

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ МУТАНТОВ ГРИБОВ *Fusarium*, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ФЛУДИОКСОНИЛУ

А.С. ОРИНА¹ ✉, О.П. ГАВРИЛОВА¹, Т.Ю. ГАГКАЕВА¹, Е.П. АРАБИНА¹,
А.А. БУРКИН², Г.П. КОНОНЕНКО²

Фузариоз зерновых культур — вредоносное заболевание, вызываемое несколькими видами грибов *Fusarium*. Один из наиболее распространенных патогенов — гриб *Fusarium graminearum*, поражение которым приводит к загрязнению зерна микотоксинами, в том числе дезоксиниваленолом (ДОН) и зеараленоном (ЗЕН), опасными для здоровья человека и животных. В последнее время все чаще в возделываемом зерне обнаруживают гриб *F. proliferatum*, продуцирующий фумонизины (ФУМ). Обычно при защите растений от патогенов используются фунгициды, однако они могут приводить к развитию резистентности у грибов *Fusarium* и изменению их свойств, что увеличивает риск снижения эффективности защитных мероприятий и, как следствие, загрязнения зерна микотоксинами. В представленной работе впервые определена чувствительность генетически охарактеризованных штаммов двух видов *F. graminearum* и *F. proliferatum*, выделенных из зерна, к флудиоксонилу (ФДО) и получены лабораторные мутанты грибов, резистентные к этому действующему веществу (д.в.). Также впервые установлены достоверные отличия лабораторных мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* от исходных штаммов по скорости роста, патогенности для пшеницы и токсинопродуцирующей способности. Целью работы был сравнительный анализ физиолого-биохимических свойств коллекционных штаммов грибов *Fusarium graminearum* и *F. proliferatum* и полученных из них в лабораторных условиях мутантов, резистентных к ФДО. Объектами исследования стали 16 моноконидиальных штаммов грибов *Fusarium* различного происхождения, идентифицированных по морфологическим признакам как *F. graminearum* и *F. proliferatum*, из коллекции Всероссийского НИИ защиты растений (МФГ) (ВИЗР, г. Санкт-Петербург, Россия). Для проведения экспериментов штаммы предварительно выращивали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) при 25 °С в темноте. Для молекулярно-генетической идентификации грибов секвенировали фрагмент гена фактора элонгации трансляции EF-1a (*tef*). В исследовании использовали фунгицид Максис, КС («Syngenta AG», Швейцария), содержащий 25 г/л ФДО, который разводили в стерильной воде до концентрации 5 г/л д.в. Для получения мутантов исходные штаммы *Fusarium* последовательно культивировали на КСА, содержащем увеличивающиеся концентрации фунгицида. При определении чувствительности грибов к ФДО его концентрации в питательной среде для исходных штаммов составляли 5; 0,5; 0,05 и 0,005 мг/л, для мутантов — 250; 50; 5 и 0,5 мг/л. Из колоний штаммов, выращенных на КСА, вырезали диски диаметром 4 мм и помещали на поверхность питательной среды в центр пластиковой чашки Петри диаметром 85 мм. В контрольном варианте диск помещали на поверхность КСА без добавления фунгицида. Через 3 и 5 сут инкубации соответственно штаммов *F. graminearum* и *F. proliferatum* определяли средний диаметр колонии гриба, вычитая диаметр инокуляционного диска. Концентрацию фунгицида, приводящую к 50 % подавлению роста (полумаксимальное ингибирование; IC₅₀) рассчитывали с помощью программы Quest Graph™ IC50 Calculator. Для оценки влияния температуры на скорость роста грибы культивировали при 25 °С и 35 °С в темноте в термостате Innova 44R («Eppendorf», Германия), измеряя диаметр колоний: для *F. graminearum* соответственно на 3-и и 7-е сут, для *F. proliferatum* — на 5-е и 7-е сут. Скорость роста определяли как отношение диаметра колонии к числу суток культивирования (мм/сут). Патогенность штаммов оценивали посредством инокуляции отрезков листьев пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Васса. Для изучения токсинообразования штаммы грибов выращивали на автокловированном зерне пшеницы. Количество ДОН и ЗЕН в культурах *F. graminearum* и ФУМ в культурах *F. proliferatum* определяли с помощью аттестованных коммерческих иммуоферментных тест-систем (ВНИИВСГЭ, Россия). При культивировании на КСА без фунгицида диаметр колоний исходных штаммов *F. graminearum* варьировал от 34 до 52 мм на 3-и сут, а исходных штаммов *F. proliferatum* — от 48 до 64 мм на 5-е сут. Концентрации флудиоксонила (IC₅₀), приводящие к полумаксимальному ингибированию роста мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum*, оказались соответственно в 900-60000 и 6-458 раз выше значений IC₅₀ для исходных штаммов. Два штамма *F. proliferatum* изначально показали высокую резистентность к ФДО и образовывали ФУМ в количестве, которое в 6 и 22 раза превышало средний показатель для исходных штаммов этого вида. Средняя скорость роста у лабораторных мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* при 25 °С составила соответственно 17,2±1,0 и 12,8±0,2 мм/сут и оказалась на 2,6 и 1,6 мм/сут больше, чем средние показатели у исходных штаммов этих видов грибов. Шесть лабораторных мутантов *F. graminearum* были патогенными для пшеницы, и при инокуляции на отрезках листьев появлялись некрозы длиной от 14±3 до 44±1 мм, что оказалось в среднем в 1,6 раза меньше, чем у исходных штаммов гриба, тогда как два мутанта

F. graminearum не вызывали некрозы в отличие от исходных культур. Все лабораторные мутанты *F. proliferatum*, как и исходные штаммы, оказались непатогенными при инокуляции листьев пшеницы. Средние количества ДОН и ЗЕН ($1,1 \pm 0,4$ и $7,2 \pm 6,3$ мкг/г), образуемые мутантами *F. graminearum*, были соответственно в 25 и 16 раз ниже, чем у исходных штаммов (27 ± 16 и 119 ± 72 мкг/г). В среднем мутанты *F. proliferatum* продуцировали в 4 раза больше ФУМ (900 ± 284 мкг/г), чем исходные культуры (219 ± 63 мкг/г). Полученные результаты демонстрируют неодинаковый характер влияния приобретенной резистентности к ФДО на свойства разных видов *Fusarium*.

Ключевые слова: грибы *Fusarium*, флудиоксонил, резистентность, патогенность, микотоксины.

Фузариоз зерновых культур — одно из наиболее вредоносных и активно изучаемых грибных заболеваний, которое приводит к значительным потерям урожая зерна и снижению его качества. Среди грибов *Fusarium*, вызывающих это заболевание, многие виды образуют токсичные вторичные метаболиты (микотоксины), которые имеют выраженный видоспецифичный характер (1-3). К широко распространенным и агрессивным патогенам зерновых культур относится вид *F. graminearum* Schwabe, образующий микотоксины дезоксиниваленол (ДОН) и зеараленон (ЗЕН) (4-6). Другой вид *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, с недавнего времени также часто выявляемый в микобиоте зерна, способен продуцировать фумонизины группы В, представленные преимущественно фумонизином В1 (ФУМ) (7-9).

Обработку фунгицидами считают наиболее эффективной и распространенной стратегией борьбы с фузариозом, однако известно, что при применении этого элемента технологии в популяциях грибов *Fusarium* могут появиться изоляты, резистентные к препаратам с действующими веществами из разных классов — бензимидазолов (10), стробилуринов (11), триазолов (12), а также к флудиоксонилу (ФДО) — несистемному фунгициду из класса фенилпирролов (13). Штаммы *Fusarium*, устойчивые к ФДО, впервые выявлены в популяциях *F. oxysporum* и *F. sambucinum*, выделенных из клубней картофеля (14), а позже обнаружены в популяциях *F. graminearum* (15-17) и *F. pseudograminearum* (18).

Свойства резистентных к ФДО штаммов *Fusarium* (скорость роста, чувствительность к осмотическому стрессу, интенсивность спороношения, патогенность и токсинообразование) могут существенно отличаться от свойств чувствительных штаммов того же вида в популяции, что было продемонстрировано ранее на примере *F. graminearum* (15, 19, 20), тогда как для гриба *F. proliferatum* такие исследования не проводились.

В представленной работе впервые определена чувствительность генетически охарактеризованных штаммов двух видов — *F. graminearum* и *F. proliferatum*, выделенных из зерна, к ФДО и получены лабораторные мутанты грибов, резистентные к этому действующему веществу (д.в.). Также впервые установлены достоверные отличия лабораторных мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* от исходных штаммов по скорости роста, патогенности для растений пшеницы и токсинопродуцирующей способности.

Целью работы был сравнительный анализ физиолого-биохимических свойств коллекционных штаммов грибов *Fusarium graminearum* и *F. proliferatum* и полученных из них в лабораторных условиях мутантов, резистентных к флудиоксонилу.

Методика. Объектами исследования стали 16 моноконидиальных штаммов грибов *Fusarium* различного происхождения, предварительно идентифицированных по морфологическим признакам как *F. graminearum* и *F. proliferatum*, из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии (MFG) Всероссийского НИИ защиты растений (ВИЗР, г. Санкт-Петербург, Россия). Для последующих экспериментов штаммы предварительно выращи-

вали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) при 25 °С в темноте.

Для молекулярно-генетической идентификации грибов из 10-50 мг мицелия, собранного с поверхностей колоний на КСА, выделяли ДНК по адаптированной методике с помощью 2 % раствора бромида цетилтриметиламмония и хлороформа. Фрагмент гена фактора элонгации трансляции EF-1a (*tef*) амплифицировали с использованием праймеров EF1 (5'-ATG-GGTAAGGARGACAAGAC-3') и EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (21). Реакцию проводили в объеме смеси 25 мкл, содержащей 20,5 мкл dH₂O, 2,5 мкл 10× Taq ПЦР-буфер («Qiagen N.V.», Нидерланды), 0,5 мкл dNTP 10 mM (ЗАО «Евроген», Россия), по 0,3 мкл каждого праймера в концентрации 25 мкМ (ООО «Компания Алкор Био», Россия), 0,1 ед. акт. TaqAB полимеразы (ООО «Компания Алкор Био», Россия), 1 мкл ДНК. Амплификацию осуществляли по следующему протоколу: 3 мин при 95 °С; 15 с при 95 °С, 15 с при 62 °С, 1 мин при 72 °С (35 циклов); 3 мин при 72 °С (C1000 Touch Thermal Cycler, «Bio-Rad», США).

Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов ДНК определяли на секвенаторе ABIPrism 3500 («Applied Biosystems, Hitachi», Япония) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Консенсусные нуклеотидные последовательности выравнивали в программе Vector NTI Advance 10 («Thermo Fisher Scientific», США) и депонировали в базу данных NCBI GenBank. Видовую принадлежность штаммов подтверждали посредством поиска наибольшего сходства среди гомологичных последовательностей репрезентативных штаммов грибов *Fusarium* из коллекции Northern Regional Research Laboratory (NRRL, США) и коллекции культур CBS-KNAW (CBS, Нидерланды), представленных в базе данных NCBI GenBank.

В исследовании использовали фунгицид Максим, КС («Syngenta AG», Швейцария), содержащий 25 г/л ФДО, который разводили в стерильной воде до концентрации 5 г/л д.в., соответствующей концентрации рабочего раствора для протравливания семян с максимальной рекомендованной нормой расхода. Рабочий раствор далее последовательно 10-кратно разводили стерильной водой и вносили в КСА, охлажденный до 50 °С. После тщательного перемешивания питательную среду разливали по 20 мл в чашки Петри диаметром 85 мм.

Для получения мутантов исходные штаммы *Fusarium* культивировали на КСА, содержащем 0,5 мг/л ФДО, через 7 сут отмечали наличие роста и переносили диск диаметром 4 мм, вырезанный стерильным пробочным сверлом из активно растущей части колонии, на КСА с 5 мг/л ФДО. Затем выросшую культуру вновь пересевали таким же способом на КСА с 25 мг/л ФДО. Через 7-14 сут инкубации отмечали наличие роста и повторяли пересев в тех же условиях. Лабораторные мутанты, полученные в результате пассажей на среде с возрастающей концентрацией фунгицида, проверяли на стабильность, сохраняли и далее использовали для сравнения свойств с исходными коллекционными штаммами.

При определении чувствительности грибов к ФДО его концентрации в питательной среде для исходных штаммов составляли 5; 0,5; 0,05 и 0,005 мг/л, для мутантов — 250; 50; 5 и 0,5 мг/л. Диски с культурами грибов помещали мицелием вниз на поверхность питательной среды в центр каждой чашки. В контрольном варианте диск помещали на поверхность КСА без добавления фунгицида. Через 3 и 5 сут инкубации соответственно штаммов *F. graminearum* и *F. proliferatum* определяли средний диаметр колонии гриба, вычитая диаметр инокуляционного диска. Действие фунгицида на

линейный рост штамма оценивали по уменьшению диаметра колонии в каждом варианте по сравнению с контролем, выраженному в процентах. Концентрацию фунгицида, приводящую к 50 % подавлению роста (полу-максимальное ингибирование; IC₅₀), рассчитывали с помощью программы Quest Graph™ IC50 Calculator («ААТ Bioquest», США).

Для оценки влияния температуры на скорость роста из колоний исходных штаммов и мутантов, выращенных на КСА, вырезали диски диаметром 4 мм, которые помещали на поверхность КСА в центр пластиковой чашки Петри диаметром 85 мм. Культивировали при 25 °С и 35 °С в темноте в термостате Innova 44R («Eppendorf», Германия), измеряя диаметр колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях и вычитая диаметр инокуляционного диска: для *F. graminearum* соответственно на 3-и и 7-е сут, для *F. proliferatum* — на 5-е и 7-е сут. Скорость роста определяли как отношение диаметра колонии к числу суток культивирования (мм/сут).

Патогенность штаммов оценивали при инокуляции отрезков листьев пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Васса, которую выращивали в вегетационных сосудах с почвой в течение 10 сут при искусственном освещении. Отрезки листьев длиной 5-7 см помещали в кюветы на фильтровальную бумагу, увлажненную 0,004 % водным раствором бензимидазола (22). В каждом варианте опыта использовали по 10 отрезков листьев. В центре каждого отрезка листа делали укол стерильной иглой и помещали диск диаметром 5 мм с культурой каждого штамма, располагая его мицелием вниз. В контрольном варианте на отрезки листьев раскладывали диски, вырезанные из среды КСА без культуры гриба. Кюветы накрывали стеклом, выдерживали при 20 °С, влажности 60 % и переменном освещении в режиме свет/темнота 16 ч/8 ч в климатической камере MLR-352H («Panasonic», Япония). Через 5 сут измеряли длину образовавшегося некроза (мм) для каждого отрезка листа. Штамм считали непатогенным, если средняя длина некроза была меньше диаметра инокуляционного диска.

Для оценки токсикообразования штаммов в колбы, содержащие по 20 г зерна пшеницы сорта Васса, добавляли по 12 мл воды, стерилизовали при 1 атм. в течение 60 мин в автоклаве (MLS-3751L, «PHCBI», Япония) и инокулировали остывший субстрат двумя дисками диаметром 5 мм с культурой гриба. В качестве контроля использовали неинокулированный стерилизованный субстрат. Все образцы инкубировали в течение 2 нед при 25 °С, ежедневно встряхивая, после чего высушивали при 50 °С в течение 24 ч и измельчали на лабораторной мельнице («IKA-Werke», Германия). Далее к 1 г муки добавляли 10 мл водного раствора ацетонитрила (84:16, v/v) и выдерживали 14-16 ч на шейкере S-3M («ELMI», Латвия) при 300 об/мин с 2-кратным интенсивным перемешиванием в начале и конце экстракции.

Количество ДОН и ЗЕН в культурах *F. graminearum* и ФУМ в культурах *F. proliferatum* определяли с помощью аттестованных коммерческих иммуноферментных тест-систем Дезоксиниваленол-ИФА, Зеараленон-ИФА и Фумонизин В₁-ИФА (ВНИИВСГЭ, Россия). При 10-кратном разведении экстрактов фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) с Tween 20 предел определения ДОН, ЗЕН и ФУМ был равен 0,1 мкг/г.

Для расчета средних значений (M) показателей и их доверительных интервалов при уровне значимости 95 % ($t_{0,05} \times SEM$) использовали программы Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0 («StatSoft, Inc.», США). В зависимости от типа распределения сравнение средних значений выборок проводили с помощью параметрического критерия Тьюки или непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Штаммы грибов *Fusarium*, использованные в работе, приведены в таблице 1.

1. Штаммы грибов *Fusarium*, включенные в исследование

Штамм	Вид	Происхождение, год	Растение-хозяин	Номер последовательности <i>tef</i> в GenBank
MFG 58922	<i>F. graminearum</i>	Краснодарский край, 2016	Ячмень	PP449338*
MFG 58954	<i>F. graminearum</i>	Курская область, 2016	Пшеница	PP449339*
MFG 59151	<i>F. graminearum</i>	Краснодарский край, 2016	Рис	PP449340*
MFG 59156	<i>F. graminearum</i>	Воронежская область, 2016	Пшеница	PP449341*
MFG 60025	<i>F. graminearum</i>	Алтайский край, 2016	Пшеница	PP449342*
MFG 60327	<i>F. graminearum</i>	Псковская область, 2018	Ячмень	PP449344*
MFG 60782	<i>F. graminearum</i>	Амурская область, 2019	Ячмень	MW273166
MFG 60789	<i>F. graminearum</i>	Амурская область, 2019	Пшеница	MW273174
MFG 58471	<i>F. proliferatum</i>	Краснодарский край, 2012	Пшеница	MW811115*
MFG 58589	<i>F. proliferatum</i>	Ленинградская область, 2013	Овес	MW811118*
MFG 58590	<i>F. proliferatum</i>	Приморский край, 2012	Овес	MW811119*
MFG 58603	<i>F. proliferatum</i>	Липецкая область, 2014	Кукуруза	MW811120*
MFG 58666	<i>F. proliferatum</i>	Нижегородская область, 2014	Овес	PP449337*
MFG 60308	<i>F. proliferatum</i>	Воронежская область, 2017	Ячмень	PP449343*
MFG 60309	<i>F. proliferatum</i>	Краснодарский край, 2018	Пшеница	MW811125*
MFG 60412	<i>F. proliferatum</i>	Краснодарский край, 2012	Пшеница	PP449345*

Примечание. Звездочками обозначены последовательности, полученные в настоящем исследовании.

Предварительную идентификацию штаммов подтвердили при анализе последовательности фрагмента гена *tef*, наиболее информативного для дифференциации видов *Fusarium* (23). Установлено наибольшее сходство (99,51-99,85 %) последовательностей *tef* анализируемых штаммов *F. graminearum* с гомологичной последовательностью репрезентативного штамма *F. graminearum* NRRL 31084 (GenBank acc. MW233103). Последовательности *tef* анализируемых штаммов *F. proliferatum* сравнивали с гомологичными последовательностями трех штаммов этого вида — NRRL 31071 (AF291058), NRRL 32155 (FJ538242), CBS 131570 (JX118976), сходство составило 98,99-100 %.

При культивировании на КСА в контроле без фунгицида диаметр колоний у исходных штаммов *F. graminearum* варьировал от 34 до 52 мм на 3-и сут культивирования, у исходных штаммов *F. proliferatum* — от 48 до 64 мм на 5-е сут (рис. 1).

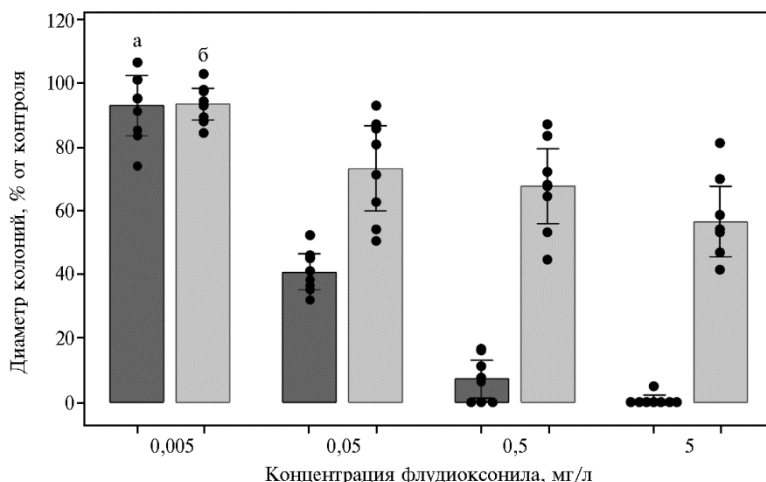


Рис. 1. Рост исходных штаммов *Fusarium graminearum* (а) на 3-и сут культивирования и *F. proliferatum* (б) на 5-е сут культивирования под влиянием флудиоксонила в различных концентрациях. Точками указаны значения для индивидуальных штаммов, отрезками — доверительные интервалы средних значений для выборки штаммов одного вида при уровне значимости 95 %, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$.

При минимальной концентрации фунгицида в среде 0,005 мг/л по-

давление роста пяти штаммов *F. graminearum* в сравнении с контролем составляло 4-26 % ($p < 0,02$), а у двух штаммов MFG 58922 и 60789 наблюдали стимулирующее действие на 7 % ($p < 0,003$). При этой же концентрации ФДО ограничение роста штаммов MFG 58590 и 58603 *F. proliferatum* составило 6 и 16 % в сравнении с контролем ($p < 0,01$), а у шести штаммов не имело статистически значимых отличий от контроля. При концентрации ФДО 5 мг/л только один штамм *F. graminearum* MFG 60782 образовал колонию небольшого диаметра ($2,5 \pm 0,3$ мм), тогда как рост остальных штаммов этого вида был полностью подавлен. В тех же условиях все штаммы *F. proliferatum* были способны к росту, подавление которого составило 19-58 % ($p < 0,01$). Два штамма *F. proliferatum* MFG 58471 и MFG 58590 продемонстрировали низкую чувствительность к ФДО — подавление их роста при наибольшей концентрации вещества не превышало 30 % ($p < 0,01$). Очевидно, эти штаммы изначально обладали резистентностью к ФДО, поэтому дальнейшего индуцирования их резистентности к этому действующему веществу не проводили.

При поэтапном культивировании исходных штаммов *F. graminearum* и *F. proliferatum* на среде с возрастающей концентрацией ФДО были получены лабораторные мутанты, которые на 7-е сут культивирования на питательной среде КСА, содержащей 25 мг/л ФДО, формировали колонии диаметром более 50 мм. У мутантов отмечали нетипичное очертание колоний с появлением более активно растущих секторов из отдельных гиф. После субкультивирования в течение ряда пассажей и хранения при 4 °С на КСА без добавок на протяжении нескольких месяцев у мутантов сохранялся исходный уровень резистентности.

При культивировании на КСА диаметр колоний мутантов *F. graminearum* варьировал от 39 до 63 мм на 3-и сут, а у мутантов *F. proliferatum* составил 54-68 мм на 5-е сут (рис. 2).

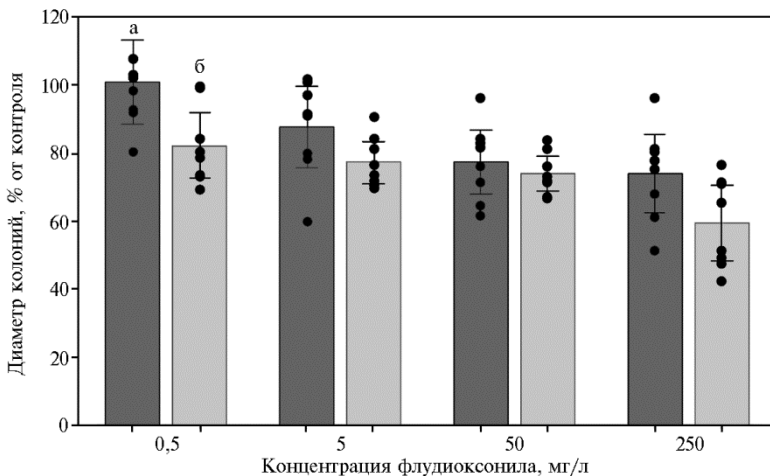


Рис. 2. Рост лабораторных мутантов *Fusarium graminearum* (а) на 3-и сут культивирования и *F. proliferatum* (б) на 5-е сут культивирования под влиянием флуидиоксонила в различных концентрациях. Точками указаны значения для индивидуальных штаммов, отрезками — доверительные интервалы средних значений для выборки штаммов одного вида при уровне значимости 95 %, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$.

При концентрации ФДО 5 мг/л рост шести исходных штаммов *F. graminearum* был подавлен на 3-40 % ($p < 0,03$) в сравнении с контролем, а два штамма оказались толерантными к такой концентрации действующего вещества. При той же концентрации действующего вещества ингибирование

роста мутантов *F. proliferatum* происходило на 9-30 % ($p < 0,009$). При максимальной концентрации действующего вещества в среде (250 мг/л) подавление роста мутантов у *F. graminearum* составило 4-49 % ($p < 0,001$), у *F. proliferatum* — 24-58 % ($p < 0,0002$).

Концентрация ФДО, приводящая к полумаксимальному ингибированию роста, для исходных штаммов *F. graminearum* варьировала от 1,6 до 5,5 мг/л, для их мутантов — от 4000 до 199000 мг/л (табл. 2).

2. Концентрации флудиоксонила, вызывающие полумаксимальное ингибирование роста исходных штаммов и лабораторных мутантов *Fusarium*

Штамм	Вид	IC ₅₀ , мг/л	
		исходный штамм	мутант
MFG 58922	<i>F. graminearum</i>	4,7	66000
MFG 58954	<i>F. graminearum</i>	3,3	199000
MFG 59151	<i>F. graminearum</i>	4,7	4200
MFG 59156	<i>F. graminearum</i>	2,8	52000
MFG 60025	<i>F. graminearum</i>	4,1	36000
MFG 60327	<i>F. graminearum</i>	4,0	148000
MFG 60782	<i>F. graminearum</i>	1,6	24000
MFG 60789	<i>F. graminearum</i>	5,5	62000
Среднее, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$		3,8 ± 0,4	74000 ± 23000
MFG 58471	<i>F. proliferatum</i>	20000	—
MFG 58589	<i>F. proliferatum</i>	345	156000
MFG 58590	<i>F. proliferatum</i>	34000	—
MFG 58603	<i>F. proliferatum</i>	2100	102000
MFG 58666	<i>F. proliferatum</i>	5700	36000
MFG 60308	<i>F. proliferatum</i>	75	34000
MFG 60309	<i>F. proliferatum</i>	721	30000
MFG 60412	<i>F. proliferatum</i>	650	49000
Среднее, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$		1600 ± 700 ^a	57000 ± 16000

Пр и м е ч а н и е. Прочерки означают, что у штаммов MFG 58471 и MFG 58590, исходно резистентных к флудиоксонилу (ФДО), мутантов не получали; ^a — без учета IC₅₀ ФДО для штаммов MFG 58471 и MFG 58590.

В среднем IC₅₀ ФДО для исходных штаммов и мутантов *F. graminearum* достоверно различались в 18500 раз ($p = 0,008$). У шести исходных штаммов *F. proliferatum* и полученных из них лабораторных мутантов интервалы варьирования IC₅₀ ФДО составили соответственно 75-5650 и 30000-156000 мг/л. В среднем IC₅₀ ФДО у мутантов *F. proliferatum* оказалась в 36 раз выше ($p = 0,002$), чем среднее значение этого показателя для исходных штаммов и в ~ 2 раза выше, чем для двух штаммов *F. proliferatum* MFG 58471 и 58590, изначально резистентных к ФДО.

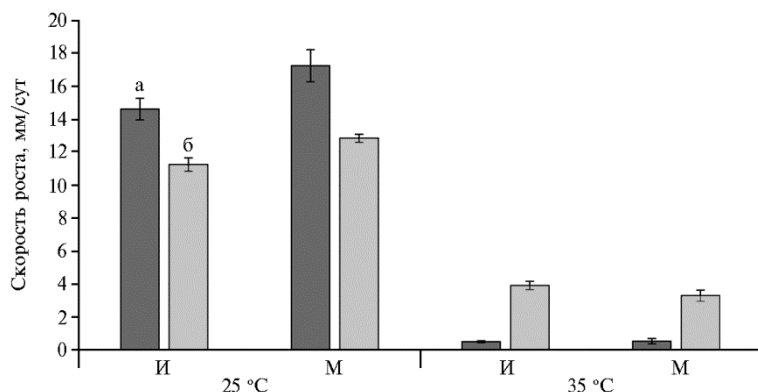


Рис. 3. Скорость роста исходных штаммов (И) и лабораторных мутантов (М) *Fusarium graminearum* (а) и *F. proliferatum* (б) при 25 и 35 °С. Отрезками указаны доверительные интервалы средних значений для выборки штаммов одного вида при уровне значимости 95 %, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$.

При 25 °С скорость роста исходных штаммов *F. graminearum* (от 11,4

до 17,3 мм/сут) в среднем была в 1,3 раза выше, чем у *F. proliferatum* (от 9,6 до 12,9 мм/сут), тогда как при 35 °С культуры *F. proliferatum* росли в 7,5 раза активнее, чем *F. graminearum* (рис. 3).

У шести мутантов *F. graminearum* при 25 °С скорость роста увеличилась на 0,6–7,4 мм/сут в сравнении с исходными штаммами, тогда как у MFG 59151 и MFG 60025 оказалась ниже на 0,7 и 3,8 мм/сут. В тех же условиях скорость роста лабораторных мутантов *F. proliferatum* была больше на 0,3–3,1 мм/сут, чем у исходных штаммов этого вида.

Средние показатели скорости роста мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* ($17,2 \pm 1,0$ и $12,8 \pm 0,2$ мм/сут) статистически значимо ($p = 0,045$ и $p = 0,02$) превышали рассчитанные для исходных штаммов ($14,6 \pm 0,7$ и $11,2 \pm 0,4$ мм/сут). При 35 °С достоверных различий по средней скорости роста у исходных штаммов и мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* мы не выявили.

При инокуляции отрезков листьев пшеницы все исходные штаммы *F. graminearum* были патогенными и вызывали некрозы длиной от 22 ± 2 до 45 ± 1 мм (рис. 4). В среднем агрессивность мутантов *F. graminearum* оказалась в 1,6 раза ниже ($p = 0,03$), чем у исходных штаммов. Два мутанта — MFG 60025 и MFG 60782, в отличие от исходных культур, не вызывали появления некрозов, тогда как остальные шесть приводили к их образованию (длина от 14 ± 3 до 44 ± 1 мм). При этом у двух мутантов агрессивность была сопоставима с исходными штаммами, у четырех — снижалась в 1,5–2,6 раза. Все проанализированные коллекционные штаммы *F. proliferatum*, а также полученные из них резистентные к ФДО мутанты оказались непатогенными в условиях эксперимента.

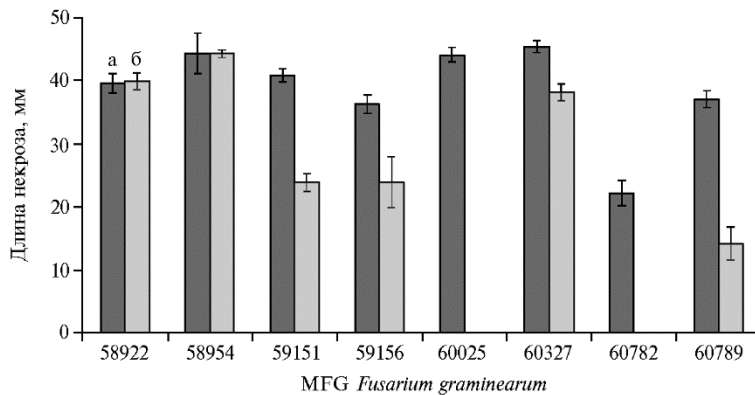


Рис. 4. Патогенность исходных штаммов (а) и лабораторных мутантов (б) *Fusarium graminearum* в отношении листьев пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Васса (5 сут, 20 °С). Отрезками указаны доверительные интервалы средних значений для выборки штаммов одного вида при уровне значимости 95 %, $M \pm (t_{0,05} \times SEM)$ ($n = 10$).

3. Токсинопродуцирующая способность исходных штаммов и лабораторных мутантов *Fusarium graminearum* (зерно пшеницы сорта Васса, 25 °С, 14 сут в темноте)

Штамм	Дезоксиниваленол, мкг/г		Зеараленон, мкг/г	
	исходный штамм	мутант	исходный штамм	мутант
MFG 58922	20	0,5	631	52
MFG 58954	0,2	0,2	36	0,3
MFG 59151	52	1,6	45	0,8
MFG 59156	0,8	1,0	5	0,4
MFG 60025	0,3	< LOQ	39	1,0
MFG 60327	133	0,2	82	0,4

Продолжение таблицы 3				
MFG 60782	2,6	3,2	40	1,7
MFG 60789	9,6	1,9	75	1,1
Среднее, $M \pm (n,05 \times SEM)$	27±16	1,1±0,4	119±72	7,2±6,3

Пр и м е ч а н и е. < LOQ означает количество микотоксина ниже предела обнаружения.

Все исходные штаммы *F. graminearum* продуцировали ДОН и ЗЕН in vitro (табл. 3). Средние количества микотоксинов, выявленные у мутантов *F. graminearum*, были ниже соответственно в 25 ($p = 0,09$) и 16 ($p = 0,005$) раз, чем у исходных штаммов. Резкое снижение способности продуцировать ДОН, вплоть до полного прекращения его синтеза, наблюдалось у большинства (62,5 %) мутантов *F. graminearum*, тогда как у остальных не было отличий от исходных штаммов. У всех мутантов *F. graminearum* способность продуцировать ЗЕН была выражена в 12-205 раз меньше, чем у исходных культур.

Все штаммы *F. proliferatum* продуцировали ФУМ, количества которого также существенно варьировали (табл. 4). Четыре мутанта *F. proliferatum* образовывали в 2-25 раз больше этого микотоксина, а два — в 2,0-2,2 раза меньше, чем исходные штаммы. В среднем мутанты *F. proliferatum* продуцировали в 4 раза больше ФУМ ($p = 0,02$), чем исходные культуры. Штаммы *F. proliferatum* MFG 58471 и 58590 с изначально высокой резистентностью к ФДО образовывали ФУМ в 6 и 22 раза выше среднего показателя для шести исходных чувствительных штаммов, а также в 1,4 и 5,4 раза — для мутантов, полученных в лабораторных условиях.

4. Токсипродуцирующая способность исходных штаммов и лабораторных мутантов *Fusarium proliferatum* (зерно пшеницы сорта Васса, 25 °С, 14 сут в темноте)

Штамм	Фумонизин В ₁ , мкг/г	
	исходный штамм	мутант
MFG 58471	1259	-
MFG 58589	327	164
MFG 58590	4842	-
MFG 58603	531	245
MFG 58666	160	1622
MFG 60308	81	148
MFG 60309	48	1216
MFG 60412	164	2000
Среднее, $M \pm (n,05 \times SEM)$	219±63	900±284 ^a

Пр и м е ч а н и е. Прочерки означают, что у штаммов MFG 58471 и MFG 58590, исходно резистентных к флуидоксонилу (ФДО), мутантов не получали; ^a — без учета штаммов MFG 58471 и MFG 58590.

Выбранные для исследования коллекционные штаммы *F. graminearum* и *F. proliferatum* были выделены из образцов различных зерновых культур и идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов. Коллекционные штаммы *F. proliferatum* оказались в среднем в 421 раз менее чувствительны к ФДО, чем штаммы *F. graminearum*. Ранее уже сообщалось о межвидовых различиях по чувствительности грибов *Fusarium* к этому фунгициду (24-26), в том числе было показано, что штаммы *F. proliferatum*, выделенные из кукурузы, менее чувствительны к ФДО (при концентрации д.в. 0,5 мг/л подавление роста грибов на 3-и сут составило 4-33 %), чем *F. graminearum* (подавление роста достигало 100 %) (26).

Поэтапное культивирование штаммов двух видов *Fusarium* на питательной агаризованной среде с последовательным повышением содержания ФДО привело к получению мутантов с устойчивым признаком резистентности. Неоднородный характер роста колоний у мутантов, который выражался в появлении активно растущих секторов воздушного мицелия из гиф, преодолевших прессинг фунгицида, уже отмечали для некоторых штаммов

Fusarium spp. после культивирования на средах с добавлением ФДО, как и факт сохранения этого нового признака при пересевах на среду с тем же фунгицидом (26, 27).

Мутанты *F. graminearum* достоверно отличались от исходных штаммов по ряду свойств: средняя скорость их роста на КСА без фунгицида при 25 °С была выше, тогда как агрессивность в отношении листьев пшеницы и количество продуцируемых микотоксинов ДОН и ЗЕН — значительно ниже. Выявленное нами увеличение скорости роста с приобретением резистентности к ФДО у штаммов *F. graminearum* отличается от описанных ранее наблюдений, в которых резистентные к ФДО мутанты демонстрировали снижение скорости роста по сравнению с чувствительными изолятами (17, 19). Температура 35 °С оказалась неблагоприятной для роста исходных штаммов и мутантов *F. graminearum*, который был одинаково слабым без статистически значимых различий по средним показателям. Многие авторы также отмечали у резистентных изолятов *F. graminearum* снижение способности поражать листья, колосья, проростки пшеницы и плоды томата, а также пониженную способность продуцировать ДОН (15–17). Известно, что ДОН служит фактором патогенности у *F. graminearum* и способствует инфицированию зерновых культур (28, 29), снижение его продуцирования приводит к потере агрессивности патогена при взаимодействии с растением.

В нашем исследовании впервые получены лабораторные мутанты *F. proliferatum*, резистентные к ФДО, а также проанализированы их свойства в сравнении с исходными штаммами этого вида и природными мутантами — штаммами MFG 58471 и 58590, изначально обладающими резистентностью к этому действующему веществу. Как и в случае с *F. graminearum*, мутанты *F. proliferatum* при 25 °С росли быстрее, чем исходные штаммы. При повышении температуры до 35 °С скорость роста у исходных штаммов и мутантов *F. proliferatum* была одинаковой. Следовательно, при повышении температуры в период вегетации встречаемость *F. proliferatum* в микобиоте зерновых культур будет возрастать, но в то же время при высокой температуре (30–35 °С) продуцирование ФУМ снижается (30, 31).

Известно, что количества продуцируемого ФУМ зависят от множества факторов, таких как температура, влажность, освещенность, субстрат. Оптимальная температура для роста гриба не всегда совпадает с температурой, при которой гриб продуцирует наибольшее количество микотоксинов. Ранее выявлено, что максимальная скорость роста трех штаммов *F. proliferatum*, выделенных из зерна пшеницы, наблюдалась при 25 °С, а два из них продуцировали максимальные количества ФУМ при более низкой температуре — 15 °С (32). Предположительно, зерно пшеницы служит менее благоприятным субстратом для продуцирования ФУМ грибами, чем зерно кукурузы (33, 34).

Как исходные штаммы, так и мутанты *F. proliferatum* не вызывали появления некрозов на отрезках листьев пшеницы в лабораторном тесте, что подтверждает слабую агрессивность этого гриба в отношении зерновых культур (35–37). Важным результатом стало отмеченное значительное увеличение количества синтезируемого ФУМ у большинства лабораторно индуцированных мутантов по сравнению с исходными штаммами, а также значительное продуцирование микотоксина двумя природными резистентными мутантами. Роль ФУМ, в частности фумонизина В₁, как фактора патогенности грибов до сих пор остается спорной, что, вероятно, связано с конкретными взаимоотношениями, возникающими между различными растениями-хозяевами и продуцентами этих микотоксинов (9, 38, 39). Многочисленные исследования демонстрируют отсутствие связи между способно-

стью грибов *Fusarium* продуцировать ФУМ и их патогенностью в отношении кукурузы и других культур (40-42). Однако, согласно некоторым публикациям, фумонизин В₁ способствует подавлению иммунных реакций растения-хозяина за счет ингибирования синтеза церамидов, что приводит к запрограммированной гибели клеток (29, 43).

Неоднородность окружающей среды приводит к сосуществованию в популяциях грибов штаммов, характеризующихся различной чувствительностью к фунгицидам (44). Наряду с глобальными природными процессами, обусловленными изменением климата, агробиоценоз подвергается всем видам воздействия, которые связаны с деятельностью человека, направленной на получение высоких урожаев. Применение фунгицидов может приводить к сдвигу в базовой чувствительности к их действующему веществу у представителей биоты. Распространение резистентности к фунгицидам в популяциях грибов во многом зависит от изменений их адаптационных свойств и динамики конкуренции между устойчивыми и чувствительными штаммами.

В России научное обеспечение защиты зерновых культур от заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, успешно развивается и остается в числе приоритетных направлений поиска (45). Гетерогенный характер влияния фунгицидных обработок на токсиногенез *F. graminearum*, а также способность триазолов стимулировать образование ДОН ранее были установлены в серии лабораторных экспериментов (46, 47). Однако системный комплексный подход к изучению многих важных аспектов формирования резистентности популяций пока не реализован. При планировании будущих проектов, несомненно, следует учитывать все многообразие разнонаправленных динамических процессов, приводящих к изменениям адаптационных свойств фитопатогенов, а также особенностей конкурентных отношений между устойчивыми и чувствительными штаммами.

Таким образом, мы определили базовую чувствительность генетически охарактеризованных штаммов двух видов *Fusarium graminearum* и *F. proliferatum*, выделенных из зерновых культур на территории России, к фунгициду, содержащему флудиоксонил. Получены лабораторные мутанты грибов *F. graminearum* и (впервые в мире) *F. proliferatum*, резистентные к этому действующему веществу, изучены их свойства в сравнении с исходными коллекционными штаммами. Показано, что концентрации флудиоксонила IC₅₀, приводящие к полумаксимальному ингибированию роста мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum*, соответственно в 900-60000 и 6-458 раз выше значений для исходных штаммов. Скорость роста лабораторных мутантов *F. graminearum* и *F. proliferatum* при 25 °C выше на 2,6 и 1,6 мм/сут в сравнении со средними показателями исходных культур. При 35 °C достоверных различий по средней скорости роста у исходных штаммов и мутантов обоих видов грибов не выявлено. Шесть лабораторных мутантов *F. graminearum* были патогенными для пшеницы, однако вызываемые ими некрозы на отрезках листьев оказались в 1,6 раза меньше, чем в случае исходных штаммов гриба, тогда как два мутанта *F. graminearum* утратили патогенность. Все лабораторные мутанты *F. proliferatum*, как и исходные штаммы, оказались неспособны инфицировать листья пшеницы в условиях эксперимента. Средние количества ДОН и ЗЕН, продуцируемые мутантами *F. graminearum*, были соответственно в 25 и 16 раз ниже, чем у исходных штаммов гриба. При этом мутанты *F. proliferatum* в среднем синтезировали в 4 раза больше ФУМ, чем исходные штаммы. Полученные нами результаты показывают, что у разных видов *Fusarium* приобретение резистентности к одному и тому же химическому препарату неодинаково влияет на метаболизм грибов, что

отражается в изменении их свойств.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: orina-alex@yandex.ru ✉, olgavrilova1@yandex.ru,
t.gagkaeva@mail.ru, arabina2001@gmail.com;

²Всероссийский НИИ ветеринарной санитарии,
гигиены и экологии — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
123022 Россия, г. Москва, Звенигородское ш., 5, стр. 1,
e-mail: aaburkin@mail.ru; kononenkogp@mail.ru

Поступила в редакцию
13 июля 2024 года
Принята к публикации
19 августа 2024 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2025, V. 60, № 1, pp. 138–152

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERS OF LABORATORY INDUCED *Fusarium* MUTANTS RESISTANT TO FLUDIOXONIL

A.S. Orina¹ ✉, O.P. Gavriloval¹, T.Yu. Gagkaeva¹, E.P. Arabina¹, A.A. Burkin²,
G.P. Kononenko²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail orina-alex@yandex.ru
(✉ corresponding author), olgavrilova1@yandex.ru, t.gagkaeva@mail.ru, arabina2001@gmail.com;

²All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene, and Ecology — Branch of FSC ARRIEV RAS, 5,
Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail aaburkin@mail.ru, kononenkogp@mail.ru

ORCID:

Orina A.S. orcid.org/0000-0002-7657-6618

Arabina E.P. orcid.org/0009-0006-8639-8540

Gavriloval O.P. orcid.org/0000-0002-5350-3221

Burkin A.A. orcid.org/0000-0002-5674-2818

Gagkaeva T.Yu. orcid.org/0000-0002-3276-561X

Kononenko G.P. orcid.org/0000-0002-9144-615X

The authors declare no conflict of interests

Final revision received July 13, 2024

doi: 10.15389/agrobiology.2025.1.138eng

Accepted August 19, 2024

Abstract

Fusarium head blight is a harmful disease of cereals caused by *Fusarium* fungi. *Fusarium graminearum* is among the most widespread fungi in the world and is of great economic importance, which leads to grain contamination with the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) that poses danger to human and animal health. Recently, *F. proliferatum*, the fumonisins (FUM) producer, has been increasingly discovered in cultivated cereals. Fungicide treatment is the most popular practice for managing pathogens, but also leads to the emergence of fungicide resistance in *Fusarium* fungi and changes in their features. As a result, the risk of reducing the effectiveness in disease control and increasing a contamination of grain with mycotoxins exists. In this study, the sensitivity of genetically characterized *F. graminearum* and for the first time *F. proliferatum* strains isolated from grain, to fludioxonil has been determined, and the laboratory mutants of fungi resistant to this active substance have been generated. Also, for the first time, significant differences between the laboratory mutants and parent strains of *F. graminearum* and *F. proliferatum* in terms of growth rate, pathogenicity to wheat and toxin-producing ability have been established. The aim of study was the comparative analysis of physiological and biochemical characters of the parent *F. graminearum* and *F. proliferatum* strains with mutants resistant to fludioxonil obtained in the laboratory conditions. The objects of the study were 16 monoconidial *Fusarium* strains of different geographical origins from the collection of All-Russian Institute of Plant Protection (MFG) (VIZR, St. Petersburg, Russia), previously morphologically identified as *F. graminearum* and *F. proliferatum*. For laboratory experiments, the strains were previously grown on potato sucrose agar (PSA) at 25 °C in the dark. The identification of *Fusarium* strains was confirmed by sequence analysis of the fragment of gene encoding translation elongation factor EF-1a (*tef*). The fungicide Maxim (Syngenta AG, Switzerland), containing 25 g/l fludioxonil, was diluted in sterile water to a concentration of 5 g/l of the active ingredient. To obtain *F. graminearum* and *F. proliferatum* mutants resistant to fludioxonil, the parent *Fusarium* strains were sequentially cultured on PSA containing increasing concentrations of the fungicide. When determining the sensitivity of fungi to fungicide, the concentrations of fludioxonil in PSA for the parent strains were 5; 0.5; 0.05 and 0.005 mg/l, and for the mutants 250; 50; 5 and 0.5 mg/l. From colonies of the parent strains and mutants grown on PSA, 4 mm discs were cut out and placed on the nutrient medium in the center of a plastic 85 mm Petri dish. In the control, the disk was placed on the surface of PSA without the fungicide. After 3- and 5-day incubation of the *F. graminearum* and *F. proliferatum* strains, respectively, the average diameter of the fungal colony was measured excluding the diameter of the inoculation disk. The fungicide concentration resulting in 50 % growth inhibition (half-maximal inhibition concentration; IC₅₀) was calculated using the Quest Graph™ IC50 Calculator program. To assess the effect of temperature on the fungal growth rate, the strains were cultured at 25 °C and 35 °C

in the dark in Innova 44R incubator (Eppendorf, Germany), and diameter of *F. graminearum* and *F. proliferatum* colonies were measured on days 3 and 7, and on days 5 and 7, respectively. The growth rate was determined as the ratio of the colony diameter to the number of days of culture (mm/day). The pathogenicity of the parent strains and mutants was assessed by the detached leaf assay, according to sizes of necrosis caused by fungal strains after inoculation of the wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Wassa). To assess toxin production, fungal strains were grown on autoclaved wheat grain. The determination of DON and ZEN in *F. graminearum* cultures and FUM in *F. proliferatum* cultures was performed using the certified commercial enzyme immunoassay test systems (VNII VSGE, Russia). When cultured on PSA without fungicide, the colony diameter of the parent *F. graminearum* strains varied from 34 to 52 mm on day 3, and that of the parent *F. proliferatum* strains were from 48 to 64 mm on day 5. The IC₅₀ concentrations of fludioxonil resulting in half-maximal growth inhibition for *F. graminearum* and *F. proliferatum* mutants were 900-60000 and 6-458 times higher than the IC₅₀ values for the parent strains, respectively. Two *F. proliferatum* strains initially demonstrated high resistance to fludioxonil and produced FUM 6 and 22 times higher than the average for the other parent strains of this species. The average growth rate of *F. graminearum* and *F. proliferatum* mutants at 25 °C was 17.2±1.0 and 12.8±0.2 mm/day, respectively, which was 2.6 and 1.6 mm/day higher than the average values of the parent strains of both species. Six *F. graminearum* mutants were pathogenic to wheat and caused 14±3 to 44±1 mm necrosis of leaves, which was on average 1.6 times less than that of the parent strains, whereas two *F. graminearum* mutants did not cause necrosis, unlike the parent strains. All *F. proliferatum* mutants as well as their parent strains were nonpathogenic to wheat leaves. The average amounts of DON and ZEN (1.1±0.4 and 7.2±6.3 µg/g) produced by *F. graminearum* mutants were 25 and 16 times lower, respectively, than those of the parent strains (27±16 and 119±72 µg/g). On average, *F. proliferatum* mutants produced 4 times more FUM (900±284 µg/g) than the parent strains (219±63 µg/g). The obtained results demonstrate the different effects of induced fludioxonil resistance on the characters of different *Fusarium* species.

Keywords: fungi, fludioxonil, resistance, pathogenicity, mycotoxins.

REFERENCES

1. Thrane U., Adler A., Clasen P.E., Galvano F., Langseth W., Lew H., Logrieco A., Nielsen K.F., Ritieni A. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 95(3): 257-266 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.005).
2. Kokkonen M., Ojala L., Parikka P., Jestoi M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 143(1-2): 17-25 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.015).
3. Stepień L. The use of *Fusarium* secondary metabolite biosynthetic genes in chemotypic and phylogenetic studies. *Critical Reviews in Microbiology*, 2014, 40(2): 176-185 (doi: 10.3109/1040841X.2013.770387).
4. Gagkaeva T., Orina A., Gavrilova O. *Fusarium* head blight in the Russian Far East: 140 years after description of the 'drunken bread' problem. *Peer Journal*, 2021, 9: e12346 (doi: 10.7717/peerj.12346).
5. Del Ponte E.M., Moreira G.M., Ward T.J., O'Donnell K., Nicolli C.P., Machado F.J., Duffeck M.R., Alves K.S., Tessmann D.J., Waalwijk C., van der Lee T., Zhang H., Chulze S.N., Stenglein S.A., Pan D., Vero S., Vaillancourt L.J., Schmale D.G. 3rd, Esker P.D., Moretti A., Logrieco A.F., Kistler H.C., Bergstrom G.C., Viljoen A., Rose L.J., van Coller G.J., Lee T. *Fusarium graminearum* species complex: a bibliographic analysis and web-accessible database for global mapping of species and trichothecene toxin chemotypes. *Phytopathology*, 2022, 112(4): 741-751 (doi: 10.1094/PHYTO-06-21-0277-RVW).
6. Hafez M., Gourlie R., Telfer M., Schatz N., Turkington T.K., Beres B., Aboukhaddour R. Diversity of *Fusarium* spp. associated with wheat node and grain in representative sites across the Western Canadian prairies. *Phytopathology*, 2022, 112(5): 1003-1015 (doi: 10.1094/PHYTO-06-21-0241-R).
7. Abbas H.K., Cartwright R.D., Xie W., Mirocha C.J., Richard J.L., Dvorak T.J., Sciumbato G.L., Shier W.T. Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Mycopathologia*, 1999, 147: 97-104 (doi: 10.1023/A:1007147813326).
8. Palacios S.A., Susca A., Haidukowski M., Stea G., Cendoya E., Ramirez M.L., Chulze S.N., Farnochi M.C., Moretti A., Torres A.M. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 201: 35-41 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.011).
9. Stepień L., Waśkiewicz A., Wilman K. Host extract modulates metabolism and fumonisin biosynthesis by the plant-pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 193: 74-81 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.020).
10. Chen Z., Gao T., Liang S., Liu K., Zhou M., Chen C. Molecular mechanism of resistance of

- Fusarium fujikuroi* to benzimidazole fungicides. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 357(1): 77-84 (doi: 10.1111/1574-6968.12504).
11. Andrade S.M.P., Augusti, G.R. Paiva G.F., Feksa H.R., Tessmann D.J., Machado F.J., Mizubuti E.S.G., Del Ponte E.M. Phenotypic and molecular characterization of the resistance to azoxystrobin and pyraclostrobin in *Fusarium graminearum* populations from Brazil. *Plant Pathology*, 2022, 71(5): 1152-1163 (doi: 10.1111/ppa.13535).
 12. Duan Y., Li M., Zhao H., Lu F., Wang J., Zhou M. Molecular and biological characteristics of laboratory metconazole-resistant mutants in *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 152: 55-61 (doi: 10.1016/j.pestbp.2018.08.011).
 13. Bersching K., Jacob S. The molecular mechanism of fludioxonil action is different to osmotic stress sensing. *Journal of Fungi*, 2021, 7(5): 393 (doi: 10.3390/jof7050393).
 14. Gachango E., Kirk W., Hanson L., Rojas A., Tumbalam P., Shetty K. First report of in vitro fludioxonil-resistant isolates of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in Michigan. *Plant Disease*, 2011, 95(2): 228 (doi: 10.1094/PDIS-10-10-0737).
 15. Zhou F., Li D.X., Hu H.Y., Song Y.L., Fan Y.C., Guan Y.Y., Song P.W., Wei Q.C., Yan H.F., Li C.W. Biological characteristics and molecular mechanisms of fludioxonil resistance in *Fusarium graminearum* in China. *Plant Disease*, 2020, 104(9): 2426-2433 (doi: 10.1094/PDIS-01-20-0079-RE).
 16. Zhou F., Zhou H., Cui Y., Hu H., Liu Q., Liu R., Wu Y., Li C. Mechanism of *Fusarium graminearum* resistant to the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2022, 24(6): 1393-1401 (doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2022.0064).
 17. Wen Z., Wang J., Jiao C., Shao W., Ma Z. Biological and molecular characterizations of field fludioxonil-resistant isolates of *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2022, 184: 105101 (doi: 10.1016/j.pestbp.2022.105101).
 18. Zhang N., Xu Y., Zhang Q., Zhao L., Zhu Y., Wu Y., Li Z., Yang W. Detection of fungicide resistance to fludioxonil and tebuconazole in *Fusarium pseudograminearum*, the causal agent of *Fusarium* crown rot in wheat. *Peer Journal*, 2023, 11: e14705 (doi: 10.7717/peerj.14705).
 19. Shi D., Wang J., Cao Y., Zhang Z., Li X., Mbadianya J.I., Chen C. Overexpression of *FgPtp3* is involved in fludioxonil resistance in *Fusarium graminearum* by inhibiting the phosphorylation of *FgHog1*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(34): 12807-12818 (doi: 10.1021/acs.jafc.3c02663).
 20. Wen Z., Zhang Y., Chen Y., Zhao Y., Shao W., Ma Z. Characterization of the fludioxonil and phenamacril dual resistant mutants of *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2024, 200: 105815 (doi: 10.1016/j.pestbp.2024.105815).
 21. O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex, *Mycologia*, 1998, 90(3): 465-493 (doi: 10.2307/3761407).
 22. Gagkaeva T.Yu., Orina A.C., Gavrilova O.P. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2020, 54(5): 347-364 (doi: 10.31857/S0026364820050049) (in Russ.).
 23. O'Donnell K., Whitaker B.K., Laraba I., Proctor R.H., Brown D.W., Broders K., Kim H.-S., McCormick S.P., Busman M., Aoki T., Torres-Cruz T.J., Geiser D.M. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: a work in progress. *Plant Disease*, 2022, 106(6): 1597-1609 (doi: 10.1094/PDIS-09-21-2035-SR).
 24. Peters R.D., Platt H.W., Drake K.A., Coffin R.H., Moorehead S., Clark M.M., Al-Mughrabi K.I., Howard R.J. First report of fludioxonil-resistant isolates of *Fusarium* spp. causing potato seed-piece decay. *Plant Disease*, 2008, 92(1): 172 (doi: 10.1094/PDIS-92-1-0172A).
 25. Orina A., Gavrilova O., Gagkaeva T. The effect of fungicides on growth of *Fusarium* fungi in vitro. *BIO Web Conf.*, 2020, 18: 00022 (doi: 10.1051/bioconf/20201800022).
 26. Masiello M., Somma S., Ghionna V., Logrieco A.F., Moretti A. In vitro and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins*, 2019, 11(1): 11 (doi: 10.3390/toxins11010011).
 27. Broders K.D., Lipps P.E., Paul P.A., Dorrance A.E. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. *Plant Disease*, 2007, 91(9): 1155-1160 (doi: 10.1094/PDIS-91-9-1155).
 28. Audenaert K., Vanheule A., Höfte M., Haesaert G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*, 2013, 6(1): 1-19 (doi: 10.3390/toxins6010001).
 29. Perochon A., Doohan F.M. Trichothecenes and fumonisins: key players in *Fusarium*—cereal ecosystem interactions. *Toxins*, 2024, 16(2): 90 (doi: 10.3390/toxins16020090).
 30. Marín P., de Ory A., Cruz A., Magan N., González-Jaén M.T. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(3): 251-258 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.022).
 31. Cendoya E., Farnochi M.C., Chulze S.N., Ramirez M.L. Two-dimensional environmental profiles of growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* on a wheat-based substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 182-183: 9-17 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.028).

32. Cendoya E., Monge M.D.P., Chiacchiera S.M., Farnochi M.C., Ramirez M.L. Influence of water activity and temperature on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* strains on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 158-166 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.001).
33. Busman M., Desjardins A.E., Proctor R.H. Analysis of fumonisin contamination and the presence of *Fusarium* in wheat with kernel black point disease in the United States. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2012, 29(7): 1092-1100 (doi: 10.1080/19440049.2012.671787).
34. Guo Z., Pfohl K., Karlovsky P., Dehne H.-W., Altincicek B. Fumonisin B1 and beauvericin accumulation in wheat kernels after seed-borne infection with *Fusarium proliferatum*. *Agricultural and Food Science*, 2016, 25(2): 138-145 (doi: 10.23986/afsci.55539).
35. Bishop D.L. Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 61(1): 65-71 (doi: 10.1006/pmpp.2002.0417).
36. Mati S., Spadaro D., Prella A., Gullino M.L., Garibaldi A. Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(3): 515-523 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.026).
37. Özer G., Erper İ., Yıldız Ş., Bozoğlu T., Zholdosbekova S., Alkan M., Tekin F., Uulu T.E., İmren M., Dababat A.A., Derviş S. Fungal pathogens associated with crown and root rot in wheat-growing areas of Northern Kyrgyzstan. *Journal of Fungi*, 2023, 9(1): 124 (doi: 10.3390/jof9010124).
38. Munkvold G.P., Weieneth L., Proctor R.H., Busman M., Blandino M., Susca A., Logrieco A., Moretti A. Pathogenicity of fumonisin-producing and nonproducing strains of *Aspergillus* species in section *Nigri* to maize ears and seedlings. *Plant Disease*, 2018, 102(2): 282-291 (doi: 10.1094/Pdis-01-17-0103-Re).
39. Xie L., Wu Y., Wang Y., Jiang Y., Yang B., Duan X., Li T. Fumonisin B1 induced aggressiveness and infection mechanism of *Fusarium proliferatum* on banana fruit. *Environmental Pollution*, 2021, 288: 117793 (doi: 10.1016/j.envpol.2021.117793).
40. Covarelli L., Stifano S., Beccari G., Raggi L., Lattanzio V.M.T., Albertini E. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*, 2012, 31(1): 17-24 (doi: 10.1016/j.fm.2012.02.002).
41. Cruz A., Marín P., González-Jaén M.T., Aguilar K.G., Cumagun C.J. Phylogenetic analysis, fumonisin production and pathogenicity of *Fusarium fujikuroi* strains isolated from rice in the Philippines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(12): 3032-3039 (doi: 10.1002/jsfa.6136).
42. Dastjerdi R., Karlovsky P. Systemic infection of maize, sorghum, rice, and beet seedlings with fumonisin-producing and nonproducing *Fusarium verticillioides* strains. *The Plant Pathology Journal*, 2015, 31(4): 334-342 (doi: 10.5423/PPJ.OA.05.2015.0088).
43. Iqbal N., Czékus Z., Poór P., Ördög A. Plant defence mechanisms against mycotoxin fumonisin B1. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 343: 109494 (doi: 10.1016/j.cbi.2021.109494).
44. Parnell S., Gilligan C.A., van den Bosch F. Small-scale fungicide spray heterogeneity and the coexistence of resistant and sensitive pathogen strains. *Phytopathology*, 2005, 95(6): 632-639 (doi: 10.1094/PHTO-95-0632).
45. Slovareva O.Yu., Muvingi M., Iaremko A.B., Igonin V.N., Rubets V.S. Detection of bacteriosis pathogens significant for grain export and a complex of associated microorganisms in grain crops (on the example of Timiryazevskaya Field Experimental Station). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, 58(1): 184-199 (doi: 10.15389/agrobiology.2023.1.184rus).
46. Sokolova G.D., Devyatkina G.A., Pavlova V.V., Dorofeeva L.L., Kozhukhovskaya V.A. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2001, 35(2): 53-57 (in Russ.).
47. Sokolova G.D., Devyatkina G.A. *Doklady RASKhN*, 2003, 3: 13-16 (in Russ.).