

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 632.4.01/08 : 632.952 : 632.95.025.8

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАРБЕНДАЗИМУ  
У *VENTURIA INAEQUALIS* В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ (РОССИЯ)

© 2022 г. А. И. Насонов<sup>1,\*</sup>, Г. В. Якуба<sup>1,\*\*</sup>, Е. В. Лободина<sup>1,\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, 350901 Краснодар, Россия

\*e-mail: nasovan@mail.ru

\*\*e-mail: galyayaku@gmail.com

\*\*\*e-mail: alyona2255@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 05.06.2022 г.

Принята к публикации 07.06.2022 г.

Эффективность контроля парши яблони на восприимчивых сортах во многом зависит от кратности применения системных фунгицидов: частое их использование приводит к отбору устойчивых штаммов. Бензимидазолы были одними из первых фунгицидов, к которым была зафиксирована резистентность у *Venturia inaequalis*. Начиная с 2015 г. эта группа фунгицидов не разрешена для использования на яблоне на территории России по причине их низкой эффективности. В работе представлены данные оценки чувствительности местной популяции патогена, включая исходную популяцию, к карбендазиму. Образцы листьев с поражениями возбудителя парши яблони отбирали в 2020–2021 гг. в различных садовых насаждениях, а также в природных произрастаниях яблони. В чашечных экспериментах “доза–эффект” была выявлена высокая степень резистентности патогена из садовых популяций: моноспорные изоляты были способны расти на среде с концентрацией фунгицида в 10000 мг/л. При этом исходная популяция была высокочувствительной к карбендазиму, ее ЭК<sub>50</sub> составил 0.0102 мг/л. Впервые для региона показана долговременная – спустя шесть лет после отмены применения – устойчивость возбудителя парши яблони к карбендазиму.

**Ключевые слова:** бензимидазолы, исходная чувствительность, парша яблони, резистентность к фунгицидам, ЭК<sub>50</sub>

**DOI:** 10.31857/S0026364822050087

Парша яблони [возбудитель – *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter], является заболеванием, имеющим большое экономическое значение, особенно в таких регионах России, как Краснодарский край, где высокая влажность воздуха – обычное явление весной и в начале лета. Эффективность контроля болезни на восприимчивых сортах яблони во многом зависит от кратности применения системных фунгицидов: частое их использование приводит к высокому селективному давлению в направлении накопления устойчивых штаммов. Устойчивость патогена к бензимидазолам, в том числе и карбендазиму, в мире была зафиксирована уже в конце 70-х годов XX столетия (Kiebacher, Hoffmann, 1976; 1980; Schwabe, 1979; Cox, 2015). В России о случаях резистентности к этой группе фунгицидов сообщалось в 80–90-х годах прошлого века (Тютютев, 2001). Однако в 2002–2004 гг. в Краснодарском крае на мелкоделяночном опыте была показана стабильная эффективность в течение трех лет нескольких вариантов систем защиты против парши яблони, включавших, в ряду фунгицидов с другими действующими ве-

ществами, одно- и двукратное применение бензимидазолов с действующими веществами карбендазим и беномил (Yakuba, 2013). В некоторых странах Европы, а также в США и Японии, метилбензимидазолкарбаматы (МБК) запрещены для контроля парши яблони, однако тиофанатметил применяется для борьбы с болезнями яблони, развивающимися во второй половине вегетации, такими, как мухосед, сажистая пятнистость, горькая, белая и черная гнили плодов (Tanaka et al., 2000; Cox, 2015; Weber, Børve, 2021). В России все бензимидазолы исключены из ежегодно издаваемого “Государственного каталога пестицидов и агрохимикатов”, разрешенных к использованию на яблоне, с 2015 г. (State Catalogue..., 2015–2022) в связи со значительным снижением их эффективности.

Согласно классификации FRAC, по механизму действия бензимидазолы относятся к группе В: вещества, воздействующие на цитоскелет и моторные белки клеток грибов (cytoskeleton and motor proteins), по единому цифровому коду – 1 и характеризуются высоким риском развития рези-

**Таблица 1.** Характеристика исследованных популяций *Venturia inaequalis*

Популяция	Район отбора	Вид или сорт хозяина	Количество изолятов
Исходная*	Северский	<i>Malus orientalis</i>	52
Садовая**	г. Краснодар	Reinette Simirenko	49
” ”	Динской	Jeromine	50
” ”	Красноармейский	Gala	44
” ”	Выселковский	Reinette Simirenko	32
Всего			227

Примечание. \*Популяция патогена никогда не подвергалась воздействию фунгицидов; \*\*популяция ежегодно контролируется фунгицидами, однако бензимидазолы не применялись в программах защиты шесть предшествовавших исследованию лет.

стентности (FRAC Code List, 2019). Устойчивость к МБК обусловлена точечными мутациями в кодирующей области гена-мишени β-тубулина в месте связывания фунгицида. Тубулин – белок-основа микротрубочек, а нарушение их сборки приводит к перебоям в синтезе ДНК, делении ядра и диспропорциям внутренней организации клеток. На других патогенных грибах было зарегистрировано несколько точечных мутаций (Ma, Michailides, 2005), но у *V. inaequalis* только три из них – в кодонах 198, 200, 240 – были связаны с умеренным, высоким и низким или умеренным уровнем устойчивости соответственно (Koenraad et al., 1992; Quello et al., 2010).

Как отмечает К.Д. Сох (2015), в некоторых случаях отмена применения фунгицида в течение длительного времени может привести к восстановлению чувствительности вредного организма к нему, однако использование бензимидазолов против других болезней на яблоне сохраняет селективное давление на резистентную популяцию *V. inaequalis*.

В связи с тем, что разрешенный на территории России для защиты от парши яблони набор фунгицидов достаточно ограничен, а в садах Краснодарского края бензимидазолы не применялись в течение 6 лет, актуальной является оценка уровня чувствительности к карбендазиму популяции патогена после длительного перерыва в его использовании.

Листья с симптомами парши отбирали в четырех различных садоводческих хозяйствах Краснодарского края с промышленными насаждениями интенсивного типа яблони домашней (*Malus × domestica* Borkh.) сортов Reinette Simirenko, Gala, Jeromine, а также в природных произрастаниях яблони восточной – *M. orientalis* Uglitzk в 2021–2022 гг. (табл. 1). Популяция патогена с дикой яблони (*M. orientalis*) – природный резервуар болезни – никогда не подвергалась воздействию фунгицидов, являясь исходной по чувствительности к ним в сравнении с сельскохозяйственными популяциями. Моноспоровые изоляты парши выделяли из листового опада яблони с использованием спороловушки (Nasonov, 2019) или путем смыва на 1.5%-й водный агар конидий со свежих заражен-

ных *Venturia inaequalis* листьев. После инкубации в течение ночи при 20°C отдельные проросшие споры переносили на питательный агар (КГА – картофельно-глюкозный агар). 230 изолятов были охарактеризованы по уровням чувствительности к карбендазиму путем измерения роста мицелия на той же среде через четыре-пять недель после инкубации при 20°C с использованием методик, описанных в работах Köllger W. et al. (2004) и Quello K.L. et al. (2010). В КГА добавляли карбендазим в виде коммерческого препарата Зимшанс, КС (500 мг/л действующего вещества, производитель – ООО “Шанс”, Россия) в концентрациях: 0.01, 0.1, 1.0, 5.0 и 10.0 мг/л – для исходной популяции и 10, 50, 100, 500, 1000, 10000 мг/л – для “садовой” популяции. Перед этим фунгицид растворяли в воде. В чашки Петри контрольного варианта вместо фунгицида вносили стерильную воду. Мицелиальные пробки диаметром 6 мм, полученные из активно растущих колоний, помещали в отдельные чашки Петри (9 см диам.) для каждой концентрации фунгицида. Опытные и контрольные посеы инкубировали в течение месяца в темноте при 20°C с дальнейшим замером диаметра изолятов линейкой. Влияние токсического вещества выражали в значениях относительного роста мицелия как отношение размера изолята, выросшего на фунгициде, к размеру изолята в контрольном варианте. Анализ повторяли трижды. Значения ЭК<sub>50</sub> (эффektivная 50%-я концентрация) изолятов были рассчитаны с помощью пробит-анализа. Для расчетов использовали программу Excel.

Оценка роста изолятов аборигенной исходной популяции *V. inaequalis* на различных концентрациях карбендазима показала ее высокую чувствительность к токсиканту. Для распределения этих изолятов была характерна логонормальная зависимость – большинство изолятов были чувствительны к низким концентрациям фунгицида (рис. 1). Среднее значение ЭК<sub>50</sub> составило 0.0102 мг/л действующего вещества (табл. 1), при этом разница между крайними значениями этого показателя составила 30.8. Значение ЭК<sub>50</sub> карбендазима для исходной популяции парши яблони из Краснодарского края было получено впервые в этом иссле-

довании (рис. 2). Все исследованные садовые популяции, каждая из которых содержала около 40 изолятов, были резистентными в отношении карбендазима. Значения ЭК<sub>50</sub> для большей части

изолятов точно рассчитать было невозможно, так как даже самые большие используемые концентрации препарата в 10000 мг/л не приводили к значимому ингибированию роста:

	Всего изолятов	ЭК <sub>50</sub> среднее	Диапазон ЭК <sub>50</sub>
Исходная популяция	52	0.0102	0.0012–0.0355
Садовая популяция	175	<10000	—

На рис. 3, где представлено распределение изолятов исходной и садовой краснодарской популяций по значениям ЭК<sub>50</sub>, можно видеть, что между чувствительными и устойчивыми изолятами практически нет переходных по чувствительности форм гриба. Известно, что к таким системным фунгицидам, как бензимидазолы и стробилурины, устойчивость развивается по качественному типу, когда субпопуляции патогенных микроорганизмов либо чувствительны, либо полностью устойчивы к пестициду. Резистентность в этом случае рассматривается как полная потеря кон-

троля над заболеванием, которую невозможно восстановить с помощью более высоких доз или более частых применений фунгицидов (Vincelli, 2014).

Долговременная устойчивость популяций патогена к бензимидазолам (беномилу, карбендазиму и тиофанат-метилу) была ранее показана немецкими учеными. Исследование чувствительности изолятов *V. inaequalis* из садов в районе Гамбурга (Германия), где бензимидазольные соединения не применялись в течение четырех вегетационных периодов, показало высокую устойчивость популяции к этим фунгицидам (Kiebacher,

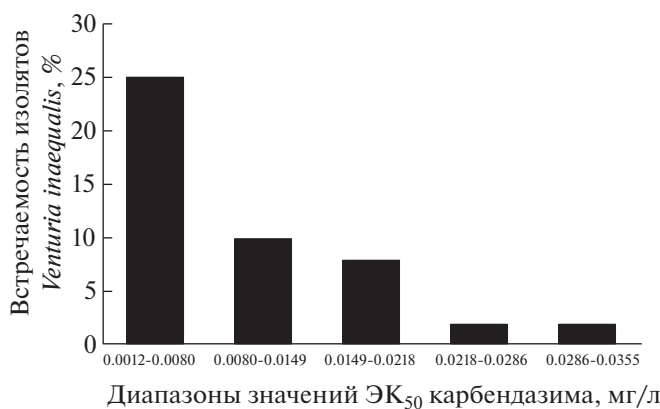


Рис. 1. Встречаемость в исходной популяции парши яблони моноспоровых изолятов с разными значениями ЭК<sub>50</sub> карбендазима, мг/л.

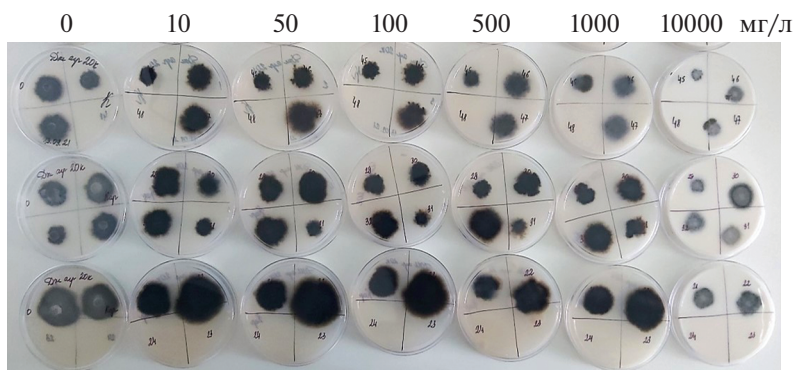
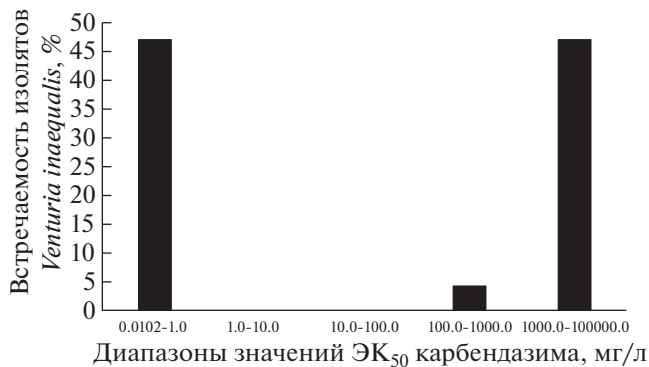


Рис. 2. Особенности роста моноспоровых изолятов *Venturia inaequalis* садовых популяций при различных концентрациях карбендазима.



**Рис. 3.** Встречаемость в краснодарской популяции парши яблони моноспоровых изолятов с различной чувствительностью к карбендазиму.

Hoffmann, 1976, 1980). С другой стороны, сообщались противоречивые данные о стабильности устойчивости некоторых популяций *V. inaequalis* к карбендазиму, среди которых одни демонстрировали довольно существенное снижение резистентности после прекращения применения бензимидазольных фунгицидов, тогда как у других резистентность оставалась на том же уровне (Schwabe, 1979). Причина этих различий неясна, возможно, приспособленность популяций грибов в полевых условиях сильно варьирует в зависимости от факторов окружающей среды. Так, Cox K.D. et al. (2007), отмечали, что “затраты на вегетативную и репродуктивную приспособленность, связанные с устойчивостью к фунгицидам у аскомицетов, очень специфичны для вида гриба, параметров приспособленности и рассматриваемого фунгицида, поскольку исследования не показывают последовательных тенденций в отношении устойчивости к фунгицидам и приспособленности”. При обследовании яблоневых садов в штате Индиана, США, Quello et al. (2010) наблюдали две различающихся по чувствительности к фунгицидам МБК популяции *V. inaequalis*: чувствительную — на декоративных яблонях и относительно устойчивую — в промышленных насаждениях. Хотя бензимидазолы не применяются в США против возбудителя парши, один из них (тиофанметил) используют против других заболеваний яблони, что может способствовать поддержанию селективного давления на популяцию *V. inaequalis* (Cox, 2015).

Полученные данные показывают, что даже спустя шесть лет перерыва в использовании бензимидазолов на яблоне в садовой популяции возбудителя парши в Краснодарском крае сохраняется высокий уровень резистентности к этим фунгицидам. Этот факт впервые зафиксирован для местной агроценотической популяции. Предположительной причиной такого длительного сохранения высокого уровня устойчивости к фунгициду у патогена после отказа от препарата может быть очень слабый эффект, так называемой, “платы за приспособленность”. С экологической и

эволюционной точек зрения любое приспособление, как, например, устойчивость к фунгицидам в обрабатываемых садах, может иметь определенные энергетические издержки для организма, нивелирующиеся теми преимуществами, которое оно дает в конкретных условиях. Однако при изменении условий, в которых приспособление давало преимущество, существующие издержки на его поддержание, если они достаточно значимы, могут приводить к снижению приспособленности таких генотипов и постепенному вытеснению их из популяции. Можно предположить, что точечная мутация в гене  $\beta$ -тубулина, обуславливающая устойчивость к бензимидазолам, не снижает приспособленности *V. inaequalis* в отсутствие давления на популяцию со стороны этих фунгицидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/109.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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)

Cox K.D., Bryson P.K., Schnabel G. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. Phytopathology. 2007. V. 97. P. 448–453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0448>

FRAC Code List. Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). 2019. P. 1–14. <http://www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf>

Kiebacher H., Hoffmann G.M. Benzimidazol-Resistenz bei *Venturia inaequalis*. J. Plant Diseases and Protection. 1976. P. 352–358. <https://www.jstor.org/stable/43214087>

Kiebacher J., Hoffmann G.M. Qualitative und quantitative Untersuchungen zur Resistenz von *Venturia inaequalis* gegen Benzimidazol-Fungizide. J. Plant Diseases and Protection. 1980. P. 705–716. <https://www.jstor.org/stable/43216433>

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 (11). P. 1348–1354.

Köller W., Parker D.M., Turechek W.W. et al. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. Plant Dis. 2004. V. 88. P. 537–544. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>

Ma Z., Michailides T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection. 2005. V. 24 (10). P. 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>

Nasonov A.I. New method of producing of *Venturia inaequalis* culture from ascospores. Mikologiya i fitopatologiya. 2019. V. 53 (1). P. 46–48 (in Russ.).

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. V. 94 (6). P. 744–750.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0744>
- Schwabe W.F.S. Resistance of the apple scab fungus (*Venturia inaequalis*) to benzimidazole fungicides. Deciduous Fruit Grower. 1979. V. 29. P. 418–422.
- State Catalogue of pesticides and agrochemicals, permitted for use on the territory of the Russian Federation. 2015–2022. (in Russ.). <http://mcx.ru/ministry/departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/>
- Tanaka S., Kamegawa N., Ito S.I. et al. Detection of thiophanate-methyl-resistant strains in *Diplocarpon mali*, causal fungus of apple blotch. J. General Plant Pathology. 2000. V. 66 (1). P. 82–85.  
<https://doi.org/10.1007/PL00012926>
- Tyuterev S.L. Problems of phytopathogen resistance to new fungicides. Novosti zashchity rasteniy. 2001. № 1. P. 38–53 (in Russ.). <https://plantprotect.ru/index.php/vizr/issue/view/232>
- Vincelli P. Some principles of fungicide resistance. Plant Pathology Fact Sheet PPFS-MISC-02. University of Kentucky. College of Agriculture. Plant Pathology Extension. 2014.
- Weber R.W., Børve J. Infection biology as the basis of integrated control of apple canker (*Neonectria ditissima*) in Northern Europe. CABI Agriculture and Bioscience. 2021. V. 2 (1). P. 1–16.  
<https://doi.org/10.1186/s43170-021-00024-z>
- Yakuba G.V. Ecologized protection of apple scab in the face of climate change: A monograph. Krasnodar, 2013 (in Russ.).
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2015–2022 гг. (State catalogue) <http://mcx.ru/ministry/departments/departament-rastenievodstva-mekhanizatsii-khimizatsii-i-zashchity-rasteniy/industry-information/info-gosudarstvennaya-usluga-po-gosudarstvennoy-registratsii-pestitsidov-i-agrokhimikatov/>
- Насонов А.И. (Nasonov) Новый способ получения культуры *Venturia inaequalis* из аскоспор. Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 1. С. 46–48.  
<https://doi.org/10.1134/S0026364819010094>
- Тютерева С.Л. (Tyuterev) Проблемы устойчивости фитопатогенов к новым фунгицидам. Вестник защиты растений. 2001. № 1. С. 38–53.
- Якуба Г.В. (Yakuba) Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений: Монография. Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2013. 213 с.

## The Long-Term Resistance to Carbendazim in *Venturia inaequalis* in the Krasnodar Region (Russia)

A. I. Nasonov<sup>a,#</sup>, G. V. Yakuba<sup>a,##</sup>, and E. V. Lobodina<sup>a,###</sup>

<sup>a</sup>North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia

<sup>#</sup>e-mail: [nasoan@mail.ru](mailto:nasoan@mail.ru)

<sup>##</sup>e-mail: [galyayaku@gmail.com](mailto:galyayaku@gmail.com)

<sup>###</sup>e-mail: [alyona2255@yandex.ru](mailto:alyona2255@yandex.ru)

Regular application of systemic fungicides to control apple scab in vulnerable types results in the selection of resistant strains. Benzimidazoles were one of the first fungicides to which *Venturia inaequalis* developed resistance. This class of fungicides has been prohibited for use on apple trees in the Russian Federation since 2015. This is due to their low efficacy. It seems relevant to assess the sensitivity of the pathogen to benzimidazoles after a long break in use. The sensitivity to carbendazim of four populations of the causative agent of apple scab, *V. inaequalis*, from Krasnodar Territory, Russia, was studied. The baseline population had never been exposed to the effects of a fungicide. It was collected in natural growths of the eastern apple tree (*Malus orientalis*) in the Western Caucasus foothills. The other populations of pathogen were collected from commercial orchards of *M. × domestica* cultivars “Rienette Simirenko”, “Gala”, and “Jeromine”, where it was once used fungicidal treatments with carbendazim. Sampling was carried out in 2020–2021. In total, the sensitivity of 227 monospore isolates was studied. In experiments in vitro, we determined an effective 50% dose (ED<sub>50</sub> or EC<sub>50</sub>) of monospore cultures of the pathogen, a dose at which there is a double decrease in mycelium growth when using five to six concentrations of carbendazim (Zimoshans 500 CE, manufacturer: ООО “Chance”, Russia). For the baseline population, the concentrations of carbendazim were 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, and 10.0 mg/l; for the garden population, they were 10, 50, 100, 500, 1000, and 10000 mg/l of the active substance. ED<sub>50</sub> was determined using probit regression analysis. The original population of *Venturia inaequalis* showed its high sensitivity to carbendazim. The distribution of these isolates was characterized by a logonormal dependence; most of the isolates were sensitive to low concentrations of the fungicide. The mean EC<sub>50</sub> value was 0.0102 mg/l active ingredient, with a difference between the extreme values of this indicator of 30.8. The EC<sub>50</sub> value of carbendazim for the initial population of apple scab from the Krasnodar region was obtained for the first time in this study. All studied horticultural populations (more than 170 isolates) were resistant to carbendazim. EC<sub>50</sub> values for most of the isolates could not be accurately calculated, as even the highest drug concentrations of 10 000 mg/l used did not result in significant growth inhibition. For the first time in the region, long-term resistance (for six years) of the apple scab pathogen to carbendazim was shown.

**Keywords:** apple scab, benzimidazoles, EC<sub>50</sub>, fungicide resistance, initial sensitivity