

На правах рукописи

Краснобаева Ирина Леонтьевна

**Биологическое обоснование возможности использования штаммов
фитопатогенного гриба *Brachycladium papaveris*
для подавления растений мака**

Шифр и наименование специальности:
06.01.07 – Защита растений
АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2014

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:

Новикова Ирина Игоревна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений

Официальные оппоненты:

Власов Дмитрий Юрьевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией микологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета

Гришечкина Светлана Денисовна

Кандидат биологических наук, и.о. заведующего лабораторией, Всероссийского научно-исследовательского сельскохозяйственной микробиологии

Ведущая организация:

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений

Защита состоится «____» _____ 2014 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского институте защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе подбельского, д.3, факс (812)470-51-10, e-mail: vizrspb@mail333.com, сайт: vizr.spb.ru

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

Автореферат разослан «____» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

**Наседкина
Галина Анатольевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одно из наиболее значимых наркотикосодержащих растений – мак снотворный. На протяжении длительного времени его выращивали только как культурное растение, используемое в фармакологии и кулинарии. Поэтому все исследования были связаны с созданием новых сортов, сочетающих высокое содержание морфина и масла в коробочках и семенах, а также необходимостью защищать мак от вредителей и болезней.

В настоящее время проблема борьбы с растениями-продуцентами наркотических веществ приобрела исключительную актуальность. В разработке методов и систем борьбы с маком снотворным, знаменующих второй период исследований биологии возбудителей болезней культуры, все большее внимание уделяют разработке биологических методов борьбы и созданию биогербицидов на основе фитопатогенных видов.

Сотрудниками ГНУ ВИЗР в процессе микофлористических исследований в рамках Государственного контракта «Комплексной программы противодействия незаконному обороту наркотиков» создана коллекция чистых культур микромицетов, поражающих разные виды мака. В настоящее время депонированная в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР коллекция содержит 242 изолята 27-и видов микромицетов из 20 родов, 9 семейств, 6 порядков, 3 отделов. Показана высокая биологическая активность штаммов нескольких видов микромицетов *Brachycladium papaveris*, *Dendryphion penicillatum*, *Sclerotinia sclerotiorum* K-2, *Fusarium oxysporum* 14, *F. proliferatum*, *F. solani* и *F. culmorum* на 3-х недельных проростках мака.

Как показали проведенные исследования, среди выявленных на маке снотворном патогенов наибольшие перспективы в качестве агента биоконтроля имеет возбудители черной пятнистости *B. papaveris* (Corda) Fr., *D. penicillatum* (Corda) Fr. В лабораторных исследованиях биологическая эффективность штаммов *B. papaveris* при искусственном заражении колебалась в пределах 75–98 % и была наивысшей в случае использования в качестве инфекционного начала штамма *B. papaveris* 1.39. Возбудитель болезни эффективно заражал растения мака и в полевых условиях. Распространенность микоза через 7 дней после искусственного заражения составляла 19–50%, а развитие болезни – 8,5–21,8% в зависимости от инфекционной дозы.

Исходя из предварительно полученных результатов и на основе анализа данных литературы **цель работы** – биологически обосновать возможность использования штаммов фитопатогенного гриба *B. papaveris* для подавления растений мака.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

- Получить и охарактеризовать моноспоровые изоляты *B. papaveris* 1.39 по показателям интенсивности роста, спороношения и стабильности морфолого-культуральных признаков, сравнить их агрессивность в модельных лабораторных опытах, отобрать наиболее перспективные изоляты для дальнейших исследований.
- Охарактеризовать патогенез отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39 на маке снотворном.
- Охарактеризовать динамику роста и развития отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39 на различных по составу питательных субстратах.

- Оптимизировать состав питательных сред и субстратов, условий культивирования отселектированного штамма *V. papaveris* 1.39 по показателям скорости накопления биомассы и споропродуктивности.
- Охарактеризовать комплексы метаболитов отселектированного штамма *V. papaveris* 1.39 по показателям фитотоксичности для целевых и нецелевых растений.
- Оценить биологическую активность лабораторных образцов биогербицида на основе штамма *V. papaveris* 1.39 в модельных лабораторных и вегетационных опытах на растениях мака.
- Оценить биологическую эффективность опытных партий биогербицида на основе отселектированного штамма *V. papaveris* 1.39 в мелкоделяночных полевых опытах.
- Оценить эффективность совместного и/или последовательного применения био- и химических гербицидов в лабораторных и полевых условиях.

Научная новизна. В результате направленной селекции исходного штамма *V. papaveris* 1.39 получен стабильный, агрессивный и вредоносный штамм *V. papaveris* 1.39-8. Охарактеризованы отличающиеся скоростями роста и интенсивностью споруляции многоспоровый, среднеспоровый и малоспоровый морфотипы исходного и отселектированного штаммов. Впервые охарактеризованы особенности патологического процесса микромицета *V. papaveris*, и определена наиболее уязвимая для инфицирования фаза развития растений мака. Показано, что существенное значение в патогенезе имеет синтезируемый штаммом *V. papaveris* 1.39-8 комплекс биологически активных веществ с основным компонентом, отнесенным к бензохинонам. В лабораторных и полевых условиях доказана способность микромицета инфицировать растения мака с помощью конидий и мицелия, полученных разными способами культивирования.

Практическая значимость. Проведена оптимизация состава питательных сред и субстратов, а также условий культивирования штамма *V. papaveris* 1.39-8 при жидкофазной и твердофазной ферментации, что позволило получить лабораторные образцы различных препаративных форм. Изучено влияние действующих веществ химических гербицидов на штамм *V. papaveris* 1.39-8, на основании чего предложены различные технологии совместного применения препаративных форм на его основе и пониженных концентраций химических гербицидов в виде баковых смесей и при последовательных обработках. В лабораторных и полевых опытах показано, что их применение приводит к значительным потерям в высоте, биомассе и площади ассимилирующих поверхностей целевых растений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Стабильный высоко агрессивный в отношении целевых растений штамм *V. papaveris* 1.39-8, полученный в результате направленной селекции исходного штамма *V. papaveris* 1.39.

2. Способы получения лабораторных образцов жидкой и гранулированной препаративных форм с использованием оптимизированных условий культивирования, питательных сред и субстратов: соево-глюкозной питательной среды с солями для глубоинной ферментации и конверсионных отходов производства шии-таке для твердофазной ферментации.

3. Способ подавления растений мака путем трехкратного применения лабораторных образцов на основе *B. papaveris* 1.39-8: довсходовое внесение гранулированного субстратного лабораторного образца; двухкратное опрыскивание целевых растений в фазе семядолей и в фазе 2–4-х настоящих листьев жидким лабораторным образцом с последующим применением пониженных концентраций химических гербицидов.

Апробация результатов и исследований. Материалы диссертации доложены на Международной научной конференции «Защита растений и продовольственная безопасность России», симпозиуме «Средства и методы подавления растений конопли и мака» (к 80-летию ВИЗР, декабрь 2009 г.), на отчетно-плановой сессии ГНУ ВИЗР 2012–2013 гг. Работа выполнена в рамках государственного контракта с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации № 1295/13 от 21 сентября 2006 г. "Разработка ассортимента высокоэффективных биологических средств для уничтожения незаконных посевов, а также сорных и дикорастущих конопли и мака. Обоснование технических средств, технологии и регламентов их применения".

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 2 печатные работы в изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 213 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержит 24 таблицы, 87 рисунков, приложение. Библиографический список содержит 177 источников, в том числе 82 – иностранных авторов.

Декларация личного участия автора. Диссертация содержит фактический материал, непосредственно полученный автором в период с 2006 по 2013 гг. Работа проведена в лаборатории микробиологической защиты растений и опытных полях Всероссийского научно-исследовательского института.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе обобщены сведения о методах контроля нежелательной растительности, включающие микогербицидный и интегрированный методы. Охарактеризованы требования к штаммам-продуцентам микогербицидов и препаративным формам на их основе. Представлены сведения о болезнях мака, видовом составе и биологических особенностях развития некоторых возбудителей, имеющих перспективы в качестве продуцентов микогербицидов. Подробно описаны 2 микромицета, вызывающих черную пятнистость мака, их морфологические и культуральные особенности, систематическое положение, а также перспективность их использования в качестве агентов биоконтроля.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования использовали штаммы-продуценты микробиологических препаратов и штаммы фитопатогенных и сапротрофных почвообитающих микромицетов, семена и проростки мака снотворного и огурца. В работе использовали как штамм-продуцент *B. papaveris* 1.39 (патент РФ № 2377774 на *Dendryphion penicillatum* 1.39), согласно новым данным отнесенный к виду *Brachycladium papaveris*, так и его моноспорные изоляты 2-х поколений,

полученные после проведения триады Коха в вегетационных опытах на растениях мака (Гасич и др., 2010, 2013).

Для оценки биологической эффективности лабораторных образцов на основе штаммов-продуцентов использовали светоустановки, термостаты, орбитальные качалки (180 и 240 об/мин.), лабораторный инструментарий, вегетационные пластиковые, стеклянные и керамические сосуды, лабораторные пульверизаторы и стандартный полевой опрыскиватель SOLO.

Для экстракции эндометаболитов использовали растворители: метанол, этанол, н-бутанол, ацетон, диэтиловый эфир, гексан, этилацетат. Хроматографическое разделение проводили на стеклянной колонке (50 × 1,5 см) с молселектом, а также на хроматографических пластинах силуфол-254. Контроль состава фракций и чистоты выделенных веществ осуществляли методом аналитической тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Для получения и хранения чистых культур микромицетов *in vitro* использовали агаризованные питательные среды: синтетическую среду Чапека и картофельно-сахарозную среду (Лилли и др., 1953; Методы ..., 1982). Инокулом для засева жидких питательных сред и конверсионных субстратов получали при выращивании штамма-продуцента на стандартной агаризованной среде Чапека в течение 5–7-и суток при 25° С.

В опытах использовали химические гербициды по действующему веществу, соответствующие 1/2, 1/4, 1/8 и полной норме расхода (НР): Ларен, СП (метсульфурон-метил, д.в. 600 г/кг), в концентрациях 500, 250, 125, 62,5 мг/л; Зонтран, ККР (метрибузин, д.в. 250 г/л), в концентрациях 40, 20, 10, 5 мг/л, а также поверхностно-активное вещество Силиплант в концентрации 0,1 %.

Для твердофазного культивирования были использованы конверсионные субстраты, полученные после выращивания на них съедобных макромицетов (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* НК-35)

Инокулом получали глубинным культивированием на модифицированной соево-глюкозной среде. Для засева субстратов применяли смывы с чистых культур штаммов, выращенных на агаризованных питательных средах, в виде суспензий пропагул.

Для оптимизации питательных сред и условий культивирования выращивали штаммы-продуценты на средах и субстратах различного состава. Для характеристики габитусов мицелия и спороношения использовали разработанную нами шкалу баллов, соответствующих их морфолого-физиологическим состояниям.

Габитус мицелия:

- 1 – мицелий тонкий, почкующийся (дрожжеподобный рост);
- 2 – мицелий тонкий разного диаметра, паутинистый;
- 3 – пеллеты, тонкий паутинистый мицелиальный валик на поверхности;
- 4 – мицелий тяжистый ветвистый, аморфная споро-мицелиальная масса, ватообразный мицелиальный валик на поверхности;
- 5 – мицелий ветвистый, толстый с гранулированным вакуолизированным содержимым, образующий хламидоспоры; с признаками апоптоза клеток;
- 6 – мицелий ветвистый, толстый, лохматый, длинный, лохматый толстый мицелиальный валик на поверхности.

Габитус спороношения:

- 1 – споры единичные, или на поверхностном мицелиальном валике;
- 2 – споры многочисленные на поверхностном мицелиальном валике;
- 3 – споры многочисленные, порастающие, вакуолизированные, образование хламидоспор;
- 4 – споры многочисленные в пеллетах и мицелиальной массе, на поверхностном мицелиальном валике.

Интенсивность накопления биомассы при глубинном культивировании определяли на 3-и и 5-е сутки роста культуры; при твердофазном культивировании использовали относительный показатель колонизации определенной доли объема субстрата.

Для выявления морфотипов штаммов-продуцентов *B. papaveris*, а также исследования их морфологических и культуральных особенностей производили культивирование на агаризованных (Чапек, картофельно-сахарозная (КСА)), и жидких (СГС-серия, Чапек) средах. Оценивали характер и скорость роста колоний и пеллет, текстуру мицелия, обильность и состояние спороносящих структур, споропродуктивность колоний. Сравнение скоростей роста и споропродукции производили при оценке линейного роста, световой микроскопии габитусов мицелия и спороношения, определения титра КОЕ/мл и КОЕ/г с помощью серийных разведений (Методы..., 1982).

Для повышения и стабилизации агрессивности штамма *B. papaveris* 1.39 в отношении целевого растения проводили выделение моноспоровых изолятов с последующим анализом их целевой активности.

Для оценки стабильности комплекса морфолого-культуральных признаков, скорости роста и споропродуктивности моноспоровых изолятов использовали разработанную шкалу стабильности признаков в баллах:

- 1 – отсутствие стабильности в течение цикла развития;
- 2 – сохранение стабильности до наступления спороношения;
- 3 – стабильность в репродуктивной стадии;
- 4 – сохранение стабильности в течение цикла развития.

Долю репродуктивной площади в площади колонии ($K_{пр}$ – коэффициент продуктивности колонии) вычисляли с использованием экспериментально полученных радиусов колоний (R) и радиусов репродуктивных зон колоний (r) по формуле $K_{пр} = \pi r^2 / \pi R^2$.

Жидкие и субстратные гранулированные лабораторные образцы получали методами глубинной и твердофазной ферментации при 25° С. Для получения жидкого лабораторного образца 5 – суточные культуры грибов гомогенизировали с помощью блендера и фильтровали через 2 слоя марли. Твердофазное культивирование осуществляли в полипропиленовых пакетах объемом 1 л в таких же термических условиях. Титр жизнеспособных клеток в лабораторных образцах разных препаративных форм определяли методом серийных разведений с последующим высевом на стандартную агаризованную среду Чапека и подсчетом числа выросших колоний (Лилли и др., 1953; Методы ..., 1982).

Для выращивания растений мака проводили посев семян (30 шт./сосуд) на поверхность почвы в вазонах объемом 150 мл и 1000 мл. Всхожесть семян мака

определяли после их выдерживания на влажном фильтре в термостате при 28° С в течение 24 часов, или высевая семена, смешанные с песком, в почву. Проростки мака получали инкубированием сосудов с посеянными семенами при комнатной температуре в стандартной лабораторной светоустановке.

Биологическую эффективность штаммов микромицетов, лабораторных образцов на их основе и их комбинаций с пониженными концентрациями гербицидов оценивали по комплексу показателей, характеризующих рост и развитие растений (высота, биомасса надземной части и корневой системы, площадь ассимиляционной поверхности листьев, количество листовых ярусов), распространенность и развитие болезни, гибель растений (Методические..., 1981, 2009). Потери ассимиляционной поверхности листьев растений определяли при помощи палетки (Никитин, 2003). Для завершения триады Коха проводили реизоляцию возбудителей заболеваний из погибших и больных растений (Лилли и др., 1953; Методы ..., 1982). Инокуляцию растений лабораторными образцами биопрепаратов и обработку химическими гербицидами проводили с помощью лабораторного пульверизатора и стандартного опрыскивателя SOLO; расход рабочей суспензии составлял 40 мл/м². Совместимость лабораторных образцов биопрепаратов с рекомендованными гербицидами определяли по среднему суточному приросту (мм) и скорости роста мицелия (мм/сут.) штаммов-продуцентов на агаризованной среде Чапека с добавлением гербицидов в различных концентрациях.

Выделение эндометаболитов мицелия штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при глубинном и твердофазном культивировании проводили с помощью тонкослойной хроматографии (Кирхнер, 1981). Для оценки фитотоксичности комплекса метаболитов семена (по 10 семян огурца и по 50 семян мака) выдерживали в растворителях, экстрактах и водных суспензиях фракций в различных концентрациях в течение 0,5, 2, 4 и 5 ч. Антагонистическую активность эндометаболитов и гексановых экстрактов субстратного мицелия 5-и, 7-и и 10-и суточных культур гриба в отношении фитопатогенных и сапротрофных почвообитающих микромицетов оценивали методом лунок (Методы..., 1982).

Патогенез изучали на проростках мака. Для этого высевали семена (20 шт./сосуд) на поверхность почвы в лабораторные сосуды объемом 200 г, наполненные смесью земли и песка (1:1). Инокуляцию проводили в фазах семядолей и 1–3-х настоящих листьев: корневую шейку проростков обрабатывали при помощи лабораторной пипетки 1–2 мл культуральной жидкости, содержащей мицелий и конидии с титром $\times 10^6$ КОЕ/мл. Исследование пораженных проростков проводили с помощью светового и электронного сканирующего микроскопов.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием показателей производных, среднеквадратичных отклонений и стандартных ошибок (Плохинский, 1970, 1978), а также программных пакетов Excel 2010 и Statistica 6.

Глава 3. СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ *B.PAPAVERIS* 1.39

ПО ПРИЗНАКАМ ТЕХНОЛОГИЧНОСТИ И АГРЕССИВНОСТИ

Анализ морфологических и культуральных особенностей штаммов-продуцентов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 и 2-х поколений их моноспоровых изолятов выявил наличие морфотипов, отличающихся скоростями роста и интенсивностью

споруляции при твердофазном культивировании на агаризованной среде Чапека. Полученные морфотипы охарактеризованы как многоспоровый, среднеспоровый и малоспоровый. При пересевах наблюдалось выщепление стерильных секторов в колониях многоспоровых и среднеспоровых морфотипов, уменьшение скоростей роста. Обнаружено, что каждый из морфотипов способен расти по другому типу. Истинность морфотипов выявлена при одинаковом развитии на искусственных и естественных питательных субстратах при твердофазном и глубинном культивировании изолятов 1-го и 2-го поколений, а также при идентичности габитусов мицелия и спороношения. Для выявления различий патогенности 3-х недельные проростки мака опрыскивали суспензиями образцов на основе различных морфотипов *B. papaveris* 1.39 в концентрации 1 % и с титрами $\times 10^6$ КОЕ/мл. Все морфотипы были агрессивны: наблюдали снижение высоты растений мака в 1,1–1,5 раза и веса надземной части – в 1,5–3 раза. Гибель проростков составила 8–46 %. При твердофазной ферментации на конверсионных субстратах все морфотипы развивались как быстрорастущий среднеспоровый морфотип. Биологическая эффективность субстратных лабораторных образцов на основе штаммов *B. papaveris* 1.39 и их изолятов через 1,5 месяца после начала опыта составила 76,7–91,7 %.

Для стабилизации штамма *B. papaveris* 1.39 и повышения агрессивности в отношении целевого растения проводили выделение моноспоровых изолятов (таблица 1). Методом серийных разведений суспензии конидий исходного штамма в 6 сериях опытов получили 21 моноспоровый изолят со значительными различиями в скорости роста, споропродуктивности, форме, окраске и текстуре колоний, характере роста воздушного и субстратного мицелиев и состоянии реверса колоний.

Таблица – 1. Морфолого-культуральные характеристики штамма *B. papaveris* 1.39 и его моноспоровых изолятов

№ изолята	Форма края колонии	Текстура колонии	Цвет реверса колонии	Начало спороношения (сутки)
1	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, иногда со светлыми пятнами по всей поверхности	темный, иногда с концентрическими кольцами	5
2	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре обширное светлое пятно из воздушного мицелия	равномерно темный	3
6	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная	темный	3
8	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре обширное светлое пятно из воздушного мицелия	темный	4
10	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотная светлая зона, иногда концентрические кольца	равномерно темный	3
19	ровный	Клочковатая, опушенная, иногда с небольшим пятном светлого мицелия в центре	темный, иногда серый	3
21	ровный	Однородная, клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотный светлый мицелий	темный, иногда серый	3
<u>Штамм</u> <i>B. papaveris</i> 1.39	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотный светлый мицелий	Темный	4

По стабильности комплекса морфолого-культуральных признаков, скорости роста и споропродуктивности были отобраны семь наиболее стабильных и продуктивных моноспоровых изолятов для наработки инокулюма на их основе с целью оценки патогенности и агрессивности на проростках мака. Все эти изоляты отнесены к быстрорастущим, по скорости роста практически не отличающимся от исходного штамма *B.papaveris*1.39. Все эти изоляты отнесены к быстрорастущим, по скорости роста практически не отличающимся от исходного штамма *B.papaveris*1.39. Стабильность морфологических и культуральных признаков и споропродуктивность моноспоровых изолятов сравнима с данными показателями исходного штамма (таблица 1).

Патогенность отобранных моноспоровых изолятов *B. papaveris* 1.39 оценивали в вегетационных опытах опрыскиванием растений конидиальными суспензиями. Средняя скорость гибели растений мака в контроле от естественных физиологических причин достигала максимума к 15-м суткам и не превышала одного растения в сутки. В опытных вариантах у растений мака наблюдали угнетенность, отставание в росте, различия в габитусе, снижение ассимиляционной поверхности листьев по сравнению с контролем. Средняя скорость гибели проростков под воздействием отобранных моноспоровых изолятов штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 достигала максимума уже на 2-е сутки (таблица 2).

Таблица – 2 Характеристика моноспоровых изолятов штамма *B. papaveris* 1.39

№ изолята	Уровень стабильности морфолого-культуральных признаков	Начало спороношения (сутки)	Средняя скорость роста, мм/сут	K _{пр}	Титр конидий, КОЕ/мл
1	1	5	4,41	0,54	3,2×10 ⁶
2	3	3	4,31	0,53	4,0×10 ⁶
6	3	3	4,68	0,33	1,8×10 ⁶
8	4	4	6,14	0,47	2,0×10⁶
10	1	3	4,58	0,62	1,8×10 ⁶
19	4	3	3,85	0,72	2,9×10⁶
21	3	3	4,12	0,88	1,1×10 ⁶
<u>Штамм</u> <u><i>B. papaveris</i> 1.39</u>	2	3	6,11	0,72	2,0×10 ⁶

Как видно из таблицы 3, все отобранные продуктивные моноспоровые изоляты штамма *B. papaveris* 1.39 были патогенны для мака и вызывали гибель 70-90% проростков. Выпады растений в контроле от физиологических причин составили около 10 %. Биологическую эффективность оценивали по количеству погибших проростков и растений мака. Наиболее высокая биологическая активность отмечена у двух моноспоровых изолятов штамма *B. papaveris* 1.39 – **8** и **19**, гибель 3-х недельных проростков мака составила 90,2 и 88,3 %, соответственно.

Таким образом, сравнение показателей воздействия исходного штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и семи отобранных моноспоровых изолятов позволило охарактеризовать уровень вредоносности каждого из изолятов. Для дальнейших исследований и разработки новых препаративных форм для биоконтроля мака были отобраны наиболее перспективные моноспоровые изоляты под номерами **8** и **19**. Для дальнейшей работы был отобран наиболее морфологически стабильный, агрессивный, вредоносный и технологичный изолят **8** 1-го поколения, получивший маркировку штамм *B. papaveris* 1.39-8.

Таблица – 3 Эффективность воздействия моноспоровых изолятов *B. papaveris* 1.39 на развитие растений мака при однократном применении в фазе 1–2-х настоящих листьев (вегетационные опыты)

Варианты опыта: моноспоровые изоляты <i>B. papaveris</i> 1.39	Потери, в ...%			Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %	Гибель растений, %
	высоте	ярусах	ассимиляционной поверхности листьев			
Контроль (без обработки)	0	0	0	0	0	9,8
1	1,5	7,4	16,9	56,3	34,9	74,6
2	16,8	22,2	23,4	33,8	15,9	70,7
6	0,9	11,1	21,9	54,5	33,4	74,6
8	99,5	7,4	99,1	59,7	23,6	90,2
10	13,6	7,4	15,5	78,2	36,6	72,6
19	28,4	18,5	14,0	34,3	14,6	88,3
21	20,2	7,4	19,5	81,1	38,7	70,7
<u>Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39</u>	<u>10,3</u>	<u>11,6</u>	<u>12,4</u>	<u>61,3</u>	<u>28,2</u>	<u>75,5</u>
НСР _{0,5}	22,4	20,8	26,7	21,5	20,0	16,8

Ранее было показано, что образование некрозов на листьях и стеблях растений мака обусловлено токсинами микромицета, поступающими в клетки хозяина при его заражении (Миско, 1973; ; Гасич и др., 2010; Bailey et al., 2000, 2004; O'Neill et al., 2000). Выявлено, что штаммы-продуценты *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8, а также и их реизоляты в процессе роста и развития накапливают комплекс токсичных для целевого растения вторичных метаболитов. Проведено выделение эндометаболитов мицелия штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при глубинном и твердофазном культивировании; выявлены активные фракции комплекса метаболитов и проведена их первичная идентификация. Активный эндотоксин мицелия по совокупности имеющихся физико-химических и биологических данных отнесен нами к бензохинонам.

Выявлено, что фитотоксичность эндометаболитов глубинного и субстратного мицелиев штаммов-продуцентов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 для семян и проростков мака увеличивается пропорционально времени культивирования. Максимальные потери всхожести семян мака отмечены при воздействии экстракта 10-и суточной культуры среднеспорового морфотипа, минимальные – при воздействии экстрактов разновозрастных культур многоспорового морфотипа.

Глава 4. ПАТОГЕНЕЗ ШТАММОВ *B. PAPAVERIS* 1.39 И 1.39-8 НА МАКЕ СНОТВОРНОМ

«Гельминтоспориоз» – наиболее вредоносное заболевание мака – представляет собой группу болезней, возбудителями которых являются, по крайней мере, два вида грибов, поражающие различные органы растений (чаще листья, стебли и коробочки, реже - корни) (Del Serrone, et al., 1989; Farr et al., 1999; Bailey et al., 2000a, 2000b, 2004a, 2004b; O'Neill et al., 2000; Гасич и др., 2009). В нашей стране это заболевание впервые было описано А. Г. Пospelовым в 1931–45 гг. (Пospelов, 1957). Затем черная пятнистость была выявлена во всех районах произрастания мака (Миско, 1965; Вахрушева и др., 1976). Возбудителями являются два близкородственных морфологически сходных вида – *Crivellia papaveracea* (анаморфа – *Brachycladium penicillatum*) (syn. *Pleospora papaveracea* (de Not.) Sacc.,

(*Pleospora calvescens* (Fr.) Tul) и *Brachycladium papaveris* (syn. *Dendryphion papaveris* (Corda) Fr., *Helminthosporium papaveris* K. Savada). (Гасич и др., 2013).

В ряде работ представлены результаты исследований некоторых особенностей патологического процесса, вызываемого этими микромицетами (Миско, 1973; Дроздовская, 1977; Farr et al., 1999; Bailey et al., 2000 a, b; O'Neill et al., 2000). Для подтверждения и подробного изучения патологического процесса на растениях мака корневая шейка проростков в фазах семядолей и 1–2-х настоящих листьев была обработана культуральной жидкостью *B. papaveris* 1.39-8, содержащей мицелий и конидии с титром $\times 10^6$ КОЕ/мл. Первые симптомы поражения были зафиксированы на 7-е сутки после инокуляции. Максимальное количество погибших растений после первой обработки отмечено на 8-е сутки, после второй – уже на 5-е сутки; скорость гибели составила 3–4 растения/сутки и 5–6 растений/сутки, соответственно.

Микроскопическое исследование показало, что мицелий микромицета *B. papaveris* 1.39-8 сначала развивается на поверхности корневой шейки проростков мака. Затем ростковые гифы патогена проникают в ткани растения, распространяются по межклетникам, вызывая отмирание клеток хозяина. На поверхности пораженных участков и в некротизированной ткани формируется разветвленный мицелий и множественные конидиеносцы с конидиями, служащими для дальнейшего распространения поражения на здоровые участки проростков мака (рисунок 1). В процессе развития поражения стебель в области корневой шейки проростков скручивается, далее ткань некротизируется с образованием перетяжки. Затем в этом месте наблюдается переламывание стебля с последующей быстрой гибелью растений.

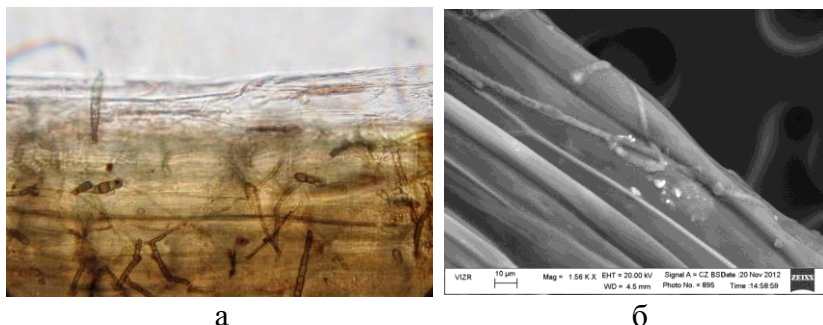


Рисунок – 1 Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – конидиогенез в растительной ткани, увеличение $\times 320$; б – распространение мицелия по поверхности пораженного стебля.

Следует особо отметить, что при инокуляции в период от фазы семядолей до формирования первого настоящего листа наблюдается поражение по типу увядания (псевдосистемное поражение), а при заражении растений мака в более поздние фазы развития – по типу пятнистости с формированием хлорозов и некрозов листьев и стебля. Это позволяет сделать вывод о том, что растения мака наиболее уязвимы для заражения грибом в фазу семядолей.

Глава 5. ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОТСЕЛЕКТИРОВАННЫХ ШТАММОВ *B.PAPAVERIS*

Технологичность перспективного штамма-продуцента микогербицида определяется возможностью быстрого получения большого количества жизнеспособного и качественного инокулюма (спор, фрагментов мицелия) на доступных и дешевых субстратах, способного сохранять целевую активность в

течение длительного времени. Для разработки способов получения разных препаративных форм на основе *V. papaveris* необходимо было подобрать питательные среды, сбалансированные по основным источникам питания, и оптимизировать условия культивирования штаммов-продуцентов.

Оптимизацию питательных субстратов проводили при жидкофазной и твердофазной ферментациях в несколько этапов. На первом этапе оценивали скорости изменения биомассы и количества жизнеспособных единиц штамма *V. papaveris* 1.39. Скорость накопления биомассы и интенсивность спорообразования отличалась при глубинном культивировании на разных по составу средах. Наилучшие показатели были получены при развитии *V. papaveris* 1.39 на соево-глюкозных средах. В течение цикла развития микромицета на СГС-2 наблюдалась стабильно высокая скорость накопления биомассы, которая в 1,5-6 раз превышала средние скорости накопления биомассы на других питательных средах и позволяла получать высокий титр спор $\times 10^5$ КОЕ/мл (рис. 1). На других средах (полная с пептоном, среда Сабуро, среда Борисова, жидкое сусло, среда Чапека, пептоно-глюкозная среда) интенсивность роста и развития культуры была значительно ниже.

На следующем этапе исследований проводили подбор и оптимизацию питательных субстратов, а также условий культивирования для обеспечения максимальной скорости роста и интенсивности споропродуктивности штаммов *V. papaveris* 1.39 и 1.39-8. Опираясь на полученные данные, оптимизацию сред и условий жидкофазной ферментации для штамма *V. papaveris* 1.39-8 проводили на следующих средах: оптимизированные питательные среды СГС-серии, контрольные синтетические среды (СЧ – среда Чапека и ССС – синтетическая среда с солями) и среды на основе пептона (ПП – полная с пептоном; ПС – пептоно-сахарозная; ПГ – пептоно-глюкозная). Максимум роста *V. papaveris* 1.39-8 наблюдали к 5-м суткам культивирования. К 7-м суткам отмечено торможение роста, вакуолизация и грануляция содержимого мицелия. Увеличение количества неорганических солей в составе питательных сред приводило к стабилизации накопления биомассы и споропродукции *V. papaveris* 1.39-8. Данные по различиям в средней скорости накопления биомассы при жидкофазной ферментации на питательных средах различного состава штаммов *V. papaveris* 1.39 и 1.39-8 представлены на рисунке 2.

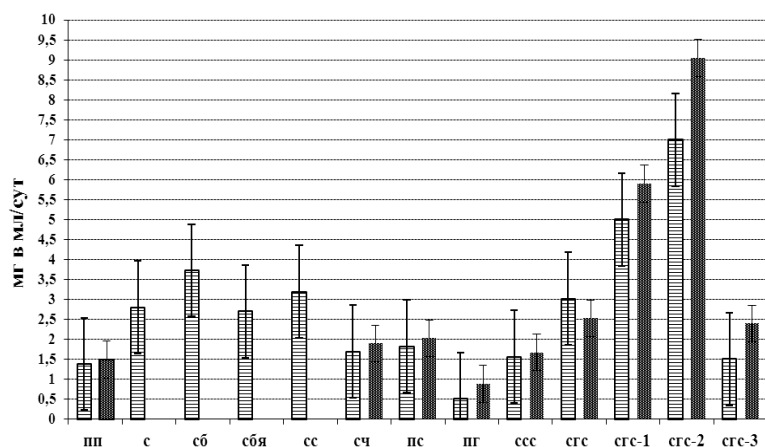


Рисунок – 2 Средняя скорость накопления биомассы штаммами *V. papaveris* 1.39 и 1.39-8 в глубинной культуре на питательных средах различного состава: ПП – полная с пептоном; С – жидкое сусло; СБ – среда Борисова; СБЯ – среда Борисова на яичном порошке; СС – среда Сабуро; СЧ – среда Чапека; ПС – пептоно-сахарозная среда; ПГ – пептоно-глюкозная среда; ССС – синтетическая среда с солями; СГС – соево-глюкозные среды (СГС; СГС-1; СГС-2; СГС-3).

Наиболее активно микромицеты накапливали биомассу на оптимизированной по минеральному и углеводному составу соево-глюкозной среде 2-ой модификации (СГС-2). Кроме того, именно на этой среде у штамма *B. papaveris* 1.39-8 была отмечена максимальная споропродуктивность и сохранение самого высокого титра КОЕ/мл в течение длительного времени.

Для подбора и оптимизации составов конверсионных субстратов и условий твердофазной ферментации проводили культивирование родительского и отселектированного штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 на промышленных субстратах, первично конвертированных вешенкой (*Pleurotus ostreatus*) и шии-таке (*Lentinus edodes*), а также оценивали потенциал мультиконверсионных субстратов после последовательного выращивания шии-таке и вешенки. В качестве контроля использовали синтетическую агаризованную среду Чапека и картофельно-сахарозный агар (КСА). Штаммы-продуценты *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 активно колонизировали промышленные конверсионные отходы, прорастая в толщу субстрата и образуя воздушный и субстратный мицелии. Развитие сопровождалось волнообразной споруляцией, начинающейся с 3-х суток культивирования. Смыв микромицетов с субстрата и их последующее микроскопирование показали наличие хорошо развитого мицелия и множества зрелых конидий обоих штаммов. В процессе культивирования штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 эффективность утилизации конверсионных субстратов оценивали по скорости роста (мм/сутки); титру жизнеспособных клеток (КОЕ/г); времени наступления спороношения; споропродуктивности (прямой подсчет в камере Горяева и/или оценка КОЕ методом серийных разведений).

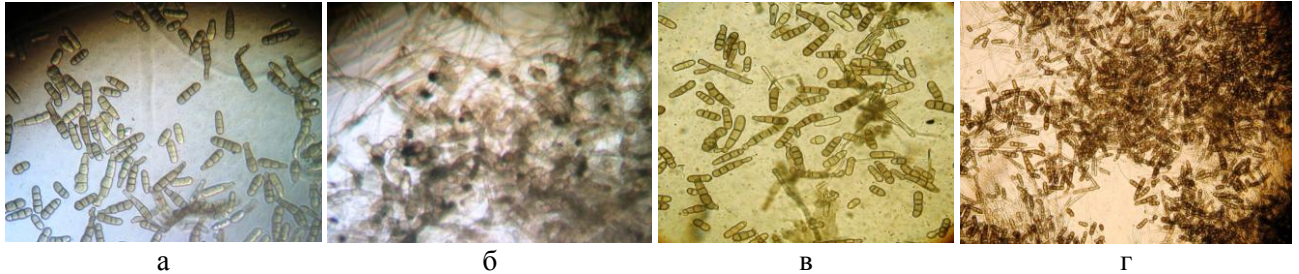


Рисунок – 3 Габитус мицелия и спороношения штамма *B. papaveris* 1.39-8 (7-е сутки культивирования) при жидкофазной и твердофазной ферментации: а – на соево-глюкозной среде, увеличение $\times 640$; б – на агаре Чапека, увеличение $\times 640$; на конверсионных субстратах (смыв с субстрата): в – после выращивания шиитаке, увеличение $\times 640$; г – после выращивания вешенки, увеличение $\times 320$.

Средние скорости роста и споропродукции штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при твердофазной ферментации на агаризованных средах Чапека и конверсионных субстратах различного состава представлены на рисунке 3.

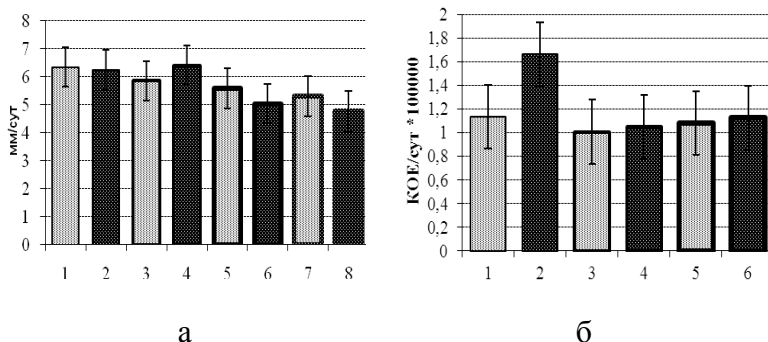


Рисунок – 4 Средние скорости роста (мм/сут) (а) и споропродукции (КОЕ/сут $\times 10^5$) (б) штаммов: 1 – *B. papaveris* 1.39-8 на агаризованной среде Чапека; 2 – *B. papaveris* 1.39-8 на КСА; 3 – *B. papaveris* 1.39, 4 – *B. papaveris* 1.39-8 на субстрате после *L. edodes*; 5 – *B. papaveris* 1.39, 6 – *B. papaveris* 1.39-8 на субстрате после *P. ostreatus*.

Таким образом, в процессе оптимизации питательных субстратов и условий культивирования отселектированного штамма *V. papaveris* 1.39-8 были выявлены высокие технологические потенциалы СГС-2 для жидкофазной ферментации и конверсионных отходов производства *L. edodes* для твердофазной ферментации, обеспечивающие скорости роста штамма до 9,1 мг/мл/сут и 5,2 мм/сут; споропродуктивность – до $6,6 \times 10^5$ КОЕ/мл и $5,4 \times 10^5$ КОЕ/г соответственно. Для получения лабораторных образцов биопрепаратов на основе отселектированного штамма *V. papaveris* 1.39-8 в дальнейшей работе использовали вышеназванные питательные субстраты.

Глава 6. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ОБРАЗЦОВ И ОПЫТНЫХ ПАРТИЙ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *V. PAPAVERIS* 1.39 И 1.39-8 И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОВМЕСТНО С ГЕРБИЦИДАМИ

Необходимый этап в разработке технологий подавления нежелательной растительности с использованием биогербицидов – оценка биологической эффективности лабораторных образцов биопрепаратов на основе отселектированных штаммов фитопатогенных видов в модельных вегетационных и в полевых опытах. При этом особенно важно подобрать инфекционную дозу, обеспечивающую максимальную эффективность в подавлении целевых растений, оценить качество и эффективность различных препаративных форм (Гасич и др., 1995; Шипилова и др., 2011; Павлюшин и др., 2013). Интегрированный биологический метод контроля нежелательной растительности совмещает различные биологические и химические средства, что позволяет существенно снизить нормы расхода и кратность обработок. Исследованиями сотрудников ГНУ ВИЗР отобраны перспективные химические гербициды из группы сульфонилмочевин и на основе метрибузина, характеризующиеся высокой избирательностью и фитотоксичностью, способные поражать целевые растения мака в период вегетации от всходов до формирования органов плодоношения.

При оценке биологической эффективности лабораторных образцов биопрепаратов на основе отселектированных штаммов *V. papaveris* 1.39 и 1.39-8 учитывали показатели вредоносности вызываемых ими поражений целевых растений мака снотворного и изменения биометрических показателей развития. Проведено сравнительное изучение эффективности совместного и последовательного применения лабораторных образцов биопрепаратов на основе *V. papaveris* 1.39-8 и гербицидов. При этом оценивали показатели скорости роста штамма-продуцента, вредоносности поражений, биометрические показатели развития и гибели растений мака.

Для подбора оптимальной инфекционной дозы и оценки биологической эффективности лабораторного образца жидкой препаративной формы на основе штамма *V. papaveris* 1.39 растения мака в фазе 2-3 настоящих листьев опрыскивали водными суспензиями гриба с концентрациями инфекционных единиц микроциста $\times 10^3$ – $\times 10^5$ КОЕ/мл. Штамм-продуцент *V. papaveris* 1.39 эффективно заражал растения мака в полевых условиях: через 7 суток после обработки на всех розетках листьев у растений мака появились хорошо заметные хлорозы и некрозы (2–4 балла). Для увеличения эффективности

подавления целевых растений оценили возможности комплексного использования биологических средств и химических гербицидов.

Для приготовления рабочих растворов использовали гербициды на основе концентраций действующих веществ (д.в.) метсульфурон-метила (Ларен, СП; НР – 100 г/л) – 0,5 и 1 мл/10м² и метрибузина (Зонтран, ККР; НР – 250 г/л) – 1 и 2 мл/10м² при нормах расхода рабочей жидкости 50 и 200 мл/10м².

Воздействие гербицидов на рост и развитие штаммов-продуцентов оценивали по изменениям средней скорости роста микромицетов. Все исследованные гербициды во всех оцениваемых концентрациях подавляли рост и развитие штаммов *V. papaveris* 1.39 и 1.39-8. Штамм-продуцент *V. papaveris* 1.39-8 оказался более устойчивым к воздействию гербицидов по сравнению с родительским штаммом *V. papaveris* 1.39: выявили снижение скорости роста под воздействием различных доз Зонтрана, ККР в 3,3–4 и 1,6–2,7 раза, соответственно, Ларена, СП – в 2,1–3,3 и 1,9–2,1 раза, соответственно. Микромицет продолжал расти и развиваться после завершения опыта с добавлением Ларена, СП, что свидетельствует о возможности его применения совместно с данным гербицидом.

При оценке биологической эффективности использования штамма *V. papaveris* 1.39-8 совместно с химическими гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в пониженных концентрациях применили однократное опрыскивание в полевых условиях образцами биопрепарата растений мака в фазе 2–3-х настоящих листьев при норме расхода рабочей жидкости 1000 л/га. Титр рабочего раствора биопрепарата составлял $\times 10^6$ КОЕ/мл. В контроле растения обрабатывали водой (таблица 4).

Таблица 4 – Биологическая эффективность лабораторных образцов препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 в полевых условиях

Варианты опыта	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Гибель растений, %	Потери в..., %	
			высоте	биомассе
Контроль (без обработки)	-	18.0	0	0
Образец жидкой препаративной формы	1.1×10^6	6.1	44.0	63.4
НСП 0,5%		-	40.4	100
Образец гранулированной препаративной формы *	1.2×10^6	11.7	27.9	0
НСП 0,5%			45.5	0

Примечание: *использовали водную суспензию пропагул *V. papaveris* 1.39-8, полученную смывом с гранулированной препаративной формы.

Оценка результатов применения Ларена, СП и Зонтрана, ККР для подавления растений мака во всех используемых концентрациях выявила высокую эффективность гербицидов. Однако полную гибель целевых растений наблюдали только при рекомендованных нормах расхода химических препаратов (таблица 5).

Опрыскивание растений мака водной суспензией пропагул гриба в смеси с пониженными концентрациями гербицида Ларен, СП существенно усилило биологическую эффективность биопрепарата. У всех растений наблюдались обширные хлорозы и некротическое поражение листьев на всех листовых ярусах, растения были в значительной степени угнетены: потери в росте – 63,2–73,8 %, в

биомассе – 39,7–82,5 % по сравнению с контролем. Гибель растений составила 94,2–99,4 %. В дальнейшем растения мака не отрастали (таблица 6).

Таблица 5 – Биологическая эффективность различных концентраций гербицидов Ларен, СП и Зонтран, ККР в полевых условиях

Варианты опыта	Гибель растений, %	Потери в ..., %			
		высоте	НСР _{0,5}	биомассе	НСР _{0,5}
Контроль (без обработки)	18,0	0	0	0	0
Ларен, СП, ¼ НР	89,2	79,1	2,7	81,9	11,6
Ларен, СП, ½ НР	99,4	92,9	2,1	99,3	11,4
Ларен, СП, НР	100	100	1,9	100	11,4
Зонтран, ККР ¼ НР	90,4	70,9	2,8	77,7	11,8
Зонтран, ККР ½ НР	100	100	1,9	100	11,4
Зонтран, ККР НР	100	100	1,9	100	11,4

Предварительно в условиях модельных вегетационных опытов было показано, что последовательная обработка проростков мака жидкой препаративной формой на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 и гербицидами в пониженных концентрациях более эффективна на ранних этапах развития целевого растения мака – фазу семядолей.

Таблица 6 – Биологическая эффективность лабораторных образцов препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 и их смесей с гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в полевых условиях

Варианты опыта	Гибель растений, %	Потери в ..., %			
		высоте	НСР _{0,5}	био-массе	НСР _{0,5}
Контроль (без обработки)	18,0	0	0	0	0
Образец гранулированной формы* + Ларен, СП, ¼ НР	71,6	73,8	2,6	39,7	12,2
Образец гранулированной формы* + Ларен, СП, ½ НР	92,9	63,2	3,4	82,5	11,5
Образец гранулированной формы* + Зонтран, ККР, ¼ НР	99,4	94,0	2,2	98,7	11,4
Образец гранулированной формы* + Зонтран, ККР, ½ НР	100	100	1,9	100	23,7

Примечание: * использовали водную суспензию пропагул *V. papaveris* 1.39-8, полученную смывом с гранулированной препаративной формы.

В полевых условиях было проведено довсходовое внесение в почву лабораторного образца гранулированной препаративной формы на основе *V. papaveris* 1.39-8. Затем в фазах 1–2-го и 3–4-го настоящих листьев проростки мака были обработаны жидкой препаративной формой. Это позволило обеспечить необходимый уровень инфекционного фона и высокую биологическую эффективность: всех вариантах опыта наблюдали хлорозы и некрозы листьев, угнетение роста и гибель растений мака. Распространённость болезни достигала 79 %, а гибель растений – 13,7 %. Снижение биомассы мака за период наблюдения составило 66,3%, высоты растений – 63,7%; площадь ассимиляционной поверхности сократилась на 72 %. Последующее использование пониженных концентраций гербицидов повысило биологическую эффективность: распространённость достигла 100%; гибель – 35–40%.

В вариантах опыта с последовательным применением гербицида Ларен, СП в ¼ НР и ½ НР потери в биомассе составили 84,4–87 %, в высоте – 82,4–91 %, ассимиляционной поверхности – 83,7–100 %. Применение более высоких концентраций гербицида Ларен, СП было менее эффективным (таблица 7).

Таблица 7 – Биологическая эффективность последовательного применения гербицида Ларен, СП после трехкратной обработки образцами препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 в полевых условиях против растений мака (14-е сутки после применения гербицида)

Варианты опыта	Гибель растений, %	Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %	Потери в..., %		
				высо-те	био-массе	ассимиля-ционной поверхности листьев
Контроль (без обработки)	9,52	23,28**	0,98	0	0	0
ЛО* <i>V papaveris</i> 1.39-8	13,72	79,11	25,02	63,67	66,33	72,04
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/8 НР	35,31	100	8,57	82,42	84,42	68,76
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/4 НР	29,64	100	8,03	90,67	86,96	83,65
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/2 НР	40,42	100	7,61	85,72	78,74	100
НСР _{0,5}	18,7	56,6	4,4	48,3	47,3	48,7

Примечание: *ЛО – лабораторные образцы на основе *V papaveris* 1.39-8; ** – в контроле указывается заболеваемость растений любой этиологии.

В вариантах с обработкой растений мака гербицидом Зонтран, ККР в 1/8 НР потери в биомассе составили 76,9 %, высоте растений – до 33–75 %, ассимиляционной поверхности листьев - на 46,5–70,5%. Применение более высоких концентраций гербицида в сочетании с трехкратной обработкой биопрепаратом привело к повышению эффективности. При использовании Зонтран, ККР 1/4 НР потери биомассы составили только 53,2 %, при использовании Зонтран, ККР 1/2 НР достигли 85,9 % (таблица 8).

Таблица 8 – Биологическая эффективность последовательного применения гербицида Зонтран, ККР после трехкратной обработки образцами препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 в полевых условиях против растений мака (14-е сутки после применения гербицида)

Варианты опыта	Гибель растений, %	Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %	Потери в..., %		
				высо-те	био-массе	ассимиля-ционной поверхности листьев
Контроль (без обработки)	9,52	23,28	0,98	0	0	0
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8	13,72	79,11	25,02	63,67	66,33	72,04
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/8 НР	13,59	93,99	4,56	74,75	76,92	46,48
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/4 НР	13,72	93,64	4,41	33,45	53,15	70,46
ЛО <i>V papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/2 НР	10,49	95,57	5,46	63,43	85,85	64,59
НСР _{0,5}	7,7	53,9	2,9	36,1	42,6	38,2

Потери в биомассе растений мака после использования гербицида Ларен, СП составляли 70,9–100 % при разных концентрациях препарата. Эффективность Зонтрана, ККР была несколько ниже, и потери биомассы достигли 55–72,8 %. Полная норма расхода Зонтрана, ККР приводила к гибели мака (таблица 9).

Проведенные полевые испытания выявили эффективность применения лабораторных образцов на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 для подавления растений мака: после обработки проростков в ранние фазы развития потери высоты растений составили 64 % и 44 %; биомассы – 66 % и 63 %; ассимиляционной поверхности листьев – 79 % и 75 %, соответственно. Гибель растений достигла

14 % и 12 % через 7 суток после обработки растений при распространенности микоза мака 79 % и 51 % и развитии – 25 % и 22 %, соответственно.

Таблица 9 – Биологическая эффективность применения Ларена, СП и Зонтрана, ККР в полевых условиях против растений мака (14-е сутки после применения)

Варианты опыта	Гибель растений, %	Распространенность поражения гербицидами/болезни, %	Потери в ..., %		
			высоте	биомассе	ассимиляционной поверхности листьев
Контроль (без обработки)	9,52	23,28	0	0	0
Ларен, СП 1/8 НР	0	77,78	78,58	70,85	76,86
Ларен, СП 1/4 НР	33,33	100	100	100	100
Ларен, СП 1/2 НР	44,44	100	100	100	100
Ларен, СП НР	24,56	100	83,29	74,94	100
Зонтран, ККР 1/8 НР	14,29	100	59,49	72,81	81,19
Зонтран, ККР 1/4 НР	28,57	100	59,91	71,17	90,02
Зонтран, ККР 1/2 НР	30,29	100	43,73	54,59	79,02
Зонтран, ККР НР	100	66,67	100	100	100
НСР _{0,5}	27,6	55,8	47,3	48,7	54,2

Под воздействием лабораторных образцов на основе штамма *B. papyaveris* 1.39-8 происходила не только гибель проростков, но их ослабление за счет развития заболевания, вызванного микромицетом, поэтому к моменту применения гербицида 79 % целевых растений были поражены. Поэтому дальнейшее воздействие пониженных концентраций гербицида приводило к их полной гибели с более коротким периодом ожидания по сравнению с обработкой полными гектарными нормами расхода.

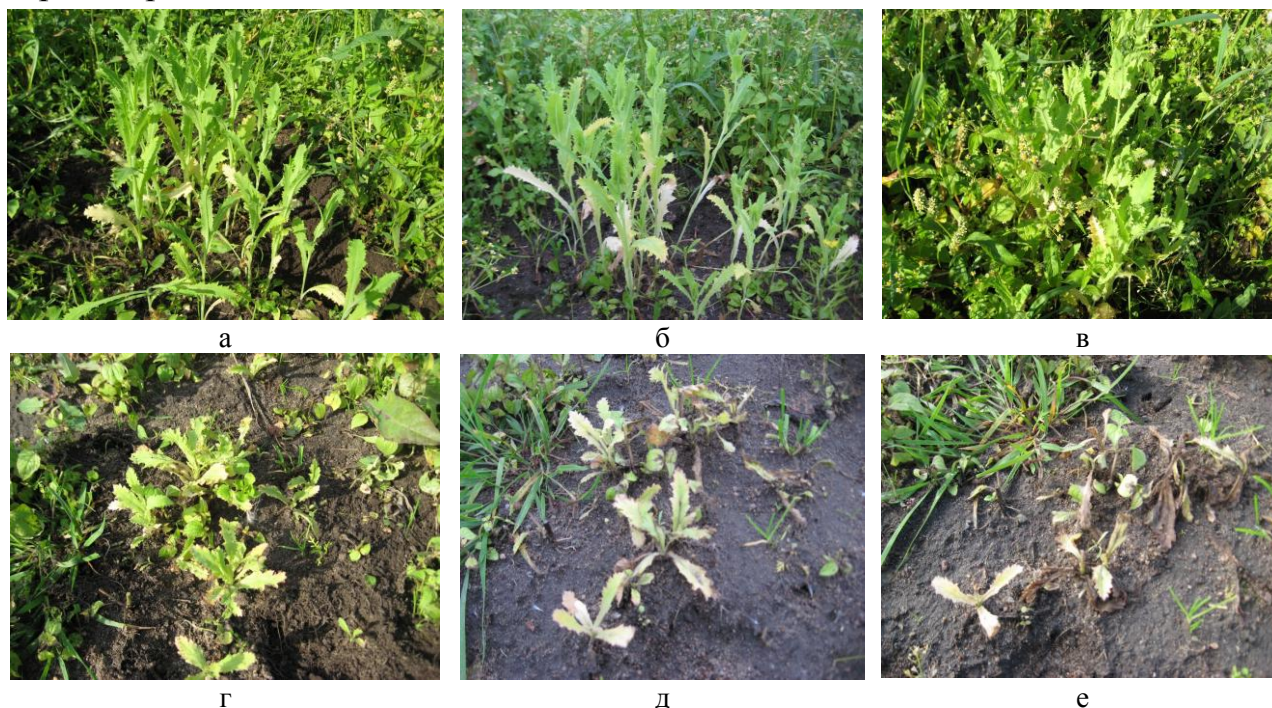


Рисунок – 5 Биологическая эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе *B. papyaveris* 1.39-8 и Ларена, СП: Контроль (без обработки): а – 21-е, б – 37-е, в – 44-е сутки учета; Ларен, СП 1/4 НР: г – 14-е, д – 21-е, е – 28-е сут. после применения гербицида.

Воздействие высоких концентраций гербицидов приводило к падению эффективности *B. papyaveris* 1.39-8, способствовало ремиссии растений мака и более длительному периоду, предшествующему их гибели от примененного химического

препарата. Это позволяет предположить, что более раннее применение Зонтрана, ККР и особенно Ларена, СП, совмещенное во времени с максимальным нарастанием биологической эффективности лабораторных образцов на основе *V. papaveris* 1.39-8, позволит существенно повысить эффективность их последовательного применения.

Таким образом, проведенные исследования показали высокую эффективность последовательного применения трехкратной обработки образцами препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 при норме расхода препарата – 10 кг/га, рабочего раствора – 1000 л/га и гербицида Ларен, СП с интервалом 7–10 суток при $\frac{1}{8}$ -й и $\frac{1}{4}$ -й НР от рекомендованной гектарной нормы расхода гербицида. Потери высоты целевых растений к 14-м суткам после применения гербицида составили 82–91 %, биомассы – 79–84 %, ассимиляционной поверхности листьев – 69–100 %. В этих случаях эффективность обработки практически соответствовала эффективности применения Ларена, СП и Зонтрана, ККР при полной норме расхода и приводила к полному искоренению целевых растений мака.

Выводы

1. В результате направленной селекции штамма *V. papaveris* 1.39, выделенного из пораженных черной пятнистостью растений мака, получен стабильный высокоагрессивный в отношении целевых растений штамм *V. papaveris* 1.39-8.
2. Штамм 1.39-8 характеризуется значительной морфологической изменчивостью. При культивировании гриба на синтетической среде выявлены морфотипы, различающиеся по скорости роста и интенсивности споруляции. При глубинном и твердофазном культивировании на естественных средах развитие культуры происходит по быстрорастущему среднеспоровому морфотипу, образующему комплекс фитотоксинов с основным активным компонентом, отнесенным к бензохинонам.
3. Отселектированный штамм 1.39-8 наиболее агрессивен в фазе семядолей: гриб активно развивается на поверхности корневой шейки проростков мака, в течение 3–5-и суток вызывая отмирание растительных клеток. Развитие болезни при заражении растений мака в фазе семядолей до формирования первого настоящего листа происходит по типу увядания, в более поздние фазы развития – по типу пятнистости.
4. Штамм-продуцент 1.39-8 технологичен для жидкофазного и твердофазного культивирования: в процессе оптимизации питательных субстратов и условий культивирования подобраны состав соево-глюкозной питательной среды с солями для глубинной ферментации и конверсионные отходы производства шии-таке для твердофазной ферментации, обеспечивающие скорость роста штамма более 9 мг/мл/сут и 5 мм/сут соответственно; споропродуктивность составила $\times 10^6$ колониеобразующих единиц в мл или в грамме.
5. В лабораторных модельных опытах выявлена высокая агрессивность отселектированного штамма 1.39-8. Опрыскивание проростков мака в фазе семядолей суспензиями лабораторных образцов с титром жизнеспособных клеток $\times 10^6$ КОЕ/мл приводило к снижению высоты растений на 58 %, биомассы – на 64 %, ассимиляционной поверхности листьев – на 77 %. Распространенность болезни составила 57 %, развитие – 28 %. Гибель проростков достигла 77 %.

6. Полевые испытания подтвердили эффективность применения лабораторных образцов на основе штамма 1.39-8 для подавления растений мака: после двукратного опрыскивания в фазы семядолей и 2–3-х настоящих листьев суспензиями лабораторных образцов с титром жизнеспособных клеток $\times 10^6$ КОЕ/мл потери высоты растений составили 64 %; биомассы – 66 %; ассимиляционной поверхности листьев – 79 %. Распространенность микоза мака через 7 суток после обработки растений достигла 79 %, развитие болезни – 25 %. Гибель растений составила 14 %.

7. Биологическая эффективность обработок гербицидами Лареном, СП и Зонтраном, ККР и их баковыми смесями с лабораторными образцами на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 была одинаковой вследствие подавления развития гриба гербицидами: потери высоты растений мака составили 74-99%; биомассы – 82-100%, гибель растений достигала 91-99%.

8. Показано существенное повышение биологической эффективности обработок при последовательном трехкратном применении образцов на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 путем предпосевного внесения гранулированной формы и опрыскивания в ранние фазы развития с последующей обработкой ослабленных микозом растений химическими гербицидами в пониженных концентрациях.

9. Высокая агрессивность гриба в отношении целевых растений и синергидный эффект с пониженными концентрациями Ларена, СП и Зонтрана, ККР сокращали период ожидания после обработок до 2–4-х суток. Уже к 14-м суткам после применения Ларена, СП и Зонтрана, ККР потери высоты растений составили 91 % и 75 %; биомассы – 87 % и 86 %, ассимиляционной поверхности листьев – 99 % и 71 % соответственно. Гибель растений на 14-е сутки достигла 40 % и 14 %, соответственно.

10. При последовательных обработках растений гербициды в более высоких концентрациях снижали эффективность образца на основе *V. papaveris* 1.39-8 и увеличивали период ожидания.

Практические рекомендации

Материалы диссертации легли в основу ТУ, регламентов производства и применения лабораторных образцов на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8. Для получения опытных партий препаративных форм на основе штамма-продуцента при жидкофазной и твердофазной ферментации рекомендовано использовать оптимизированные по составу питательные среды и субстраты, а также условия культивирования.

Для подавления растений мака рекомендовано последовательное трехкратное применение препаративных форм на основе штамма *V. papaveris* 1.39-8 и гербицидов в пониженных концентрациях согласно следующему регламенту:

1. Довсходовое внесение в почвы субстратной гранулированной препаративной формы при норме расхода 10 кг/га.

2. Двукратное опрыскивание жидкой препаративной формой в фазе семядолей и 2–4-х настоящих листьев (1000 л/га) с последующим опрыскиванием целевых растений гербицидами Ларен, СП; и Зонтран, ККР в пониженных концентрациях ($\frac{1}{8}$ НР; $\frac{1}{4}$ НР).

Список работ по теме диссертации:

1. Новикова, И. И. Особенности развития штамма *Dendryphion penicillatum* 1.39 на питательных субстратах различного состава / И.И. Новикова, Ю.А. Титова, **И.Л. Краснобаева** и др. // Микология и фитопатология. – 2010. – Т.44. – вып.1. – С. 71 – 87.
2. Титова, Ю. А. Вторичные эндометаболиты штамма *Brachycladium papaveris* 1.39 и его реизолятов / Ю. А. Титова, Ю. Д. Шенин, В. А. Павлюшин, **И. Л. Краснобаева** // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47. – вып. 4. – С. 266 – 273.
3. Павлюшин, В. А. Лабораторный регламент на производство гранулированного субстратного биопрепарата на основе штамма *Brachycladium papaveris* 1.39-8 путем двухступенчатой биоконверсии отходов сельского хозяйства, первично конвертированных *Pleurotus ostreatus* / В. А. Павлюшин, Ю. А. Титова, И. И. Новикова, **И. Л. Краснобаева** и др. // Регламенты производства мультиконверсионных биопрепаратов. Под ред. акад. Россельхозакадемии В. А. Павлюшина. СПб: ВИЗР. – 2009. – 50 с.
4. Павлюшин, В. А. Гранулированный субстратный двухэтапноконверсионный биопрепарат на основе штамма *Brachycladium papaveris* 1.39-8 – «Субстратный вешеночный мультиконверсионный биопрепарат на основе *Brachycladium papaveris* 1.39-8, Г» / В. А. Павлюшин, Ю. А. Титова, И. И. Новикова, **И. Л. Краснобаева** и др. // Технические условия на производство мультиконверсионных биопрепаратов. Под ред. акад. Россельхозакадемии В. А. Павлюшина. СПб: ВИЗР. – 2009. – 15 с.
5. Павлюшин, В. А. Лабораторный регламент на производство гранулированного субстратного биопрепарата на основе штамма *Brachycladium papaveris* 1.39-8 путем двухступенчатой биоконверсии отходов сельского хозяйства, первично конвертированных *Lentinus edodes* / В. А. Павлюшин, Ю. А. Титова, И. И. Новикова, **И. Л. Краснобаева** и др. // Регламенты производства мультиконверсионных биопрепаратов. Под ред. акад. Россельхозакадемии В. А. Павлюшина. СПб: ВИЗР. – 2009. – 50 с.
6. Павлюшин, В. А. Гранулированный субстратный двухэтапноконверсионный биопрепарат на основе штамма *Brachycladium papaveris* 1.39-8 – «Субстратный шиитачный мультиконверсионный биопрепарат на основе *Brachycladium papaveris* 1.39-8, Г» / В. А. Павлюшин, Ю. А. Титова, И. И. Новикова, **И. Л. Краснобаева** и др. // Технические условия на производство мультиконверсионных биопрепаратов. Под ред. акад. Россельхозакадемии В. А. Павлюшина. СПб: ВИЗР. – 2009. – 15 с.
7. Павлюшин, В. А. Регламент технологии применения биологических средств для экологически обоснованного уничтожения незаконных посевов мака с помощью наземной техники / В. А. Павлюшин, И. И. Новикова, Ю. А. Титова, А. К. Лысов, **И. Л. Краснобаева** и др. // Госконтракт МСХ РФ №1295/13 от 21.09.2006 г. Этап 17.1. – 2009. – 36 с.

8. Павлюшин, В. А. Регламент технологии применения биологических средств для экологически обоснованного уничтожения незаконных посевов и дикорастущего мака с помощью малой авиации / В. А. Павлюшин, И. И. Новикова, Ю. А. Титова, А. К. Лысов, **И. Л. Краснобаева** и др. // Госконтракт МСХ РФ №1295/13 от 21.09. 2006 г. Этап 17.2. – 2009. – 38 с.
9. Новикова, И. И. Современные подходы к созданию препаративных форм на основе фитопатогенных грибов для подавления конопли и мака / И. И. Новикова, А. П. Дмитриев, Ю. А. Титова, **И. Л. Краснобаева** // Межд. науч. конф. «Защита растений и продовольственная безопасность России», симпозиум «Средства и методы подавления растений конопли и мака» (к 80-летию ВИЗР). Тезисы докладов. – СПб: ВИЗР, 2009. – С. 8 – 9.
10. Титова, Ю. А. Эффективность биологических и химических препаратов для подавления растений мака / Ю. А. Титова, Т. А. Маханькова, **И. Л. Краснобаева** // Межд. науч. конф. «Защита растений и продовольственная безопасность России», симпозиум «Средства и методы подавления растений конопли и мака» (к 80-летию ВИЗР). Тезисы докладов. – СПб: ВИЗР, 2009. – С. 15.
11. Новикова, И. И. Биологическая эффективность опытных партий биопрепаратов на основе штамма *Brachycladium papaveris* и перспективы его использования с гербицидами / И. И. Новикова, Ю. А. Титова, **И. Л. Краснобаева** // Сб. науч. тр. Междунар. науч.-практич. конф. проф.-препод. состава СПбГАУ «Научное обеспечение инновационного развития АПК». – СПб – 2014. – С. 96 – 98.

