

На правах рукописи



КУРИЛОВА ДИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФУЗАРИОЗ СОИ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ
(*CHAETOMIUM* И *PSEUDOMONAS*) ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
ЗАЩИТЫ КУЛЬТУРЫ**

**Шифр и наименование специальности
06.01.07 – Защита растений**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург, 2013

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский НИИ масличных культур
Россельхозакадемии

Научный руководитель:

Маслиенко Любовь Васильевна

доктор биологических наук, старший научный сотрудник,
ГНУ Всероссийский НИИ масличных культур Россельхозакадемии

Официальные оппоненты:

Ивашенко Владимир Гаврилович

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник,
ГНУ Всероссийский НИИ защиты растений Россельхозакадемии;

Гришечкина Светлана Денисовна

кандидат биологических наук, и.о. заведующего лабораторией,
ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии

Ведущая организация:

ГНУ Всероссийский НИИ биологической защиты растений Россельхозакадемии

Защита состоится «12» декабря 2013 г. в ___ часов на заседании диссертационного
совета Д 006.015.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте
защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе
Подбельского, д. 3, факс (812)470-51-10, e-mail: vizrspb@mail333.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-
исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан «12» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Г.А. Наседкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы в нашей стране всё большее внимание уделяется сое – ценной белково-масличной культуре. Краснодарский край является лидирующим регионом по её производству в европейской части России, в 2012 году на площади 170 тыс. га было получено более 300 тыс. т семян. Рост площадей и объёмов производства сои в крае приводит к распространению болезней и повышению их вредоносности.

Защита сои от болезней, и, в частности от фузариоза, связана с разработкой комплексных мероприятий, включающих и биологический метод. Стратегия биологического метода защиты растений от болезней не ставит задачу полного уничтожения вредных организмов, а ориентирована на регулирование численности популяции патогена на уровне ниже экономического порога вредоносности [Cook, 1988]. Грамотное и своевременное применение микробиологических средств защиты растений на фоне высокой агротехники может значительно улучшить фитосанитарную обстановку в посевах и значительно увеличить урожайность, поскольку микробиологические средства защиты растений обладают различными механизмами действия на растения и перспективны для включения в микробиоценоз.

Преимуществом микробиопрепаратов является их экологичность, специфичность действия, способность восстанавливать природные регуляторные механизмы в агробиоценозах, возможность решения проблем резистентности популяций фитопатогенов к пестицидам. При этом микробиопрепараты приобретают ещё большее значение в защите сои, так как биоагенты, продуценты биопрепаратов, не подавляют жизнедеятельность клубеньковых бактерий.

В связи с этим разработка эффективных и экологически безопасных микробиологических препаратов для снижения вредоносности фузариоза на сое является актуальной.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы – уточнить видовой состав грибов рода *Fusarium* на сое, определить их вредоносность в полевых условиях и разработать эффективный и экологически безопасный микробиологический способ защиты сои от фузариоза.

В соответствии с намеченной целью были поставлены следующие задачи:

- уточнить видовой состав возбудителей фузариоза сои;
- изучить патогенные свойства изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных с растений сои;
- осуществить скрининг штаммов антагонистов фитопатогенов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК по антагонистической, ростстимулирующей активности и защитному эффекту к наиболее распространённому и патогенному возбудителю фузариоза сои;
- определить в полевых условиях эффективность обработки семян сои лабораторными образцами микробиопрепаратов против фузариоза;
- изучить биологические особенности перспективных штаммов;

– выявить оптимумы процессов роста и развития штаммов-продуцентов, разработать элементы технологии производства и применения лабораторных образцов микробиопрепаратов на их основе;

– определить совместимость лабораторных образцов микробиопрепаратов с перспективными пестицидами, рекомендуемыми к применению на сое.

Научная новизна. Уточнён видовой состав грибов рода *Fusarium* на сое, сложившийся в современных условиях центральной зоны Краснодарского края; установлен наиболее патогенный для сои вид *Fusarium sporotrichioides* Sherb.

Разработана и апробирована 4-балльная шкала для определения степени поражения растений сои фузариозом в полевых условиях.

В результате ступенчатого скрининга отобраны штаммы-продуценты микробиопрепаратов полифункционального типа действия: бактерия 14-3 *Pseudomonas chlororaphis* и гриб Хк-1 *Chaetomium olivaceum* Cook et Ellis.

Изучены механизмы действия перспективных штаммов антагонистов 14-3 *P. chlororaphis* и Хк-1 *Ch. olivaceum* в отношении фитопатогенного гриба *F. sporotrichioides*.

Оптимизированы условия культивирования штамма-продуцента нового микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis*.

Определена совместимость лабораторных образцов микробиопрепаратов с пестицидами с целью применения в интегрированной системе защиты сои от болезней.

Научно-практическая значимость работы.

1. Разработана 4-балльная шкала для определения степени поражения растений сои фузариозом в полевых условиях.

2. Разработаны элементы технологии производства и применения лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных биоагентов для применения в интегрированной системе защиты сои от фузариоза.

3. Обработка семян сои лабораторными образцами микробиопрепаратов обеспечивает биологическую эффективность в полевых условиях, в зависимости от состояния популяции патогена и складывающихся погодных условий, до 28,7 %; величину сохранённого урожая – до 0,44 т/га.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Видовой состав и вредоносность возбудителей фузариоза сои.

2. Экологически безопасные лабораторные образцы микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов-продуцентов 14-3 *P. chlororaphis* и Хк-1 *Ch. olivaceum*, эффективные против фузариоза сои, и элементы технологии их производства и применения.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на ежегодных методических комиссиях ГНУ ВНИИМК Россельхозакадемии по аттестации аспирантов (2007-2011 гг.); I всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», КубГАУ, Краснодар, 2007 г.; V всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов: «Современное состояние и приоритеты развития фундаментальных наук в регионах», Анапа, 2008 г.; V международной конференции молодых учёных и

специалистов «Перспективные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур», Краснодар, 2009 г.; XII съезде товарищества микробиологов Украины им. С.М. Виноградского, Ужгород, 2009 г.; IV всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», Куб ГАУ, Краснодар, 2010 г.; VI международной конференции молодых учёных и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур», посвящённой 125-летию со дня рождения В.С. Пустовойта, Краснодар, 2011 г.; региональной научно-практической конференции молодых учёных Краснодарского края «Региональная конференция по программе У.М.Н.И.К. 11 среди студентов, аспирантов, учащихся и молодых учёных», Краснодар, 2011 г.; IV международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 2011 г.; VII международной конференции молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных культур», посвящённой 100-летию со дня основания ВНИИМК, Краснодар, 2013 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 09-08-00726-а и программы У.М.Н.И.К. Министерства образования и науки Российской Федерации Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, государственный контракт № 14046.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ общим объёмом 3,97 печатных листов, в том числе 5 – в изданиях рекомендованных ВАК РФ.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений, содержит 39 таблиц, 27 рисунков. Библиографический список содержит 225 источников, в том числе 85 – иностранных авторов.

Декларация личного участия автора. Автор выполнила диссертацию в рамках тематического плана научно-исследовательских работ государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Краснодар) по заданию 04.07.04. «Разработать эффективные, экологически безопасные биопрепараты для защиты подсолнечника и сои от основных заболеваний»

Диссертация содержит фактический материал, непосредственно полученный автором в период 2007-2011 гг. на центральной экспериментальной базе Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Представлены сведения о распространённости, видовом составе и биологических особенностях развития грибов рода *Fusarium*.

Обобщены сведения о становлении микробиологического метода защиты растений от болезней, в том числе и от фузариоза.

Собраны и представлены данные о существующих в нашей стране и в мире микробиопрепаратах на основе грибов и бактерий-антагонистов для защиты растений от возбудителей фузариоза.

Глава 2. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Почвенно-климатические условия

Научно-исследовательская работа проводилась на центральной экспериментальной базе (ЦЭБ) Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук (ВНИИМК), г. Краснодар, Российская Федерация, в период 2007-2011 гг.

Почва опытных участков представлена выщелоченным малогумусным сверхмощным чернозёмом тяжелосуглинистого гранулометрического механического состава, сформированного на лесовидном карбонатном суглинке. Почвы характеризуются сравнительно высоким содержанием основных элементов минерального питания.

Среднегодовая температура воздуха составляет +10,4 ... +10,6 °С, средняя многолетняя января –1,8 °С, и июля +23,2 °С, безморозный период длится 194-195 дней, сумма эффективных температур +3543 ... +3618 °С, среднегодовое количество осадков – 734 мм. Характерной особенностью весеннего периода является быстрое нарастание температуры. Лето наступает в первой декаде мая, часто бывает жаркое и сухое.

2.2 Материалы и методы исследований

Объектом исследований служили: штаммы грибов и бактерий-антагонистов возбудителей болезней масличных культур, тест-культуры возбудителей фузариоза сои, опытные образцы микробиопрепаратов, районированные сорта сои Вилана, Альба, Ника и Славия. Грибы и бактерии, проявляющие антагонизм в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium* были взяты из коллекции микроорганизмов лаборатории биометода ВНИИМК. В работе использован патогенный штамм *Fusarium sporotrichioides*, выделенный из корневой системы поражённого растения сои. Выделение возбудителей фузариоза сои проводили на экспериментальных полях ВНИИМК по общепринятой методике [Наумов, 1937; Доспехов, 1968]. Изучение морфолого-культуральной характеристики выделенных изолятов проводили на двух средах: картофельно-глюкозном (КГА) и картофельно-сахарозном (КСА) агаре. Идентификацию проводили по определителям под редакцией М.А. Литвинова (1967) и В.И. Билай (1982). С целью выявления наиболее патогенных изолятов возбудителей фузариоза сои для искусственного заражения семян использовали метод агаровых блоков [Зайчук, 1983]. Для определения вредоносности фузариоза на сое в фазу цветения и плодообразования в полевых условиях одновременно выявляли и этикетировали по 20 растений в 3-кратной повторности каждого балла поражения фузариозом. Степень поражения определяли визуально согласно разработан-

ной нами 4-балльной шкале. После созревания учётных растений изучали элементы структуры их урожая.

Ступенчатый скрининг коллекционных микроорганизмов включал: выявление антагонистической активности штаммов *in vitro* методом встречных культур [Егоров, 1957] на КСА и среде Кинга В, при двух температурных режимах: 25 и 10 °С; оценку биологической эффективности отобранных штаммов на фоне искусственного заражения семян во влажной камере в лабораторных условиях [Зайчук, 1983]; определение колонизирующей активности и защитного эффекта корней проростков сои [Антонова, Саукова, 2006]; оценку активных штаммов антагонистов на фитотоксичность и ростостимулирующую активность, а также полевые испытания.

Морфолого-культуральные признаки и физиологические свойства перспективного штамма бактерии-антагониста изучали по общепринятым методам [Градова, Бабусенко, Горнова, 2004; Теппер, Шильникова, Переверзева, 2004; Нетрусов и др., 2005]. Подбор оптимальных искусственных питательных сред и условий культивирования перспективного штамма бактерии-антагониста проводили на жидких питательных средах (мясо-пептонный бульон (МПБ), Кинга В, Чапека для бактерий, пептон-дрожжевая).

Механизм взаимодействия штаммов антагонистов с возбудителем фузариоза изучали по модифицированной методике встречных культур. Антибиотическую активность бактериального штамма определяли методом диффузии в агар [Егоров, 2004].

Лабораторные образцы микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов были наработаны в лаборатории биометода ВНИИМК. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в жидкой культуре (ЖК) и водной суспензии (ВС) лабораторных образцов микробиопрепаратов определяли методом Коха [Нетрусов и др., 2005].

Совместимость лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе штаммов антагонистов с рекомендованными пестицидами и перспективными инокулянтами определяли, используя модифицированный метод диффузии в агар [Егоров, 1957; Маслиенко, 1999].

Оценку биологической эффективности лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе штаммов антагонистов проводили в лабораторных условиях на фоне искусственного заражения, а также в полевых мелкоделяночных (площадь делянки 14 м², повторность 3-кратная), крупноделяночных (площадь делянки 126 м², повторность 3-кратная) и производственном (площадь делянки 0,75 га) опытах на естественном фоне поражения болезнями на ЦЭБ ВНИИМК, в Красноармейском районе Краснодарского края и на ГНУ Армавирской ОС ВНИИМК. Эффективность защитных мероприятий определяли сравнением данных учетов в контроле и в вариантах опытов по поражению растений болезнями и урожаю. Экономическую эффективность применения лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе штаммов антагонистов рассчитывали в лаборатории экономики ВНИИМК.

Математическую обработку опытных данных проводили с использованием статистических расчетов [Лакин, 1980] и стандартных компьютерных программ.

Глава 3. РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ВИДОВОЙ СОСТАВ И ВРЕДНОСНОСТЬ ФУЗАРИОЗА СОИ В УСЛОВИЯХ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

3.1 Видовой состав грибов рода *Fusarium* на сое в условиях Краснодарского края

В результате проведённых в 2007-2009 гг. исследований по уточнению видового состава грибов рода *Fusarium* на сое, в чистую культуру выделен и идентифицирован 201 изолят грибов, относящихся к 10 видам: *F. sporotrichiella*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. javanicum* и *F. tricinctum*. Установлено, что за прошедшие 10-20 лет видовой состав возбудителей фузариоза сои претерпел существенные изменения (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительный видовой состав грибов рода *Fusarium* на сое в условиях Краснодарского края

Видовое название гриба	Частота встречаемости возбудителей фузариоза сои, %		
	1988 г.*	1998 г.**	2007-2009 гг.***
<i>F. oxysporum</i>	37-92,6	32,9-70,1	24,8-38,0
<i>F. solani</i>	25,9	13,4-23,7	4,8-7,9
<i>F. gibbosum</i>	11,1	12,8-19,9	-
<i>F. culmorum</i>	-	0,8-14,1	2,0-6,0
<i>F. semitectum</i>	-	0,7-6,7	3,0-7,1
<i>F. moniliforme</i>	40,7	0,8-10,1	6,0-25,0
<i>F. sporotrichiella</i>	-	2,5-7,3	19,0-41,7
<i>F. sambucinum</i>	25,9	1,4-3,7	4,9-6,5
<i>F. lateritium</i>	единично	0,6-0,8	-
<i>F. heterosporum</i>	единично	0,4-0,9	2,4
<i>F. javanicum</i>	-	0,5-0,6	1,2
<i>F. tricinctum</i>	-	-	1,2

Примечание: * по данным Е.В. Данилец, Д.В. Подкиной, И.А. Элланской; ** по данным И.А. Котляровой; *** по нашим данным.

Долгое время наиболее распространённым на сое являлся *F. oxysporum* с частотой встречаемости 32,9-92,6 %. По нашим данным в последние годы частота встречаемости этого вида составила 24,8-38,0 %, в то же время значительное распространение получил вид *F. sporotrichiella* (19,0-41,7 %), доля которого ранее не превышала 7,3 %. Третьим по распространённости стал *F. moniliforme* (6,0-25,0 %). Существенно снизилась частота встречаемости *F. solani* (с 13,4-25,9 до 4,8-7,9 %). Достаточно распространённого в прошлые годы вида *F. gibbosum* (11,1-19,9 %) нами не выделено. Чёткой органотропной специализации среди выделенных изолятов не выявлено.

3.2 Вредоносность грибов рода *Fusarium* на сое

С целью изучения влияния степени развития фузариоза на структуру урожая была разработана 4-балльная шкала визуальной оценки степени поражения вегетирующих растений сои фузариозом в полевых условиях, апробированная на разных сортах (Ника, Альба, Славия) с различной степенью устойчивости к болезням:

0 баллов – здоровые растения;

1 балл – слабая степень поражения (до 15 %), растения не отстают в росте и развитии, стебель зелёный, наблюдается пожелтение и поникание нижних листьев, не связанное с созреванием, единичное поражение бобов, либо усыхание верхушки стебля;

2 балла – средняя степень поражения (до 80 %), растения отстают в росте, стебель на половину/две трети пожелтевший, сухой, листья большей частью желтые, вялые, либо сухие, половина/большая часть бобов поражена;

3 балла – сильная степень поражения (до 100 %), растения значительно отстают в росте и развитии, полностью сухие, бобы щуплые либо отсутствуют совсем, листья остаются на растении.

Согласно нашим многолетним наблюдениям учёт степени проявления болезни следует проводить в фазу плодообразования, когда количество растений сои с сильной степенью поражения (3 балла) составляет не менее 10 % от общей численности.

Оценка влияния разной степени развития фузариоза на элементы структуры урожая показала существенное снижение последних при среднем (2 балла) и сильном (3 балла) поражении растений сои фузариозом. Наиболее значительно это отразилось на числе бобов и семян, массе семян с одного растения и массе 1000 семян (таблица 2).

Таблица – 2 Влияние степени поражения сои сорта Альба фузариозом на элементы структуры урожая, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Число бобов, шт	Число семян, шт	Масса семян, шт	Масса 1000 семян, г	Высота растения, см
Здоровые растения	72,9	153,0	19,5	131,0	122,8
1й балл поражения	54,2	119,2	15,6	128,7	126,8
2й балл поражения	41,1	84,6	10,9	120,4	113,9
3й балл поражения	27,7	50,5	5,8	109,6	95,9
НСР ₀₅	9,3	19,3	2,4		5,5

Поражение растений сои фузариозом даже при слабой степени поражения (1 балл) существенно снизило число бобов с одного растения – на 25,7 %, при средней степени поражения (2 балла) – на 43,6 % и при сильной (3 балла) – на 62,0 %. Уменьшение числа бобов приводило к значительному снижению числа семян с одного растения. Так, при слабой степени поражения, число семян снизилось на 22,1 %, при средней степени – на 44,7% и при сильной – на 67,0 %. Вследствие уменьшения числа бобов и семян с одного растения, масса семян с одного растения также снизилась в зависимости от степени поражения на 20,0 %, 44,1 %, и 70,3 %

соответственно. Масса 1000 семян при слабой степени поражения снизилась на 2,3 %, при средней степени – на 8,1 % и при сильной – на 16,3 %. Кроме того, отмечено существенное снижение высоты сои, по сравнению со здоровыми растениями, при средней и сильной степени поражения – на 7,3 и 21,9 % соответственно.

3.3 Патогенность изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных с растений сои

С целью проведения ступенчатого скрининга штаммов антагонистов фитопатогенов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК необходимо было выявить наиболее патогенный штамм возбудителя фузариоза. Для этого была изучена вирулентность изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных с растений сои в первый год исследований. Все изоляты оказались патогенными, но в разной степени. Для ступенчатого скрининга коллекции антагонистов отобран наиболее вирулентный изолят гриба рода *Fusarium*, который после видовой идентификации, проведённой в ВИЗР (г. Санкт-Петербург-Пушкин) Т.Ю. Гагкаевой, согласно современной систематике отнесён к виду *F. sporotrichioides* Sherb.

Глава 4. СКРИНИНГ ШТАММОВ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕНОВ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ФУЗАРИОЗА СОИ *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES*

4.1 Первичный скрининг штаммов грибов и бактерий антагонистов фитопатогенов к возбудителю фузариоза сои *F. sporotrichioides*

В результате первичного скрининга штаммов грибов и бактерий-антагонистов к возбудителю фузариоза сои *F. sporotrichioides in vitro* при двух температурных режимах (25 и 10 °С) для следующих этапов скрининга нами отобрано 9 штаммов антагонистов, среди которых 5 штаммов грибов: Тк-1 *Trichoderma koningii*, Т-4 *Trichoderma sp.*, Sm-1 *Sordaria macrospora*, А-1 *Basidiomycetes*, Хк-1 *Chaetomium olivaceum* и 4 штамма бактерий: 12-2 *Pseudomonas sp.*, 14-3 *P. chlororaphis*, Sgrc-1 *P. fluorescens*, Б-5 *Bacillus licheniformis*.

Исследование показало, что тестируемые штаммы не снижали всхожесть семян и не вызывали увядания проростков сои. Более того, отмечено повышение всхожести семян по сравнению с контролем на 9-20 %.

Установлено ростстимулирующее действие перспективных штаммов антагонистов на проростки сои. Наиболее сильное влияние штаммы оказывали на длину и массу корня (таблица 3).

Значительное увеличение длины корня проростков сои наблюдалось в вариантах со штаммами Тк-1 *Tr. koningii* и А-1 *Basidiomycetes* (на 19,9-22,0 %), а массы корня – со штаммами 12-2 *Pseudomonas sp.* и 14-3 *P. chlororaphis* (на 13,3-20,0 %). Но лучший результат по увеличению как длины (на 25,2 %), так и массы корня (на 20,0 %) показал штамм Хк-1 *Ch. olivaceum*. Существенное увеличение массы корня проростков происходило за счет интенсивного развития главного и боковых корней. Влияние штаммов на длину и массу стебля также отмечено, но в меньшей степени (0,4-11,5 %; 1,2-9,8 % соответственно).

Таблица 3 – Ростстимулирующее влияние перспективных штаммов антагонистов на проростки сои, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Длина корня		Масса корня	
	см	в % к контролю	г	в % к контролю
Контроль	8,4	-	0,15	-
12-2 <i>Pseudomonas sp.</i> , ЖК	9,0	7,7	0,18	20,0
Sgrc-1 <i>P. fluorescens</i> , ЖК	8,7	4,3	0,15	0
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК	9,8	17,5	0,17	13,3
Б-5 <i>B. licheniformis</i> , ЖК	9,4	12,1	0,15	0
Тк-1 <i>Tr. koningii</i> , ЖК	10,2	22,0	0,16	6,7
Т-4 <i>Trichoderma sp.</i> , ЖК	9,3	11,4	0,15	0
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	10,5	25,2	0,18	20,0
Sm-1 <i>S. macrospora</i> , ВС	9,1	8,7	0,14	0
А-1 <i>Basidiomycetes</i> , ВС	10,0	19,9	0,16	6,7
НСР ₀₅	1,4		0,01	

Примечание: ЖК – жидкая культура; ВС – водная суспензия.

В результате первичного скрининга грибов и бактерий-антагонистов выделены следующие штаммы: Хк-1 *Ch. olivaceum*, Тк-1 *Tr. koningii*, Sm-1 *S. macrospora*, А-1 *Basidiomycetes*, 12-2 *Pseudomonas sp.*, 14-3 *P. chlororaphis* и Б-5 *B. licheniformis*.

4.2 Вторичный скрининг перспективных штаммов грибов и бактерий, проявивших высокую антагонистическую активность к *F. sporotrichioides*

Определение защитного эффекта перспективных штаммов антагонистов прорастающего семени сои, а также отработку оптимальных норм расхода опытных образцов микробиопрепаратов проводили во влажной камере, используя метод агаровых блоков. Для опытных образцов микробиопрепаратов на основе бактериальных штаммов испытывались нормы от 0,5 до 3,0 л/т, на основе грибных – от 2,0 до 4,0 л/т. На фоне поражения проростков сои фузариозом в контроле 58,6 % максимальная биологическая эффективность установлена у штаммов: 12-2 *Pseudomonas sp.* с нормой расхода 1,0 л/т (65,9 %), Хк-1 *Ch. olivaceum* с нормой расхода 3,0 л/т (59,0 %), 14-3 *P. chlororaphis* с нормой расхода 2,0 л/т (52,2 %). Также высокая эффективность отмечена у Тк-1 *Tr. koningii* с нормой расхода 4,0 л/т (49,8 %), Sm-1 *S. macrospora* с нормой расхода 4,0 л/т (47,6 %).

Эффективность биологического агента во многом определяется не только его способностью обеспечивать защиту семян, но и колонизировать растущий корень. Максимальную колонизирующую активность и одновременно защитный эффект на жёстком (100 %) фоне заражения сои *F. sporotrichioides* проявили штаммы бактерий 14-3 *P. chlororaphis* и Б-5 *B. licheniformis*, также высокую колонизирующую активность проявили штаммы Sm-1 *S. macrospora* и Хк-1 *Ch. olivaceum*. В этих ва-

риантах от 40 до 80 % проростков оказались жизнеспособны, тогда как в контроле с инфекцией жизнеспособных проростков не обнаружено (таблица 4).

Таблица 4 – Колонизирующая активность перспективных штаммов антагонистов на фоне искусственного заражения проростков сои сорта Славия *F. sporotrichioides* в лабораторных условиях методом перфорированных чашек Петри, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Проростки			Биологическая эффективность, %
	здоровые, %	жизнеспособные, %	нежизнеспособные, %	
Контроль без инфекции	100	0	0	-
Контроль с инфекцией	0	0	100	-
12-2 <i>Pseudomonas sp.</i> , ЖК	0	40,0	60,0	40,0
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК	20,0	60,0	20,0	80,0
Б-5 <i>B. licheniformis</i> , ЖК	15,0	40,0	45,0	55,0
Тк-1 <i>Tr. koningii</i> , ЖК	0	20,0	80,0	20,0
А-1 <i>Basidiomycetes</i> , ВС	0	0	100	0
Sm-1 <i>S. macrospora</i> , ВС	20,0	20,0	60,0	40,0
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	5,0	35,0	60,0	40,0

Следующим этапом вторичного скрининга было определение эффективности опытных образцов микробиопрепаратов на фоне искусственного заражения семян сои возбудителем фузариоза в почве в лабораторных условиях (таблица 5).

Таблица 5 – Биологическая эффективность обработки семян сои сорта Славия опытными образцами микробиопрепаратов на фоне искусственного заражения *F. sporotrichioides* почвы, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Норма расхода, л/т	Поражено проростков, %	Биологическая эффективность, %
Контроль без инфекции	-	7,8	-
Контроль с инфекцией	-	78,7	-
Эталон ТМТД, ВСК	6,0	68,0	13,6
12-2 <i>Pseudomonas sp.</i> , ЖК	1,0	73,3	6,9
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК	2,0	62,7	20,3
Б-5 <i>B. licheniformis</i> , ЖК	3,0	77,3	1,8
Тк-1 <i>Tr. koningii</i> , ЖК	3,0	57,3	27,2
А-1 <i>Basidiomycetes</i> , ВС	4,0	93,3	0
Sm-1 <i>S. macrospora</i> , ВС	4,0	74,4	5,1
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	3,0	52,0	33,9

Примечание: ВСК – водно-суспензионный концентрат.

Биологическая эффективность испытываемых штаммов-продуцентов, на жёстком фоне поражения фузариозом в контроле 78,7 %, составила от 0 до 33,9 %, при биологической эффективности химического эталона ТМТД, ВСК – 13,6 %. Максимальную биологическую эффективность проявили штаммы Хк-1 *Ch. olivaceum* – 33,9 %, Тк-1 *Tr. koningii* – 27,2 % и 14-3 *P. chlororaphis* – 20,3 %.

Следующим этапом скрининга стало испытание штаммов-продуцентов на естественном фоне заражения фузариозом в полевых условиях на мелко-деляночных опытах (таблица 6).

Таблица 6 – Биологическая эффективность обработки семян сои сорта Альба опытными партиями микробиопрепаратов против фузариоза в полевых условиях, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Норма расхода, л/т	Поражено фузариозом (2+3 балл), %	Биологическая эффективность, %	Урожайность, т/га	Сохранённый урожай, т/га
Контроль, б/о	-	49,1	-	1,64	-
ТМТД, ВСК, эталон	6,0	43,8	10,8	1,77	0,13
12-2 <i>Pseudomonas sp.</i> , ЖК	1,0	37,6	23,4	1,70	0,06
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК	2,0	36,5	25,7	1,79	0,15
Б-5 <i>B. licheniformis</i> , ЖК	3,0	48,1	2,0	1,79	0,15
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	3,0	35,0	28,7	1,79	0,15
Sm-1 <i>S. macrospora</i> , ВС	4,0	39,6	19,4	1,78	0,14
Тк-1 <i>Tr. koningii</i> , ЖК	3,0	34,7	29,3	1,64	0
А-1 <i>Basidiomycetes</i> , ВС	4,0	35,8	27,1	1,60	0
НСР ₀₅				0,13	

На фоне поражения сои сорта Альба фузариозом в контроле 49,1 % максимальная биологическая эффективность отмечена при обработке семян опытными образцами микробиопрепаратов на основе штаммов Тк-1 *Tr. koningii* (29,3 %), Хк-1 *Ch. olivaceum* (28,7 %), 14-3 *P. chlororaphis* (25,7 %) и 12-2 *Pseudomonas sp.* (23,4 %) при эффективности химического эталона ТМТД, ВСК 10,8 %.

Сохранённый урожай в вариантах с лабораторными образцами микробиопрепаратов на основе штаммов Хк-1 *Ch. olivaceum*, 14-3 *P. chlororaphis* и Б-5 *B. licheniformis* составил 0,15 т/га, с эталона ТМТД, ВСК – 0,13 т/га.

Принимая во внимание положение о том, что успешный биоагент должен обладать комплексом положительных свойств на растении [Боронин, 1998; Штерншис и др., 2003], мы проанализировали данные, полученных по скринингу активных штаммов антагонистов (рисунок 1).

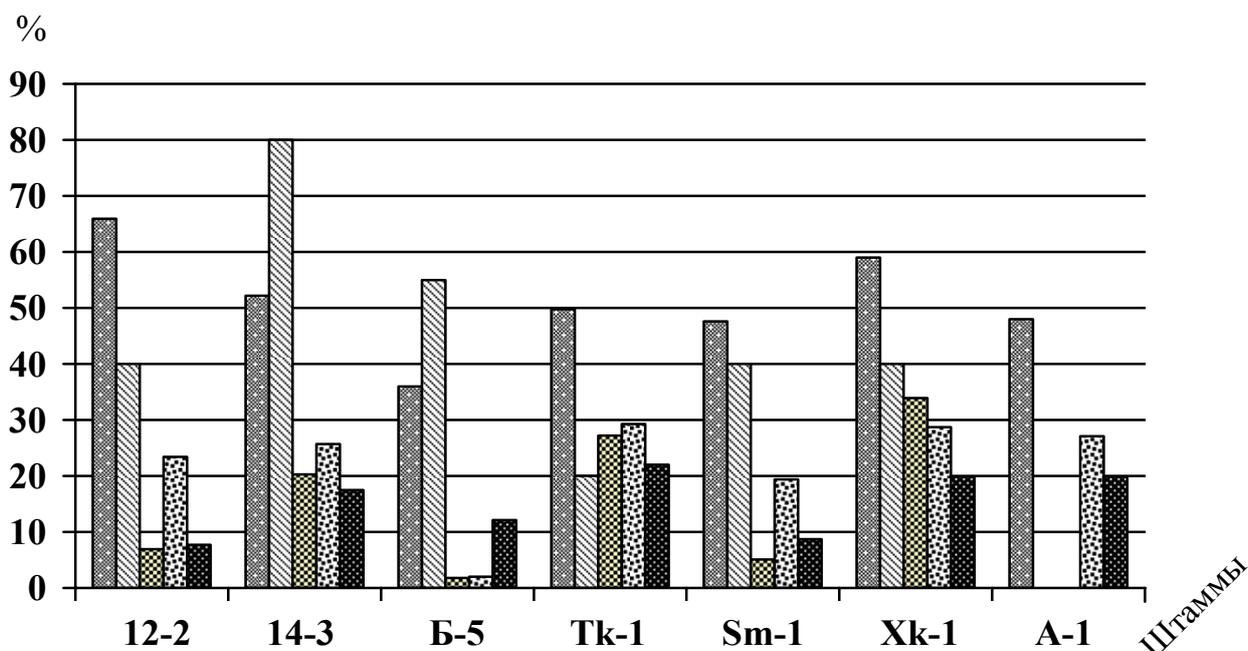


Рисунок 1 – Защитный эффект на фоне искусственного заражения *Fusarium sporotrichioides* и ростостимулирующее действие лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов при обработке семян сои:

- - защитный эффект во влажной камере;
- ▨ - колонизирующая активность во влажной камере;
- ▩ - защитный эффект в почве;
- ▧ - защитный эффект в поле;
- - ростостимулирующее действие перспективных штаммов антагонистов на проростки сои.

Наиболее эффективными признаны штаммы 14-3 *P. chlororaphis* и Xk-1 *Ch. olivaceum*, обеспечивающие защиту семян и проростков сои на жёстком фоне искусственного заражения фузариозом во влажной камере и в почве, а также в полевых условиях, активно колонизирующие корень, оказывая одновременно ростостимулирующее влияние.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МИКРОБИОПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИИ 14-3 *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* И ГРИБА XK-1 *CHAETOMIUM OLIVACEUM*

Так как гриб *Ch. olivaceum* является продуцентом микробиопрепарата Хетомин, разработанного ранее в лаборатории биометода, основная часть дальнейших исследований проводилась по изучению бактериального штамма 14-3, относящегося к роду *Pseudomonas*.

Видовая генетическая идентификация бактериального штамма 14-3 проведена в учреждении Российской академии наук Центр «Биоинженерия» (г. Москва). Согласно проведённой экспертизе штамм 14-3 отнесён к виду *P. chlororaphis*.

5.1 Морфолого-культуральная характеристика штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis*

Клетки штамма 14-3 *P. chlororaphis* палочковидные, одиночные или соединены попарно, подвижные (движение поступательное), размеры – 0,6-0,9 x 1,7-3,7 мкм. Споры отсутствуют. Окраска по Граму отрицательная.

Культуральные признаки штамма 14-3 *P. chlororaphis* изучали на МПА и агаризованной среде Кинга В на 2-е сутки инкубации. На этих средах форма колоний круглая, поверхность гладкая. Профиль колоний выпуклый, край на МПА гладкий, на среде Кинга В – гладкий, изредка волнистый. Колонии блестящие, просвечивающиеся, пигментированные (жёлто-зелёный флюоресцирующий пигмент, диффундирующий в среду). Структура колоний однородная, консистенция слизистая. Диаметр колоний на среде Кинга В – 1-6 мм, на МПА – 1-5 мм.

5.2 Физиологические признаки перспективного штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis*

Для разработки регламента производства микробиопрепарата с высокой плотностью микробных клеток в сочетании с максимальной концентрацией антифунгальных веществ изучали физиологические признаки перспективного штамма-продуцента 14-3 *P. chlororaphis*: оптимальные источники углеродного и азотного питания, температура культивирования и кислотность среды.

Штамм выращивали на жидкой питательной среде Кинга В. Для определения оптимальной температуры, культивирование осуществляли при 20, 25, 30 и 35 °С. Максимальный титр был отмечен при 25-30 °С ($2,9-5,7 \times 10^{12}$ КОЕ/мл). Оптимальную кислотность среды устанавливали в пределах 3-10 путём добавления лимонной кислоты или щелочи (NaOH). Достаточно высокий титр ЖК штамма 14-3 *P. chlororaphis* отмечался при рН среды 5-10 (от $3,2 \times 10^{10}$ до $5,3 \times 10^{12}$ КОЕ/мл), при реакции среды 3 выживали лишь единичные клетки.

Для определения оптимальных источников углеродного и азотного питания штамм 14-3 *P. chlororaphis* выращивали при температуре 25 °С и рН среды 5. Источниками углерода служили глюкоза, сахароза, меласса и глицерин. Максимальный титр отмечен в вариантах с добавлением глюкозы, глицерина и сахарозы ($2,8-8,3 \times 10^{12}$ КОЕ/мл). Также высокий титр бактерии получен в варианте с мелассой ($2,1 \times 10^{10}$ КОЕ/мл). Источниками азота служили азотнокислый натрий, пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты. При добавлении кукурузного экстракта в среду наблюдалась полная гибель клеток. На питательной среде с добавлением азотнокислого натрия отмечен низкий титр штамма ($3,5 \times 10^3$ КОЕ/мл). Высокий титр штамма 14-3 *P. chlororaphis* наблюдался при использовании пептона и дрожжевого экстракта ($2,1-4,4 \times 10^{12}$ КОЕ/мл).

5.3 Взаимодействие штаммов-продуцентов микробиопрепаратов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis* с возбудителем фузариоза сои *F. sporotrichioides*

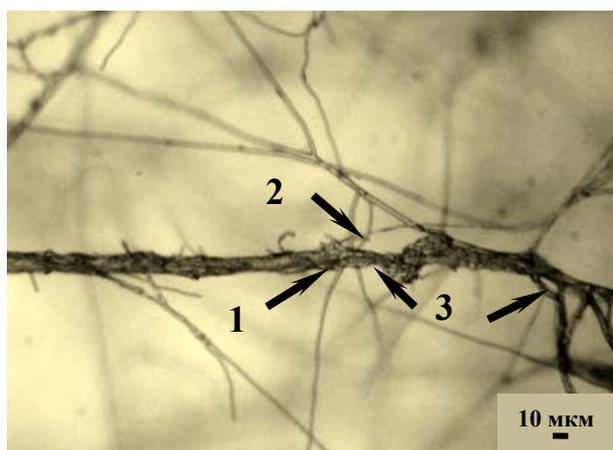
При совместном инкубировании штамма Хк-1 *Ch. olivaceum* и возбудителя фузариоза сои *F. sporotrichioides* на 4-е сутки произошло срастание колоний антагониста и патогена. Микрокопирование показало, что гифы антагониста активно оплетали гифы патогена. В зоне срастания наблюдалась агрегация мицелия патогена в тяжи, его потемнение, скручивание, деформация и усыхание (рисунок 2 А). На 7 – 10-е сутки происходила дальнейшая деградация мицелия патогена, разрастание зоны взаимодействия, где наблюдалось активное формирование плодовых тел антагониста (рисунок 2 Б). На 15-е сутки в зоне срастания отмечена полная гибель мицелия и разрушение хламидоспор патогена (рисунок 2 В), тогда как в контроле мицелий *F. sporotrichioides* имел нормальное развитие и активное спороношение (рисунок 2 Г).

Установлено, что штамм гриба-антагониста Хк-1 *Ch. olivaceum* не только препятствовал разрастанию колонии патогена, но и разрушал мицелий, а также препятствовал формированию спор, что говорит об антибиотическом действии антагониста. Факт гибели гиф возбудителя фузариоза без разрушения клеточных стенок и без внедрения в гифы патогена подтверждает антибиотическое действие антагониста, что соответствует проведённым ранее исследованиям с возбудителями белой гнили, фомопсиса и фузариоза подсолнечника [Маслиенко, 2005].

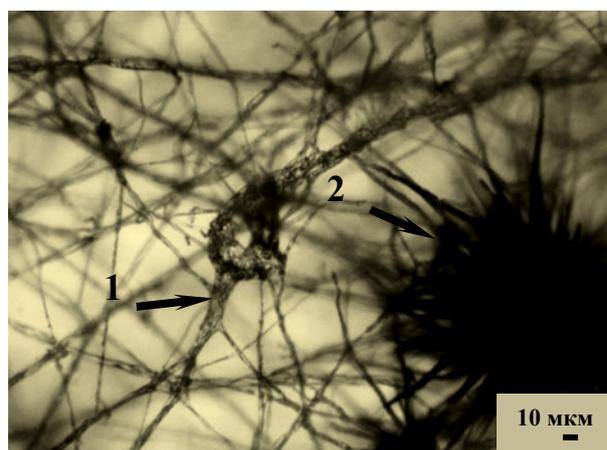
При совместной инкубации штамма 14-3 *P. chlororaphis* и возбудителя фузариоза сои *F. sporotrichioides* наблюдалась задержка в росте мицелия патогена, по сравнению с контролем, с образованием между ними антибиотической зоны. Вблизи зоны наблюдалось угнетение, частичный лизис и морфологические изменения мицелия патогенного гриба.

При микрокопировании мицелия патогена на 5-е сутки совместной инкубации наблюдалось нехарактерное интенсивное ветвление гиф (рисунок 3 А). Также отмечена задержка удлинения апикальных гиф, которые истончались к концу и отличались меньшим диаметром, тогда как в контроле мицелий имел нормальное развитие (рисунок 3 Б). На 7-е сутки отмечалась агрегация мицелия патогена в тяжи, отдельные тяжи скручивались в огромные бесформенные узлы (рисунок 3 В). На 10 – 15-е сутки вблизи антибиотической зоны наблюдалась деградация мицелия патогена. Отдельные гифы патогена в тяжах разрывались, вследствие чего происходил распад узлов и гибель мицелия (рисунок 3 Г). В контрольном варианте наблюдался нормальный рост и развитие мицелия гриба.

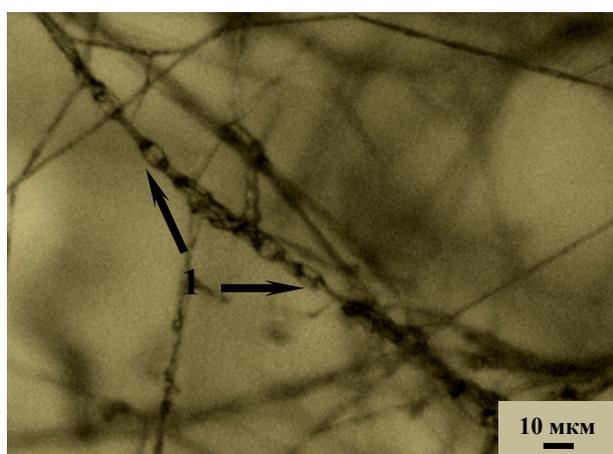
Установлено, что исследуемый бактериальный штамм 14-3 *P. chlororaphis* выделяет антибиотические вещества, под воздействием которых происходит ингибирование роста колонии патогена с образованием между ними пустой, «стерильной» зоны.



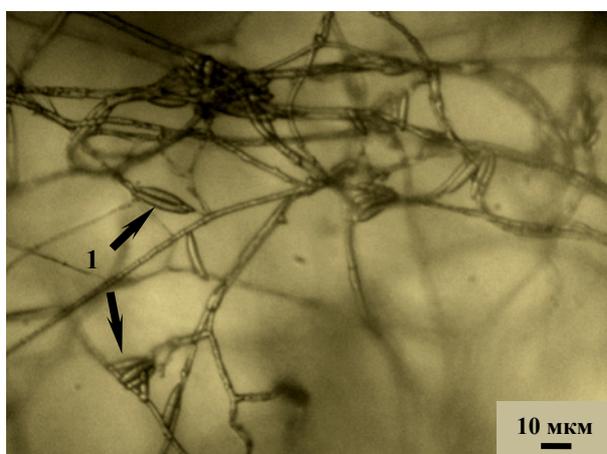
А



Б



В



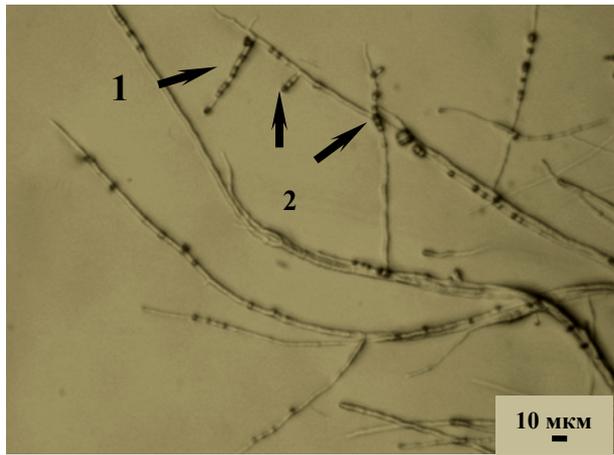
Г

Рисунок 2 – Мицелий возбудителя фузариоза сои *F. sporotrichioides* и антагониста Хк-1 *Ch. olivaceum* (ориг.):

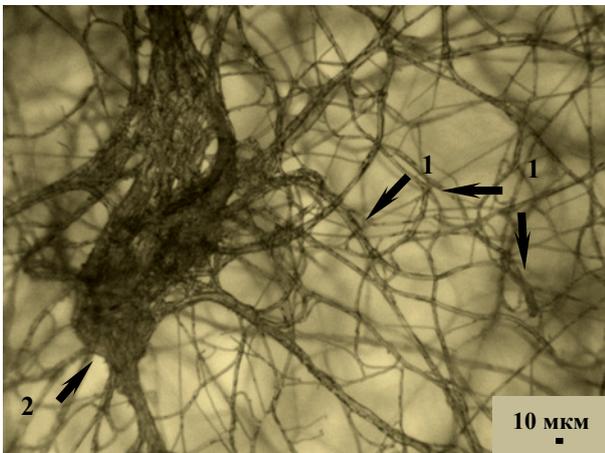
- А – оплетание гиф патогена (1) гифами антагониста (2), агрегация мицелия патогена в тяжи (3), а также его потемнение, скручивание, деформация и усыхание на 4-е сутки совместной инкубации;
- Б – дальнейшая деградация и гибель мицелия патогена (1), активное формирование плодовых тел антагониста (2) на 7 – 10-е сутки совместной инкубации;
- В – полная гибель мицелия и разрушение хламидоспор патогена (1) на 15-е сутки совместной инкубации;
- Г – контроль (без антагониста): нормальный рост и развитие мицелия *F. sporotrichioides* с активным спороношением (1).



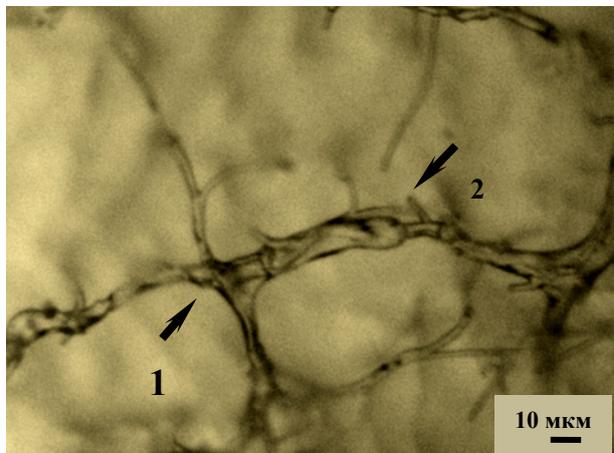
А



Б



В



Г

Рисунок 3 – Мицелий возбудителя фузариоза *F. sporotrichioides* на десятые сутки совместного культивирования совместно с 14-3 *P. chlororaphis* (ориг.):

А – контроль (без антагониста): нормальный рост и развитие мицелия *F. sporotrichioides*;

Б – нехарактерное интенсивное ветвление гиф мицелия патогена (1), задержка удлинения апикальных гиф (2) на 5-е сутки совместной инкубации;

В – агрегация мицелия патогена в тяжи (1), скручивание отдельных тяжей в огромные бесформенные узлы (2) на 7-е сутки совместной инкубации

Г – деградация мицелия патогена (1), разрыв отдельных гиф патогена в тяжах (2), и гибель мицелия на 10 – 15-е сутки совместной инкубации.

Антибиотическую активность штамма 14-3 *P. chlororaphis* к возбудителю фузариоза *F. sporotrichioides* определяли в зависимости от срока глубинного культивирования бактерии на жидкой среде Кинга В. Пробы для анализа брали через 8, 16, 24, 36, 48, 72 и 96 ч после начала культивирования. Действие антифунгальных веществ фильтрата жидкой культуры штамма антагани-

ста при культивировании в течение 8-48-и часов преодолевалось патогеном. Максимальная концентрация антибиотических веществ, которая оказывала стойкое сдерживающее действие на патоген, образовалась в культуральной жидкости бактериального штамма через 72-96 часов культивирования и сохранялась неизменной до конца эксперимента.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ МИКРОБИОПРЕПАРАТОВ

Разработка элементов технологии производства и применения микробиопрепаратов включает несколько этапов: подбор оптимальных питательных сред, установление сроков культивирования, определение совместимости микробиопрепаратов с перспективными фунгицидами с целью применения их в интегрированной системе защиты растений от комплекса болезней, определение эффективности микробиопрепаратов в полевых условиях на фоне естественного поражения патогенами.

6.1 Подбор оптимальных питательных сред для культивирования штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis*

Максимальный титр штамма 14-3 *P. chlororaphis* отмечен при культивировании на пептон-дрожжевой и среде Кинга В ($3,5-4,8 \times 10^{12}$ КОЕ/мл). Также хорошее развитие культура бактерии получила на среде Чапека для бактерий ($2,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл). На МПБ была получена ЖК с низкой плотностью бактериальных клеток ($2,9 \times 10^7$ КОЕ/мл).

6.2 Кинетика роста штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis* при глубинном культивировании

При изучении динамики периодического роста штамм 14-3 *P. chlororaphis* культивировали в течение четырёх суток. Пробы для анализа ЖК брали через 8, 16, 24, 36, 48, 72 и 96 ч от начала культивирования. Полученные нами экспериментальные данные по кинетике роста штамма 14-3 *P. chlororaphis* свидетельствуют о том, что длительность культивирования 36-48 часов для данной бактерии являются оптимальной. Образцы жидкой культуры биопрепарата в этот период характеризовались наиболее высоким титром ($1,6-1,7 \times 10^{13}$ КОЕ/мл).

6.3 Хранение лабораторных образцов микробиопрепарата на основе штамма-продуцента 14-3 *P. chlororaphis* в препаративной форме жидкая культура

Необходимость проведения исследований по изучению жизнеспособности бактериального штамма-продуцента 14-3 *P. chlororaphis* при различных способах хранения в лабораторных условиях вызвана чувствительностью микроорганизмов к условиям хранения.

В результате проведенных исследований установлено, что ЖК перспективного штамма 14-3 *P. chlororaphis* можно хранить в течение шести месяцев при переменных и при пониженных температурах без добавления питательных добавок и стабилизаторов (титр $4,7 \times 10^9$ - $7,1 \times 10^{11}$ КОЕ/мл), и в течение девяти месяцев с доступом воздуха при пониженной температуре (титр $1,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл).

6.4 Совместимость лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов с пестицидами, рекомендованными для применения на сое и перспективными инокулянтами

С целью возможного совместного применения разработанных лабораторных образцов микробиопрепаратов с фунгицидами, рекомендованных для применения на сое, и перспективными инокулянтами в интегрированной системе защиты сои от комплекса возбудителей болезней, определяли их совместимость.

Установлено, что штамм бактерии-антагониста 14-3 *P. chlororaphis* совместим со всеми испытанными фунгицидами, рекомендуемыми в настоящее время для обработки семян сои: ТМТД, ВСК (тирам, 400 г/л), Максим, КС (флудиоксонил, 25 г/л), Фундазол, СП, (беномил, 500 г/кг) и с инокулянтами: Нитрофикс, Ж; Нитрофикс, Ж + ProNoc, Нитрофикс, П; Оптимайз и Ризоторфин. Из всех испытанных фунгицидов, грибной штамм Хк-1 *Ch. olivaceum* оказался частично совместим с ТМТД, ВСК (тирам, 400 г/л), который оказывал на него незначительное ингибирующее действие. Препараты Максим, КС (флудиоксонил, 25 г/л) и Фундазол, СП, (беномил, 500 г/кг) существенно задерживали рост гриба-продуцента, что исключает их совместное применение. Из испытанных инокулянтов штамм Хк-1 совместим с Нитрофикс, П и Ризоторфин, частично – с Оптимайз и Нитрофикс, Ж. Полученные данные позволяют использовать совместимые варианты в интегрированной защите сои.

6.5 Определение эффективности применения лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis* на фоне естественного поражения фузариозом в полевых условиях

Погодные условия вегетационного периода 2008 года сложились благоприятно для культуры сои и для грибов рода *Fusarium*, что вызвало массовое поражение растений (таблица 7).

Во всех вариантах биологическая эффективность опытных образцов микробиопрепаратов была выше, чем химического эталона. На фоне поражения сои сорта Альба фузариозом в контроле 49,1 %, биологическая эффективность штаммов 14-3 *P. chlororaphis* и Хк-1 *Ch. olivaceum* составила 25,7-28,7 % соответственно, при эффективности ТМТД, ВСК 10,8 %. Поражение сои сорта Ника фузариозом в контроле составило 78,8 %. На этом фоне биологическая эффективность штаммов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3

P. chlororaphis составила 10,9-11,5 % соответственно, при нулевой эффективности химического эталона.

Таблица 7 – Биологическая эффективность обработки семян сои лабораторными образцами микробиопрепаратов против фузариоза в полевых условиях, ВНИИМК, 2008 г.

Вариант	Норма расхода, л/т	Поражено фузариозом (2+3 балл), %	Биологическая эффективность, %	Урожайность, т/га	Сохранённый урожай, т/га
сорт Альба					
Контроль, б/о	-	49,1	-	1,64	-
ТМТД, ВСК, эталон	6,0	43,8	10,8	1,77	0,13
14-3 <i>P. chlororaphis</i>, ЖК	2,0	36,5	25,7	1,79	0,15
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i>, ВС	3,0	35,0	28,7	1,79	0,15
НСР ₀₅				0,13	
сорт Ника					
Контроль, б/о	-	78,8	-	1,36	-
ТМТД, ВСК, эталон	6,0	83,5	0	1,38	0,02
14-3 <i>P. chlororaphis</i>, ЖК	2,0	69,7	11,5	1,58	0,22
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i>, ВС	3,0	70,2	10,9	1,80	0,44
НСР ₀₅				0,11	

6.6 Производственные испытания лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе штаммов-продуцентов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis*

В полевом производственном опыте в ООО «Кубрис» Красноармейского района Краснодарского края на фоне отсутствия поражения посевов сои фузариозом и другими болезнями установлено положительное влияние обработки семян опытными образцами микробиопрепаратов на полевую всхожесть за счёт снижения семенной инфекции и защиты от почвенной, а также на урожайность (таблица 8).

Полевая всхожесть семян сои, обработанных лабораторными образцами микробиопрепаратов, составила 72,6-75,2 %, что не уступало химическому эталону ТМТД, ВСК и превышало всхожесть в контрольном варианте на 23,5-26,1 %. При обработке семян Нитрофиксом, Ж всхожесть семян сои была ниже, чем в контроле. Установлено положительное влияние обработки семян сои опытными образцами микробиопрепаратов и эталоном на урожайность. Сохранённый урожай в вариантах с лабораторными образцами микробиопрепаратов составил 0,12-0,30 т/га, с эталоном – 0,28 т/га. В варианте с обработкой семян одним инокулянтом Нитрофикс, Ж урожайность была на уровне контроля.

Таблица 8 – Влияние обработки семян сои сорта Вилана опытными образцами микробиопрепаратов на всхожесть и урожайность, Красноармейский район, ООО «Кубрис», 2011 г.

Вариант	Норма расхода, л/т	Всхожесть, %	Урожайность, т/га	Сохранённый урожай, т/га
Контроль	-	49,1	1,44	-
ТМТД, ВСК, эталон + Нитрофикс, Ж	6,0+6,0	73,6	1,72	0,28
Нитрофикс, Ж	6,0	44,3	1,40	0
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	3,0	73,2	1,58	0,14
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС + Нитрофикс, Ж	3,0+6,0	75,2	1,74	0,30
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК + Нитрофикс, Ж	2,0+6,0	72,6	1,56	0,12
НСР ₀₅			0,21	

Примечание: Ж – жидкий инокулянт.

В полевом производственном опыте на Армавирской опытной станции ВНИИМК также не отмечено поражения растений сои фузариозом и другими болезнями в течение вегетации, при этом установлено положительное влияние обработки семян опытными образцами микробиопрепаратов на всхожесть и урожайность (таблица 9).

Таблица 9 – Влияние обработки семян сои сорта Альба опытными образцами микробиопрепаратов на всхожесть и урожайность, Армавирская ОС ВНИИМК, 2011 г.

Вариант	Норма расхода, л/т	Всхожесть, %	Урожайность, т/га	Сохранённый урожай, т/га
Контроль	-	52,7	1,80	-
ТМТД, ВСК, эталон	6,0	75,5	1,80	0
Хк-1 <i>Ch. olivaceum</i> , ВС	3,0	61,1	1,97	0,17
14-3 <i>P. chlororaphis</i> , ЖК	2,0	60,7	1,85	0,05

Максимальная всхожесть семян отмечена в варианте с химическим эталоном ТМТД, ВСК (75,5 %), что превышало контроль на 22,8 %. В вариантах с опытными образцами микробиопрепаратов всхожесть семян также была выше, чем в контроле (61,1-60,7 %) и превышала контроль на 8,0-8,4 %. Установлено ростостимулирующее и защитное действие лабораторных образцов микробиопрепаратов – сохранённый урожай составил 0,05-0,17 т/га, при урожайности в эталоне равной контролю.

Производственные испытания, проведённые в двух районах Краснодарского края показали, что на фоне отсутствия поражения сои фузариозом и другими болезнями установлено положительное влияние обработки семян лабораторными образцами микробиопрепаратов на урожайность за счёт снижения семенной инфекции и защиты от почвенной, а также ростостимулирующего действия.

6.7 Экономическая эффективность применения лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов-продуцентов

Оценку экономической эффективности обработки семян сои опытными образцами микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis* определяли на ЦЭБ ВНИИМК по экономическим параметрам 2012 года.

При ориентировочной стоимости одного литра опытного образца микробиопрепарата 120 рублей условный чистый доход на 1 га у опытного образца микробиопрепарата на основе штамма-продуцента Хк-1 *Ch. olivaceum* составил 2753,8 рублей (при норме расхода 3,0 л/т), рентабельность обработки – 454,3 %, окупаемость – 4,5 раза; у опытного образца микробиопрепарата на основе штамма-продуцента 14-3 *P. chlororaphis* условный чистый доход на 1 га составил 1530,2 рублей (при норме расхода 2,0 л/т), рентабельность обработки – 278,3 %, окупаемость – 2,8 раза. Тогда как условный чистый доход при обработке семян сои химическим фунгицидом ТМТД, ВСК с нормой расхода 6,0 л/т на 1 га составил 811,3 рублей, рентабельность – 129,0%, окупаемость – 1,3 раза.

ВЫВОДЫ

1. Уточнён видовой состав возбудителей фузариоза сои и их распространённость в центральной зоне Краснодарского края в 2007-2009 гг. Доминирующая группа представлена тремя видами: *F. sporotrichiella* (частота встречаемости 40,5 %), *F. oxysporum* (28,0 %) и *F. moniliforme* (12,5 %).

2. Разработана и апробирована 4-балльная шкала визуальной оценки степени поражения растений сои фузариозом в полевых условиях.

3. Изучена вредоносность фузариоза сои. Максимальное поражение (3 балла) приводило к уменьшению числа бобов на 62,0 %, числа семян – на 86,2 %, массы семян с одного растения – на 70,3 %, массы 1000 семян – на 16,3 %.

4. В результате скрининга из коллекции антагонистов фитопатогенов лаборатории биометода ВНИИМК отобраны два наиболее эффективных штамма: Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis*, обеспечивающие эффективную защиту семян и проростков сои на жёстком фоне искусственного заражения фузариозом во влажной камере (52,2-59,0 %), в почве (20,3-33,9 %), а также в полевых условиях (25,7-28,7 %), активно колонизирующие корень (40,0-80,0 %), одновременно оказывая ростостимулирующее влияние на растения.

5. Установлены оптимальные условия культивирования для штамма-продуцента 14-3 *P. chlororaphis*: t – 25-30 °С, рН – 5-10. При производстве микробиопрепарата на основе штамма 14-3 *P. chlororaphis* в качестве источников угле-

родного питания можно использовать глюкозу, сахарозу, глицерин и мелассу; в качестве источников азотного питания – дрожжевой экстракт и пептон.

6. Изучены механизмы действия штаммов-продуцентов микробиопрепаратов Хк-1 *Ch. olivaceum* и 14-3 *P. chlororaphis* в отношении фитопатогенного гриба *F. sporotrichioides*: для обоих штаммов характерен синтез антибиотических веществ, сопровождающийся разрушением мицелия патогена на 7-10 сутки.

7. Определён оптимальный срок глубинного культивирования штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis* – 72 часа (с учётом синтеза максимальной концентрации антибиотических веществ) с титром $1,8 \times 10^{12}$ КОЕ/мл.

8. Подобраны оптимальные питательные среды для культивирования штамма 14-3 *P. chlororaphis*: пептон-дрожжевая ($4,8 \times 10^{12}$ КОЕ/мл), среда Кинга В ($3,5 \times 10^{12}$ КОЕ/мл) и Чапека для бактерий ($2,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл).

9. Установлены оптимальные сроки хранения препаративной формы ЖК штамма-продуцента микробиопрепарата 14-3 *P. chlororaphis*: в течение шести месяцев при переменных и пониженных температурах без добавления питательных добавок и стабилизаторов ($4,7 \times 10^9$ - $7,1 \times 10^{11}$ КОЕ/мл), и в течение девяти месяцев с доступом воздуха при пониженной температуре ($1,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл).

10. Установлена совместимость опытных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов-продуцентов с рядом пестицидов и инокулянтов. Штамм-продуцент 14-3 *P. chlororaphis* совместим со всеми испытанными перспективными фунгицидами и инокулянтами: ТМТД, ВСК; Максим, КС; Фундазол, СП; Нитрофикс, Ж; Нитрофикс, П; Ризоторфин и Оптимаиз, тогда как штамм-продуцент Хк-1 *Ch. olivaceum* совместим с Нитрофиксом, П и Ризоторфином, частично – с Оптимаизом и ТМТД, ВСК, что позволяет использовать совместимые варианты в интегрированной защите сои.

11. Биологическая эффективность опытных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов 14-3 *P. chlororaphis* и Хк-1 *Ch. olivaceum* в полевых условиях в год проявления фузариоза составляла 10,9-28,7 % при максимальной эффективности химического эталона ТМТД, ВСК 10,8 %. Сохранённый урожай при применении опытных образцов микробиопрепаратов, вне зависимости от погодных условий и степени поражения растений сои болезнями, составил 0,11-0,44 т/га, тогда как у химического эталона ТМТД, ВСК не превышал 0,02-0,13 т/га.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве продуцентов микробиопрепаратов полифункционального типа действия использовать перспективные штаммы Хк-1 *Chaetomium olivaceum* Cooke et Ellis и 14-3 *Pseudomonas chlororaphis*.

2. Для снижения вредоносности фузариоза на сое предлагается проводить обработку семян микробиопрепаратами полифункционального типа действия на основе перспективных штаммов-продуцентов Хк-1 *Ch. olivaceum* (препаративная форма ВС, норма расхода 3,0 л/т) и 14-3 *P. chlororaphis* (препаративная форма ЖК, норма расхода 2,0 л/т). Расход рабочей жидкости 4,0 л/т.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Маслиенко, Л.В. Первичный скрининг штаммов грибов и бактерий антагонистов к возбудителю фузариоза сои / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова, А.М. Асатунова [и др.] // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2009. – Вып. № 1 (140). – С. 114-119.

2. Маслиенко, Л.В. Влияние лабораторных образцов биопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов фитопатогенов на проростки сои / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова, А.М. Асатунова [и др.] // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2010. – Вып. № 1 (142-143). – С. 104-108.

3. Курилова, Д.А. Вредоносность фузариоза сои в зависимости от степени поражения растений / Д.А. Курилова // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2010. – Вып. № 2 (144-145). – С. 84-89.

4. Маслиенко, Л.В. Влияние микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов возбудителей фузариоза на культуру сои в полевых условиях / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова, Е.Ю. Шипиевская [и др.] // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2011 г. – Вып. № 2 (148-149). – С. 145-148.

5. Маслиенко, Л.В. Разработка микробиологического метода снижения вредоносности фузариоза на сое / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИ маслич. культур. – Краснодар, 2012 г. – Вып. № 2 (151-152). – С. 167-174.

Публикации в прочих изданиях

6. Курилова, Д.А. Патогенные свойства изолятов грибов рода *Fusarium* выделенных с растений сои / Д.А. Курилова // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: материалы I Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых (14-16 ноября 2007 г.) – Краснодар, 2007. – С. 95 - 96.

7. Курилова, Д.А. Симптомы проявления фузариоза и видовой состав грибов рода *Fusarium* на сое в центральной зоне / Д.А. Курилова // Современное состояние и приоритеты развития фундаментальных наук в регионах: труды V Всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов (1-5 октября, 2008 г.). – Краснодар, 2008. – С. 73-74.

8. Маслиенко, Л.В. Скрининг штаммов грибов и бактерий – антагонистов возбудителей фузариоза сои / Л.В. Маслиенко, Д.А. Курилова, А.М. Асатунова [и др.] // XII съезд товарищества микробиологов Украины им. С.М. Виноградского: тезисы докладов (25-30 мая 2009 г.). – Ужгород, 2009. – С. 389.

9. Курилова, Д.А. Отбор перспективных штаммов грибов и бактерий, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенным на сое грибам рода *Fusarium* / Д.А. Курилова, Л.В. Маслиенко, А.М. Асатунова [и др.] // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: материалы

IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых (24-26 ноября 2010 г.) – Краснодар, 2010. – С. 95 - 96.

10. **Курилова, Д.А.** Создание искусственного фона заражения почвы в лабораторных условиях для определения эффективности перспективных штаммов антагонистов возбудителей фузариоза сои / Д.А. Курилова // Сборник материалов 6-й Международной конференции молодых учёных и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур», посвящённой 125-летию со дня рождения В.С. Пустовойта (24-25 февраля 2011 г.) – Краснодар, 2011.

11. **Курилова, Д.А.** Физиологические признаки перспективного штамма 14-3 *Pseudomonas chlororaphis* – продуцента микробиопрепарата для защиты сои от фузариоза / Д.А. Курилова, Л.В. Маслиенко // Сборник материалов IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», (22-25 сентября 2011 г.) – Ростов-на-Дону, 2011 г. – С. 25.

12. Маслиенко, Л.В. Бактериальный штамм 14-3 *Pseudomonas sp.* – продуцент микробиопрепарата для защиты сои от фузариоза / Л.В. Маслиенко, **Д.А. Курилова** // Современная микология в России. Третий съезд микологов России. Тезисы докладов. – Москва, 2012. – С. 345.

13. **Курилова, Д.А.** Эффективность перспективных штаммов-продуцентов микробиопрепаратов против фузариоза сои на фоне искусственного заражения в лабораторных условиях сои / Д.А. Курилова // Сборник материалов 7-й Международной конференции молодых учёных и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки масличных культур», посвящённой 100-летию со дня основания ВНИИМК (19-21 февраля 2013 г.) – Краснодар, 2013. – С. 109-113.

Подписано в печать 01.11.2013. Заказ № 13298.
Формат 60x84_{1/16}. Уч.-изд. л. 1. Тираж 100 экз.
Бумага Maestro. Печать трафаретная.

Отпечатано в типографии ООО «Просвещение-Юг»
с оригинал-макета заказчика.
г. Краснодар, ул. Селезнева, 2. Тел. 239-68-30.