

УДК 632.4.01/.08:575.174.015.3:57.083.182

UDC 632.4.01/.08:575.174.015.3:57.083.182

DOI 10.30679/2219-5335-2022-4-76-169-182

DOI 10.30679/2219-5335-2022-4-76-169-182

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ
АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ФУНГИЦИДОВ В ОТНОШЕНИИ
ALTERNARIA ALTERNATA
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ
МЕТОДОВ *IN VITRO***

**DETERMINATION
OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY
OF FUNGICIDES AGAINST
ALTERNARIA ALTERNATA
USING VARIOUS
IN VITRO METHODS**

Астапчук Ирина Леонидовна¹
канд. биол. наук,
научный сотрудник
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов
и фитофагов
e-mail: irina_astapchuk@mail.ru

Astapchuk Irina Leonidovna¹
Cand. Biol. Sci.,
Senior Research Associate
of biotechnological control
of phytopathogens
and phytophages laboratory
e-mail: irina_astapchuk@mail.ru

Насонов Андрей Иванович¹
канд. биол. наук,
заведующий лабораторией
биотехнологического контроля
фитопатогенов и фитофагов
e-mail: nasoan@mail.ru

Nasonov Andrei Ivanovich¹
Cand. Biol. Sci.,
Head of Biotechnological Control
of Phytopathogens
and Phytophages Laboratory
e-mail: nasoan@mail.ru

Якуба Галина Валентиновна¹
канд. биол. наук,
старший научный сотрудник
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов
и фитофагов
e-mail: galyayaku@gmail.com

Yakuba Galina Valentinovna¹
Cand. Biol. Sci.,
Senior Research Associate
of Biotechnological Control
of Phytopathogens
and Phytophages Laboratory
e-mail: galyayaku@gmail.com

Фоменко Александра Анатольевна²
магистрант

Fomenko Alexandra Anatolievna²
master's student

¹Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия

¹Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia

²Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Кубанский государственный
университет», Краснодар, Россия

²Federal State Budgetary
Educational Institution
of Higher Education
«Kuban State University»,
Krasnodar, Russia

Для разработки защитных мероприятий необходимо выявлять наиболее опасные и новые вредные объекты, а также осуществлять подбор препаратов, обладающих высокой эффективностью. Но не всегда оказывается возможным оценить эффективность ингибирования химическими препаратами конкретного вида гриба, кроме того, многие фитопатогены могут приобретать определенный уровень резистентности к фунгицидам. По этой причине возникает необходимость изучения эффективности препаратов в отношении отдельных видов с помощью лабораторных методов с использованием чистых культур грибов. Метод *in vitro* позволяет в достаточно короткие сроки оценить эффективность химических препаратов против возбудителей болезней. Однако, существует проблема отсутствия стандартизированного метода оценки антифунгальной активности в отношении экономически значимых патогенов сельскохозяйственных культур. Исследования выполнены двумя методами в зависимости от способа внесения препарата в среду: методом укола при равномерном внесении препарата на поверхность питательной среды и расевом конидиальной суспензии патогена микробиологическим шпателем при внесении препарата на бумажных дисках. Антифунгальная активность химических препаратов в отношении гриба *Alternaria alternata* возбудителя гнили плодов яблони различалась в широком диапазоне от отсутствия эффекта до сильной, но в большинстве вариантах опыта была средней и данные, полученные двумя методами изучения, были сопоставимы. Сопоставление данных двух методов, показало различную степень воспроизводимости результатов. Так наиболее стабильные и повторяющиеся результаты давал метод с равномерным внесением рабочей концентрации препарата на поверхность питательной среды и посевом методом укола. В нашем исследовании диско-диффузионный метод оказался более трудоёмким, а эффекты, полученные данным методом, характеризовались не всегда

To develop protective measures, it is necessary to identify the most dangerous and new harmful objects, as well as to select drugs with high efficiency. However, it is not always possible to assess the effectiveness of inhibition of a particular fungus species by chemical preparations; in addition, many phytopathogens can acquire a certain level of resistance to fungicides. For this reason, it becomes necessary to study the effectiveness of drugs against individual species using laboratory methods using pure cultures of fungi. The *in vitro* method makes it possible to evaluate the effectiveness of chemical preparations against pathogens in a fairly short time. However, there is the problem of the lack of a standardized method for assessing antifungal activity against economically important pathogens of agricultural crops. The studies were performed by two methods depending on the method of introducing the drug into the medium: by agar stab technique with a uniform introduction of the drug onto the surface of the nutrient medium and by inoculation the conidial suspension of the pathogen with a microbiological spatula when the drug is introduced on paper disks. The antifungal activity of chemicals against the fungus *Alternaria alternata*, the causative agent of apple fruit rot, varied in a wide range from no effect to strong, but in most variants of the experiment it was medium and the data obtained by the two methods of study were comparable. Comparison of these two methods showed a different degree of reproducibility of the results. So the most stable and repeatable results were given by the method with a uniform application of the working concentration of the drug to the surface of the nutrient medium and sowing by injection. In our study, the disk-diffusion method turned out to be more laborious, and the effects obtained by this method were not always characterized by an unambiguous interpretation and differed in repetitions,

однозначной трактовкой и различались в повторностях, в сравнении с методом, в котором фунгицид вносился непосредственно на агаровую пластину, а посев осуществлялся уколом. Необходимо провести дальнейшую оптимизацию и стандартизацию этого метода, в том числе количество вносимого инокулюма гриба и толщину, и выровненность агаровой пластинки.

Ключевые слова: АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, МЕТОДЫ *IN VITRO*, *ALTERNARIA ALTERNATA*

in comparison with the method in which the fungicide was applied directly to the agar plate, and the sowing was carried out by agar stab technique. Further optimization and standardization of this method is needed, including the amount of fungal inoculum applied and the thickness and evenness of the agar plate.

Key words: ANTIFUNGAL ACTIVITY, *IN VITRO* METHODS, *ALTERNARIA ALTERNATA*

Введение. Для контроля развития различных заболеваний на сельскохозяйственных культурах применяют широкий круг фунгицидов различных химических классов и механизма действия [1-4]. Однако не все из них являются высокоэффективными в отношении патогенных видов грибов, к тому же часть патогенов со временем может приобретать резистентность к действующим веществам используемых фунгицидов. В связи с этим весьма актуальным является постоянный скрининг химических препаратов и их баковых композиций с целью выявления наиболее эффективных средств защиты против микозов [5].

Как известно, испытание фунгицидов в полевых условиях требует достаточно больших финансовых затрат и длительного промежутка времени. К тому же ряд заболеваний вызывается целым комплексом патогенов, для которых необходимо изучать биологическую эффективность фунгицидов в индивидуальном порядке. Для сокращения временного периода и с целью предварительной оценки эффективности препаратов в отношении конкретных видов грибов, способных расти и развиваться на искусственной питательной среде, используют разные методы *in vitro*.

В медицинской практике микробиологических лабораторий стандартным является диск-диффузионный метод определения чувствительности микроорганизмов, чаще бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli, *Pseudomonas aeruginosa* и др.), к противомикробным препаратам. В данном методе на поверхность агаровой пластины в чашке Петри наносится водная суспензия изучаемого вида микроорганизма и в качестве носителя антибактериального или антигрибкового препарата (АБП) используют бумажный диск. Величину диаметра зоны подавления роста тест-культур изучаемыми штаммами оценивают для бактерий на 2-е сутки, для грибов – на 5-7 сутки. Полученные результаты интерпретируют следующим образом: 0 мм – активности нет; до 10 мм – слабая чувствительность; от 10 до 25 мм – средняя чувствительность; 25 мм и более – высокая чувствительность [6]. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК – минимальной концентрации, подавляющей видимый рост исследуемого микроорганизма в жидкой культуре или на плотной среде. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный) [7].

При изучении влияния фунгицидов на развитие патогенов в условиях *in vitro* также используется метод агаровых пластин (или метод разведения). Он изложен в ряде изданий и используется для подсчета количества микроорганизмов в каком-либо субстрате [8]. Сущность данного метода состоит в следующем: на поверхность агаровой пластины в чашке Петри наносится 0,5 мл водной суспензии конидий изучаемого вида гриба и 0,5 мл раствора фунгицида. В контрольном варианте вместо раствора фунгицида используется стерильная вода. Жидкости смешиваются и распределяются по поверхности пластины стеклянным шпателем. Чашка Петри накрывается крышкой и помещается в термостат на 3-7 суток в зависимости от вида гриба. По окончании периода инкубации подсчитывается

количество образовавшихся колоний гриба в вариантах опыта, в том числе и в контроле. Данный метод используют и в модифицированном варианте, при котором фунгицид добавляют в колбу перед разливкой среды или равномерно распределяют стерильным стеклянным шпателем по поверхности питательного агара в каждой чашке Петри. Далее гриб помещают в чашку Петри методом укола, через 5-7 дней проводят измерение диаметра колонии в мм и затем рассчитывают биологическую эффективность испытываемых препаратов по общеизвестной формуле [9].

Существует проблема отсутствия стандартизированного метода оценки антифунгальной активности в отношении экономически значимых патогенов сельскохозяйственных культур. Для них в основном применяют модифицированный метод агаровых пластин (метод разведения), в частности для рода *Fusarium* [8, 10, 11], для видов *Venturia inaequalis* [12-14], *Bipolaris sorokiniana* [15], *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* и многих других [8, 11, 16]. Иногда исследователи используют и стандартный диск-диффузионный метод [17] или два метода одновременно [18]. Для нас является актуальным сравнить два данных метода и выявить наиболее удобный и точный для подбора фунгицидов против вида *Alternaria alternata*.

Цель исследования: сравнить различными методами *in vitro* эффективность фунгицидов химического происхождения против штамма *Alternaria alternata* – возбудителя гнили сердцевины плодов яблони и подобрать наиболее корректный.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены в 2021 г. в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов ФГБНУ СКФНЦСВВ. Объектом исследований являлся моноконидиальный штамм возбудитель гнили сердцевины плодов *Alternaria alternata* (штамм FR 21IV1.2) из коллекции лаборатории.

В работе было изучено действие действующих веществ современных фунгицидов, состоящих из одного или двух компонентов, под номерами:

1. (125 г/л флуопирама + 375 г/л пириметанила);
2. (200 г/л тебуконазол + 200 г/л флуопирама);
3. (75 г/л мефентрифлуконазол);
4. (800 г/кг тирама);
5. (400 г/л тирама + 30 г/л дифеноконазола);
6. Стандарт (750 г/кг ципродинила);
7. Контроль – дистиллированная, автоклавированная вода

Растворы фунгицидов готовили из расчёта норм расхода фунгицидов, зарегистрированных в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов» для применения на территории Российской Федерации на яблоне, по методике Чекмарева В.В. [8]. Водные растворы препаратов готовили в день эксперимента и использовали свежими. В каждую чашку Петри со средой КГА (картофельно-глюкозный агар) вносили по 300 мкл водного раствора препарата или воды двумя методами: равномерным распределением стерильным стеклянным шпателем по поверхности питательного агара и путем раскапывания на три бумажных диска диаметром 1 см, по 100 мкл на каждый.

Для посевов контрольных и опытных вариантов питательной среды использовали семидневную чистую культуру патогена, выращенную на среде КГА. Суспензию конидий получали смывом с поверхности культуры водой, с дальнейшим её фильтрованием через двойной слой стерильной марли.

Посев патогена осуществляли в чашках Петри на среде КГА (картофельно-глюкозный агар) двумя методами в зависимости от способа внесения препарата в среду: методом укола при равномерном внесении препарата на поверхность питательной среды и рассевом конидиальной суспензии патогена микробиологическим шпателем при внесении препарата на бумажных дисках. Порядок посевов и внесения препаратов также различался: в первом методе посев осуществлялся после внесения препарата, во втором – порядок был обратным. Полученные посевы ставили в термостат

на 7 суток и инкубировали при 25 °С. Все процедуры, связанные с манипуляциями с чистыми культурами, проводили в стерильных условиях.

Критерием оценки биологической эффективности (БЭ) препаратов служила средняя скорость роста (см) колонии гриба (воздушного мицелия), анализ которого проводили по общепринятой методике [7-8]. С помощью модифицированного метода бумажных дисков [15, 19] определяли антифунгальную активность препаратов по шкале, отражающей долю покрытия поверхности питательной среды воздушным мицелием тестируемого микроорганизма:

- 0 баллов – отсутствие эффекта (100 %);
- 1 балл – низкая активность (75 %);
- 2 балла – средняя активность (50 %);
- 3 балла – высокая активность (25 %);
- 4 балла – очень высокая активность (0 %).

Обсуждение результатов. В результате проведенных исследований методом дисков в *in vitro* условиях изученные действующие вещества и композиции действующих веществ проявили как высокую (3 балла), так и нулевую (отсутствие эффекта) антифунгальную активность против штамма *A. alternata* (рис. 1).

В целом, для всех действующих веществ и композиций действующих веществ антифунгальная активность была ниже, чем у вещества стандарта, которое, в свою очередь, не подавило патоген на 100 %. Действующие вещества препарата в варианте 4 показали отсутствие эффекта против изучаемого штамма, а действующие вещества препарата варианта 2 проявили очень низкую активность. Активность действующих веществ остальных вариантов была средняя. Также необходимо отметить, что культура патогена под действием химических веществ этих вариантов не изменяла свои морфолого-культуральные характеристики (рис. 2).

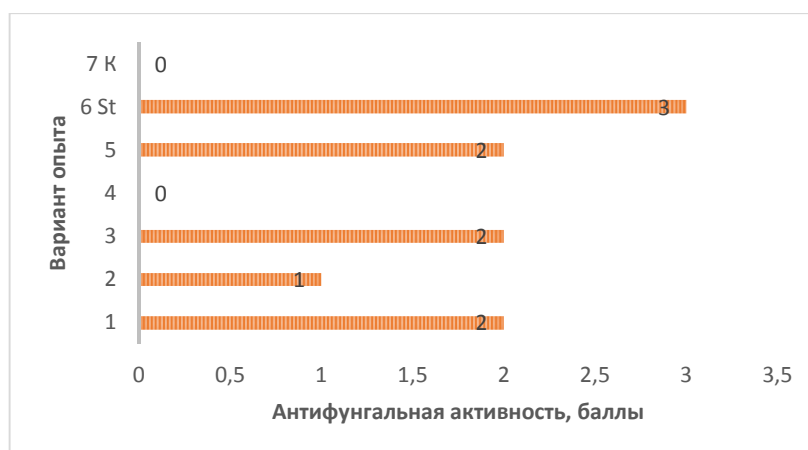


Рис. 1. Антифунгальная активность действующих веществ фунгицидов в отношении *Alternaria alternata*, возбудителя гнили сердцевины плодов яблони, *in vitro*, 7-е сутки после посева, метод бумажных дисков

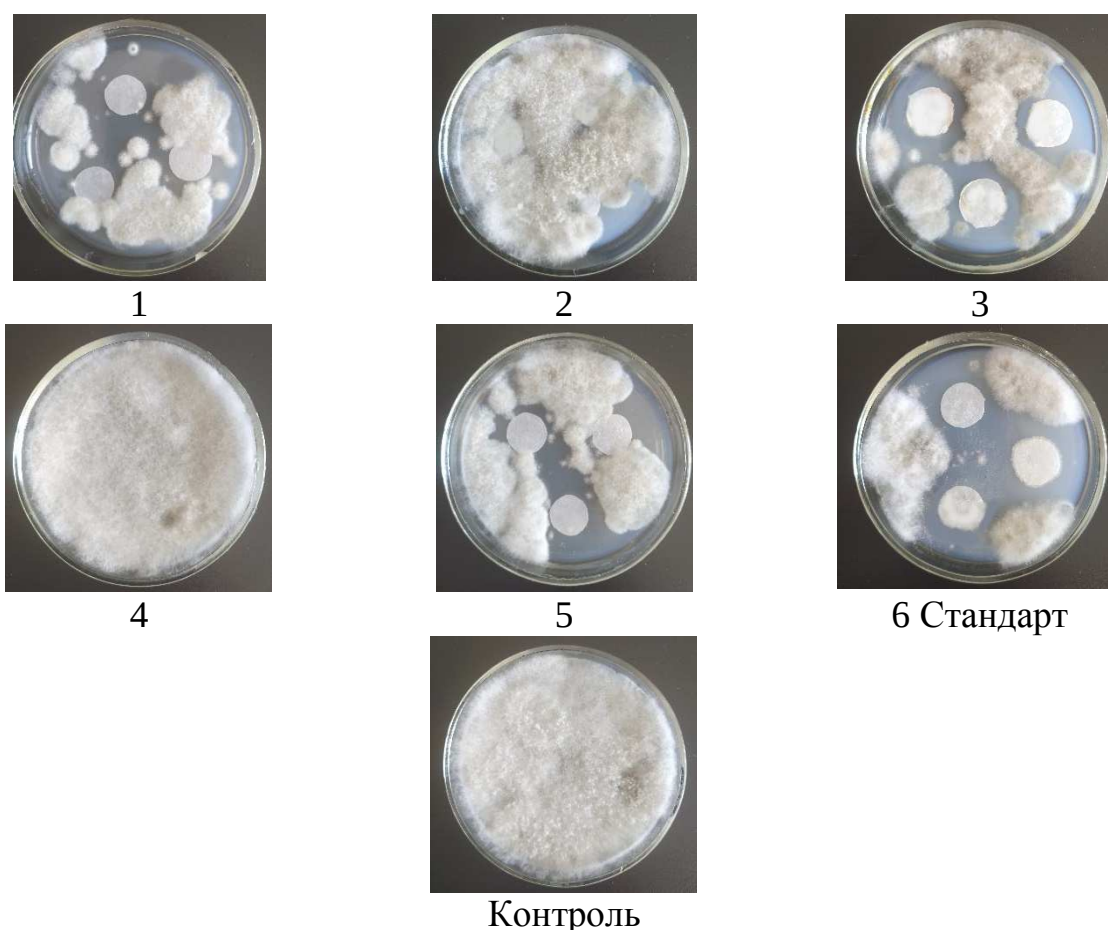


Рис. 2. Рост патогена *Alternaria alternata*, возбудителя гнили сердцевины плодов яблони, под воздействием действующих веществ фунгицидов в культуре *in vitro* (метод бумажных дисков, 7-е сутки после посева)

Метод бумажных дисков предполагает наличие градиента концентраций фунгицида в результате его диффузии в агаровую среду, что выражается образованием зоны ингибирования роста мицелия вокруг диска [18]. Такая зона чётко просматривалась только для двух вариантов опыта: № 3 и № 6, стандарт (рис. 2). В чашках с вариантами № 5 и № 1 мицелий патогена в некоторых участках поверхности среды контактировал с дисками, но не нарастал на них. Таким образом, в этих вариантах опыта не прослеживалось влияние градиента концентраций фунгицидов, кроме этого, мицелий рос случайно по поверхности питательного агара. Причиной такой реакции могут быть неравномерный посев суспензии конидий или различия скорости диффузии препаратов из бумажных дисков при разной толщине агаровой пластины [18]. В вариантах опыта № 7 (К) и № 3 воздушный мицелий гриба покрывал всю поверхность чашки, включая диски, в то время как в варианте № 2 они были свободны от мицелия (рис. 2).

При равномерном внесении химического препарата на поверхность агара также было установлено, что изученные действующие вещества фунгицидов, кроме № 4, ингибировали рост воздушного мицелия, но в разной степени (табл.). На 7-е сутки роста грибов диаметр культуры составил от 2 см до 7 см.

Влияние действующих веществ фунгицидов
на штамм *Alternaria alternata in vitro*, 7-е сутки после посева

Вариант опыта	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6 (St)	№ 7 (K)
Диаметр культуры, см	0,0	4,5	2,0	7,0	3,2	3,0	6,1
БЭ, %	100	26,2	67,0	0	47,5	50,8	-

При данном методе изучения БЭ действующих веществ фунгицидов № 1, № 3 и № 5 составила 47-100 %, что сопоставляется с данными другого метода. Стоит отметить, что под влиянием действующих веществ вариан-

тов № 3, № 5 и стандарта изменились морфолого-культуральные характеристики патогена, такие как форма (на неправильную), цвет (на более темный оттенок зеленого) и край колонии (на волнистый) (рис. 3).

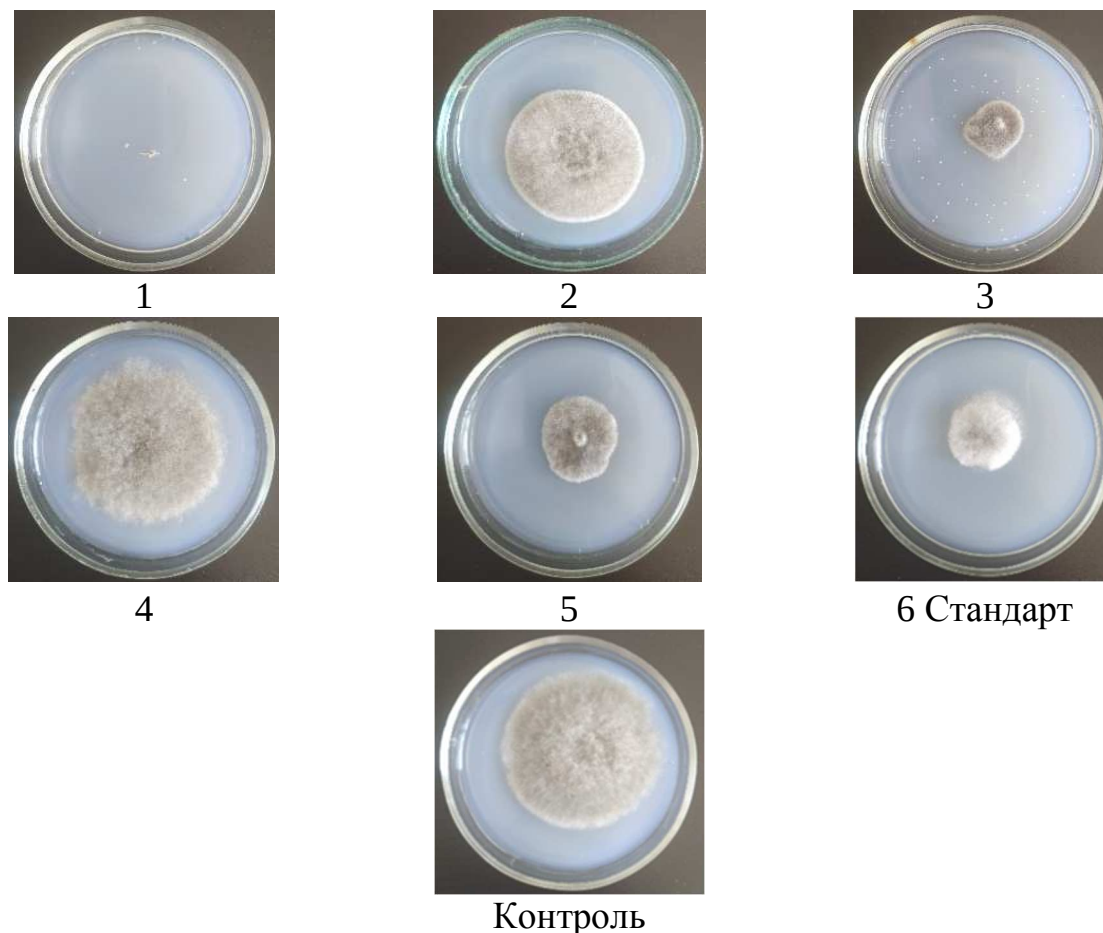


Рис. 3. Рост патогена *Alternaria alternata*, возбудителя гнили сердцевины плодов яблони, под воздействием действующих веществ фунгицидов в культуре *in vitro* (метод агаровых пластин, 7-е сутки после посева)

Исследователи Arikap и др. (2002) [18] при изучении чувствительности к каспофунгину изолятов из рода *Aspergillus* двумя методами пришли к выводу, что методы дисковой диффузии и микроразведений дают сопоставимые результаты, но имеют ряд нюансов. По мнению авторов, диско-диффузионный метод предпочтительнее метода микроразведений, так как он менее кропотливый и трудоемкий. Но в тоже время он не позволяет определить результат восприимчивости тестируемых объектов через 24 часа, в отличии от метода микроразведений.

В нашем исследовании диско-диффузионный метод оказался более трудоёмким в сравнении с методом, в котором фунгицид вносился непосредственно на агаровую пластину, а посев осуществлялся уколом. Это связано с тем, что в классическом варианте первого метода необходим равномерный посев поверхности агара споровой суспензией известной концентрации, только при этих условиях возможно формирование чёткой границы ингибирования роста. Соблюдение этого условия предполагает проведение дополнительного этапа работ по получению инокулята и подсчёту концентрации спор. Также реализация этого подхода усложняется частой потерей способности к спорообразованию чистой культуры при её длительном культивировании.

Выводы. Антифунгальная активность химических препаратов в отношении гриба *Alternaria alternata*, возбудителя гнили плодов яблони, различалась в широком диапазоне от отсутствия эффекта до сильной, но в большинстве вариантах опыта была средней.

Данные, полученные двумя методами изучения, были в целом сопоставимы, однако имели различную степень воспроизводимости результатов. Наиболее стабильные и повторяющиеся результаты давал метод с равномерным внесением рабочей концентрации препарата на поверхность питательной среды и посевом методом укола. Эффекты, полученные методом бумажных дисков, не всегда характеризовались однозначной трактовкой и различались по повторностям. Кроме этого, диск-диффузионный метод отличался большей трудоёмкостью.

Таким образом, для оценки эффективности фунгицидов в отношении *Alternaria alternata* можно рекомендовать метод с равномерным внесением рабочей концентрации препарата на питательную среду в сочетании с посевом уколом.

Литература

1. Гришечкина Л.Д., Долженко В.И., Милютенкова Т.И. Современные фунгициды для защиты сада // Плодоводство и ягодоводство России. 2012. Т. 30. С. 408-422.
2. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. Москва: Колос С, 2005. 232 с.
3. Долженко В.И., Новожилов К.В. Современные аспекты развития химического метода защиты растений // Агрохимия. 2006. № 7. С. 82-85.
4. Лаптиева А.Б. Развитие защиты растений в условиях повышения продовольственной безопасности страны // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2017. № 52. С. 187-190.
5. Dubrovskaya, N.N. The effectiveness of fungicides against the causative agent of wheat root rot - the fungus *Fusarium solani* using the agar plate method // Colloquium-journal. 2020. No. 3-3(55). P. 12-13.
6. Куварица А.Е. Микромицеты (отдел Ascomycota порядка Eurotiales и Нуроcreales) с антигрибной активностью и отбор продуцента антибиотиков-пептаиболов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.12 / Куварица Анастасия Евгеньевна. Москва, 2016. 22 с.
7. Поляк М.С., Цветкова И.А. Некоторые факторы, влияющие на результативность диск-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам // Клиническая лабораторная диагностика. 2007. № 5. С. 36-39.
8. Чекарцев В.В. Методика определения биологической эффективности фунгицидов в отношении грибов рода *Fusarium* и их резистентности к химическим препаратам. М-во обр. и науки РФ [и др.]. Тамбов, 2015. 61 с.
9. Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Новый штамм *Trichoderma* sp.15 ИБ г-58, перспективный для создания нового биопрепарата для сельского хозяйства // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 4-1. С. 22-24.
10. Yakuba, G. V. Sensitivity of micromycetes of the genus *Fusarium* Link, causative agents of rot of the core of apple fruits, to the active substances of modern fungicides / G.V. Yakuba, I.L. Astapchuk, A.I. Nasonov // BIO Web of Conferences : International Scientific and Practical Conference, Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation, 06-10 сентября 2021 года. Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation: EDP Sciences, 2021. P. 04005.
11. Чекарцев В.В., Дубровская Н.Н., Корабельская О.И., Бучнева Г.Н. Биологическая оценка фунгицидов *in vitro* // Зерновое хозяйство России. 2017. Т. 5 (53), С. 65-68.
12. Astapchuk, I. L. Efficacy of fungicides against pathogens of apple core rot from the genera *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees and *Botrytis* (Fr.) under laboratory conditions / I.L. Astapchuk, G.V. Yakuba, A.I. Nasonov // E3s web of conferences: International Conference on Advances in Agrobusiness and Biotechnology Research (ABR 2021), Krasnodar, Russia, 24–26 мая 2021 года. Krasnodar, Russia: EDP Sciences, 2021. P. 03015. – DOI 10.1051/e3sconf/202128503015.
13. Насонов А.И., Якуба Г.В., Астапчук И.Л. Чувствительность краснодарской популяции *Venturia inaequalis* к дифеноконазолу, ингибитору деметилирования стерина // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 4. С. 297-308.

14. Дубровская Н.Н., Гусев И.В., Чекмарев В.В. Применение чашечного метода для оценки эффективности фунгицидов в отношении грибов рода *Fusarium* // Фундаментальные научные исследования: теоретические и практические аспекты. 2018. С. 215-217.
15. Милевская И.А. Влияние некоторых экологически безопасных средств защиты растений на рост *in vitro* грибов *Trichoderma harzianum* и *T. atroviride* как патогенов шампиньона двуспорового (Польша) // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. 2009. № 3. 679 с.
16. Савчук Н.В., Юрченко Е.Г. Антифунгальная активность химических препаратов в отношении возбудителей инфекционного усыхания генеративных органов винограда // Защита растений от вредных организмов: материалы IX международной научно-практической конференции, Краснодар, 17-21 июня 2019 года. Краснодар: 2019. С. 232-233.
17. Arikan, S. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates / S. Arikan, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick J.H. Rex // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. № 45. P. 327–330.
18. Arikan, S., *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. / S. Arikan, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick J.H. Rex // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. № 46. P. 245–247.
19. Arikan, S. Comparative Evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates / S. Arikan, V. Paetznick, H. John // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002. Vol. 46, No. 9 P. 3084-3087.
20. Arikan, S. Comparison of two methods and three end points in determination of *in vitro* activity of micafungin against *Aspergillus* spp. S. Arikan, P. Yurdakul, G. Hascelik // Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003. Vol. 47. No. 8. P. 2640–2643.
21. Lo'pez-Oviedo, E. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method / E. Lo'pez-Oviedo, A. I. Aller, C. Mart'ın, C. Castro, M. Ramirez, J. M. Pema'n, E. Canto'n, C. Almeida, E. Mart'ın-Mazuelos // Antimicrob Agents Chemother. 2006. № 50 (3). P.1108–1111.

References

1. Grishechkina L.D., Dolzhenko V.I., Milyutenkova T.I. Sovremennye fungicidy dlya zashchity sada // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. 2012. T. 30. S. 408-422.
2. Zinchenko V.A. Himicheskaya zashchita rastenij: sredstva, tekhnologiya i ekologicheskaya bezopasnost': uchebnoe posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij. Moskva: Kolos S, 2005. 232 s.
3. Dolzhenko V.I., Novozhilov K.V. Sovremennye aspekty razvitiya himicheskogo metoda zashchity rastenij // Agrohimiya. 2006. № 7. S. 82-85.
4. Laptiev A.B. Razvitie zashchity rastenij v usloviyah povysheniya prodovol'stvennoj bezopasnosti strany // Informacionnyj byulleten' VPRS MOBB. 2017. № 52. S. 187-190.
5. Dubrovskaya, N.N. The effectiveness of fungicides against the causative agent of wheat root rot - the fungus *Fusarium solani* using the agar plate method // Colloquium-journal. 2020. No. 3-3(55). P. 12-13.
6. Kuvarina A.E. Mikromicety (otdel Ascomycota poryadki Eurotiales i Hypocreales) s antigribnoj aktivnost'yu i otbor producenta antibiotikov-peptaidolov : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.02.12 / Kuvarina Anastasiya Evgen'evna. Moskva, 2016. 22 s.
7. Polyak M.S., Cvetkova I.A. Nekotorye faktory, vliyayushchie na rezul'tativnost' disk-diffuzionnogo metoda opredeleniya chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibiotikam // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2007. № 5. С. 36-39.

8. Chekmarev V.V. Metodika opredeleniya biologicheskoy effektivnosti fungicidov v otnoshenii gribov roda *Fusarium* i ih rezistentnosti k himicheskim preparatam. M-vo obr. i nauki RF [i dr.]. Tambov, 2015. 61 s.
9. Galimzyanova N.F., Bojko T.F. Novyj shtamm *Trichoderma* sp.15 IB g-58, perspektivnyj dlya sozdaniya novogo biopreparata dlya sel'skogo hozyajstva // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo centra RAN. 2015. № 4-1. S. 22-24.
10. Yakuba, G. V. Sensitivity of micromycetes of the genus *Fusarium* Link, causative agents of rot of the core of apple fruits, to the active substances of modern fungicides / G.V. Yakuba, I.L. Astapchuk, A.I. Nasonov // BIO Web of Conferences : International Scientific and Practical Conference, Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation, 06-10 sentyabrya 2021 goda. Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation: EDP Sciences, 2021. P. 04005.
11. Chekmarev V.V., Dubrovskaya N.N., Korabel'skaya O.I., Buchneva G.N. Biologicheskaya ocenka fungicidov in vitro // Zernovoe hozyajstvo Rossii. 2017. T. 5 (53), S. 65-68.
12. Astapchuk, I. L. Efficacy of fungicides against pathogens of apple core rot from the genera *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees and *Botrytis* (Fr.) under laboratory conditions / I.L. Astapchuk, G.V. Yakuba, A.I. Nasonov // E3s web of conferences : International Conference on Advances in Agrobusiness and Biotechnology Research (ABR 2021), Krasnodar, Russia, 24–26 maya 2021 goda. Krasnodar, Russia: EDP Sciences, 2021. P. 03015. - DOI 10.1051/e3sconf/202128503015.
13. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Astapchuk I.L. Chuvstvitel'nost' krasnodarskoj populyacii *Venturia inaequalis* k difenokonazolu, inhibitoru demetilirovaniya sterinov // Mikologiya i fitopatologiya. 2021. T. 55. № 4. S. 297-308.
14. Dubrovskaya N.N., Gusev I.V., Chekmarev V.V. Primenenie chashechnogo metoda dlya ocenki effektivnosti fungicidov v otnoshenii gribov roda *Fusarium* // Fundamental'nye nauchnye issledovaniya: teoreticheskie i prakticheskie aspekty. 2018. S. 215-217.
15. Milevskaya I.A. Vliyanie nekotoryh ekologicheskimi bezopasnyh sredstv zashchity rastenij na rost in vitro gribov *Trichoderma harzianum* i *T. atroviride* kak patogenov shampin'ona dvusporovogo (Pol'sha) // Ekologicheskaya bezopasnost' v APK. Referativnyj zhurnal. 2009. № 3. 679 c.
16. Savchuk N.V., Yurchenko E.G. Antifungal'naya aktivnost' himicheskikh preparatov v otnoshenii vzbuditelej infekcionnogo usyhaniya generativnyh organov vinograda // Zashchita rastenij ot vrednyh organizmov: materialy IX mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, Krasnodar, 17-21 iyunya 2019 goda. Krasnodar: 2019. S. 232-233.
17. Arikan, S. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates / S. Arikan, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick J.H. Rex // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. № 45. P. 327–330.
18. Arikan, S., In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. / S. Arikan, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick J.H. Rex // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. № 46. P. 245–247.
19. Arikan, S. Comparative Evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates / S. Arikan, V. Paetznick, H. John // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002. Vol. 46, No. 9 P. 3084-3087.
20. Arikan, S. Comparison of two methods and three end points in determination of in vitro activity of micafungin against *Aspergillus* spp. S. Arikan, P. Yurdakul, G. Hascelik // Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003. Vol. 47. No. 8. P. 2640–2643.
21. Lo´pez-Oviedo, E. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method / E. Lo´pez-Oviedo, A. I. Aller, C. Martı´n, C. Castro, M. Ramirez, J. M. Pema´n, E. Canto´n, C. Almeida, E. Martı´n-Mazuelos // Antimicrob Agents Chemother. 2006. № 50 (3). P.1108-1111.