



ISSN 1727-1320 (Print),  
ISSN 2308-6459 (Online)

# ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2020 ТОМ VOLUME 103 ВЫПУСК ISSUE 3



**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И УСТОЙЧИВОСТЬ К ФУНГИЦИДАМ  
ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *ILYONECTRIA CRASSA*****Е.М. Чудинова<sup>1</sup>, В.А. Платонов<sup>1</sup>, А.В. Александрова<sup>2</sup>, С.Н. Еланский<sup>1,2\*</sup>**<sup>1</sup> *Российский университет дружбы народов, Москва*<sup>2</sup> *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва*\* *ответственный за переписку, e-mail: snelansky@gmail.com*

Недавно было показано, что гриб-аскомицет *Ilyonectria crassa* способен поражать клубни картофеля. В работе впервые проанализированы биологические особенности и устойчивость к некоторым фунгицидам выделенного с картофеля штамма *I. crassa*. Последовательности видоспецифичных участков “картофельного” штамма совпали с полученными ранее для грибов, выделенных из корней нарцисса, женьшеня, осины и бука, луковиц лилии и листа тюльпана. По-видимому, многие дикорастущие и садовые растения могут быть резерватами *I. crassa*. Исследуемый штамм заражал ломтики томата и картофеля, но не инфицировал целый плод томата и неповрежденный клубень картофеля. Это показывает, что *I. crassa* является раневым паразитом. Оценка устойчивости к флудиоксонилу, дифеноконазолу и азоксистробину на питательной среде показала высокую эффективность этих препаратов. Показатель ЕС50 (концентрация фунгицида, замедляющая в 2 раза скорость радиального прироста колонии относительно бесфунгицидного контроля) был равен 0.4; 7.4 и 4 мг/л соответственно. Возможность развития заболевания, вызываемого *I. crassa*, следует учитывать при фитопатологической оценке клубней картофеля и разработке мероприятий по защите растений.

**Ключевые слова:** патогены картофеля, хранение картофеля, флудиоксонил, дифеноконазол, азоксистробин, болезни картофеля

*Поступила в редакцию: 08.06.2020**Принята к печати: 24.07.2020*

Развитие фитопатогенных микроорганизмов приводит к высоким потерям на всех этапах выращивания и хранения картофеля. При планировании защитных мероприятий учитываются, как правило, хорошо известные возбудители болезней, такие как виды родов *Alternaria*, *Fusarium*,

*Phoma*, *Helminthosporium*, *Colletotrichum*, *Phytophthora* и др. Однако в последние годы появляется все больше сообщений о появлении на картофеле новых фитопатогенных микроорганизмов. Их биология слабо изучена, эффективность используемых на картофеле фунгицидов

в их отношении неизвестна, методы диагностики не разработаны. При массовом развитии они способны нанести ощутимый урон урожаю картофеля. Одним из таких микроорганизмов является гриб-аскомицет *Ilyonectria crassa* (Wollenw.) A. Cabral & Stous, впервые обнаруженный авторами на клубнях картофеля (Chudinova et al., 2019).

### Материалы и методы

В работе использован штамм *I. crassa* 18KSuPT2, выделенный в 2018 году из пораженного клубня картофеля, выращенного в Костромской области. Клубень был поражен по типу сухой гнили с полостью, покрытой светло-коричневым мицелием. С помощью стерильной препаровальной иглы мицелий гриба переносили в чашку Петри с агаризованной средой (пивное сусло 10%, агар 1.5%, пенициллин 1000 ед/мл). Инкубировали чашки в темноте при 24 °С.

Для фотографирования, оценки размеров и морфологии спор и органов спороношения использовали световой микроскоп Leica DM2500 с цифровой камерой ICC50 HD и бинокулярный микроскоп Leica M80 с цифровой камерой IC80HD (Leica Microsystems, Германия).

Для выделения ДНК мицелий гриба наращивали в жидкой гороховой среде, после чего замораживали в жидком азоте, гомогенизировали, инкубировали в СТАВ буфере, очищали хлороформом, 2 раза промывали 70% спиртом. Подробно метод выделения ДНК описан в статье Kutuzova et al. (2017).

Для определения видовой принадлежности молекулярными методами и сравнения с другими известными штаммами *I. crassa* проводили ПЦР с праймерами, позволяющими амплифицировать видоспецифичные участки ДНК: ITS1-5,8S-ITS2 (праймеры ITS5/ITS4, White et al., 1990), участки генов  $\beta$ -тубулина (Bt2a/Bt2b, Glass, Donaldson, 1995) и фактора элонгации трансляции 1 $\alpha$  (tef1 $\alpha$ ) (праймеры EF1-728F/EF1-986R, Carbone and Kohn, 1999). Ампликоны нужной длины экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp компании «Евроген». Амплифицированные участки секвенировали с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 xl (Applied Biosystems, CA, USA). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

### Результаты и обсуждение

На чашках Петри с сусло-агаром гриб образовывал колонии с белым хлопьевидным мицелием. Среда под мицелием окрашивалась в красно-коричневый цвет. При подсыхании среды гриб формировал споры двух типов на одиночных и агрегированных в небольшие спородохии конидиеносцах. Макроконидии вытянутые, цилиндрические, с одной-тремя септами, средняя длина 27.2 мкм с разбросом значений от 23.2 до 32.2 мкм, ширина – до 4.9 мкм (рис. 1). Средняя длина микроконидий – 14.3 мкм с разбросом значений от 10.3 до 18.1 мкм, ширина – до 4.0 мкм. Все макро- и микроморфологические признаки

В данной работе приведены результаты анализа выделенного из клубня картофеля штамма *I. crassa*. Изучены морфология колоний и мицелиальных структур *I. crassa*, последовательности нуклеотидов видоспецифичных участков ДНК, вирулентность к картофелю и томату, устойчивость к некоторым популярным фунгицидам.

Определение вирулентности проводили на целых зеленых плодах крупноплодного томата (сорт Дубрава) и клубнях картофеля (сорт Гала). Кроме того, для имитации поражения поврежденных плодов и клубней использовали дольки тех же плодов и клубней. Ломтики клубней помещали во влажные камеры, представляющие собой чашки Петри с мокрой фильтровальной бумагой на дне. На бумагу помещали предметное стекло, на которое, в свою очередь, клали ломтики клубней или плодов. Целые клубни и плоды также помещали в контейнеры, на дне которых была мокрая фильтровальная бумага. В центр ломтика (или на неповрежденную поверхность клубня или плода) помещали кусочек агара (5×5 мм) с гифами гриба после 5 дней выращивания на сусло-агаре.

Оценку устойчивости штаммов грибов к фунгицидам проводили в лабораторных условиях на агаризованной питательной среде. Изучали восприимчивость к фунгицидным препаратам Максим, КС (действующее вещество флудиоксонил, 25 г/л), Квадрис, КС (азоксистробин 250 г/л), Скор, КЭ (дифеноконазол 250 г/л) (Государственный каталог..., 2020). Оценку проводили в чашках Петри на среде сусло-агар с добавлением исследуемых препаратов в концентрациях действующего вещества 0.1; 1; 10 ppm (мг/л) (для флудиоксонила и дифеноконазола), 1; 10; 100 ppm (для азоксистробина) и на среде без фунгицида (контроль). Фунгицид добавляли в расплавленную и охлажденную до 60 °С среду, после чего среду разливали по чашкам Петри. Агаровый блок с мицелием гриба помещали в центр чашки Петри и культивировали при температуре 24 °С в темноте. Через 7 суток инкубирования проводили замер диаметров колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях; результаты измерений для каждой колонии усредняли. Эксперименты выполняли в трёх повторностях. По результатам анализов рассчитывали показатель ЕС<sub>50</sub>, равный концентрации фунгицида, снижающей в 2 раза скорость радиального прироста колонии относительно бесфунгицидного контроля.

укладываются в диапазон варьирования вида *Ilyonectria crassa* (Cabral et al., 2012).

Последовательности видоспецифичных участков ДНК (ITS,  $\beta$ -тубулин, TEF 1 $\alpha$ ) полностью совпали с сиквенсами ранее исследованных нами штаммов *I. crassa* (Chudinova et al., 2019, табл. 1). С целью изучения распространенности *I. crassa* в других регионах и анализа спектра поражаемых культур были проанализированы аналогичные последовательности ДНК в базе GenBank (табл. 1). Перекрытие составило от 86 до 100%. Сиквенсы всех трех участков ДНК “картофельного” штамма *I. crassa* были идентичны последовательностям штаммов, выделенных с лукавицы

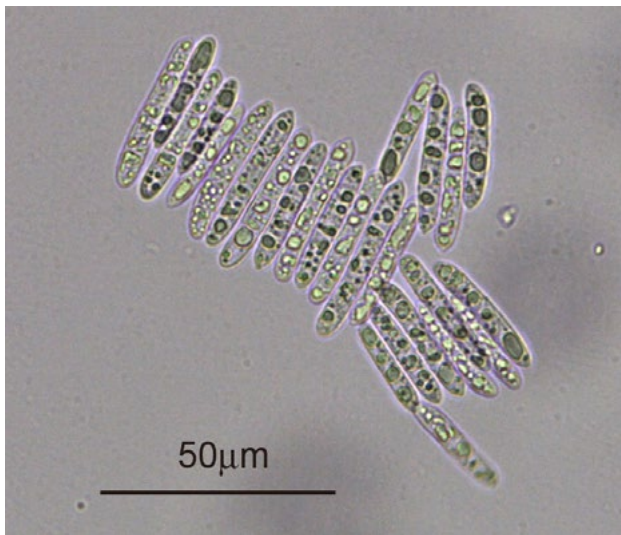


Рисунок 1. Конидии *Ilyonectria crassa* под световым микроскопом

Figure 1. Light microscopy of the *Ilyonectria crassa* conidia  
 лилии и корней нарцисса в Нидерландах и из корня женьшеня в Канаде. Других штаммов *I. crassa* с тремя проанализированными аналогичными последовательностями в открытых базах данных нам обнаружить не удалось. Однако анализ депонированных последовательностей ITS и  $\beta$ -тубулина показал присутствие *I. crassa* на листьях тюльпана в Великобритании. Грибы с похожей последовательностью ITS были выявлены при анализе микобиоты корней осины в Канаде и бука в Италии, клубней картофеля в Саудовской Аравии (табл. 1). Результаты данного исследования показывают, что *I. crassa* имеет глобальное распространение и способен поражать разные виды растений.

При определении патогенности на ломтиках томата и картофеля на 5 день диаметр поражения достигал 1.5 см. При этом исследуемый штамм не инфицировал целый плод томата и неповрежденный клубень картофеля.

Однако на томате наблюдалось поражение чашелистиков. Для исключения возможности контаминации из развившегося на ломтике клубня картофеля мицелия был выделен в чистую культуру изолят гриба. Он был полностью идентичен родительскому штамму. По-видимому, *I. crassa* является раневым паразитом.

Предпосадочная обработка семенных клубней фунгицидами позволяет снизить развитие болезней на растениях во время вегетации. Для подбора эффективных фунгицидов важно оценить, какие из них эффективны по отношению к *I. crassa*. В работе изучены широко распространенные действующие вещества фунгицидов – флудиоксонил, азоксистробин, дифеноконазол. Флудиоксонил входит в состав нескольких смесевых препаратов, используемых для протравливания семян и семенных клубней перед посадкой. Флудиоксонил (препарат Максим) используется также для обработки семенных клубней перед закладкой на хранение. Дифеноконазол и азоксистробин также входят в состав ряда препаратов, используемых для обработки семенного материала, а также в состав препаратов, предназначенных для обработки вегетирующих растений (Государственный каталог..., 2020).

Изучена скорость роста *I. crassa* на средах (рис. 2) с разными концентрациями действующих веществ: флудиоксонила ( $EC_{50} = 0.4$  ppm), азоксистробина ( $EC_{50} = 4$  ppm) и дифеноконазол ( $EC_{50} = 7.4$  ppm) (табл. 2). Эти препараты можно признать высокоэффективными в отношении *I. crassa*, так как их  $EC_{50}$  существенно ниже рекомендованной концентрации препарата в рабочей жидкости, используемой для обработки клубней. Согласно Государственному каталогу... (2020), концентрация флудиоксонила в жидкости для обработки клубней картофеля составляет от 500 до 1000 ppm, азоксистробина (в жидкости для обработки дна борозды) – 3750–9375 ppm, дифеноконазола (в жидкости для обработки вегетирующих растений) – 187.5–625 ppm.

Таблица 1. Сходство сиквенсов видоспецифичных последовательностей штамма 18KSuPT2 и имеющихся в базе Genbank штаммов *Ilyonectria crassa*  
 Table 1. The similarity of species-specific sequences of tested *Ilyonectria crassa* strain 18KSuPT2 and available in the Genbank database

Штамм	Растение-хозяин, место выделения	Номера сиквенсов, депонированных в GenBank, процент сходства			Ссылка
		ITS	$\beta$ -тубулин	TEF 1 $\alpha$	
17KSPT1 и 18KSuPT2	Клубень картофеля, Костромская обл.	MN818326	MN822872	MK281307	Chudinova et al., 2019, данная работа
CBS 158/31	Корни нарцисса, Нидерланды	JF735276 100	JF735394 100	JF735724 99.3	Cabral et al., 2012
CBS 139/30	Луковица лилии, Нидерланды	JF735275 100	JF735393 99.7	JF735723 99.3	
NSAC-SH-1	Корень женьшеня, Канада	AY295311 99.4	JF735395 100	JF735/725 99.6	
RHS235138	Лист тюльпана, Великобритания	KJ475469 100	KJ513266 100	НД	Denton, Denton, 2014
MT294410	Корни осины, Канада	MT294410 100	НД	НД	Ramsfield et al., 2020
ER1937	Бук, Италия	KR019363 99.65	НД	НД	Tizzani, Haegi, Motta. Direct submission
KAUF19	Клубень картофеля, Саудовская Аравия	HE649390 98.3	НД	НД	Gashgari, Gherbawy, 2013

НД = не депонировано

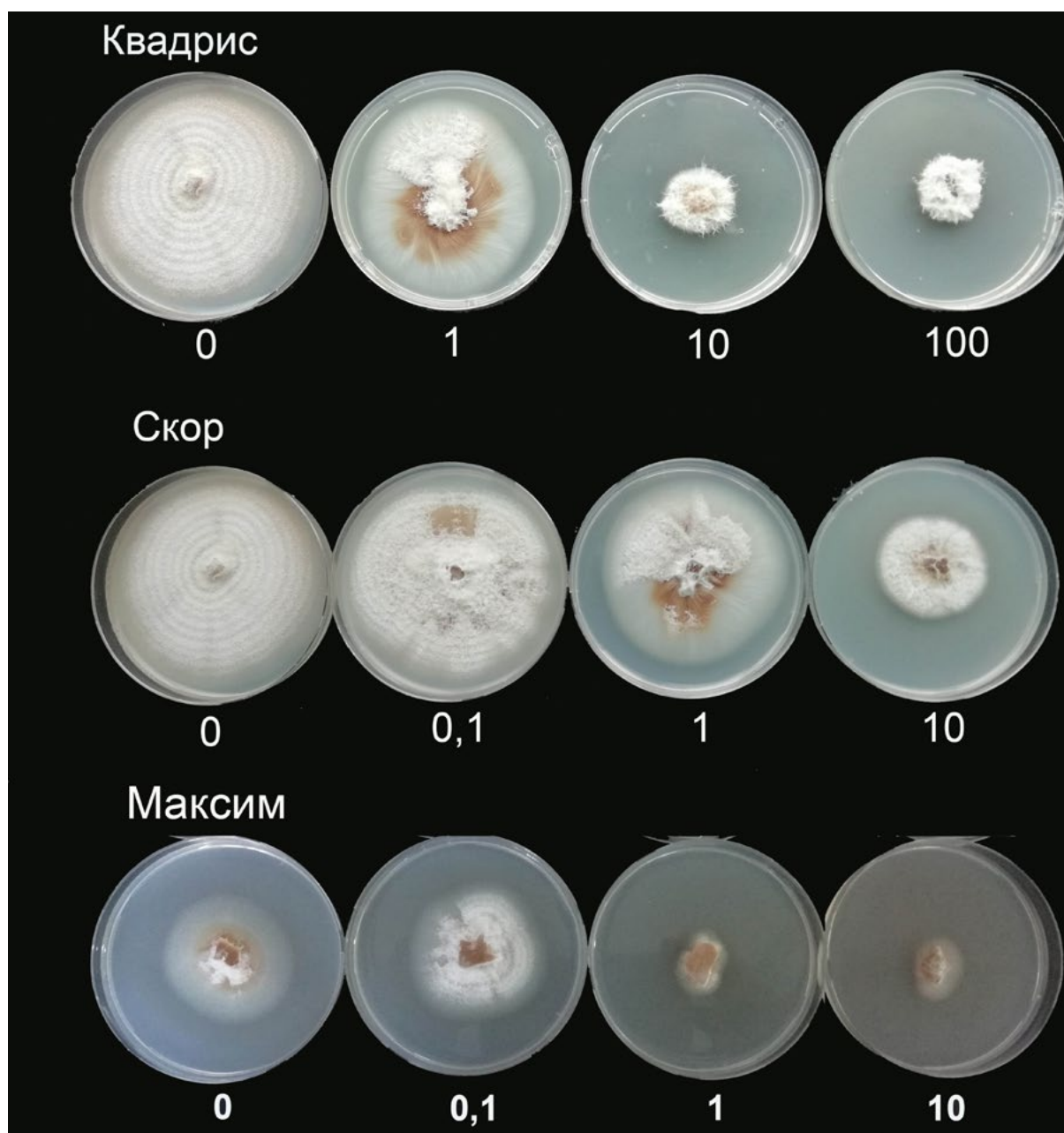


Рисунок 2. Тестирование устойчивости *Ilyonectria crassa* к фунгицидам методом выращивания на среде с различной концентрацией фунгицидов (ppm) по сравнению с контролем (0 ppm).

Фотографии сделаны на 21 день роста гриба для фунгицидов Квадрис и Скор, на 7 суток – для фунгицида Максим

Figure 2. Testing of resistance of *Ilyonectria crassa* to fungicides using growth on medium with different concentration of fungicides (ppm) as compared to control (0 ppm).

Pictures taken at day 21 for fungicides Kvadriss and Skor (upper and middle rows), at day 7 for fungicide Maksim (lower row)

Таблица 2. Устойчивость *Ilyonectria crassa* к фунгицидам  
Table 2. Resistance of *Ilyonectria crassa* to fungicides

Фунгицид (действующее вещество)	Концентрация фунгицида, ppm	Диаметр колонии, мм±станд.откл.			EC <sub>50</sub> , ppm
		3 день	5 день	7 день	
Квадрис, КС (фзоксистробин)	0	17±2	33±5	47±3	0
	1	18±1	34±2	48±2	
	10	11±1	11±1	12±1	
	100	11±1	11±1	12±1	
Максим, КС (флудиоксонил)	0.1	16±1	28±2	48±2	0.4
	1	7±1	13±3	19±4	
	10	5±1	12±1	17±5	
Скор, КЭ (дифеноконазол)	0.1	18±1	35±2	48±1	7.4
	1	11±1	24±3	35±4	
	10	11±1	13±1	17±3	

В нашей работе штаммы *I. crassa* были выделены с клубней картофеля в Костромской и Московской (Chudinova et al., 2019) областях. Высокая доля штаммов грибов с сиквенсами ITS, идентичными *I. crassa*, была выявлена при анализе микобиоты клубней картофеля в Саудовской Аравии (Gashgari, Gherbawy, 2013). По-видимому, *I. crassa* встречается на картофеле не так редко, как может показаться. В наших экспериментах показано, что гриб мог поражать поврежденные плоды томата. Из литературных данных известно, что *I. crassa* способен развиваться в почве сапротрофно (Moll et al., 2016), а также поражать

самые разные растения, даже такие далёкие в таксономическом плане, как нарциссы, лилии, женьшень, осина, бук (табл. 1). По-видимому, многие дикорастущие и садовые растения могут быть резерватами *I. crassa*. Вышесказанное показывает, что при разработке мер защиты необходимо учитывать возможность поражения клубней картофеля этим грибом. Широко распространенные препараты для обработки клубней картофеля, содержащие флудиоксонил, азоксистробин и дифеноконазол, показали высокую фунгицидную эффективность в отношении *I. crassa*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-016-00139).

### Библиографический список (References)

- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. Пестициды (2020). М.: Министерство сельского хозяйства. 830 с.
- Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW (2012) *Cylindrocarpus* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radialis* species complex *Mycol Prog* 11(3): 655–688. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- Carbone I, Kohn LMA (1999) Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia* 91:553. <https://doi.org/10.2307/3761358>
- Chudinova E, Platonov V, Elansky S, Alexandrova A, Kokaeva L, and Krutyakov Y (2019) First report of *Ilyonectria crassa* on potato. *J Plant Pathol* 101(4):1293–1294. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00355-x>
- Denton JO, Denton GJ (2014). First report of *Ilyonectria* sp. affecting foliage of Tulipa. *New Disease Reports* 29:23. <http://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.023>
- Gashgari RM, Gherbawy YA (2013) Pathogenicity of some *Fusarium* species associated with superficial blemishes of potato tubers. *Polish J Microbiol* 62(1):59–66.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Env Microbiol* 61(4): 1323–1330.
- Kutuzova IA, Kokaeva LY, Pobedinskaya MA, Krutyakov YA et al (2017) Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment. *J Plant Pathol* 99(3):635–642. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3950>.
- Moll J, Hoppe B, König S, Wubet T et al (2016) Spatial Distribution of Fungal Communities in an Arable Soil. *PLoS ONE* 11(2): e0148130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148130>
- Ramsfield T, Shay PE, Trofymow T, Myrholm C et al (2020) Distance from the Forest Edge Influences Soil Fungal Communities Colonizing a Reclaimed Soil Borrow Site in Boreal Mixedwood Forest. *Forests* 11:427. <https://doi.org/10.3390/f11040427>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc Guide Methods Appl* 18(1):315–322.

### Translation of Russian References

- State catalogue of pesticides and agrochemicals approved for usage on the territory of Russian Federation. Part 1. Pesticides. (2020). Moscow: Ministry of Agriculture. 830 p. (In Russian)

Plant Protection News, 2020, 103(3), p. 196–201

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-13431>

### Short communication

## BIOLOGY AND RESISTANCE OF PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *ILYONECTRIA CRASSA* TO FUNGICIDES

E.M. Chudinova<sup>1</sup>, V.A. Platonov<sup>1</sup>, A.V. Alexandrova<sup>2</sup>, S.N. Elansky<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Lomonosov State University, Moscow, Russia

\*corresponding author, e-mail: [snelansky@gmail.com](mailto:snelansky@gmail.com)

It has been recently shown that the ascomycete fungus *Ilyonectria crassa* can infect potato tubers. In this work, the biological characteristics and resistance to some fungicides of the “potato” *I. crassa* strain were analyzed for the first time. The sequences of the species-specific regions of the tested strain (rRNA and protein-coding genes) were identical to those obtained earlier for the fungi isolated from the roots of narcissus, ginseng, aspen, beech, as well as lily bulbs and tulip leaves. Apparently, many wild and garden plants can be carriers of *I. crassa*. The investigated strain infected tomato and potato slices but did not infect the whole intact tomato fruit and potato tuber. This demonstrated that *I. crassa* is a wound pathogen. Evaluation of resistance to fludioxonil, difenoconazole and azoxystrobin on a nutrient medium showed

high efficacy of these compounds. The EC<sub>50</sub> index, i.e. the concentration of the fungicide slowing the rate of radial growth of the colony by 2 times as compared to the non-fungicidal control, was equal to 0.4; 7.4 and 4 mg/L, respectively. The possibility of disease induction by *I. crassa* should be considered for evaluation of potato tuber infections and development of protective measures.

**Keywords:** potato pathogens, fludioxonil, difenoconazole, azoxystrobin, storage of potato, potato diseases

*Received:* 08.06.2020

*Accepted:* 24.07.2020