

На правах рукописи

РЕВКОВА МАРИЯ АНДРЕЕВНА

**АГРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЗАЩИТЫ
ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ОТ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ В ЦЧР**

**Шифр и наименование специальности:
06.01.07. - защита растений**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург - Пушкин
2011**

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Россельхозакадемии.

Научный руководитель: академик Россельхозакадемии, доктор сельскохозяйственных наук, профессор
Долженко Виктор Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Джалилов Февзи-Сеид Умерович
кандидат сельскохозяйственных наук
Здрожевская Светлана Дмитриевна

Ведущее учреждение: Федеральное Государственное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений МСХ РФ

Защита диссертации состоится " 1 " июля 2011 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета, шифр Д 006.015.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3.

Факс: (812)4705110

e-mail: vizrspb@mail333.com; web-site: <http://vizrspb.narod.ru>

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

Автореферат разослан " " мая 2011 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.А. Наседкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ячмень – одна из ведущих культур в зерносеющих районах страны, использующийся в пищевой промышленности, пивоварении.

В сложившейся в Центрально-Черноземном регионе в последнее время ситуации ячмень ежегодно подвергается активному воздействию со стороны – комплекса патогенов, вызывающих корневые гнили.

Возбудители корневых гнилей зерновых, передаваемые семенами, могут уже на ранних стадиях снижать всхожесть семян. При большой доле зерновых в севообороте вредоносность корневых гнилей возрастает. Выпады от корневых гнилей могут достигать 40-60%. Корневые гнили зерновых чрезвычайно быстро прогрессируют по причине нарушения агротехники, особенно севооборотов, отсутствия устойчивых сортов.

При этом одним из основных способов ограничения болезни является химическое обеззараживание семян, позволяющее резко снизить потери и повысить качество посевного материала.

Цель и задачи исследований. Целью работы является определение эффективности новых протравителей против корневых гнилей ячменя ярового в ЦЧР и обоснование возможности диагностики их возбудителей молекулярно-генетическими методами. Для реализации цели научной работы были поставлены следующие задачи:

- уточнение видового состава и доминирующих патогенов, вызывающих корневые гнили ячменя;
- определение возможности использования молекулярно-генетических методов для идентификации видов возбудителей корневых гнилей ярового ячменя;
- оценка патогенности возбудителей корневых гнилей ярового ячменя;
- оценка биологической эффективности современных фунгицидов для предпосевной обработки семян для защиты ярового ячменя от возбудителей корневых гнилей в зависимости от сорта и сроков сева;
- разработка регламентов применения фунгицидов для защиты ярового ячменя от возбудителей корневых гнилей в условиях ЦЧР.

Научная новизна работы. Уточнен видовой состав возбудителей болезней ярового ячменя и определен доминантный вид (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.)), в условиях ЦЧР, выявлен ранее не описанный на территории России гриб *Fusarium nygamai* (Burgess et Trimboli). Использование ПЦР-анализа позволило установить, что гриб *Fusarium oxysporum* Schltdl. является основным патогеном, вызывающим фузариозную корневую гниль ячменя в Воронежской области. Изучена биологическая эффективность предпосевной обработки семян ячменя такими фунгицидами, как Раксил, КС (60 г/л тебуконазола); Террасил Форте, КС (80 г/л тебуконазола + 80 г/л флутриафола), Стингер Трио, КС (80 г/л тиабендазола + 60 г/л тебуконазола + 60 г/л имазалила), Грандсил, КС (60 г/л тебуконазола), Скарлет, МЭ (100 г/л имазалила + 60 г/л тебуконазола). Установлено, что в условиях региона лучшую биологическую эффективность обеспечивали двухкомпонентные препараты Террасил Форте, КС и Скарлет, МЭ.

Практическая ценность работы. Установлена целесообразность использования ПЦР для быстрой и качественной идентификации возбудителей корневых гнилей ячменя. Показано, что в условиях ЦЧР основным возбудителем корневой гнили ярового ячменя является гриб *B. sorokiniana* и наиболее эффективные фунгициды Террасил Форте, КС и Скарлет, МЭ. Предложены агробиологические регламенты эффективного и безопасного применения фунгицидов для защиты ярового ячменя от корневых гнилей в условиях ЦЧР.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на научной конференции профессорско-преподавательского состава (Санкт-Петербург, СПбГАУ, 29-30 января 2009 г.), на научной сессии ВИЗР (ВИЗР, 2010 г.); конференции молодых ученых и аспирантов «Генетические ресурсы растений и селекция» (Санкт-Петербург, 2010), на Круглом столе «Применение новых видов удобрений и средств защиты в обеспечении устойчивого развития растениеводческих отраслей АПК» (Санкт-Петербург, Агрорусь-2010, 25 августа 2010 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 182 страницах, включая 38 таблиц и 15 рисунков. Работа состоит из введения, 5 разделов, выводов, рекомендаций и списка литературы, включающего 188 названия, в том числе 40 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Введение

Во введении работы обоснована актуальность использования химического метода борьбы с корневыми гнилями на посевах ярового ячменя. Сформулированы цель и задачи исследований.

1. Основные возбудители корневых гнилей ярового ячменя в ЦЧР и современные средства и технологии борьбы с ними (обзор литературы)

Проанализированы способы агротехники ячменя ярового, позволяющие возделывать его в условиях Центрально-Черноземного региона. Приведены сведения о корневых гнилях, в частности, о составе патогенного комплекса, его распространении и вредоносности. Также приведены сведения об использовании ПЦР-диагностики с целью идентификации возбудителей корневых гнилей из рода *Fusarium*.

Приведены способы борьбы с данным заболеванием и современный ассортимент фунгицидов для применения на посевах зерновых культур. Проведенный анализ литературы позволяет определить актуальное направление исследований на основе изучения биологических и экотоксикологических аспектов применения фунгицидов в посевах ярового ячменя в Центрально-Черноземном регионе РФ.

2. Материалы, место и методы исследований

Работа выполнена в 2008-2010 г.г.

Лабораторные опыты проводили в ГНУ ВИЗР, в Центре биологической регламентации использования пестицидов.

Выделение фитопатогенных грибов в чистую культуру проводили по общепринятым методикам (Наумов, 1937; Билай, 1973; Горленко, 1974; Хохряков,

1976) из собранных в полевых условиях пораженных корней ячменя ярового путем посева изучаемого материала на агаризованные питательные среды.

Нами была изучена патогенность *B. sorokiniana*, видов р. *Fusarium* – *F. solani*; *F. equiseti*; *F. oxysporum*. Инокулюм патогена получали на стерилизованных зернах овса. (Paravizas, 1965). Семена ячменя сортов Гонар и Таловский 9, полученных из урожая предыдущего года при двух сроках сева: раннем и оптимальном, в 4-х кратной повторности высевали в вазоны. В опыте учитывали всхожесть семян, степень пораженности корневой системы.

После проведения учетов, зараженные части корней поверхностно стерилизовали и раскладывали на питательную агаризованную среду для подтверждения заражения растений исследуемым патогеном.

Патогенность вышеописанных изолятов определяли на зернах ячменя по модифицированной методике Челковского и Манки (Chelkowski, Mankam 1983). Поверхностно стерилизованные 70%-м спиртом зерна ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9 замачивали на сутки в стерильной воде, и затем зерна раскладывали на поверхности культуры гриба, выращенной в течение одной недели на КСА. В контроле зерна раскладывали на поверхность агаризованной среды. Через неделю инкубации в темноте при температуре 23-25°C учитывали длину появившихся проростков и их поражение. Снижение длины ростков под воздействием гриба оценивали в процентах к средней длине ростков в контроле.

Первичную оценку фунгицидности препаратов проводили по методике Субханкулова А.А. (1966 г.).

Навеску препарата вводили после автоклавирования в расплавленную среду и тщательно перемешивали. На поверхность застывшей среды с фунгицидом помещали диск диаметром в 5 мм, вырезанный из чистой 7-ми дневной культуры соответствующего гриба, выращенной на среде без внесения препаратов. Контролем служили чашки без внесения препарата. Для определения активности фунгицидов на рост грибов проводили измерение диаметров колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях и вычисляли средний диаметр.

Степень подавления роста грибов выражали в процентах и вычисляли по формуле Аббота: $X = (a - b) * 100 / a$, где a – диаметр колонии в мм в контроле; b – диаметр колонии в чашках с препаратами. Концентрацию препаратов выражали в мг/л среды (частей на миллион) в пересчете на действующее вещество. Расчет концентраций проводили по суммарному фунгицидному началу.

Для идентификации грибов рода *Fusarium* был использован метод ПЦР-диагностики.

Метод RAPD (Williams et al., 1999) основан на амплификации фрагментов ДНК организма в ПЦР со случайными короткими (10 п. н.) олигонуклеотидами (праймерами) с последующим фракционированием амплифицированных фрагментов ДНК в гелях. Для RAPD-анализа достаточно очень малого количества ДНК (измеряемого в нг), не требующего дополнительной очистки.

УП-ПЦР метод, разработанный одновременно с RAPD (Булат, Мироненко, 1989, 1996), в общих чертах сходный с RAPD, был впервые использован для

анализа популяций мицелиального фитопатогенного гриба *Cochliobolus sativus* (Булат, Мироненко, 1989, 1993), он пригоден также для анализа популяций любых других грибов.

Объектом исследования являлись изоляты грибов рода *Fusarium*, выделенные из корневой системы ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9, имеющих симптомы заболевания корневой гнилью. Растения выращены в Таловском районе Воронежской области в 2009-2010 гг. В результате было отобрано 35 изолятов грибов рода *Fusarium*. Для уточнения видового состава был проведен ПЦР-анализ с использованием методов УП-ПЦР и RAPD.

Всего в исследованиях было проанализировано 46 изолятов грибов рода *Fusarium*: *F. oxysporum* (38 шт.), *F. solani* (3 шт.) и изоляты по предварительной морфологической идентификации отнесенные к комплексу видов грибов *Gibberella fujikuroi* (5 шт.). Из них в качестве тестовых объектов были использованы референтные изоляты из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР: 5 изолятов *F. oxysporum*, 3 изолята *F. nygamai*, 2 изолята *F. solani*.

Для изучения действия фунгицидов на корневые гнили в посевах ярового ячменя были использованы следующие препараты на основе тебуконазола:

1. Раксил, КС (60 г/л тебуконазола), норма расхода 0,5 л/т;
2. Террасил Форте, КС (80 г/л тебуконазола + 80 г/л флутриафола), норма расхода 0,5 л/т;
3. Стингер Трио, КС (80 г/л тиабендазола + 60 г/л тебуконазола + 60 г/л имазапила), норма расхода 0,5 л/т;
4. Грандсил, КС (60 г/л тебуконазола), норма расхода 0,5 л/т;
5. Скарлет, МЭ (100 г/л имазапила + 60 г/л тебуконазола) норма расхода 0,4 л/т.

Полевые опыты с фунгицидами проводили в соответствии с «Методическими указаниями по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве» (2009). При работе с препаратами следовали «Инструкции по технике безопасности при хранении и применении пестицидов в сельском хозяйстве» (1985).

Опыты по изучению биологической эффективности фунгицидов проводили в селекционном севообороте ГНУ Воронежский НИИСХ им. В.В. Докучаева (Воронежская область) на посевах ярового ячменя сортов Гонар и Таловский 9.

В опытах площадь делянки составляла 2 м². Каждый вариант был представлен 4 повторностями. Расположение делянок в опытах было рендомизированное. В качестве контроля использовались необработанные фунгицидом семена.

Протравливали семенной материал в стеклянных колбах. Расход рабочей жидкости составил 10 л/т. Исследовалось два срока сева: ранний и оптимальный. Фон естественный, предшественник – пар.

3. Возбудители болезней, вызывающие корневые гнили ярового ячменя в условиях Центрально-Черноземного региона

3.1 Влияние фунгицидов на возбудителей корневых гнилей ярового ячменя

В результате проведенных исследований установлено, что микобиота семян ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9 представлена одним и тем же на-

бором видов в составе *B. sorokiniana*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp. Общая зараженность семян при этом постоянно была выше (64,0% против 50,3%) у сорта Гонар. Преобладающую роль в патогенном комплексе занимал гриб *B. sorokiniana* – 41,0%. Процент поражения *Alternaria* spp. составлял около 13,0%, *Rhizopus* spp. – 5,7%; *Fusarium* spp. – 4,3%. По сорту Таловский 9 распределение в заспорении по видам и родам грибов соответствовало: по *B. sorokiniana* – 19,7%, *Alternaria* spp. – 19,0%, *Rhizopus* spp. – 8,3% и *Fusarium* spp. – 3,3%.

По итогам фитоэкспертизы семян определено, что в среднем по двум сортам лучший эффект по ограничению присутствия инфекции на семенах получен при использовании препарата Террасил Форте, КС (рис.1). Практически не уступал ему, в том числе и по результативности в спектре действия, Грандсил, КС. Чувствительность инфекции грибов *B. sorokiniana*, грибов рода *Fusarium*, была минимальной в варианте с препаратом Раксил, КС: 22,0% и 6,0% выделенных грибов соответственно. Против грибов рода *Alternaria* наименьший эффект был получен в варианте с препаратом Стингер Трио, КС – 12,0%, против грибов рода *Rhizopus* – в вариантах с препаратами Грандсил, КС, Скарлет, МЭ, Террасил Форте, КС – по 5,0%.

Фитопатологический анализ корней пораженных растений показал, что, независимо от принадлежности исследуемого материала к сортам и срокам сева, основу комплекса возбудителей составляют следующие виды: *B. sorokiniana*, грибы рода *Fusarium* и грибы рода *Alternaria*. Причем патогенный вид *B. sorokiniana* преобладал во всех опытных вариантах при первом учете в фазу кущения (рис. 2, 3). Количество пораженных корней в контрольном варианте на сорте Гонар при двух сроках сева было выше: 54,4%(ранний срок сева), 59,8% (оптимальный срок сева), чем на сорте Таловский 9 – 34,6% (40,6%) соответственно. С признаками поражения фузариумами на сорте Гонар приходилось в то же время всего 6,5% (ранний срок сева), 16,1% (оптимальный срок сева), на сорте Таловский 9 - 13,2% (11,9%) соответственно; альтернарией на сорте Гонар - 6,8% (ранний срок сева), 14,8% (оптимальный срок сева),

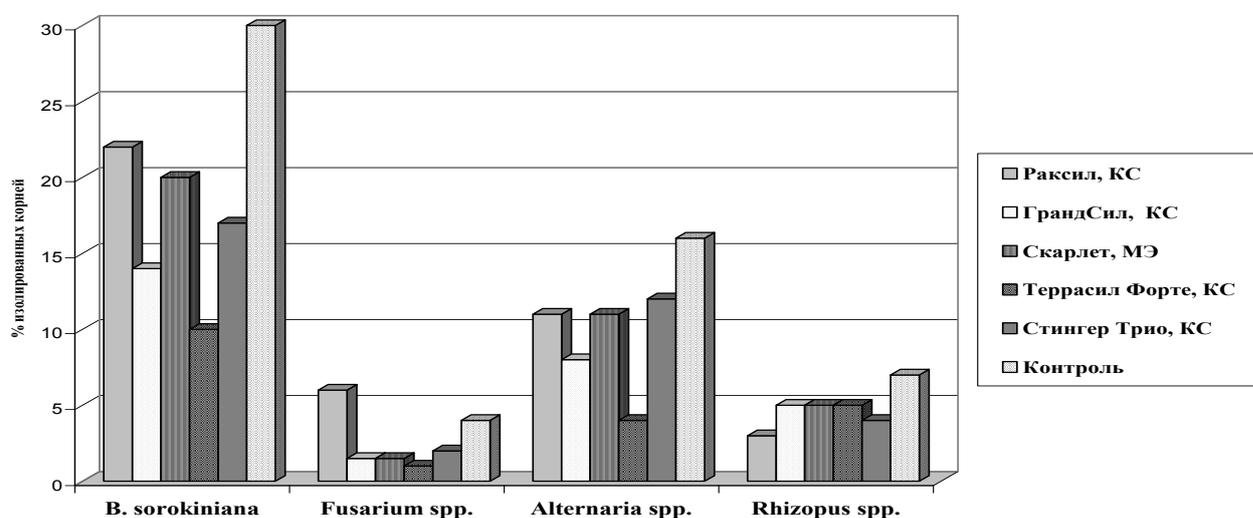


Рис. 1 Фитоэкспертиза семян ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9 (2008-2010 гг.)

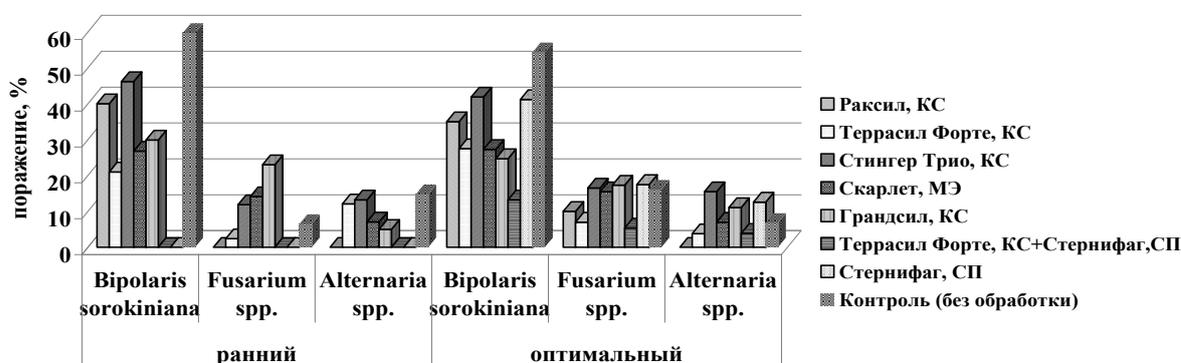


Рис. 2 Влияние фунгицидов на возбудителей корневых гнилей ячменя ярового сорта Гонар (2008-2010 гг.)

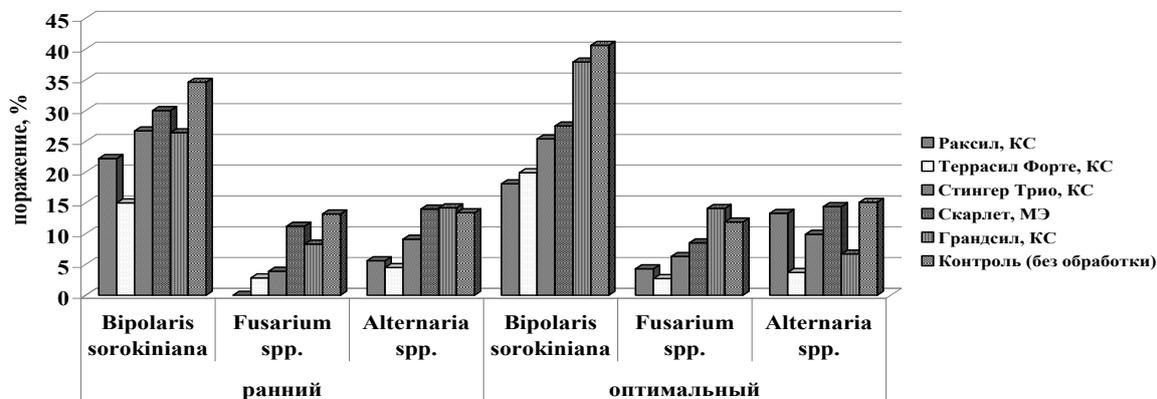


Рис. 3 Влияние фунгицидов на возбудителей корневых гнилей ячменя ярового сорта Таловский 9 (2008-2010 гг.)

на сорте Таловский 9 13,4% (15,1%) соответственно.

Нами установлено, что к фазе полной спелости отмечены количественные изменения в патогенном комплексе видов (табл. 1 и 2). На фоне общего повышения объема пораженных корней до 99,9% на сорте Гонар доля грибов из рода *Fusarium* увеличилась более чем в 3 раза и составила 42,0%, *B. sorokiniana* снизилась до 50,0% и по *Alternaria* spp. – уменьшилась до 4,0%.

Таблица 1

Результаты фитопатологического анализа корней ячменя ярового на сорте Гонар в разные фазы развития культуры (2009 г.)

Вид патогена	кущение		восковая спелость		полная спелость	
	сроки сева					
	ранний	оптимальный	ранний	оптимальный	ранний	оптимальный
общий % изолированных грибов	80,0	85,3	85,8	91,4	99,9	96,0
<i>B. sorokiniana</i>	55,8	70,5	42,9	48,4	56,0	50,0
<i>Fusarium spp</i>	8,7	10,0	31,0	31,7	32,0	42,0
<i>Alternaria spp.</i>	15,5	4,8	11,9	11,3	11,0	4,0

Таблица 2

Результаты фитопатологического анализа корней ярового ячменя на сорте Таловский 9 в разные фазы развития культуры (2009 г.)

Вид патогена	кущение		восковая спелость		полная спелость	
	сроки сева					
	ранний	оптимальный	ранний	оптимальный	ранний	оптимальный
общий % изолированных грибов	83,2	78,5	86,9	91,2	98,0	97,0
<i>B. sorokiniana</i>	45,7	48,2	47,2	52,8	31,0	21,0
<i>Fusarium spp</i>	17,5	13,4	26,1	26,4	63,0	74,0
<i>Alternaria spp.</i>	20,0	16,9	13,6	12,0	4,0	2,0

Аналогичные изменения были зафиксированы и на сорте Таловский 9: при общем поражении корней до 98,0%, наличие возбудителей из рода *Fusarium* возросло до 74,0%, количество патогенного вида *B. sorokiniana* снизилось более чем в два раза – до 21,0%; пораженность корней грибами из рода *Alternaria* снизилась до 2,0%.

По итогам фитопатологического анализа корней определено, что в среднем по двум сортам лучший эффект по ограничению количества пораженных корней был достигнут при использовании препарата Террасил Форте, КС. Практически не уступали ему, в том числе и по результативности в спектре действия, Грандсил, КС и Скарлет, МЭ. Чувствительность гриба *B. sorokiniana*, на двух сортах была выше в варианте с применением препарата Террасил Форте, КС. На сорте Гонар количество пораженных корней в варианте с применением данного препарата составило 21,0% (ранний срок сева) и 27,5% (оптимальный срок

сева); на сорте Таловский 9 количество пораженных корней при раннем сроке сева составило 15,0%, при оптимальном – 19,9%.

Развитие гриба *B. sorokiniana* на сорте Гонар ограничивало применение препарата Скарлет, МЭ: количество пораженных корней при раннем сроке сева составило 26,8%, при оптимальном – 27,3%.

Против грибов рода *Fusarium* также были эффективны Террасил Форте, КС, Стингер Трио, КС, Скарлет, МЭ. В варианте с использованием препарата Террасил Форте, КС на сорте Гонар при раннем сроке сева процент пораженных корней составил всего 2,8%, при оптимальном – 7,0%; на сорте Таловский 9 – 2,8% (2,7%) соответственно.

Применение препарата Стингер Трио, КС также ограничивало развитие грибов из рода *Fusarium* на сорте Гонар при раннем сроке сева – 11,9%; при оптимальном сроке сева лучший эффект был получен при применении препарата Скарлет, МЭ – 15,5%.

Лучший эффект против грибов из рода *Alternaria* был достигнут при применении протравителей Грандсил, КС, Террасил Форте, КС и Скарлет, МЭ.

В варианте с применением препарата Грандсил, КС на сорте Гонар при раннем сроке сева количество пораженных корней составило 5,0%, при оптимальном сроке сева количество пораженных корней было ниже в варианте с препаратом Скарлет, МЭ – 7,0%.

На сорте Таловский 9 развитие грибов из рода *Alternaria* ограничивало применение препарата Террасил Форте, КС: 4,5% (ранний срок сева) и 3,7% (оптимальный срок сева).

Также на сорте Гонар при оптимальном сроке сева мы изучали возможность применения биопрепарата на основе микроорганизмов – Стернифага, СП. (10^{10} КОЕ/г *Trichoderma harzianum* штамм ВКМ F-4099D) внесением в почву.

Данный препарат был использован как отдельный вариант, так и совместно с препаратом Террасил Форте, КС. Применение Стернифага, СП слабо ограничивало поражение ячменя корневыми гнилями: *B. sorokiniana* – 41,2%, грибов рода *Fusarium* – 17,5%, *Alternaria* spp. – 12,6%. В варианте с совместным применением Стернифага, СП и Террасил Форте, КС количество пораженных корней было меньше, чем в остальных вариантах: *B. sorokiniana* – 13,2%, грибов рода *Fusarium* – 5,4%, *Alternaria* spp. – 3,9%.

3.2 Идентификация возбудителей болезней методом ПЦР-анализа

Анализ морфологических признаков коллекции изолятов грибов, выделенных из корней ячменя, показал, что большинство изолятов относилось к виду *F. oxysporum*. Кроме того, идентифицированы несколько изолятов вида *F. solani*. Также выявлены изоляты, по сумме признаков относящиеся к грибам комплекса *Gibberella fujikuroi*, предположительно к виду *F. nuygatai*.

Данный вид по морфолого-культуральным признакам сходен с *F. oxysporum*, однако, в отличие от последнего, способен образовывать микроконидии в цепочках. Гриб *F. nuygatai* способен образовывать микроконидии как в фальшивых головках, так и в цепочках и формировать хламидоспоры.

Таким образом, для выявления генетического разнообразия *F. oxysporum* и уточнения таксономического статуса *F. nygatai* был проведен ПЦР-анализ. Для доказательства таксономической принадлежности изучаемых изолятов к различным видам рода *Fusarium* был использован метод молекулярного генотипирования с последующей оценкой генетического родства. В результате генотипирования методами RAPD и УП-ПЦР изолятов, перечисленных в табл.3, были составлены бинарные матрицы, которые включали 34 и 25 признаков, соответственно. На основе этих матриц были построены дендрограммы генетического родства изолятов. Было очевидно, что топология полученных дендрограмм совпадает. Поэтому мы объединили две матрицы в одну и построили одно консенсусное дерево (рис. 4).

Изоляты *F. oxysporum* кластеризовались в 6 гаплотипов (бутстреп > 50) – А, В, С, D, Е, F гаплотипы. Наиболее представлены три гаплотипа 1С, 1F и 1D, включающие 30,0; 27,5 и 25,0% исследованных изолятов, соответственно. Изоляты *F. oxysporum* из Воронежской области, изолированные из одной местности (поля) распределились в два основных гаплотипа 1F и 1С, куда относились 71,9% всех выделенных изолятов. Такое невысокое генетическое

Таблица 3

Распределение исследуемых изолятов грибов рода *Fusarium* по гаплотипам

Вид гриба	Гаплотип	№ изолята из дерева	Генетически родственные изоляты	Представленность гаплотипов <i>F. oxysporum</i> , %	
				Воронеж	Всего
<i>F. oxysporum</i>	I A	MR 259	MR 256	0	5
	I B	MR 118	MR 138, MR 148	9,4	7,5
	I C	MR 113	MR 103, MR 112, MR 123, MR 119, MR 121	34,4	27,5
		MR 143	MR 128, MR 131, MR 135, MR 136		
	I D	MR 124	MR 101, MR 110	18,7	25
		MR 150	MFG 70507, MR 152, MR 153		
	I E	MR 154	MR 258	0	5
I F	MR 107	MR 104 A, MR 106, MR 125, MR 127, MR 129, MR 130, MR 133, MR 146, MR 137, MR 147, MR 104 B	37,5	30	
<i>F. nygatai</i>	II	MR 126	MR 253	-	-
			MR 139	-	-
			MR 252	-	-
			MR 251	-	-
<i>F. solani</i>	III	MR 260	MR 145	-	-
		MR 257	-	-	-

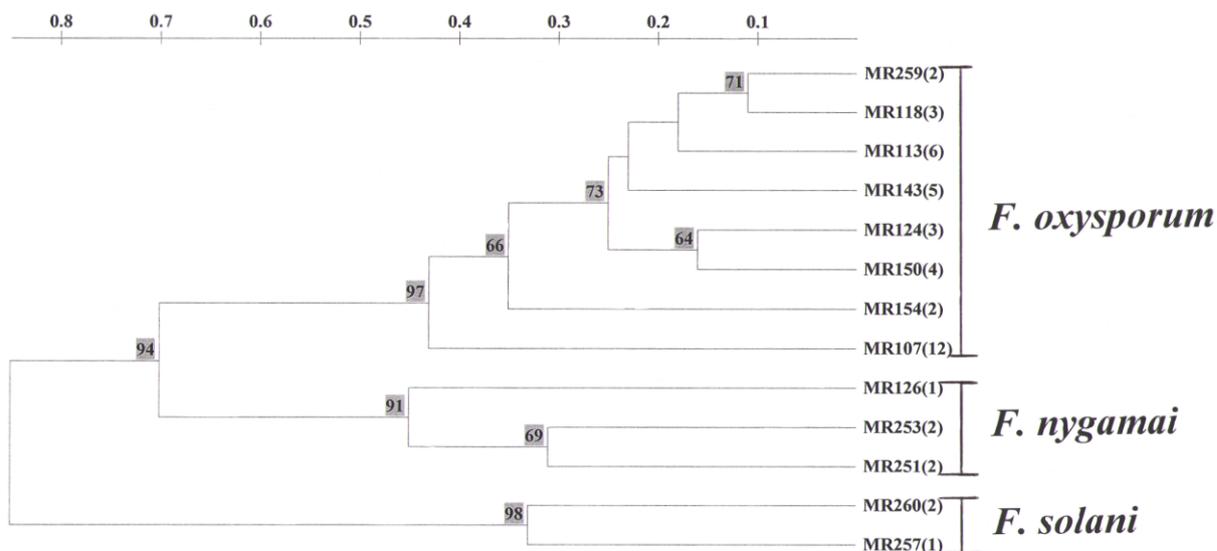


Рис. 4 Консенсусное дерево генетического родства изолятов грибов рода *Fusarium*

разнообразие связано с селективным отбором адаптированных клонов патогена.

Гаплотип 1А составили изоляты, выделенные из корней пшеницы из Ленинградской и Курской областей. Также отдельный гаплотип 1Е представлен изолятами выделенными из корней пшеницы Курской области и Приморского края. Только один изолят из Приморского края, выделенный из гнили плодов томата, попал вместе с изолятами из Воронежской области (гаплотип 1D).

Второй кластер включал два референтных изолята гриба *F. nygamai*, а также изоляты, выделенные из корней ячменя, выращенного в Воронежской области, и из зерна ячменя, выращенного в Орловской области. Таким образом, показано, что гриб *F. nygamai* встречается в комплексе грибов, поражающих зерновые культуры на территории РФ.

Изоляты *F. solani* представляли наиболее удаленную обособленную группу – коэффициент различия с группой остальных изолятов исследуемых видов составил 90%.

3.3 Патогенность возбудителей корневых гнилей

3.3.1 Пораженность сортов ячменя ярового основными возбудителями корневых гнилей при искусственном заражении (вегетационный опыт)

Изоляты изучаемых грибов были изолированы в 2008 г. из пораженных растений двух сортов ячменя ярового (Гонар и Таловский 9). Из корней и подземного междоузлия были выделены и идентифицированы: *B. sorokiniana*, виды р. *Fusarium* – *F. solani* (MR 145); *F. equiseti*; *F. oxysporum* (MR 148). Оценка патогенности была проведена путем внесения инокулюма в стерильную почву с последующим высевом семян ячменя.

На сорте Гонар при 2-х сроках сева всхожесть семян ячменя при внесении *F. solani* значительно уступала остальным опытными вариантам: 26,0% (ранний); 16,0% (оптимальный). Также при оптимальном сроке сева ошутимое

снижение всхожести было получено в варианте с внесением *F. oxysporum* – 25,0%.

На сорте Таловский 9 низкая всхожесть семян ячменя была получена в варианте с внесением *B. sorokiniana*: 10,0% (ранний срок сева), 17,0% (оптимальный срок сева).

Наибольшее количество пораженных корней на сорте Гонар при 2-х сроках сева наблюдалось в варианте с внесением *F. oxysporum* – 20,0% (ранний), 28,0% (оптимальный), причем при идентификации возбудителя из данных растений выделился только *B. sorokiniana* (табл.4). Данный факт может свидетельствовать о том, что инфекция *B. sorokiniana* находилась в семенах и вид оказался более патогенным, чем *F. oxysporum*. На сорте Таловский 9 при 2-х сроках сева количество пораженных корней было выше в варианте с внесением в почву *F. solani*: 12,0 (ранний срок сева) и 20,0% (оптимальный срок сева).

Таблица 4

Патогенность возбудителей корневой гнили ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9.

Вариант		Выделенный вид патогена	Количество пораженных корней грибами, %		
Сорт	Вид, вносимого в почву патогена		всего	<i>B. sorokiniana</i>	<i>Fusarium</i> spp.
Семена урожая 2008 г. (ранний срок сева)					
Гонар	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. sorokiniana</i>	12,0	12,0	-
	<i>F. equiseti</i>	<i>B. sorokiniana</i> * + <i>F. equiseti</i>	16,0	12,0	4,0
	<i>F. solani</i>	<i>B. sorokiniana</i> * + <i>F. solani</i>	12,0	4,0	8,0
	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. sorokiniana</i> *	20,0	20,0	-
Таловский 9	<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	12,0	-	12,0
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	8,0	4,0	4,0
	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. sorokiniana</i>	4,0	4,0	-
	<i>F. equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>	4,0		4,0
Семена урожая 2008 г. (оптимальный срок сева)					
Гонар	<i>F. equiseti</i>	<i>B. sorokiniana</i> * + <i>F. equiseti</i>	16,0	12,0	4,0
	<i>F. solani</i>	<i>B. sorokiniana</i> *	4,0	4,0	-
	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. sorokiniana</i> *	28,0	28,0	-
	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. sorokiniana</i>	16,0	16,0	-
Таловский 9	<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	20,0	-	20,0
	<i>F. equiseti</i>	<i>B. sorokiniana</i> * + <i>F. equiseti</i>	20,0	12,0	8,0
	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. sorokiniana</i> * + <i>F. oxysporum</i>	16,0	8,0	8,0
	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. sorokiniana</i>	8,0	8,0	-

*-семенная инфекция

Также при оптимальном сроке сева высокой патогенностью обладал инокулюм гриба *F. equiseti*: процент пораженных корней составил 20,0. При идентификации возбудителя из пораженных корней выделялся не только вносимый в почву патоген (8,0% пораженных корней), но также и *B. sorokiniana* (12,0%). Данный факт может свидетельствовать о том, что инфекция *B. sorokiniana* находилась в семенах и вид оказался более патогенным, чем изначально вносимый *F. equiseti*.

3.3.2 Патогенность возбудителей корневых гнилей ячменя ярового (лабораторный опыт)

Также нами была проведена оценка патогенности возбудителей корневых гнилей ярового ячменя в чашках Петри. На 7-дневную культуру гриба раскладывались семена ячменя, полученные из урожая 2009 года, и затем определялась гибель проростков и развитие болезни (табл. 5).

Таблица 5

Пораженность сортов ярового ячменя основными возбудителями корневых гнилей

Сорт	Вариант опыта	Сроки сева					
		ранний			оптимальный		
		% пораженных проростков	гибель проростков, %	развитие болезни, %	% пораженных проростков	гибель проростков, %	развитие болезни, %
Гонар	<i>B. sorokiniana</i>	100	37,2	79,7	100	39,5	86,3
	<i>F. solani</i>	100	20,0	69,3	100	22,3	77,1
	<i>F. oxysporum</i>	100	20,0	65,4	100	22,1	64,2
	<i>F. equiseti</i>	52,0	0,0	21,0	48,0	5,8	19,4
Таловский 9	<i>B. sorokiniana</i>	100	43,3	84,2	100	47,2	85,5
	<i>F. solani</i>	100	34,5	76,3	100	36,3	78,4
	<i>F. oxysporum</i>	100	30,0	71,7	100	27,3	62,6
	<i>F. equiseti</i>	61,2	13,3	29,9	63,0	17,2	32,5

Мы установили, что проростки ячменя сортов Гонар и Таловский 9, полученные из семян урожая раннего и оптимального сроков сева 100%-но поражались *B. sorokiniana*, *F. solani*, *F. oxysporum*.

Развитие болезни было выше в варианте с использованием инокулюма *B. sorokiniana*: на сорте Гонар – 79,7% (ранний срок сева), 86,3% (оптимальный срок сева); на сорте Таловский 9 – 84,4% (ранний срок сева), 85,5% (оптимальный срок сева).

4. Токсичность фунгицидов в отношении грибов *F. oxysporum* и *B. sorokiniana*

Для проведения данного исследования нами были отобраны следующие протравители семян:

1. Скарлет, МЭ (100 г/л имазазила + 60 г/л тебуконазола)
2. Террасил Форте, КС (80 г/л тебуконазола + 80 г/л флутриафола)
3. Стингер Трио, КС (80 г/л тиабендазола + 60 г/л тебуконазола + 60 г/л имазазила)
4. Винцит Форте, КС (37,5 г/л флутриафола + 25 г/л тиабендазола + 15 г/л имазазила)
5. Дивиденд стар, КС (30 г/л дифеноконазола + 6,3 г/л ципроконазола)
6. Витавакс 200 ФФ, ВСК (200 г/л карбоксина + 200 г/л тирама)
7. Раксил, КС (60 г/л тебуконазола)
8. Грандсил, КС (60 г/л тебуконазола)
9. Премис Двести, КС (200 г/л трипиконазола)
10. Виал ТТ, ВСК (80 г/л тиабендазола + 60 г/л тебуконазола)

Подбор препаратов основывался на том, что, во-первых, в настоящее время наиболее широко используются протравители, содержащие тебуконазол, и, во-вторых, исходя из реального увеличения количества препаратов, содержащих не одно действующее вещество.

Первая часть опыта включала в себя исследование содержания препаратов по действующему веществу в количестве 10 мг/л (рис. 5).

По итогам проведения оценки сравнительной токсичности фунгицидов к *F. oxysporum* определено, что лучший эффект по ограничению развития гриба получен при использовании препарата Скарлет, МЭ Винцит Форте, КС и Стингер Трио, КС, причем два последних препарата подавляли данный патоген на 100%, при всех 3-х учетах (на 3-и, 5-е, 7-е сутки).

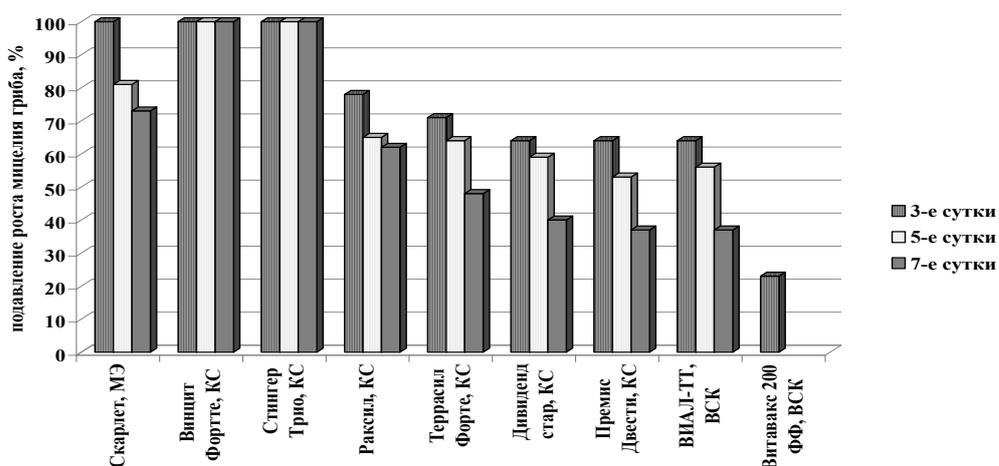
Во второй части опыта концентрация препарата по действующему веществу была уменьшена во всех вариантах опыта за исключением препарата Витавакс 200 ФФ, ВСК в связи с низким подавлением роста мицелия гриба *F. oxysporum*. Содержание Витавакса 200 ФФ, ВСК было увеличено до 22 мг/л по действующему веществу (табл.6).

В опытном варианте Стингер Трио, КС 100%-е подавление роста мицелия гриба получено при учетах на 3-и, 5-е, 7-е сутки.

Также достаточно высокую эффективность показал исследуемый препарат Витавакс 200 ФФ, ВСК: 70,0% (на 3-и сутки учета); 66,0 % (на 5-е сутки); 53,0% (на 7-е сутки), что очевидно связано с повышением концентрации данного препарата по действующему веществу более чем в 2 раза.

Остальные исследуемые препараты заметно уступали по эффективности подавления роста мицелия гриба. На 7-е сутки учета эффективность отсутствовала в вариантах с препаратами Винцит Форте, КС, Дивиденд стар, КС, Премис Двести, КС, Виал ТТ, ВСК.

По результатам проведения сравнительной токсичности исследуемых препаратов к *B. sorokiniana* определено, что 100%-е подавление роста мицелия



содержание препаратов по действующему веществу - 10 мг/л

Рис. 5 Токсичность фунгицидов по отношению к возбудителю *F. oxysporum*

Таблица 6

Сравнительная токсичность фунгицидов по отношению к возбудителю *F. oxysporum*

Вариант опыта	Подавление роста мицелия гриба <i>Fusarium oxysporum</i> (%)			
	Содержание препарата по д.в., мг/л	на 3-е сутки	на 5-е сутки	на 7-е сутки
Скарлет, МЭ (100 + 60 г/л)	1,0	55,9	40,0	13,0
Винцит Форте, КС (37,5 + 25 + 15 г/л)	1,0	29,4	6,0	-
Стингер Трио, КС (80 + 60 + 60 г/л)	1,0	100,0	100,0	100,0
Раксил, КС (60 г/л)	2,2	64,0	51,0	31,0
Террасил Форте, КС (80 + 80 г/л)	2,2	61,0	37,0	11,0
Дивиденд стар, КС (30 + 6,3 г/л)	2,2	38,0	13,0	-
Премис Двести, КС (200 г/л)	2,2	38,0	15,0	-
Виал ТТ, ВСК (80 + 60 г/л)	2,2	44,0	20,0	-
Витавакс 200 ФФ, ВСК (200 + 200 г/л)	22,0	70,0	66,0	53,0

гриба было отмечено в вариантах с применением Винцит Форте, КС (на 3-и сутки учета), Раксил, КС (на 3-и сутки), Террасил Форте, КС (при учетах на 3-и, 5-е, 7-е сутки учета), (рис. 6).

Эффективность остальных препаратов также была достаточно высокой при всех трех учетах: 52,0-82,0% (3-и сутки учета); 46,0-79,0% (5-е сутки учета); 40,0-68,0% (7-е сутки учета).

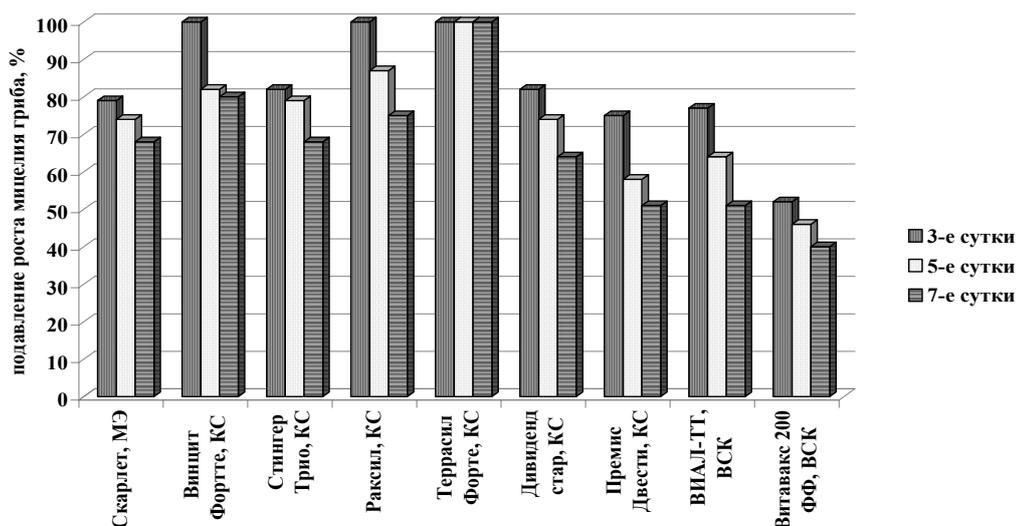


Рис. 6 Сравнительная токсичность фунгицидов по отношению к возбудителю *B. sorokiniana*

Во второй части опыта концентрация препарата по действующему веществу также была уменьшена во всех вариантах опыта за исключением препарата Витавакс 200 ФФ, ВСК в связи с недостаточно высоким подавлением роста мицелия гриба *B. sorokiniana*. Содержание Витавакса 200 ФФ, ВСК было увеличено до 22 мг по действующему веществу.

Достаточно высокую эффективность при снижении концентрации показал исследуемый препарат Тетрасил Форте, КС: 83,0% (на 3-и сутки); 64,0% (на 5-е сутки); 46,0% (на 7-е сутки).

Препарат Витавакс 200 ФФ, ВСК при увеличении концентрации также значительно подавлял рост мицелия гриба *B. sorokiniana*: 80,0% (на 3-и сутки), 74,0% (на 5-е сутки), 62,0% (на 7-е сутки).

Чувствительность мицелия гриба к остальным препаратам была несколько ниже: на 7-е сутки не наблюдалось эффективности в вариантах с исследуемыми препаратами – Винцит Форте, КС, Дивиденд Стар, КС.

5. Биологическая эффективность протравителей против корневых гнилей ячменя ярового

Нами установлено, что интенсивность поражения корневыми гнилями различалась в вариантах опыта, максимальный балл поражения был 3. На пораженность оказывал влияние срок сева: при раннем сроке сева поражение сортов Таловский 9 (22,5%) и Гонар (20,6%) было на одном уровне, тогда как при оптимальном, пораженность Гонара составила 27,5%, Таловского 9 – 18,8%.

5.1 Биологическая эффективность протравителей против корневых гнилей на ячмене пивоваренного назначения (сорт Гонар)

Результаты опытов по оценке биологической эффективности протравителей семян на сорте Гонар представлены на рис. 7.

Наилучшую эффективность на сорте Гонар при обоих сроках сева показали препараты Террасил Форте, КС и Скарлет, МЭ.

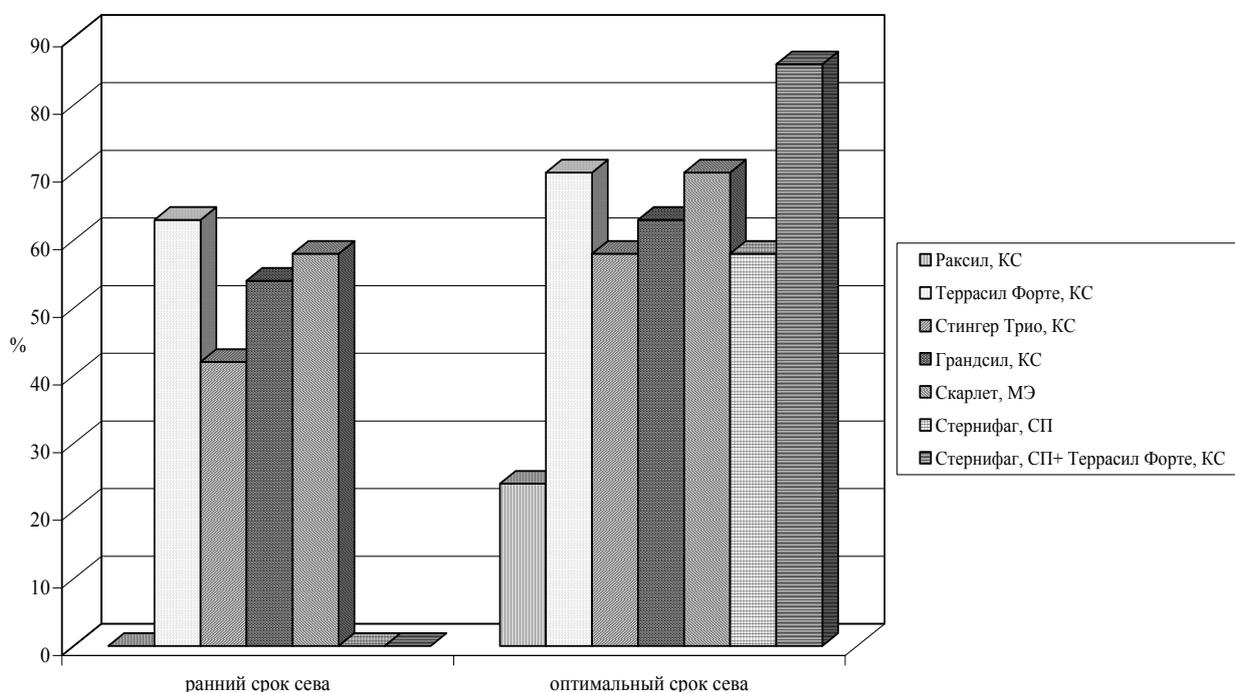
На сорте Гонар в ранние сроки сева эффективность препарата Террасил Форте, КС достигала 63,1%, в оптимальные – 69,8%

Биологическая эффективность препарата Скарлет, МЭ при раннем сроке сева составила 57,9%, при оптимальном – 70,0%.

Достаточно высокая эффективность была получена при совместном применении Террасил Форте, КС и Стернифага, СП при оптимальном сроке сева: 85,9%.

По показателю массы 1000 зерен варианты с исследуемыми препаратами были на уровне контроля: Раксил, КС (32,0 г), Грандсил, КС (32,7 г), Скарлет, МЭ (33,0 г), Террасил Форте, КС (32,8 г), Террасил Форте, КС + Стернифаг, СП (33,2 г), Стернифаг, СП (33,2 г), Стингер Трио, КС (35,4 г), в контроле – 31,9 г, НСР₀₉₅=3,08.

По показателю урожая (ц/га) варианты с препаратами Раксил, КС (34,7 ц/га), Грандсил, КС (29,0 ц/га), Скарлет, МЭ (29,5 ц/га), Террасил Форте, КС (32,2 ц/га), Стингер Трио, КС (31,0 ц/га) были на уровне контроля – 31,0 ц/га. Варианты с применением препарата Стернифаг, СП (24,1 ц/га) и совместном применении Террасила Форте, КС и Стернифага, СП (25,4 ц/га) несколько уступали контролю; НСР₀₉₅=4,2.



Развитие болезни в контроле: 20,6% (ранний срок сева), 27,5% (оптимальный срок сева).

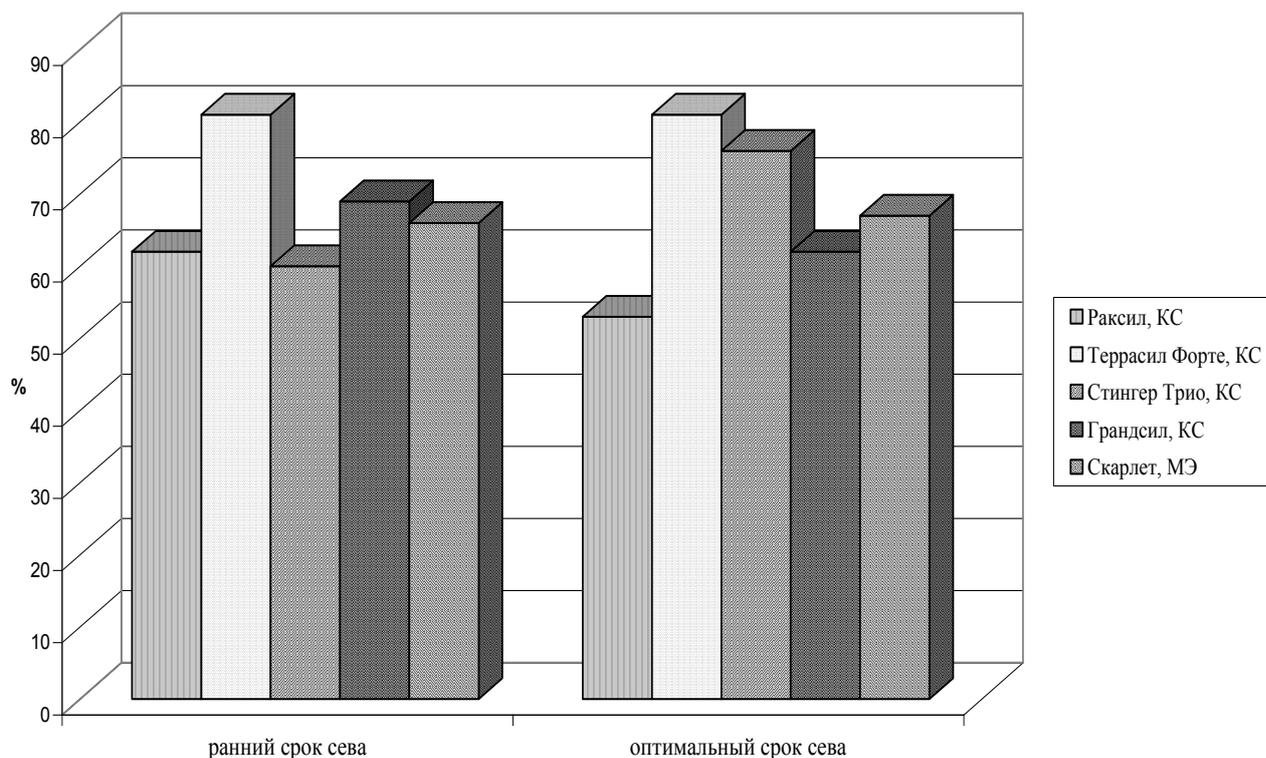
Рис. 7 Биологическая эффективность протравителей против корневых гнилей на сорте Гонар (2008-2010 гг.)

5.2 Биологическая эффективность протравителей против корневых гнилей на ячмене кормового назначения (сорт Таловский 9)

На сорте Таловский 9 максимальное снижение развития корневых гнилей на культуре обеспечивали препараты: Террасил Форте, КС – 81,4% (ранний срок сева), 83,0% (оптимальный); Скарлет, МЭ – 64,5% (ранний срок сева), 66,6% (оптимальный), см рис. 8.

По показателю массы 1000 зерен варианты с исследуемыми препаратами были на уровне контроля: Раксил, КС (35,5 г), Грандсил, КС (37,7 г), Скарлет, МЭ (37,6 г), Террасил Форте, КС (34,5 г), Стингер Трио, КС (34,8 г), в контроле – 36,2 г, НСР₀₉₅= 2,1.

По показателю урожая (ц/га) варианты с препаратами Раксил, КС (33,4 ц/га), Грандсил, КС (31,2 ц/га), Террасил Форте, КС (32,8 ц/га), Стингер Трио, КС



Развитие болезни в контроле: 22,5% (ранний срок сева), 18,8% (оптимальный срок сева).

Рис. 8 Биологическая эффективность протравителей против корневых гнилей на сорте Таловский 9 (2008-2010 гг.)

(31,6 ц/га) были на уровне контроля – 32,2 ц/га. Вариант с применением препарата Скарлет, МЭ (28,6 ц/га) несколько уступал контролю; НСР₀₉₅=3,1.

Выводы

1. Установлено, что микобиота семян ячменя ярового сортов Гонар и Таловский 9 представлена комплексом следующих видов: *B. sorokiniana*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* sp. Общая зараженность семян в течение трех лет наблюдений достигала 64,0% (сорт Гонар). Доминирующее положение в патогенном комплексе занимал гриб *B. sorokiniana*.

Фитопатологический анализ корней пораженных растений показал, что, независимо от принадлежности исследуемого материала к сортам и срокам сева, основу комплекса возбудителей составляют следующие виды: *B. sorokiniana*, грибы рода *Fusarium* и грибы рода *Alternaria*. Причем вид *B. sorokiniana* преобладал во всех опытных вариантах в фазу кущения. Количество пораженных корней в контрольном варианте составляло 60,0% (сорт Гонар).

2. Нами подтверждена тенденция нарастания в патогенном комплексе грибов рода *Fusarium* к фазе полной спелости. На фоне общего повышения объема пораженных корней до 99,9% на сорте Гонар доля грибов из рода *Fusarium* увеличилась более чем в 3 раза и составила 42,0%, *B. sorokiniana* несколько снизилась - до 50,0% и *Alternaria* spp. – до 4,0%.

Аналогичные изменения были зафиксированы и на сорте Таловский 9: при общем поражении корней до 98,0%, наличие возбудителей из рода *Fusarium* возросло до 74,0%, количество патогенного вида *B. sorokiniana* снизилось более чем в два раза – до 21,0%; пораженность корней грибами из рода *Alternaria* снизилась до 2,0%

3. Нами определено, что в среднем по двум сортам лучший эффект по ограничению количества пораженных корней был достигнут при использовании препаратов Террасил Форте, КС (80+80 г/л), Грандсил, КС (60 г/л) и Скарлет, МЭ (100+60 г/л).

4. Молекулярно-генетические исследования позволили установить, что гриб *F. oxysporum* является основным патогеном, вызывающим фузариозную корневую гниль ячменя в Воронежской области. Изоляты данного гриба, распределены в два основных гаплотипа, куда относились 71,9% всех выделенных изолятов.

5. Выявлен ранее не описанный на территории Российской Федерации гриб *F. nygatai*, вызывающий корневые гнили ячменя в Воронежской области.

Разработана система распознавания вида *F. nygatai* на основе суммы морфолого-культуральных характеристик – способности к образованию микроконидий в фальшивых головках и цепочках на монофиалидах и реже полифиалидах, а также хламидоспор.

6. При оценке патогенности возбудителей корневых гнилей ячменя в лабораторных условиях установлено, что проростки ячменя сортов Гонар и Таловский 9, полученные из семян урожая раннего и оптимального сроков сева поражались *B. sorokiniana*, *F. solani*, *F. oxysporum* на 100%. Развитие болезни было выше в варианте с использованием инокулюма *B. sorokiniana*.

7. Оценка сравнительной токсичности фунгицидов к *F. oxysporum* показала, что лучший эффект по ограничению развития гриба получен при использовании препарата Скарлет, МЭ (100+60 г/л), Винцит Форте, КС (37,5+25+15 г/л) и Стингер Трио, КС (80+60+60 г/л), причем два последних препарата подавляли данный патоген на 100%. Полное подавление роста мицелия гриба *B. sorokiniana* было отмечено в вариантах с применением фунгицидов Винцит Форте, КС (37,5+25+15 г/л), Раксил, КС (60 г/л), Террасил Форте, КС (80 + 80 г/л).

8. Нами выявлена различная поражаемость сортов ячменя в зависимости от сроков сева: при раннем сроке сева поражение сортов Таловский 9 и Гонар было на одном уровне (22,5% и 20,6% соответственно), тогда как при оптимальном, пораженность сорта Гонар была выше (27,5%), чем на сорте Таловский 9 – 18,8%.

9. Биологическая эффективность препаратов Террасил Форте, КС (80+80 г/л) и Скарлет, МЭ (100+60 г/л) против возбудителей корневых гнилей при обоих сроках сева составила на сорте Гонар (68,2% и 69,0% соответственно), на сорте Таловский 9 (83,0% и 67,0% соответственно). По показателям массы 1000 зерен и выходу урожая варианты с исследуемыми препаратами были близки к контролю.

10. Разработаны регламенты применения протравителей Террасил Форте, КС; Стингер Трио, КС; Грандсил, КС; Скарлет, МЭ для защиты ярового ячменя от корневых гнилей в ЦЧР.

Практические рекомендации

1. При протравливании семян следует применять фунгициды в следующих оптимальных нормах внесения в условиях ЦЧР:

-Террасил Форте, КС применять при протравливании заблаговременно или перед посевом при норме расхода 0,5 л/т;

-Стингер Трио, КС применять при протравливании заблаговременно или перед посевом до посева при норме расхода 0,5 л/т;

-Грандсил, КС применять при протравливании заблаговременно или перед посевом при норме расхода 0,5 л/т;

-Скарлет, МЭ применять при протравливании заблаговременно или перед посевом при норме расхода 0,4 л/т;

2. Целесообразно использовать ПЦР-анализ для быстрой и качественной идентификации возбудителей корневых гнилей ячменя.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Лаптиева, А.Б. Эффективность фунгицидов в борьбе с корневыми гнилями ячменя ярового / А.Б. Лаптиева, В.И. Долженко, М.А. Ревкова // Зерновое хозяйство. – 2010. - №4 (10). -С. 56-59.

2. Ревкова, М.А. Эффективность протравителей для защиты ячменя от корневых гнилей / М. А. Ревкова, В.И. Долженко // Защита и карантин растений. – 2011. - №3. - С. 37.

3. Ревкова М.А. Сравнительная оценка некоторых протравителей в борьбе с корневыми гнилями ячменя ярового в Воронежской области / М. А. Ревкова, В.И. Долженко // Проблемы защиты растений в условиях современного сельскохозяйственного производства. Материалы научной конференции. – СПб, 2009. - С. 124-125.
4. Ревкова М.А. Эффективность фунгицидов в борьбе с корневыми гнилями ячменя ярового / М.А. Ревкова // Материалы конференции молодых ученых и аспирантов. Генетические ресурсы растений и селекция.- СПб, 2010. - С. 77.
5. Ревкова, М.А. Биологическая эффективность протравителей семян в борьбе с корневыми гнилями ярового ячменя / М. А. Ревкова // Промышленная агрономическая выставка-ярмарка. Инновации – основа развития агропромышленного комплекса. – СПб, 2010. -С. 144-145.