

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДИФЕНОКОНАЗОЛУ ИЗОЛЯТОВ *PARASTAGONOSPORA NODORUM* ИЗ ЛЕНИНГРАДСКОЙ И ОМСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Ю.В. Зеленева¹, д.б.н., Л.Д. Гришечкина¹, д.с.-х.н., Н.Г. Зубко¹, к.б.н.,
Л.Я. Плотникова², д.б.н., А.А. Ермолаева³

¹ ФГБНУ ВИЗР, e-mail: zelenewa@mail.ru

² ФГБОУ ВО Омский ГАУ e-mail: lya.plotnikova@omgau.org

³ ФГБОУ ВО СПбГАУ, e-mail: cartoshkalove@mail.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005)

Проведены исследования по изучению чувствительности изолятов *Parastagonospora nodorum* к триазолам на примере дифеноконазола. Установлено его выраженное ингибирующее действие на рост всех тестируемых изолятов гриба. Образцы получены из растительного материала пшеницы яровой и озимой в двух географически отдаленных регионах России – Ленинградской и Омской областях. Доказано, что степень ингибирования напрямую зависит от концентрации фунгицида. Наиболее чувствительными к дифеноконазолу были изоляты из Омской области ($СК_{50} = 0,02–0,03$ мг/л), а изоляты из Ленинградской области проявили несколько меньшую чувствительность ($СК_{50} = 0,04–0,05$ мг/л). Статистический анализ с применением *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони ($p = 0,444$) не выявил достоверных различий в чувствительности между географическими группами изолятов.

Ключевые слова: триазолы, изоляты гриба, ПЦР, резистентность, септориоз листа и колоса пшеницы, фунгициды.

Для цитирования: Зеленева Ю.В., Гришечкина Л.Д., Зубко Н.Г., Плотникова Л.Я., Ермолаева А.А. Оценка чувствительности к дифеноконазолу изолятов *Parastagonospora nodorum* из Ленинградской и Омской областей// Плодородие. – 2025. – №5. – С. 37-42. DOI: 10.25680/S19948603.2025.146.07.

Септориоз листьев и колоса пшеницы (*Stagonospora nodorum* blotch) вызывается грибом *Parastagonospora nodorum*. Данный патоген, наряду с *Zymoseptoria tritici* – возбудителем септориоза листьев пшеницы (*Septoria tritici* blotch), входит в число наиболее экономически значимых заболеваний пшеницы в мировом земледелии. Важной особенностью *P. nodorum* является его способность инфицировать не только пшеницу, но и другие культуры, такие как рожь, ячмень, тритикале, а также дикие злаки [9].

Подавляющее большинство современных сортов пшеницы, отечественной и зарубежной селекции, сильно восприимчиво к возбудителю септориоза (SNB) [11]. Наиболее эффективным и экономически оправданным методом контроля *P. nodorum* остается применение эффективных средств защиты, какими являются большинство современных фунгицидов. Их необходимо своевременно применять, соблюдать регламенты использования для обработки как семенного материала, так и вегетирующих растений [3, 10].

Интенсивное применение фунгицидов влечет за собой и ряд негативных последствий – загрязнение агроэкосистем и продовольственной продукции остаточными количествами пестицидов, снижает биоразнообразие микробиты в агроценозах полевых культур вследствие угнетения не только патогенных, но и полезных микроорганизмов. Как отмечают некоторые исследователи, результатом этого является постепенное накопление в популяции патогена форм, устойчивых к действию применяемых химических средств путем селекции резистентных штаммов у целевых фитопатогенов.

Для борьбы с *P. nodorum* используют фунгициды различных химических классов, ингибирующие следующие мишени действия: деметилирование (DMI), наружный

хиноновый сайт (QoI), а также сукцинатдегидрогеназу (SDHI) и др. В борьбе с возбудителем септориоза наиболее широко применяют препараты на основе триазолов (группа DMI), включая тебуконазол, пропиконазол, дифеноконазол, ципроконазол и др. Они используются как в виде однокомпонентных препаратов, так и в комбинациях с другими действующими веществами иного механизма и мишени действия, что обеспечивает синергический эффект и расширяет спектр подавляемых возбудителей заболеваний [1].

Триазолы являются средне- и малотоксичными веществами для теплокровных животных и человека и характеризуются слабовыраженными кумулятивными свойствами. Деградируют в объектах окружающей среды до нетоксичных соединений в пределах 30-100 дней. Они обладают рядом положительных качеств: широкий спектр подавления фитопатогенов, системная активность, пролонгированный защитный период, высокая избирательность, более низкие нормы применения, не зависящие от погодных условий.

Мировая практика свидетельствует, что несмотря на высокую эффективность применение триазолов и стробилуринов в борьбе с *P. nodorum*, их использование сопряжено с высоким риском селектирования резистентных форм патогена [6-8]. Отсутствие в России единой системы мониторинга устойчивости не позволяет получить достоверные данные о распространении резистентных штаммов на территории страны и существенно затрудняет разработку мер противодействия.

Предпринимаются попытки решения этой проблемы: использование не только комбинированных препаратов с эффектом синергизма или аддитивности, с высокой эффективностью против возбудителей заболеваний, но и сочетания их с активными природными соединениями,

обладающими иммунизирующим эффектом в низких нормах применения и при комбинации с ними многократно усиливающими их действие [4].

На зерновых культурах в борьбе с возбудителем септориоза листьев и колоса рекомендованы в основном комбинированные препараты и лишь некоторые из них, такие как Тилт, КЭ (пропиконазол), Эминент, МЭ (тетраконазол), Кэнсел, КС (флутриафол), Фоликур, КЭ (тебуконазол), являются однокомпонентными фунгицидами. На зерновых культурах дифеноконазол, используют только в комбинациях с другими триазолами и стробилуринами. Он обладает системной активностью в борьбе со многими фитопатогенами и длительным профилактическим лечебным действием, воздействует на патоген во время прорастания мицелия и образования гаусторий. В связи с этим в проводимых исследованиях использовали однокомпонентный зарегистрированный на других культурах в России препарат Раек, КЭ (250 г/л), содержащий дифеноконазол.

Цель исследования – оценить чувствительность к дифеноконазолу (химический класс триазолов) изолятов гриба *Parastagonospora nodorum*, отобранных из растительного материала пшеницы в двух географически удаленных регионах России – Ленинградской и Омской областях.

Научная новизна исследований – впервые проведено сравнение уровня чувствительности к дифеноконазолу между популяциями патогена из европейской (Ленинградская обл.) и западно-сибирской (Омская обл.) частей Российской Федерации. Полученные данные позволяют сформировать основу для **дальнейшего** усовершенствования стратегии эффективной борьбы с фитопатогеном, снизив безопасность блока химической защиты агробиотеносов зерновых культур для окружающей среды за счёт рационального применения средств защиты.

Методика. В 2024 г. в Ленинградской и Омской областях были отобраны листья пшеницы семи сортов, пораженные возбудителем септориоза в фазе молочно-восковой спелости (75-85 баллов по шкале Задокса). Выборка включала не менее 30 растений каждого сорта. Из данного инфекционного материала впоследствии изолировали 35 моноконидиальных колоний возбудителя *P. nodorum* (табл. 1).

Выделение изолятов *P. nodorum* в чистую культуру проводили на картофельно-глюкозный агар (КГА). Изоляты инкубировали при температуре 21 °С в условиях 12-часового фотопериода. Методы лабораторной идентификации гриба подтверждались молекулярным анализом с применением видоспецифичных разработанных праймеров [2].

Геномную ДНК выделяли из 10-дневных культур по модифицированному протоколу со СТАВ [5].

Чувствительность изолятов гриба к дифеноконазолу оценивали по ограничению роста культур на питательной среде (КГА) в лабораторных условиях, согласно методике [6].

После автоклавирования питательной среды и охлаждения ее до 40°С, с соблюдением условий асептики, вносили навеску фунгицида и тщательно перемешивали. После чего питательную среду разливали по стерильным чашкам Петри. Затем на поверхность застывшего агара

помещали микробиологический диск (диаметром 3 мм), вырезанный из чистой культуры гриба. Далее культуру гриба инкубировали в темноте при 21°С в климатической камере MIR-154 (Panasonic, Япония). В качестве контроля использовали чашки Петри без добавления фунгицида. Оценку фунгицидной активности проводили на 14-й день путём измерения диаметра колоний в двух перпендикулярных направлениях с последующим расчетом среднего значения. Исследуемый диапазон концентраций действующего вещества составлял: 100, 10, 1, 0,1 и 0,01 мг/л [6]. Для каждой концентрации и контроля выполнено по три повторности.

1. Происхождение инфекционного материала

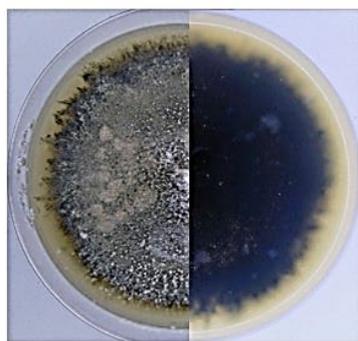
№ п/п	Обозначение инфекционного образца	Происхождение инфекционного образца/растение-хозяин
1	1-24	Ленинградская область, Гатчинский район, населенный пункт Меньково, озимая мягкая пшеница, сорт Галина
2	4-24	Ленинградская область, Гатчинский район, населенный пункт Белогорка, яровая мягкая пшеница, сорт Ленинградская 97
3	7-24	Ленинградская область, Гатчинский район, населенный пункт Белогорка / яровая мягкая пшеница, сорт Ленинградская 6
4	8-24	Ленинградская область, Гатчинский район, населенный пункт Рождествено, яровая мягкая пшеница, сорт Сударыня
5	34-24	Омская область, яровая мягкая пшеница, сорт Элемент 22
6	36-24	Омская область, яровая мягкая пшеница, селекционная линия 12/20/19
7	32-24	Омская область, яровая мягкая пшеница, сорт Памяти Азиева

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «STATISTICA12».

Результаты и их обсуждение. Изоляты *P. nodorum*, выделенные из образцов пшеницы Ленинградской и Омской областей на КГА, характеризовались следующими морфолого-культуральными свойствами: хорошо развитым бархатистым воздушным мицелием и обильным образованием пикнид. Для колоний была характерна зональность окраски – светло-бурая центральная часть и более темная периферическая, что соответствует описанию смешанного типа. Изоляты демонстрировали высокую споруляционную активность (>10 млн спор/см²). Интенсивный радиальный рост колоний патогена в диаметре достигал 80–90 мм к 30 суткам инкубации на КГА (рис. 1).

Как отмечалось ранее, классические подходы чаще всего не позволяют достоверно проводить диагностику некоторых видов, в том числе грибов рода *Parastagonospora* [2]. Точная видовая идентификация может быть проведена только при сочетании классических методов лабораторной диагностики с молекулярно-генетическими подходами, например, ПЦР с видоспецифичными праймерами. Применение праймеров YPEL_Pn / YPEL_Pag позволило подтвердить предварительную идентификацию видовой принадлежности грибов (рис. 2).

Parastagonospora nodorum



A.

Б.

В.

Рис. 1. Изображение зрелой колонии *P. nodorum* на КГА (выращивание 30 сут при 21°C, фотопериодизм 12 ч, ультрафиолетовый свет – 12 ч):

А – фронтальный вид, Б – вид снизу на культуральную чашку, В – микропрепарат пикноспор

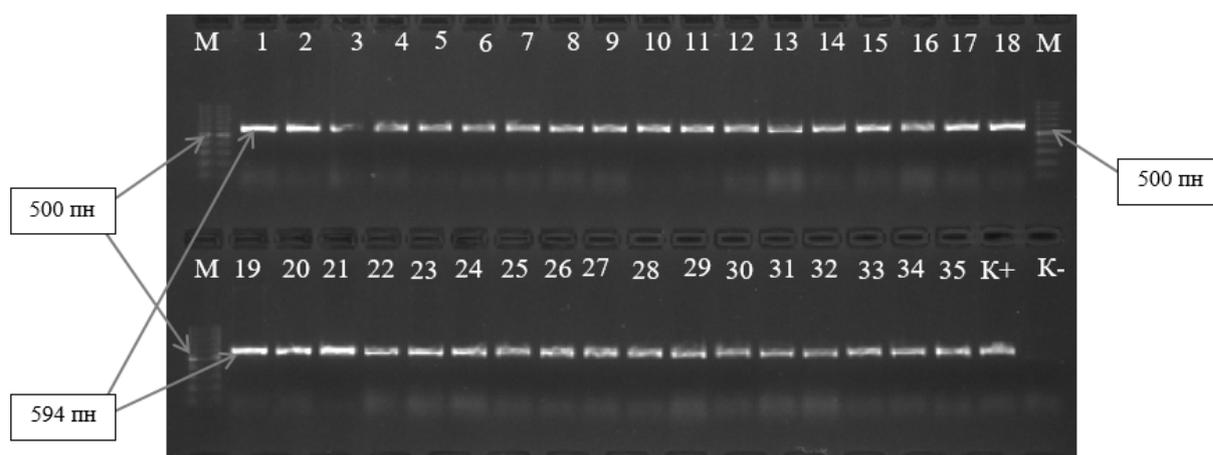


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученная с помощью праймеров YPEL_Pn / YPEL_Par, видоспецифичных для вида *P. nodorum*:

1-5 – пять изолятов гриба с сорта Галина (Ленинградская область); 6-10 – пять изолятов гриба с сорта Ленинградская 97 (Ленинградская обл.); 11-15 – пять изолятов гриба с сорта Ленинградская 6 (Ленинградская обл.); 16-20 – пять изолятов гриба с сорта Сударыня (Ленинградская обл.); 21-25 – пять изолятов гриба с сорта Элемент 22 (Омская обл.); 26-30 – пять изолятов гриба с селекционной линии 12/20/19 (Омская обл.);

31-35 – пять изолятов гриба с сорта Памяти Азиева (Омская обл.).

Положительный контроль (K+) – *P. nodorum* из микологической коллекции ВИЗР,
отрицательный контроль (K-) – *P. pseudonodorum* из микологической коллекции ВИЗР.

Размер диагностического фрагмента 594 п.н. М – ДНК маркер Gene Ruler 100bp (Thermo Fisher scientific).

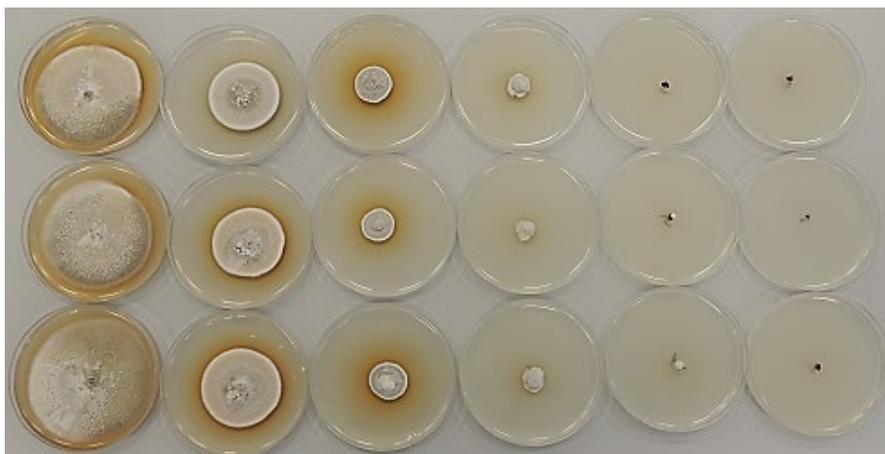
Результаты исследований показали, что дифеноко-назол ингибировал рост колоний изолятов гриба *P. nodorum* в разной степени в зависимости от их концентрации (рис. 3, 4).

При использовании препарата в минимальной концентрации 0,01 мг/л, наибольшее ограничение роста колоний гриба отмечено у изолятов, полученных с сорта Памяти Азиева (Омская обл.), у изолятов с селекционной линии 12/20/19 (Омская обл.) и с сорта Ленинградская 6 (Ленинградская обл.), средний диаметр колоний составил $56,43 \pm 6,45\%$, $56,54 \pm 7,30$ и $62,50 \pm 13,39\%$ от

контроля соответственно. В контрольных вариантах диаметр колоний патогена на 14 сут культивирования составил от $58,91 \pm 5,33$ мм (сорт Ленинградская 6 из Ленинградской обл.) до $75,49 \pm 2,95$ мм (сорт Элемент из Омской обл.).

Существенных различий по вариантам опыта для изолятов из разных регионов не наблюдалось: диаметр колоний гриба при минимальной концентрации препарата варьировал в среднем от $59,57 \pm 6,76\%$ (Омская обл.) до $67,55 \pm 10,54\%$ (Ленинградская обл.) от контроля.

Изолят гриба 1-24-3 (Ленинградская обл., озимая мягкая пшеница, сорт Галина) (три повторности)



Изолят гриба 32-24-5 (Омская обл., яровая мягкая пшеница, сорт Памяти Азиева) (три повторности)



0 мг/л 0,01 мг/л 0,1 мг/л 1 мг/л 10 мг/л 100 мг/л

Концентрация фунгицида

Рис. 3. Чистая культура *Parastagonospora nodorum* на картофельно-глюкозном агаре с внесением дифеноконазола в разной концентрации

Чувствительность *P. nodorum* к дифеноконазолу определяли по значениям СК₅₀. Концентрации дифеноконазола в питательной среде, приводящие к 50% ингибированию роста колоний *Parastagonospora nodorum*:

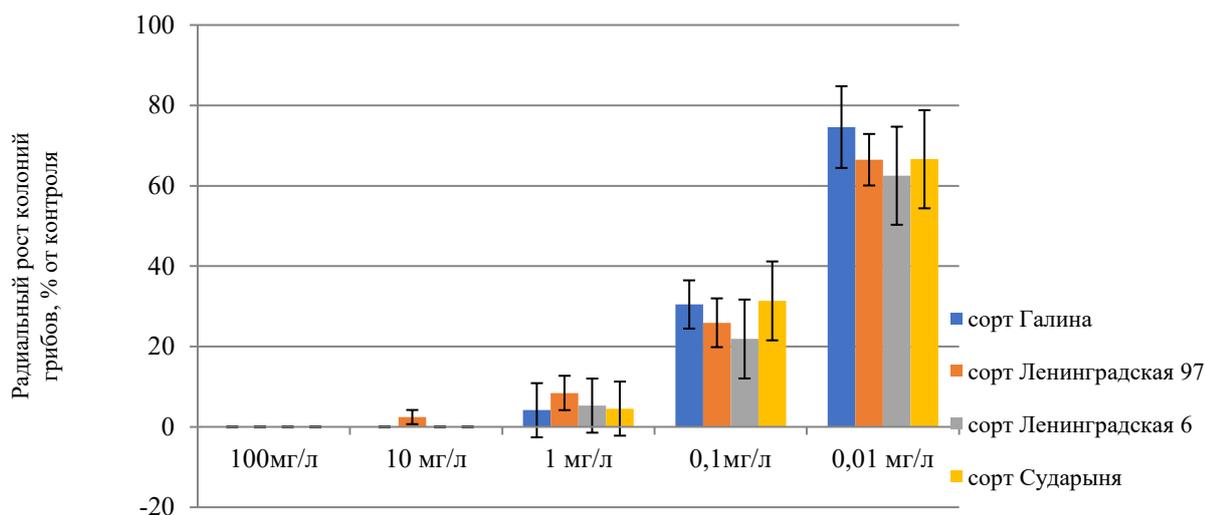
Изоляты гриба, происхождение	Средняя СК ₅₀ , мг/л, Mean±Std.Dev. (min – max)
<i>Ленинградская область (20 изолятов)</i>	
1-24-1...5, сорт Галина	0,05±0,01 (0,04-0,05)
8-24-1...5, сорт Сударыня	0,04±0,03 (0,03-0,04)
4-24-1...5, сорт Ленинградская 97	0,03±0,01 (0,02-0,09)
7-24-1...5, сорт Ленинградская 6	0,03±0,03 (0,02-0,07)
<i>Омская область (15 изолятов)</i>	
34-24-1...5, сорт Элемент 22	0,04±0,01 (0,03-0,05)
36-24-1...5, селекционная линия 12/20/19	0,02±0,01 (0,01-0,03)
32-24-1...5, сорт Памяти Азиева	0,02±0,01 (0,01-0,03)

Как свидетельствуют полученные данные дифеноконазол значительно ингибировал рост всех изученных

изолятов гриба. Наименьшие показатели СК₅₀ установлены в вариантах с изолятами из Омской области, полученными с сорта Памяти Азиева и с селекционной линии 12/20/19: 0,02±0,01 мг/л (min 0,01 – max 0,03) мг/л соответственно, наибольшие – в вариантах с изолятами из Ленинградской области (сорт Галина) 0,05±0,01 (min 0,04 – max 0,05) мг/л.

Использование *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони не позволило установить достоверные различия между колониями гриба, имеющими разное географическое происхождение. Показатель составил 0,444, что превышает $p < 0,05$. Данный факт позволяет сделать заключение, что препарат Раек, КЭ, содержащий действующее вещество дифеноконазол, одинаково эффективен для защиты посевов пшеницы против опасного патогена *P. nodorum* как для Сибирского Федерального округа (Омская обл.), так и для Северо-Западного региона (Ленинградская обл.).

Изоляты *P. nodorum* из Ленинградской области



Изоляты *P. nodorum* из Омской области

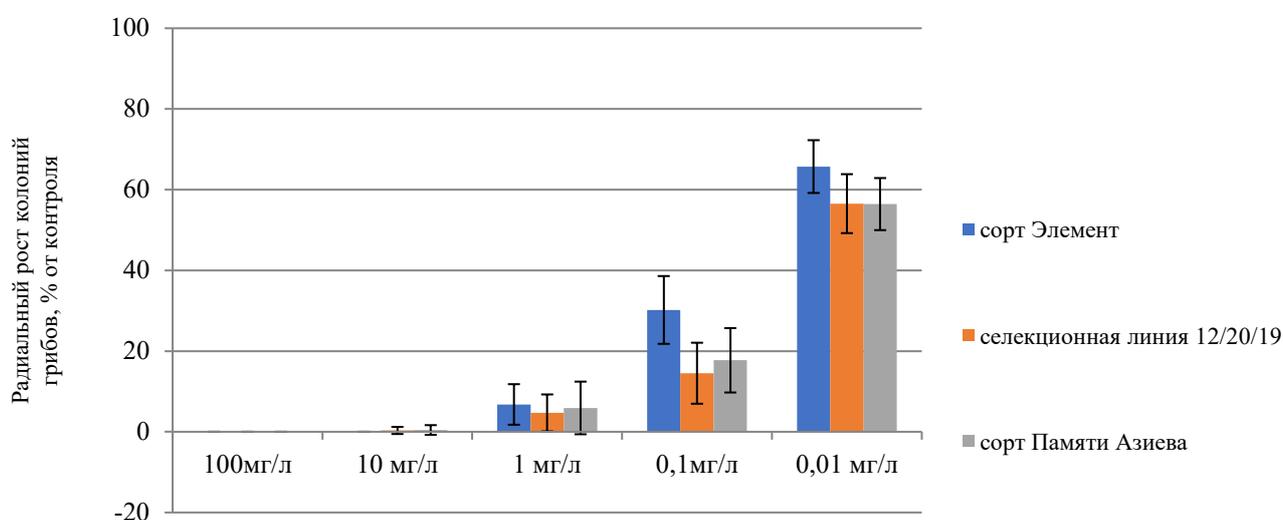


Рис. 4. Влияние дифеноконазола на рост изолятов гриба *P. nodorum* (культивирование изолятов в течение 14 сут на КГА)

Чувствительность *P. nodorum* к дифеноконазолу определяли по значениям $СК_{50}$. Концентрации дифеноконазола в питательной среде, приводящие к 50% ингибированию роста колоний *Parastagonospora nodorum*:

Изоляты гриба, происхождение	Средняя $СК_{50}$, мг/л, Mean±Std.Dev. (min – max)
<i>Ленинградская область (20 изолятов)</i>	
1-24-1...5, сорт Галина	0,05±0,01 (0,04-0,05)
8-24-1...5, сорт Сударыня	0,04±0,03 (0,03-0,04)
4-24-1...5, сорт Ленинградская 97	0,03±0,01 (0,02-0,09)
7-24-1...5, сорт Ленинградская 6	0,03±0,03 (0,02-0,07)
<i>Омская область (15 изолятов)</i>	
34-24-1...5, сорт Элемент 22	0,04±0,01 (0,03-0,05)
36-24-1...5, селекционная линия 12/20/19	0,02±0,01 (0,01-0,03)
32-24-1...5, сорт Памяти Азиева	0,02±0,01 (0,01-0,03)

Как свидетельствуют полученные данные дифеноконазол значительно ингибировал рост всех изученных изолятов гриба. Наименьшие показатели $СК_{50}$ установлены в вариантах с изолятами из Омской области, полученными с сорта Памяти Азиева и с селекционной линии 12/20/19: 0,02±0,01 мг/л (min 0,01 – max 0,03) мг/л соответственно, наибольшие – в вариантах с изолятами из

Ленинградской области (сорт Галина) 0,05±0,01 (min 0,04 – max 0,05) мг/л.

Использование *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони не позволило установить достоверные различия между колониями гриба, имеющими разное географическое происхождение. Показатель составил 0,444, что превышает $p < 0,05$. Данный факт позволяет сделать заключение, что препарат Раек, КЭ, содержащий действующее вещество дифеноконазол, одинаково эффективен для защиты посевов пшеницы против опасного патогена *P. nodorum* как для Сибирского Федерального округа (Омская обл.), так и для Северо-Западного региона (Ленинградская обл.).

Выводы. Как следует из экспериментальных данных, дифеноконазол гарантирует высокую и статистически одинаковую эффективность *in vitro* против изолятов *P. nodorum*. Все изученные изоляты *P. nodorum* проявили высокую чувствительность к дифеноконазолу, что подтверждается низкими значениями $СК_{50}$. Наибольшей чувствительностью характеризовались изоляты из Омской области ($СК_{50} = 0,02±0,01$ мг/л), тогда как изоляты из Ленинградской области ($СК_{50} = 0,05±0,01$ мг/л) показали несколько сниженную чувствительность к фунгициду. Это свидетельствует об отсутствии региональной

дифференциации в чувствительности патогена к данному действующему веществу и подтверждает возможность его успешного применения для защиты посевов пшеницы от септориоза.

Литература

1. Гришечкина Л.Д. Комбинированные препараты – эффективные средства защиты сельскохозяйственных культур от комплексной инфекции. Защита растений от вредных организмов // Сборник статей по материалам XII Международной научно-практической конференции, Краснодар, 16–20 июня 2025 года. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина., 2025. – С. 107–110.
2. Казарцев И.А., Зеленева Ю.В. Разработка и применение мультиплексной ПЦР для идентификации трёх видов грибов рода *Parastagonospora*, распространенных в России // Вестник защиты растений. – 2025. – Т. 108, № 2. – С. 107–111. – DOI: 10.31993/2308-6459-2025-108-2-17138.
3. Bakulina A.V., Kharina A.V., Shirokikh A.A. Septoria tritici and Stagonospora nodorum Blotch of Wheat: Genetic Control of Host Resistance (Review) // Теор Прикл Екол. – 2020. – В. 2. – P. 26–35. – DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-026-035
4. Campbell B., Chan K., Kim J.H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents // Front. Microbiol. – 2012. – В. 3, Article ID 79. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00079

5. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem Bull. – 1987. – V.19. – P. 11–15
6. FRAC 2022. Authors: Stefano Torriani, Reto Kühn – Syngenta Crop Protection AG, CH-4332 Stein Switzerland. [Electronic resource]. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.frac.info/media/s3gf2h0s/leptno-monitoring-method-sbi-and-sdhi-syngenta-2022.pdf (accessed 12.09.2025).
7. Kaur N., Mullins C., Kleczewski N. M., Mehl H. L. Occurrence of Quinone Outside Inhibitor Resistance in Virginia Populations of *Parastagonospora nodorum* Infecting Wheat // Plant Dis. – 2021. – V. 105. – P. 1837–1842. DOI: 10.1094/PDIS-11-19-2288-RE
8. Pereira D., McDonald B. A., Croll D. The Genetic Architecture of Emerging Fungicide Resistance in Populations of a Global Wheat Pathogen. *Genome Biol. Evol.* – 2020. – V. 12. – P. 2231–2244. DOI: 10.1093/gbe/evaa203
9. Richards J.K., Kariyawasam G.K., Seneviratne S., Wyatt N.A., Xu S.S., Liu Z., Faris J.D., Friesen T.L. A triple threat: the *Parastagonospora nodorum* SnTox267 effector exploits three distinct host genetic factors to cause disease in wheat // New Phytol. – 2022. – V. 233 (1). – P. 427–442. – DOI: 10.1111/nph.17601. Epub 2021
10. Toropova E.Yu, Kazakova O.A., Piskarev V.V., Porsev I.N., Khristov Yu.A. The Role of Varieties and Fungicides in the Control of Spring Wheat Septoriosis // Agrokhimiya. – 2019. – V. 5. – P. 66–75. DOI: 10.1134/S0002188119050107
11. Toropova E.Yu, Kazakova O.A., Piskarev V.V. Septoria Blotch Epidemic Process on Spring Wheat Varieties // Vavilov J. Genet. Breed. – 2020. – V.24. P. 139–148. DOI: 10.18699/VJ20.609

ASSESSMENT OF DIFENOCONAZOLE SENSITIVITY IN *PARASTAGONOSPORA NODORUM* ISOLATES FROM THE LENINGRAD AND OMSK REGIONS OF RUSSIA

Yu.V. Zeleneva, D.Sc. (Biol.), Assoc. Prof.¹; L.D. Grishechkina, D.Sc. (Agr.), Assoc. Prof.¹, N.G. Zubko, Ph.D. (Biol.)¹,
L.Ya. Plotnikova, D.Sc. (Biol.), Prof.², A.A. Ermolaeva³

¹ FSBSI All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), e-mail: zelenewa@mail.ru

² FSBEIoHE Omsk State Agrarian University, e-mail: lya.plotnikova@omgau.org

³ FSBEIoHE St. Petersburg State Agrarian University, e-mail: cartoshkalove@mail.ru

Studies on the sensitivity of Parastagonospora nodorum isolates to triazoles, using difenoconazole as an example, revealed its pronounced inhibitory effect on the growth of all tested fungal isolates. The samples were obtained from spring and winter wheat plant material from two geographically distant regions of Russia – Leningrad and Omsk. The degree of inhibition was found to be directly dependent on the fungicide concentration. The isolates from the Omsk region were the most sensitive to difenoconazole ($EC_{50} = 0,02-0,03$ mg/L), while the isolates from the Leningrad region exhibited slightly lower sensitivity ($EC_{50} = 0,04-0,05$ mg/L). Statistical analysis using Student's t-test with Bonferroni correction ($p = 0,444$) did not reveal significant differences in sensitivity between the geographical groups of isolates. Keywords: triazoles, fungal isolates, PCR, resistance, wheat leaf and spike blotch, fungicides