonan-2-one]. *Siberian Journal of Life Sciences & Agriculture*, 2021, vol. 13, no. 5, pp. 307-320. <https://doi.org/10.12731/2658-6649-2021-13-5-307-320>
5. Komardina V.S., Vasekha E.V., Pleskatsevich R.I. Otsenka chuvstvitel'nosti vozbuditelya parshi yabloni – griba *Venturia inaequalis* k krezoksim-metilu razlichnymi metodami [Evaluation of the causing agent of apple scab – fungus *Venturia inaequalis* sensitivity to cresoxym-methyl by various methods]. *Zashchita rasteniy* [Plant Protection], 2022, no. 44, pp. 96-103.
6. Nasonov A.I. Baza dannykh «Morfologo-kul'tural'nye priznaki razlichnykh izolyatov v populyatsiyakh vozbuditelya parshi *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter agrotsenozov yabloni Zapadnogo Predkavkaz'ya» [Morphological and cultural characters of different isolates in populations of scab pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter apple-tree agrocenoses of the Western Caucasus]. *Svidetel'stvo o registratsii bazy dannykh 2021622649* [Database Registration Certificate 2021622649], 25.11.2021, Application no. 2021622619 dated 11.19. 2021.
7. Nasonov A.I. Novyy sposob polucheniya kul'tury *Venturia inaequalis* iz askospor [New method of producing of *Venturia inaequalis* culture from ascospores]. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and Phytopathology], 2019, vol. 53, no. 1, pp. 46-48. <https://doi.org/10.1134/S0026364819010094>
8. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Astapchuk I.L. Chuvstvitel'nost' krasnodarskoy populyatsii *Venturia inaequalis* k difenokonazolu, ingibitoru demetilirovaniya sterinov [Sensitivity of the Krasnodar population of *Venturia inaequalis* to difenoconazole, an inhibitor of sterol demethylation]. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and Phytopathology], 2021, vol. 55, no. 4, pp. 297-308. <https://doi.org/10.31857/S0026364821040103>
9. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Lobodina E.V. Dlitel'noe sokhranenie rezistentnosti k karbendazimu u *Venturia inaequalis* v Krasnodarskom krae (Rossiya) [The long-term resistance to carbendazime in *Venturia inaequalis* in the Krasnodar region (Russia)]. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and Phytopathology], 2022, vol. 56, no. 5, pp. 374-378. <https://doi.org/10.31857/S0026364822050087>
10. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Lobodina E.V. Osobennosti morfotipnogo sostava populyatsii *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter na vospriimchivyykh k parshe sortakh yabloni [Peculiarities of the morphotype composition of the *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter population on susceptible to scab apple tree varieties]. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii* [Pomiculture and small fruits

- culture in Russia], 2019, vol. 58, pp. 151-157. <https://doi.org/10.31676/2073-4948-2019-58-151-157>
11. Suprun I.I., Nasonov A.I., Tokmakov S.V., Barsukova O.N., Yakuba G.V. Primenenie SSR markerov dlya izucheniya geneticheskogo raznobraziya *Venturia inaequalis* na Severnom Kavkaze v agrofittotsenozakh raznogo tipa [Application of SSR markers for study of genetic diversity of *Venturia inaequalis* in the different types of orchards in the North Caucasian region]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* [Agricultural Biology], 2018, vol. 53, no. 1, pp. 170-178. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.170rus>
  12. Tyuterev S.L. *Mekhanizmy deystviya fungitsidov na fitopatogennyye griby* [Mechanisms of fungicide action on phytopathogenic fungi]. St. Petersburg: IPK "Niva", 2001, 172 p.
  13. Yakuba G.V. *Ekologizirovannaya zashchita yabloni ot parshi v usloviyakh klimaticheskikh izmeneniy* [Ecological protection of apple trees from scab under conditions of climatic changes]. Krasnodar: GNU SKZNIISiV, 2013, 213 p.
  14. Belete T., Boyraz N. Critical review on apple scab (*Venturia inaequalis*) biology, epidemiology, economic importance, management and defense mechanisms to the causal agent. *J. Plant Physiol. Pathol.*, 2017, vol. 5, no. 2, pp. 1-11. <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000166>
  15. Chapman K.S., Sundin G.W., Beckerman J.L. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis*, 2011, vol. 95, pp. 921-926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0899>
  16. Cox K.D. Fungicide resistance in *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, in the United States. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer: Tokyo, 2015, pp. 433-447. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_27)
  17. Fiaccadori R. Researches on methodologies to verify reduced sensitivities of *Venturia inaequalis* in field to difenoconazole and first indications of a survey in Italy. *American Journal of Plant Sciences*, 2017, vol. 8, no. 9, pp. 2056–2068. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.89138>
  18. Finney D.J. *Probit analysis*. Cambridge: UK, 1971, 383 p.
  19. Gladioux P., Zhang X.G., Afoufa-Bastien D., Sanhueza R.V., Sbaghi M., Le Cam B. On the origin and spread of the scab disease of apple: out of Central Asia. *PLoS ONE*, 2008, vol. 3, no. 1, p. 1455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001455>
  20. Gladioux P., Zhang X.G., Roldan-Ruiz I.R., Caffier V., Leroy T., Devaux M., Glabeke S.V., Coart E., Cam B.L. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Mol. Ecol.*, 2010, vol. 19, no. 4, pp. 658-674. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04498.x>

21. Henriquez Sáez J., Sarmiento O., Alarcón P. Sensitivity of *Venturia inaequalis* Chilean isolates to difenoconazole, fenarimol, mancozeb, and pyrimethanil. *Chilean J. Agric. Res.*, 2011, vol. 71, no. 1, pp. 39-44. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000100005>
22. Koller W., Parker D.M., Turechek W.W., Avila-Adame C., Cronshaw K. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Dis*, 2004, vol. 88, pp. 537-544. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>
23. Leroy T., Lemaire C., Dunemann F., Le Cam B. The genetic structure of a *Venturia inaequalis* population in a heterogeneous host population composed of different *Malus* species. *BMC Evol. Biol.*, 2013, vol 13, no. 1, p. 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-64>
24. Li X., Li H., Yu Z., Gao L., Yang J. Investigating the sensitivity of *Venturia inaequalis* isolates to difenoconazole and pyraclostrobin in apple orchards in China. *European Journal of Plant Pathology*, 2021, vol. 161, no. 1, pp. 207-217. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02316-6>
25. Mondino P., Casanova L., Celio A., Bentancur O., Leoni C., Alaniz S. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to Trifloxystrobin and Difenoconazole in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 2015, vol. 163, no. 1, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1111/jph.12274>
26. Polat Z., Bayraktar H. Resistance of *Venturia inaequalis* to multiple fungicides in Turkish apple orchards. *Journal of Phytopathology*, 2021, vol. 169, no. 6, pp. 360-368. <https://doi.org/10.1111/jph.12990>
27. Quello K.L., Chapman K.S., Beckerman J.L. In situ detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana. *Plant disease*, 2010, vol. 94, no. 6, pp. 744-750. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0744>
28. Sither V., Garrido Haro P.A., Molineros J.E., Garzon C.D., Jiménez-Gasco M.M. Genetic diversity of apple-and crabapple-infecting isolates of *Venturia inaequalis* in Pennsylvania, the United States, determined by microsatellite markers. *Forest Pathology*, 2018, vol. 48, no. 2, p. e12405. <https://doi.org/10.1111/efp.12405>
29. Villani S.M., Biggs A.R., Cooley D.R. Raes J.J., Cox K.D. Prevalence of myclobutanil resistance and difenoconazole insensitivity in populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Dis*, 2015, vol. 99, pp. 1526-1536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-15-0002-RE>
30. Xu X., Yang J., Thakur V., Roberts A., Barbara D.J. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2013, vol. 135, no.1, pp. 97-104. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0068-4>

### ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ

**Насонов Андрей Иванович**, заведующий лабораторией биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов, кандидат биологических наук  
*ФГБНУ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия*  
*ул. 40-летия Победы, 39, г. Краснодар, Краснодарский край, 350901, Российская Федерация*  
*nasoan@mail.ru*

**Бардак Мария Владимировна**, магистрант биологического факультета Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»  
*ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, Краснодарский край, 350040, Российская Федерация*  
*maria.brd1405@mail.ru*

### DATA ABOUT THE AUTHORS

**Andrey I. Nasonov**, Head of the Laboratory for Biotechnological Control of Phytopathogens and Phytophages, Candidate of Biological Sciences  
*North Caucasian Research Institute of horticulture, viticulture, winemaking*  
*39, 40 years of Victory Str., Krasnodar, Krasnodar Region, Russian Federation*  
*nasoan@mail.ru*  
*SPIN-code: 5636-6106*  
*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4927-2192>*  
*Scopus Author ID: 56989221000*  
*ResearcherID: K-9142-2017*

**Mariya V. Bardak**, Master's degree student of the Faculty of Biology  
*Kuban State University*  
*149, Stavropol'skaya Str., Krasnodar, Krasnodar Region, Russian Federation*  
*maria.brd1405@mail.ru*  
*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1559-5073>*

Поступила 16.11.2022

После рецензирования 29.11.2022

Принята 10.12.2022

Received 16.11.2022

Revised 29.11.2022

Accepted 10.12.2022