

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

На правах рукописи

КРАСНОБАЕВА

Ирина Леонтьевна

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММОВ
ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BRACHYCLADIUM PARAPERIS*
ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ МАКА**

06.01.07 – защита растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Новикова Ирина Игоревна

Санкт-Петербург

2014

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. История выращивания культуры мака.....	11
1.2. Современные меры борьбы с нежелательной растительностью.....	14
Механический метод.....	14
Химический метод.....	14
Биологический метод	16
1.3. Требования к штаммам-продуцентам и препаративным формам микогербицидов.....	19
1.4. Препаративные формы биогербицидов.....	21
1.5. Интегрированный метод подавления нежелательной растительности.....	25
1.6. Биологический контроль наркотикосодержащих растений.....	30
1.7. Болезни мака.....	31
1.8. Черная пятнистость мака.....	37
Глава 2. Материалы, методы и объекты исследований.....	47
2.1. Материалы и объекты исследований.....	47
Объекты исследований.....	47
Материалы исследований.....	48
Химические гербициды.....	49
Поверхностно-активное вещество (ПАВ) Силиплант.....	52
Конверсионные субстраты.....	53
2.2. Методы исследований.....	54
Методы создания инокулюма.....	54
Методы исследования морфотипов штаммов <i>B. papaveris</i>	55
Методы получения и оценки стабильности моноспоровых изолятов.....	56
Методы оптимизации питательных сред.....	57
Методы определения накопления биомассы при глубинном и	

твердофазном культивировании.....	59
Методы получения лабораторных образцов.....	59
Методы получения растительного материала.....	60
Методы реизоляции штаммов.....	61
Методы оценки биологической эффективности лабораторных образцов.....	61
Методы оценки влияния химических гербицидов на жизнеспособность штаммов <i>B. papaveris</i>	62
Методы обработки растений лабораторными образцами и химическими гербицидами.....	63
Методы выделения и характеристики основного активного компонента метаболитного комплекса.....	67
Методы оценки фитотоксичности компонентов метаболитного комплекса штаммов-продуцентов для семян и проростков мака.....	68
Методы выявления антагонистической активности компонентов метаболитного комплекса.....	69
Методы изучения патологического процесса.....	69
Статистическая обработка экспериментальных данных.....	70
Глава 3. Направленная селекция на технологичность и агрессивность штаммов <i>B. papaveris</i> 1.39.....	71
3.1. Морфотипы штамма фитопатогенного гриба <i>B. papaveris</i> 1.39 и их патогенность.....	72
3.2. Моноспоровые изоляты штамма <i>B. papaveris</i> 1.39 и их патогенность.....	81
3.3. Морфотипы отселектированного штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 и их патогенность.....	92
3.4. Особенности комплекса активных эндометаболитов мицелия штаммов <i>B. papaveris</i> 1.39 и 1.39-8.....	98
Глава 4. Патогенез на маке снотворном при его поражении штаммами <i>B. papaveris</i> 1.39 и 1.39-8.....	109
Глава 5. Оптимизация питательных сред и условий культивирования	

отселектированных штаммов <i>B. papaveris</i>	120
5.1. Динамика роста и развития штаммов фитопатогенного гриба <i>B. papaveris</i> 1.39 на лабораторных и промышленных питательных средах.....	122
5.2. Подбор и оптимизация питательных сред и условий культивирования отселектированных штаммов <i>B. papaveris</i>	126
Глава 6. Биологическая эффективность лабораторных образцов и опытных партий биопрепаратов на основе штаммов <i>B. papaveris</i> 1.39 и 1.39-8 и перспективы их использования совместно с гербицидами.....	145
6.1. Оценка эффективности лабораторного образца на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39 против мака снотворного в полевых условиях.....	146
6.2. Воздействие различных доз гербицидов на отселектированные штаммы <i>B. papaveris</i> 1.39 и 1.39-8.....	147
6.3. Оценка биологической эффективности различных форм лабораторных образцов на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 совместно с химическими гербицидами против мака снотворного в полевом опыте.....	153
6.4. Особенности и эффективность последовательного применения различных лабораторных образцов на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 и гербицидов против мака снотворного.....	159
6.5. Биологическая эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 и пониженных концентраций гербицидов в отношении растений мака в полевых условиях при разных технологиях внесения.....	170
Выводы.....	183
Практические рекомендации.....	185
Список использованной литературы.....	186
Приложение.....	205

Введение

Употребление наркотиков – одна из острейших проблем современности, а наркомания – это глобальная проблема общества. В мире более 200 млн. человек употребляют наркотики, и с каждым годом число наркозависимых возрастает. В России за последние семь лет их количество увеличилось в девять раз. По оценкам Министерства здравоохранения около 6-ти миллионов россиян (из 143 миллионов населения), или 4,2 % регулярно принимают наркотики. При этом динамика роста численности наркозависимых сохраняется (Транснациональный наркобизнес: новая глобальная угроза, 2002; Емельянов, 2002; Доклад ..., 2008, электронный ресурс).

В производстве наркотиков одно из наиболее значимых растений – мак снотворный. На протяжении длительного времени мак выращивали как культурное растение, используемое в фармакологии и кулинарии. Первое упоминание о маке как о культурном растении датируется II тысячелетием до н.э. Гиппократ и Теофраст (конец IV век до н.э.) описывали его болеутоляющие и успокаивающие свойства. В I веке до н.э. греческие, арабские и китайские лекари использовали опий, получаемый из мака, в качестве лекарства против многих болезней и снотворного средства. В VII - XIII века в опий начали употреблять в пищу, а затем и курить. К этому времени можно отнести начало использования опия в качестве наркотика. В середине XX века 40% ежегодно производимого во всем мире опиума использовали в медицине, остальные 60% использовали в качестве наркотика. В настоящее время из незаконного оборота наркотиков изымается не более 15% наркотических веществ, из них около 22% приходится на опиаты (Гасымов, 2002).

С каждым годом в мире и в нашей стране увеличиваются площади незаконных посадок наркотикосодержащих растений, и расширяется сеть наркотраффика (Транснациональный ..., 2002). В связи с этим, разработка способов подавления растительности, содержащей наркотические вещества, становится задачей первостепенной важности, что определяет актуальность проведенных исследований.

На протяжении длительного времени эффективно применяется механическое уничтожение нежелательной растительности. Использование этого метода приводит к полному искоренению растений и не оказывает негативного влияния на окружающую среду. Однако он отличается высокими трудо- и энергозатрадами, а его результативность зависит от полноты информации о расположении посевов наркотикосодержащих растений.

Химический метод борьбы с сорняками основан на использовании селективных и высокоэффективных гербицидов на основе большого числа различных действующих веществ. Гербициды способны поражать нецелевые растения, в том числе, сельскохозяйственные культуры, т.к. обладают широким спектром действия. Целый ряд химических гербицидов могут быть токсичными для теплокровных животных и человека. К недостаткам химических гербицидов также можно отнести вероятность смыывания дождевыми водами и, в связи этим, необходимость многократного применения.

В настоящее время значительно расширены исследования, направленные на анализ возможности использования фитопатогенных грибов в борьбе с сорняками и нежелательной растительностью. Многие виды микромицетов высокоспецифичны, быстро распространяются в популяциях растений-хозяев и не оказывают негативного влияния на теплокровных животных и человека. Штаммы грибов способны утилизировать широкий спектр источников питания, их можно легко культивировать на искусственных питательных средах, что позволяет накапливать инфекционный инокулюм в промышленных масштабах. Кроме того, микромицеты способны синтезировать вещества, обладающие гербицидными свойствами, и, тем самым, служить продуцентами биологических гербицидов. Микогербициды активно применяют в отношении таких широко распространенных и трудно искоренимых сорняков, как осот и бодяк полевой, горчак ползучий, горец, подмаренник цепкий, вьюнок полевой, марь белая (Charudattan et al., 1997; Hasan, 1983, Исаева 1972, 1985, 1987; Берестецкий, 1997; Гасич и др. 1995, 2007). Использование биологических гербицидов на основе фитопатогенных грибов и их метаболитных комплексов может быть как альтернативой, так и дополнением химическому методу.

Создание эффективной технологии регуляции численности вредных популяций, в первую очередь, основано на формировании набора штаммов-продуцентов биопрепаратов, обладающих следующими характеристиками (Новикова, 2005):

1. Высокий адаптационный потенциал и эффективные экологические тактики, позволяющие не только выживать в меняющихся природных условиях в течение длительного времени, но и эффективно сдерживать нарастание плотности популяций вредных видов.

2. Активный синтез комплексов БАВ с высокой полифункциональной биологической активностью по отношению к ряду вредных объектов.

3. Хорошие технологические характеристики, способность утилизировать дешевые и доступные источники питания, выдерживать разные режимы концентрирования и высушивания, длительно сохранять жизнеспособность и целевую активность в разных препаративных формах.

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 задепонированная в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР коллекция содержит 242 изолята 27 видов микромицетов из 20 родов, 9 семейств, 6 порядков, 3 отделов. Показана высокая биологическая активность штаммов нескольких видов микромицетов *Brachycladium papaveris*, *Dendryphion penicillatum* 1.39, *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 возбудитель черной пятнистости *Brachycladium 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* 1.39 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 на маке снотворном отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39.
- 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 *B. papaveris* 1.39 по показателям скорости накопления биомассы и споропродуктивности.
- Охарактеризовать метаболитные комплексы отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39 по показателям фитотоксичности для целевых и нецелевых растений.
- Оценить биологическую активность лабораторных образцов биогербицида на основе штамма *B. papaveris* 1.39 в модельных лабораторных и вегетационных опытах на растениях мака.
- Оценить биологическую эффективность опытных партий биогербицида на основе отселектированного штамма *B. 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 *Brachycladium papaveris* 1.39 получен стабильный, агрессивный и вредоносный штамм *Brachycladium 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 *B. papaveris*, и определена наиболее уязвимая для инфицирования фаза развития мака. Показано, что существенное значение в патогенезе имеет синтезируемый штаммом *Brachycladium 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 *B. 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 *Brachycladium papaveris* 1.39-8, на основании чего предложены различные технологии совместного применения препаративных форм на его основе и химических гербицидов в пониженных нормах расхода 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 *B. papaveris* 1.39-8, полученный в результате направленной селекции из исходного изолята *B. 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 глубинной 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 норм расхода 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".

Глава 1. Обзор литературы

1.1. История выращивания культуры мака

Одно из наиболее значимых растений в производстве наркотиков – мак снотворный. Мак на протяжении длительного времени выращивали как культурное растение, используемое в фармакологии и кулинарии. Первые исторические данные о маке как о культурном растении относятся к временам микенского царства (II тысячелетие до н.э.), находившегося на полуострове Пелопоннес. Снотворные и лечебные свойства мака были известны и ассирийцам, которые выращивали мак в царских садах вместе с овощами. Первые определенные указания на лечебные свойства напитка из мака приводят Гиппократ и Теофраст (конец IV век до н.э.). Они описывают его болеутоляющие и успокаивающие свойства. В I веке до н.э. греческие лекари активно используют опий, получаемый из мака, в качестве лекарства против многих болезней. В арабской медицине опий также широко применяли в качестве снотворного средства. Отвар из маковых головок и опий прочно заняли свое место в китайской медицине в качестве лекарства от многих болезней – дизентерии, ревматизма, астмы. В VII веке в Персии, а с XIII века в Китае и Индии, начали употреблять опий в пищу, смешивая его с ароматическими и сладкими пряностями, чуть позже его стали курить. К этому времени можно отнести начало использования опия в качестве наркотика.

В связи с полезными свойствами мака, на протяжении длительного времени его выращивали как культурное растение, используемое в фармакологии и кулинарии. На территории России и прилегающих государств бывшего Советского Союза произрастает около 90 видов рода *Papaver*, среди которых экономическое значение имеет *P. somniferum* L. (мак снотворный) (Базилевская, 1931; Веселовская, 1933, 1975; Попов, 1937; Черепанов, 1995; Шеберстов и др., 1955).

Ранее все исследования, проводимые на культуре мака, были связаны с созданием новых сортов, сочетающих высокое содержание морфина в коробочках с высоким процентом масла в семенах, а также необходимостью защищать растения мака от вредителей и болезней. Первые исследования были проведены еще в начале

прошлого века. Они касались защиты культуры мака снотворного от болезней, а также экологии, источников инфекции и симптоматики болезней, вызываемых микромицетами (Sawada, 1917, Christoff, 1930, Barbacka, 1935, Flachs, 1936, Ballarin, 1950, Czyzewska et al., 1960, Mraz, 1960, Миско, 1963, 1965).

Направление исследований существенно изменилось с началом использования мака как наркотического растения. В настоящее время из растений мака получают опиаты – вещества с морфиноподобными свойствами (морфин, героин, кодеин, эторфин), а также производят наркотические препараты – опий и маковую соломку ("кокнар"). Опиаты оказывают сильное влияние на центральную нервную систему человека, вызывая эйфорию. При этом быстро формируется толерантность, т.е. ослабление действия при повторном применении, что приводит к потребности применения все возрастающих доз для достижения эффекта (Глобализация ..., 1999).

В последние десятилетия рассматриваемое явление, имея историю не одной тысячи лет, приобрело отчетливый вид общемировой проблемы, охватив практически все уголки планеты. За время своего существования человечество познакомилось с множеством веществ, способных вызвать наркотическое опьянение. Ежегодно около 10 000 человек умирают от передозировки наркотиков, и еще 70 000 смертей, как полагают, связано с употреблением наркотических веществ. Россия с 1988 года полноправный участник «Конвенции Организации Объединенных Наций о борьбе против незаконного оборота наркотических средств и психотропных веществ». Правительство Российской Федерации уделяет большое внимание борьбе с нелегальным выращиванием наркотикосодержащих растений и показывает свою готовность углублять и укреплять сотрудничество с другими странами в этой сфере (Доклад..., 2011, электронный ресурс). Российские власти проводят комплексную стратегию борьбы с наркотиками. В сентябре 2005 года была начата федеральная программа, цель которой сократить к 2020 году масштабы наркомании в России на 16-20% по сравнению с уровнем 2004 года (Доклад..., 2008, электронный ресурс).

По некоторым данным, уже в середине XX века только 40% ежегодно производимого во всем мире опиума использовали в медицине, остальные 60% реализовывали на подпольном рынке. Правоохранительными органами изымается лишь незначительная часть находящихся на нем наркотиков, составляющая, по мнению специалистов, около 5-15% от всего объема рынка. В последние несколько лет около 22% фактов изъятия наркотиков в мире приходились на опиаты. По сравнению с серединой 90-х годов, эксперты отмечают увеличение доли опиатов до 30% (Гасымов, 2002). К сожалению, среди европейских стран Российская Федерация остается на первом месте по числу лиц, злоупотребляющих опиатами. По данным ЮНОДК, в России насчитывается от 1,6 до 1,8 миллиона таких лиц, что составляет 1,6% населения страны в возрасте от 15 до 64 лет.

В настоящее время проблема борьбы с растениями-продуцентами наркотических веществ приобрела исключительную актуальность. После 1991 года на всем постсоветском пространстве резко расширились посевы наркотикосодержащих растений, причем выращиванием и производством наркотиков растительного происхождения стали заниматься повсеместно (Гасымов, 2002). Официальных статистических данных о масштабах культивирования мака снотворного в России не существует (Доклад..., 2008, электронный ресурс). Незаконные посевы встречаются в Омской, Новосибирской, Томской областях, а также на границе с государствами Центральной Азии. Растения мака выращивают на небольших защищенных участках или на полях под прикрытием посадок других культур, и их площадь обычно не превышает 1–2 гектара. По данным американских наблюдателей, общая площадь посевов мака опийного в России не превышает 1000 га (Доклад..., 2008, электронный ресурс). Но даже с площади не более 1200 м², где в среднем произрастает около 110 тысяч кустов опийного мака, по оценкам экспертов, можно собрать более 400 килограммов высококачественного опия (Всемирный ..., 1999).

В июне 2010 года правительством Российской Федерации была принята Стратегия государственной антинаркотической политики Российской Федерации на период 2010-2020 годов. Этот документ консолидирует усилия по предупреждению

распространения наркомании в стране. Цель стратегии – пресечение незаконного производства и оборота наркотиков, сокращение спроса на наркотики, а также развитие и укрепление международного сотрудничества в сфере контроля над наркотиками (Доклад..., 2011, электронный ресурс).

1.2. Современные меры борьбы с нежелательной растительностью

На протяжении многих веков человек боролся с сорными и нежелательными растениями. Изменялась тактика и стратегия борьбы, но, благодаря приспособительным особенностям, сорняки сохранились в качестве «спутников» культурных растений на всех этапах развития земледелия.

Механический метод

История земледелия свидетельствует о том, что в борьбе с нежелательной растительностью использовались и до сих пор успешно используются механические методы ее ликвидации (прополка, культивация).

К несомненным достоинствам этого метода можно отнести как полное искоренение нежелательных растений, так и отсутствие негативного влияния на окружающую среду. Вместе с тем, этот метод отличается высокой трудо- и энергоемкостью, а его результативность крайне зависима от имеющейся оперативной информации о месторасположениях нежелательной растительности и незаконных посевов наркотикосодержащих растений.

Химический метод

Развитие этого направления исследований связано, прежде всего, с успехами в разработке способов борьбы с сорной и нежелательной растительностью, которая имеет долгую историю. Открытие гербицидов явилось большим достижением науки. В настоящее время химический метод борьбы занимает ведущее место, и с каждым годом количество применяемых гербицидов возрастает.

Применение химических гербицидов для подавления численности наркотикосодержащих растений началось в конце 60-х годов, и было связано с успехами в области уничтожения сорной растительности. К середине прошлого века успехи в химическом синтезе новых классов высокоэффективных гербицидов

на основе большого числа действующих веществ разного спектра действия подняло контроль нежелательной растительности на новый уровень. В настоящее время существуют системы борьбы с сорной растительностью, основанные на использовании широкого арсенала химических средств (в настоящее время разрешено применение более 200 наименований гербицидов) (Государственный каталог..., 2013).

Борьба с сорняками с помощью гербицидов – высокоэффективный прием, но химические препараты могут быть токсичны для теплокровных животных и человека. Из-за опасности их накопления и превращения в окружающей среде и живых организмах в токсичные соединения широкое использование гербицидов может привести к тяжелым последствиям, загрязнению окружающей среды, снижению плодородия почвы и ухудшению здоровья людей. Существует опасность превышения норм остаточных количеств химикатов в продуктах питания.

Высокая физиологическая активность, относительная стабильность гербицидов и длительный срок утилизации в природных круговоротах веществ создают определенный селективный прессинг в экосистемах при систематическом применении, что ведет к отбору устойчивых к гербицидам форм и видов растений, нежелательным сдвигам в микробиоте почвы. К недостаткам химического метода также можно отнести широкий спектр действия, способность поражать нецелевые растения, смывание дождевыми водами, необходимость многократного применения.

В последнее время ведутся работы по улучшению и расширению ассортимента гербицидов, их модификации и органическому синтезу аналогов природных биологически активных веществ. Менее эффективные и токсичные препараты заменяются более эффективными, высокоселективными и безопасными для окружающей среды. Совершенствуются и технологии применения гербицидов. Для повышения эффективности обработок и уменьшения негативного воздействия гербицидов необходимо хорошо подготовить почву, правильно выбирать сроки обработки, учитывать погодные условия. Наиболее целесообразно применять 2–3-кратное опрыскивание низкими дозами препаратов вместо однократной обработки большими дозами. Данные исследования помогут в значительной степени решить

экологические проблемы применения гербицидов (Орел, 1991; Кудрявцев и др., 2007).

Биологический метод

В последние десятилетие все больше расширяются научные исследования, направленные на разработку методов биологической борьбы с сорными растениями на основе использования фитопатогенных микроорганизмов и фитофагов. Кроме «экологической причины», разработке этого метода уделяют большое внимание еще и потому, что систематическое использование одних и тех же гербицидов приводит к образованию устойчивых к ним популяций растений. Биологические средства в ряде случаев можно использовать в районах, где применение гербицидов ограничено. На программы по разработке биогербицидов только в США выделяется 3–5 миллионов долларов ежегодно (Annual Report USDA, 2005, Internet Resource). Считается, что на разработку биогербицида для опытного применения требуется в 2–3 раза меньше времени, чем на создание и доведение до государственного стандарта химического гербицида (Harman et al., 1991).

До недавнего времени для подавления нежелательных и сорных растений использовали только насекомых-фитофагов (трипсы, клопы, чешуекрылые и т.д.). Сейчас активно изучается возможность применения и других организмов. Установлена перспективность использования в биологической борьбе с сорными растениями нематод, растительноядных клещей, моллюсков. В последнее десятилетие значительно расширились исследования по использованию для борьбы с сорняками и фитопатогенных микроорганизмов (Исаева, 1972, 1985).

Существуют два основных направления биологической борьбы с сорной и нежелательной растительностью при помощи фитопатогенов. Классический метод биоконтроля применяется для снижения численности адвентивных (заносных) растений, ставших злостными сорняками из-за отсутствия или недостаточного количества на данной территории их естественных врагов. В этом случае один или несколько патогенов из первичного ареала распространения переносят в ареал, куда ранее было занесено растение-хозяин (McPartland, 2000). Даже однократное введение инокулюма способно вызвать естественную

эпифитотию, и патоген будет сдерживать численность популяции сорных растений на более низком уровне. Таким образом можно контролировать численность вредоносных сорняков на лугах, пастбищах и рудеральных участках (TeBeest et al., 1992).

При микогербицидном методе производят массовую интродукцию предварительно размноженных в лаборатории агентов биологической борьбы с целью увеличения плотности их популяций. В этом случае преимущественно используют эндемичные виды фитопатогенных грибов, которые встречаются на сорных растениях в их естественном ареале, но из-за отсутствия благоприятных факторов для инфицирования популяции сорняка сохраняют свою численность на низком уровне (Hasan, 1983). Возникновению эпифитотии в популяции сорного растения препятствует неравномерное распределение целевых растений-хозяев по полю и их различная восприимчивость к фитопатогенам; недостаточные вирулентность и агрессивность возбудителей болезней сорняков; неблагоприятные климатические условия (TeBeest et al., 1992, 1996). Внесение в агробиоценоз фитопатогенных микроорганизмов в виде инокулюма тем же способом, что и химические гербициды, приводит к возникновению искусственной эпифитотии, вследствие чего численность сорных растений уменьшается до допустимого уровня. Для сохранения инфекции и достижения длительного эффекта в популяции растения-хозяина бывает достаточно 1–2-х кратного применения биопрепарата (TeBeest et al., 1992).

Наиболее перспективными для борьбы с сорными и нежелательными растениями микроорганизмами считаются грибы. В настоящее время проводится исследования возможности использования микромицетов для биологической борьбы более, чем на двадцати видах сорных растений, среди них бодяк (*Cirsium arvense*), василек (*Centaurea picris*), выюнок (*Convolvulus arvensis*), разные виды повилики (*Cuscuta sp*) и подмаренника (*Galium spurium*, *G. aparine*), а также просвирник (*Malva pusilla*), морения (*Morrenia odorata*), мятлик (*Poa annua*), сыть (*Cyperus esculentus*) и пр. (Исаева, 1972, 1985, 1987). Потенциальными агентами классического биоконтроля могут считаться высоко агрессивные виды грибов,

имеющие узкую специализацию и обладающие способностью к быстрому распространению среди популяций сорного растения-хозяина (Hasan, 1983). Такими свойствами особенно отличаются ржавчинные грибы. Микромицеты этой группы облигатных паразитов широко исследуются в качестве агентов биологической борьбы с заносными сорными растениями. Представители родов *Melampsora*, *Phragmidium*, *Puccinia*, *Uromyces*, *Uromycladium* (Charudattan, 1997; Kropp et al., 2006; Turner et al., 1981; Peschken et al., 1982) рассматриваются в качестве перспективных агентов биоконтроля. Однако культивирование облигатных паразитов в искусственных условиях затруднено, поэтому для создания микогербицидов наиболее предпочтительны гемибийотрофы, при культивировании которых на дешевых субстратах в искусственных условиях можно получать достаточно большие количества инокулюма. Предпочтение отдается эндемичным грибам, которые в природе способны вызывать серьезное поражение целевого растения, не поражая растения других видов. По мнению ряда авторов, наиболее перспективны в качестве потенциальных агентов биологической борьбы микромицеты из родов: *Alternaria*, *Ascochyta*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Micosphaeropsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Plectosporium*, *Drechslera*, *Cylindrobasidium*, (Hasan, 1983; Sanjai et al., 2007; TeBeest et al., 1992; Winder, 1999). Изучают возможности создания комплексных препаратов, содержащих несколько патогенов (Daigle et al., 1995). В последние годы активно проводят изучение возможности применения в качестве биогербицидов продуктов жизнедеятельности фитопатогенных грибов. Токсины фитопатогенов быстро инактивируются в почве, обладают избирательностью действия, в большинстве своем оказывают незначительное влияние на культурные растения (Новикова и др., 2002, 2003; Новикова, 2005).

Биологическая эффективность использования фитопатогенных видов в борьбе с нежелательной растительностью в достаточно высокой степени зависит от обеспечения оптимальных для жизнедеятельности штамма-продуцента условий температуры и влажности (Орел Л.В., 1991). Так, листовым и стеблевым патогенам для успешного заражения и развития болезни часто требуется 6 – 18 часовой период

повышенного увлажнения. Однако, если в естественных условиях патогену для успешного заражения целевых растений необходим продолжительный росяной период, то использовать его в качестве агента биоконтроля неперспективно. Так, например, аскоспоры микромицета *Protomyces gravidus* Davis, поражающего амброзию трехраздельную (*Ambrosia trifida*), можно получить в жидкой культуре. Инокуляция проростков амброзии при 20°C и 48-ми часовом росяном периоде приводит к 100%-ному их поражению и дальнейшей гибели, но от использования этого микромицета в качестве продуцента биогербицида отказались, так как в биотопах с невысокой влажностью патоген недостаточно инфекционен и вирулентен (Cartwright et al., 1988).

В природе редко складываются гидротермические условия, оптимальные для заражения растения-хозяина патогеном. Поэтому для достижения высокой эффективности обработки требуется достаточно высокий титр спор фитопатогена. Рекомендуемая концентрация инфекционного материала при применении микогербицидов составляет от 200 до 500000 спор/см² (Gressel et al., 1997). С целью уменьшения инфекционной нагрузки, необходимой для успешного заражения, проводят селекцию штаммов-продуцентов по признакам агрессивности и вирулентности.

Трудности в достижении высокой эффективности заражения растения-хозяина связаны также с некоторыми биохимическими особенностями процесса патогенеза. Потенциальному продуценту биогербицида необходим определенный минимум метаболитов для преодоления защитных свойств живой ткани растения-хозяина (гидролаз, деполимераз, токсинов) (Гойман, 1954). Растения-хозяева способны подавлять скорость проникновения гиф фитопатогенных грибов с помощью ферментов хитиназ и глюканаз, выработки небелковых вторичных метаболитов – фитоалексинов, создания на пути инфекционных гиф физиологических барьеров из суберина, лигнина или каллозы (Gressel et al., 1997).

1.3. Требования к штаммам-продуцентам и препаративным формам микогербицидов

Анализ литературных источников свидетельствует, что для достижения высокой эффективности биоконтроля нежелательной растительности необходимо

учитывать целый ряд абиотических и биотических факторов. Особенно ответственный этап в разработке биогербицида для борьбы с нежелательной растительностью – выбор штамма-продуцента. Штаммы микроорганизмов, используемых в качестве основы биогербицидов, должны соответствовать целому ряду требований. С одной стороны, они должны быть высоко вирулентными и генетически стабильными, обладать высокой эффективностью в отношении целевых объектов и специфичностью в отношении культурных растений. Штаммы-продуценты биогербицидов должны обладать высоким адаптационным потенциалом, позволяющими не только выживать в меняющихся природных условиях в течение длительного времени, но и эффективно сдерживать нарастание плотности популяций целевых объектов. Необходимое условие – хорошие технологические характеристики штамма-продуцента биогербицида, способность утилизировать дешевые и доступные источники питания, быстро расти, развиваться, продуцировать необходимое количество инокулюма на искусственных питательных средах, выдерживать разные режимы концентрирования и высушивания, длительно сохранять жизнеспособность и целевую активность в разных препаративных формах (Новикова и др., 2002, 2003; Новикова, 2005).

С учетом биологических особенностей штаммов-продуцентов разрабатывают различные препаративные формы, содержащие споры и/или мицелий фитопатогенов. Важную роль играет выбор препаративной формы. Способ и условия культивирования грибов определяются их биологическими особенностями и осуществляются, исходя из критериев количества и качества получаемого инфекционного материала. Расходы микогербицидов в полевых условиях высоки, поэтому необходим большой объем биомассы, производимой агентами биологического контроля (Boyette et al., 2007; Churchill 1982; Greaves et al., 1998). Важно чтобы компоненты питательных сред, использованных для производства биомассы, были недорогими и доступными (Boyette et al., 2007; Churchill 1982; Hebbar et al., 1997). Полученный инфекционный материал должен обладать высокой биологической эффективностью в отношении целевого объекта, сохраняя ее в

процессе стабилизации, хранения и применения (Новикова и др., 2002, 2003; Новикова, 2005).

Гриб-продуцент в процессе ферментации должен производить достаточное количество биомассы, избыливающей пропагулами, которые способствуют заражению растения-хозяина. В микогербицидах в качестве инфекционного начала обычно используют конидиоспоры, в значительной степени из-за простоты их получения и возможности длительного хранения (Boyette et al., 2007; Churchill, 1982). Реже в качестве инфекционного начала используют хламидоспоры (Hebbbar et al., 1997). Менее глубоко изучена возможность использования мицелиальных фрагментов в качестве основного инфекционного материала, так как жизнеспособность мицелия сложнее сохранить и, в некоторых случаях, он менее агрессивен, чем другие источники инфекции (Boyette et al., 2007; Churchill, 1982). Тем не менее, в течение последних нескольких лет были разработаны препаративные формы и условия хранения для мицелиальных препаративных форм биопрепаратов (Коломбет, 2006).

1.4. Препаративные формы биогербицидов

Для обеспечения высокой биологической эффективности подавления нежелательной растительности разрабатываются препаративные формы биогербицидов с различными добавками, способными защитить инфекционное начало от негативного влияния окружающей среды (пониженной влажности, УФ-излучения, ветра и т.д.), поддержать жизнеспособность грибных клеток и увеличить вероятность того, что пропагулы получают быстрый доступ к восприимчивой ткани растения-хозяина (Gressel et al., 1997). Чаще всего в препаративные формы микогербицидов добавляют поверхностно активные вещества (ПАВ), питательные компоненты, эмульгаторы, растительные масла, гидрофильные полимеры и инкапсулирующие материалы (Pat. US 6248321 B1, 2001; Womack et al., 1996; Daigle et al., 1990; Zidack et al., 1999; Boyette et al., 2007). Так, мицелий *F. arthrosporioides* и *F. oxysporum*, вызывающих заболевание заразики, хорошо сохранял свою жизнеспособность, когда в препаративные формы добавляли полимер "Stabileze" (Amsellem et al., 1999).

Для лучшего распыления рабочего раствора и распределения инфекционных пропагул на поверхности листьев в состав листовых микогербицидов включают ПАВ. Они могут также служить эмульгаторами, стабилизаторами и прилипателями. Например, ТВИН-20 (1 %) в полевых условиях значительно усиливает развитие болезни, наблюдаемое при заражении мака опийного (*P. somniferum*) конидиями (1×10^6 спор/мл) *Pleospora papaveracea* Sacc. (syn. *Pleospora calvescens* (Fr.) Tul.), по сравнению с композицией, содержащей в качестве добавки растительное масло (Bailey et al., 2004). Препараты Silwet L-77 и Silwet 408 представляют собой органосиликоновые ПАВ, облегчающие проникновение инфекционных гиф микромицетов. Так, Silwet 408 способствует проникновению гиф *Ascochyta pteridis* Bres. через устьица и гидатоды листьев орляка обыкновенного (*Pteridium aquilinum*), а Silwet L-77 усиливает заболевание вейника канадского (*Calamagrostis canadensis*), вызываемое *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. (Womack et al., 1996; Winder, 1999).

Поливиниловый спирт и увлажнители, например, псиллиум (Metamucil®), используют как влагоудерживающие добавки (Greaves et al., 2000). Для того чтобы задержать испарение воды и сохранить влажность, необходимую для успешного прорастания инфекционных пропагул, используют обратные эмульсии. Например, композицию, содержащую парафиновый воск, минеральное масло, соевое масло и лецитин используют для стимуляции прорастания спор *Alternaria cassia* Jurair ex Khan для подавления сенны (*Cassia obtusifolia*) (Daigle et al., 1990). К недостаткам таких эмульсий следует отнести возможную фитотоксичность и высокую вязкость. Некоторые натуральные и синтетические гидрофильные полимеры могут усиливать эффективность биогербицидов и сокращать период повышенной влажности за счет удерживания воды (Zidack et al., 1999; Wraight et al., 2001).

Некоторые питательные добавки повышают активность биогербицидов, поддерживая жизнеспособность инфекционных пропагул (Daigle et al., 1995). В грибных суспензиях успешно применяются добавки сахарозы (Quimby et al., 2001), крахмала (Jackson et al., 1995), ксантана (Mahuku et al., 1998; Roskopf, 2005) и растительных масел (Abbas et al., 1996; Womack et al., 1996; Greaves et al., 2000; Abbas et al., 2004). Например, ТВИН-20 в концентрации 1 %, хотя частично

ингибировал формирование апрессориев конидиями гриба *P. papaveracea*, но усиливал развитие пятнистости листьев мака опийного, вызванного этим патогеном (Bailey et al., 2004). Эмульсия кукурузного масла в воде (1:1) в 3 раза увеличивала количество проросших конидий *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus ex Moore на поверхности листьев растений *Sesbania exaltata*, не оказывая влияние на формирование апрессориев, но существенно повышая микогербицидную активность. Интересно, что использование других растительных масел, в том числе подсолнечного, в той же пропорции приводило к увеличению числа проросших конидий гриба *in vitro*, но не стимулировало этот процесс на поверхности листьев и не повышало биологическую эффективность в отношении этого растения (Boyette et al., 2007). Изучение процесса проникновения масляной эмульсии, содержащей конидии *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton и рапсового масла (в соотношении по объему 1:9) в ткань листа сорного растения фиалки полевой (*Viola arvensis*) показало, что возникающий эффект – результат инверсии воды в капли масла на поверхности листа и в масло, которое проникает в ткань листа. Капли масла, смешиваясь с водными компонентами ткани листа, образовывали обращенную эмульсию (Greaves et al., 2000).

В последнее время разрабатывают и успешно применяют гранулированные формы микогербицидов. Среди препаративных форм биопестицидов широкое распространение получили альгинатные гранулы. Процесс их получения основан на реакции полимеризации альгината натрия в присутствии хлорида кальция. Испытание гранул, содержащих мицелий гриба *Alternaria cassiae*, альгинат натрия и каолин, показало высокую эффективность препарата в борьбе с растениями сенны в посевах сои. Проведены испытания гранулированного препарата, содержащего споры и мицелий гриба *Alternaria macrospora* (Sacc.) Mussat, для уничтожения аноды. Грибные пропагулы, заключенные в альгинатные гранулы, защищены от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Например, применение альгинатных гранул на основе мицелия и конидий *Phomopsis cirsii* Grove позволило сократить необходимый для эффективного заражения бодяка период повышенного увлажнения листьев до 8 часов (Leth et al., 2008).

Современные технологии позволяют получать альгинатные микрогранулы, которые можно применять, опрыскивая растения сниженными нормами биопрепарата (Pat. US 6248321 B1, 2001). Такие микрогранулы получены для фрагментов мицелия продуцента потенциального микогербицида на основе *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, эффективного в борьбе против подмаренника цепкого (*Galium aparine*) (Winder et al., 2003).

Для стабилизации инфекционного материала и повышения эффективности применения почвенных микопрепаратов используют технологию «Песта» – гранул. В основе этой технологии лежит сушка сформированной в виде «спагетти» смеси, содержащей грибные пропагулы, каолин и муку из твердых сортов пшеницы, с последующим ее измельчением до гранул определенного размера. Эту технологию используют, например, для стабилизации инокулюма *A. cassia*, *A. crassa*, *C. truncatum*, *Fusarium lateritium* Nees и *C. truncatum* (Schwein.) Andrus ex W.D. Moore (Connick et al., 1991; Pat. 5074902 (US), 1991; Boyette et al., 2007).

Биологические особенности целевого объекта и штамма-продуцента биогербицида – главные факторы, определяющие выбор соответствующей препаративной формы и способа ее применения (Zidack et al., 1999). Повышение эффективности грибных биопрепаратов может сопровождаться и расширением круга поражаемых ими растений (Amsellem et al., 1999). Поэтому при включении в состав препаративной формы новых добавок требуется заново определять селективность получившихся композиций.

Промышленный выпуск биогербицидов в экономически развитых странах (США, Японии, ФРГ, Великобритании, Франции) начался лишь в конце прошлого века (Charudattan et al., 1997). В экономически развитых странах – США, Японии, ФРГ, Великобритании, Франции, Швейцарии за последние 30 лет возникли и успешно развиваются целые отрасли промышленного производства микробиологических препаратов для сельского хозяйства. Так, например, промышленность США ежегодно выпускает биопрепаратов на сумму более 400 млн. долларов (Annual Report USDA, 2005, Internet Resource).

Научно-технические достижения в области производства микробных препаратов характеризуются активным расширением их ассортимента и спектра действия. В результате успешного завершения исследовательских программ разработаны, зарегистрированы и применяются в сельском хозяйстве следующие биогербициды:

- COLLEGO на основе *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeshynomene* J.T. Daniel, G.E. Tempelton, R.J. Sm., W.T. Fox для контроля растений эшиномены (*Aeschynomene virginica*) в посевах риса и сои в США;
- DeVINE на основе спор гриба *Phytophthora palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler для борьбы с моренией душистой (*Morenia odorata*) в цитрусовых садах;
- BIO MAL на основе *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae* для подавления просвирника приземистого (*Malva pusilla*) в Канаде;
- DR. BIOSEDGE на основе *Puccinia canaliculata* (Schwein.) Lagerh. в США для контроля сыти (*Cyperus esculentus*);
- STUMPOUT на основе *Cylindrobasidium laeve* (Pers.) Chamuris в ЮАР для предотвращения отрастания срубленных деревьев;
- ТЕНТОКСИН, на основе метаболитов *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. для подавления многих видов двудольных сорняков;
- микогербицид на основе гриба *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (телеоморфа *Cochliobolus lunatus*) против куриного проса в Нидерландах;
- микогербицид Lubao против повилики японской (*Cuscuta japonica*) в небольших количествах производится и успешно применяется в Китае (Kremer, 2005).

1.5. Интегрированный метод подавления нежелательной растительности

Как правило, биопрепараты обладают селективным действием, подавляя лишь один или несколько близкородственных видов сорных растений (TeBeest, 1996). Чем ближе филогенетическое родство сорняка с культурными растениями, тем труднее найти для борьбы с ним полностью безопасный биологический агент (Исаева, 1985). Интегрированные системы, объединяющие разные методы борьбы, обеспечивают наибольшую эффективность в подавлении сорной растительности.

Хорошие результаты в подавлении сорняков получены при совместном применении грибов и насекомых, которые способствуют проникновению патогенов в ткани, что усиливает их паразитическую активность. Так, в Австралии используемые для борьбы с опунцией бактерии – возбудители мягкой гнили проникали в растения через повреждения, вызванные деятельностью гусениц кактусовой огневки. В Канаде и США против бодяка (*Cirsium arvense*) эффективно применяют биологические средства, произведенные компанией Association of Natural Biocontrol Producers на основе следующих фитофагов: Canada Thistle Defoliating Beetle® (осотовая щитовоска (*Coleoptera: Chrysomelidae*)), Stem Gall Fly® (муха пестрокрылка *Urophora cardui* (*Diptera: Tephritidae*)), Canada Thistle Flowerhead Weevil® (долгоносик *Larinus planus*) и Canada Thistle Stem Mining Weevil® (долгоносик *Ceutorhynchus litura* (*Coleoptera: Curculionidae*)) (Biological Control of Weeds, Inc., Internet Resource). Фитофаги могут служить переносчиками инфекционных пропагул, поэтому выпуск щитовок (*Cassida rubiginosa*) совмещают с последующей обработкой растений бодяка спорами возбудителя ржавчины *Puccinia punctiformis* (F. Strauss) Röhl (Kluth et al., 2001). Разрабатываемое средство биологической защиты на основе щавелевого листоеда (*Gastrophysa viridula*) против конского щавеля (*Rumex crispus*) также совмещают с последующей обработкой пропагулами возбудителя ржавчины (Peschken et al., 1982).

Результаты многочисленных исследований показывают, что между гербицидами и микогербицидами часто наблюдается синергическое взаимодействие, однако для успешного использования в интегрированных системах биологических агентов и химических пестицидов необходимо знать их совместимость. Совместное применение химических гербицидов в сочетании с агентами микробиологического контроля усилит эффективность подавления нежелательной и сорной растительности и позволит существенно снизить нормы расхода препаратов и кратность обработок. Гербициды, применяемые в пониженных нормах расхода, способны повысить эффективность микогербицидов, действуя как синергисты (Исаева, 1985, 1987; Christy et al., 1993; Gressel, 2010).

Синергизм между химическими и биологическими препаратами был впервые обнаружен для биогербицидов на основе грибов. Микогербициды на основе микромицетов и их метаболитов наносят меньший вред окружающей среде по сравнению с химическими средствами (McPartland, 1996; TeBeest, 1992, 1996), а также имеют высокую специфичность и длительное последствие. Микогербициды можно использовать совместно с некоторыми фитофагами (Kruess, 2002) и химическими препаратами в пониженных дозах (Gressel et al., 2010). Использование гербицидов совместно или последовательно с микогербицидами не расширяет число поражаемых биогербицидами видов сорняков, но значительно повышает эффективность обработок. В некоторых случаях синергизм может быть связан с подавлением химическим гербицидом синтеза фитоалексинов, что приводит к ослаблению целевых растений. Это повышает биологическую эффективность микогербицида и обуславливает возможность снижения норм расхода химического гербицида. Похожее взаимодействие происходит между химическими гербицидами и бактериальными агентами: химические гербициды повышают восприимчивость растений к бактериальным болезням, вызванным сапротрофными видами, обычно не приносящими сорнякам никакого вреда (Christy et al., 1993).

Многие исследователи ведут скрининг пестицидов, совместимых с микогербицидами (Boyette et al., 2007; Duke et al., 2007). В ряде работ рассматривается возможность использования гербицидов как антиметаболитов, ингибирующих специфические пути обмена веществ и усиливающих вирулентность микогербицида.

Глифосат – пестицид широкого спектра действия, используемый для уничтожения нежелательных и сорных растений. США активно использовали этот препарат для уничтожения нелегальных посадок коки в Колумбии. Глифосат наиболее часто из химических гербицидов применяют совместно с микогербицидами для достижения синергического эффекта. Он обладает системным действием и способен передвигаться по растению из надземной части в корни. Этот гербицид при попадании на растения ингибирует биосинтез фенилпропаноидных фитоалексинов с помощью подавления EPSP синтазы, а также подавляет

образование каллозы вследствие хелатирующих свойств глифосата, тем самым облегчая проникновение патогена в растение (Gressel, 2010).

Фитопатогенные виды некоторых микромицетов не только вызывают заболевания, но могут выделять химические вещества, влияющие на рост и развитие растений и содействовать их восприимчивости к воздействию гербицидов. Так, метаболиты гриба *Helminthosporium speciferum* способны стимулировать прорастание семян сорных растений, что позволяет использовать эти вещества в комбинации с гербицидами послевсходового действия для повышения эффективности последних (Boyette et al., 2007).

Фитопатогенный гриб *Microsphaeropsis amaranthi* Ell. et Barth. рассматривают в качестве потенциального продуцента биогербицида, эффективного против ряда сорняков семейства амарантовых (*Amaranthaceae*). В результате проведенных исследований было установлено, что производные глифосата и большинство вспомогательных веществ в значительной мере снижают скорость или полностью подавляют прорастание конидий *M. amaranthi*. Однако показано, что это чаще связано с добавлением вспомогательных веществ, а не активного ингредиента. Так, при последовательной обработке растений амаранта конидиальной суспензией *M. amaranthi* через 1–3 суток после применения глифосата растения погибали в 2 раза быстрее, чем при обработке только химическим гербицидом. Напротив, при внесении конидий микромицета за 2 суток до обработки глифосатом эффективность обработок снижалась. Также было установлено, что *M. amaranthi* можно эффективно применять совместно с послевсходовыми гербицидами, такими, как карфентразон, хлорансулан и имазетапир (Smith et al., 2006). В тоже время, некоторые гербициды подавляют действие грибных препаратов. Например, производные 2,4-Д кислоты в концентрации в 2–4 раза ниже рекомендуемой снижают всхожесть конидий таких грибов, как *Puccinia thlaspeos* Ficin. et C. Schub., *Stagonospora cirsii* Davis и др. (Kropp et al., 2006; Duke et al., 2007).

Для достижения максимального эффекта важно учитывать не только совместимость химического гербицида и гриба, но и последовательность их применения. Например, при одновременном применении широко

распространенного химического препарата глифосат и *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schwein.) Ditmar эффективность от применения гриба была ниже, чем при последовательном применении с интервалом в 2-е суток. Последовательное применение этого же гербицида и микромицета *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus et W.D. Moore) для подавления *Sesbania exaltata* было более эффективным (Boyette et al., 2007).

В условиях теплицы были протестированы несколько химических гербицидов (Сетоксидим, Тралкоксидим, Имзетапир, Квинхлорак, Пропанил, Глифосат, Глюфосинат) в смеси с микромицетом *Pyricularia setariae* Niskada в сублетальных нормах расхода для уничтожения щетинника (*Setaria viridis*). Все гербициды в $\frac{1}{4}$ нормы расхода в смеси с микромицетом с титром 2×10^7 спор/мл вызвали полное уничтожение целевого растения при применении его на стадии 3-5 настоящих листьев (Peng et al., 2005).

Для подавления вредоносных сорняков, устойчивых к гербицидам, паразитических сорняков и специализированных засорителей сельскохозяйственных культур наибольший потенциал имеют микогербициды. Кроме того, их применение целесообразно, когда для уничтожения сорных растений в агрофитоценозе подходящие гербициды отсутствуют или требуются применение их повышенных норм расхода, либо применение химического метода экономически неоправданно (McPartland et.al., 2000).

В России проводятся исследования по изучению возможности применения фитопатогенных грибов для подавления доминирующих и трудноискоренимых видов сорных растений, имеющих высокую репродуктивную способность. К ним относятся осот полевой (*Sonchus arvensis*), бодяк полевой (*Cirsium arvense*), горчак ползучий (*Acroptilon repens*), разные виды пикульника (*Galeopsis spp.*) и горца (*Polygonum spp.*), подмаренник цепкий (*Galium aparine*), вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis*), марь белая (*Chenopodium album*), а также против некоторых видов крестоцветных и злаковых сорняков (Гасич и др., 2007).

В лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, начиная с 1993 года, проводятся исследования микрофлоры сорных растений на территории России и

сопредельных стран. В качестве потенциальных продуцентов микогербицидов изучаются микромицеты различных родов *Alternaria spp.*, *Septoria spp.*, *Ascochyta spp.*, *Stagonospora spp.* против многих видов сорных растений (Берестецкий, 1997, 1999; Гасич, 1995; Гасич и др., 1995, 2007). Большие перспективы в качестве агента биоконтроля имеет гриб *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. против галинсоги мелкоцветковой (*Galinsoga parviflora*): инокуляция 3-х недельных проростков галинсоги культуральной жидкостью с титром 10^6 спор/мл и 48-ми часовом росном периоде приводила к 100 % их гибели (Гасич, 1995).

Фитопатогены могут также использоваться для уничтожения плантаций наркотикосодержащих растений. Начиная с 2002 года сотрудниками ГНУ ВИЗР, в рамках работы по Госконтракту, изучена микобиота конопли и мака на территории России и сопредельных государств и отобраны штаммы грибов, патогенные для этих наркотикосодержащих растений и создана коллекция чистых культур микромицетов, перспективных продуцентов биогербицидов (Гасич и др., 2009).

1.6. Биологический контроль наркотикосодержащих растений

Основная задача успешного биологического контроля сорных растений – не уничтожение, а снижение их численности ниже экономического порога вредоносности (ЭПВ). При этом основные сельскохозяйственные культуры могут давать урожай без существенных потерь от сорной растительности. В случае с наркотикосодержащими растениями необходимо добиться значительного снижения показателей роста и развития целевого растения (вплоть до полного искоренения), и следующее за этим уменьшение ассимиляционной продуктивности листьев, снижение семяпродуктивности, а также повреждение прикорневой части, ломкость стеблей (Павлюшин и др., 2013).

Разработка методов борьбы и создание систем контроля на основе результатов изучения биологических особенностей перспективных штаммов фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей болезней знаменует новый период создания на их основе эффективных биогербицидов. Накоплен большой опыт по использованию микромицетов в биологической борьбе с вредными объектами – более 130 таксонов

фитопатогенных грибов рассматриваются в качестве потенциальных агентов биоконтроля нежелательной растительности.

В последние годы особое внимание начали уделять разработке эффективных биогербицидов на основе фитопатогенных грибов для борьбы с незаконными посевами мака снотворного. Такие исследования проводятся в США, Италии, России, странах Азии и бывших республиках СССР. Согласно литературным данным, на маке снотворном зарегистрировано 48 видов микромицетов из 17 семейств, 11 порядков, 4 отделов. В качестве потенциальных агентов биоконтроля изучают *Fusarium oxysporum* Schltdl, (Гасич и др., 2009;) *Dendryphion penicillatum* (Corda) Fr. (Bailey et al., 2000, 2004; O'Neill et al., 2000; Гасич и др., 2009) и *Pleospora papaveracea* (De Not.) Sacc. (Hebbar et al., 1997; Bailey et al., 2000; O'Neill et al., 2000; Glukhova et al., 2007; Гасич и др., 2009). В основе исследований лежит подробное изучение видового состава фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растения мака на различных стадиях роста и развития.

1.7. Болезни мака

Во всех областях возделывания растения мака в значительной степени подвержены грибным и бактериальным заболеваниям (Вредители и болезни..., 1970). Первые исследования в области защиты культуры от болезней, а также экологии возбудителей, источников инфекции и симптоматики были проведены еще в начале прошлого века (Sawada, 1917; Tanaka, 1920; Christoff, 1930; Barbacka, 1935; Flachs, 1936; Ballarin, 1950; Czyzewska et al., 1960; Mraz, 1960; Reid, 1969; Сухоруков, 1957, Миско, 1963, 1965). В это время были даны первые научные описания возбудителей, изучены симптоматика, патогенез, определены возможные источники инфекции и предложены первые меры борьбы (Girzitska, 1930; Barbacka, 1935; Flachs, 1936; Пospelов, 1957; Миско, 1965, 1969; Островский и др., 1970; Никитина, 1975; Вахрушева и др., 1976; Дроздовская, 1977). Эти направления продолжают развиваться и в настоящее время, как микофлористическое и таксономическое (Farr et al., 1999; O'Neill et al., 2000; Мельник, 2000).

Видовой состав возбудителей бактериальных болезней растений не является стабильным в силу деятельности человека, изменчивости состава культур и сортов,

а также по мере более глубокого изучения бактериозов растений. Обследования разных сельскохозяйственных культур показали, что вредоносность бактериозов значительно возросла. Это связано с расширением ареала возбудителей бактериозов, особенно полифагов, а также с увеличением числа видов и сортов, поражающихся этими заболеваниями.

Из бактериальных болезней, поражающих мак, выделяют следующие: бактериальную пятнистость стеблей, коробочек и листьев; бактериальное увядание и гниль, бактериоз стеблей; потемнение стебля, средних жилок листа; безопийность коробочек (возбудитель *Chromobacterium papaveris* (Ram Ayyar). Возбудитель *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Sm) Bergey вызывает бактериальное увядание (вилт), слизистый бактериоз, коричневую гниль мака.

Первыми бактериоз мака отметили М.В.Горленко и И.В.Воронкевич (1949). Они описали бактериальную пятнистость стеблей и коробочек мака (возбудитель *Xanthomonas papavericola* (Br.et Mc Whort) Dowson) на раннеспелых сортах мака. Н.И.Островский и Л.С.Дроздовская (1970) выявили характер проявления на маке еще двух бактериозов – бактериального увядания и гнили, вызываемых *Bacterium papaveris* (Ayyar) Burgwitz и бактериальную пятнистость листьев, вызываемую *Xanthomonas papavericola*. С.В. Горленко (1969) описал бактериоз стеблей мака снотворного, вызываемого *Erwinia carotovora* (Jones) Holland.

В условиях Северо-Запада бактериальные болезни начинают проявляться явно в конце июля – начале августа. В Ленинградской области мак способен поражать четыре возбудителя бактериозов: *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Sm) Bergey), *Erwinia carotovora* (Jones) Holland, *Bacterium papaveris* (Ayyar) Burgwitz, *Xanthomonas papavericola* (Br.et Mc Whort) Dowson. Из них наиболее распространены *P. solanacearum*, *E. carotovora*, значительно реже встречается *B. papaveris* и *X. papavericola*. На заболевших растениях между жилками листьев (иногда по их краям), а также на других надземных частях образуются вначале темные прозрачные, затем темно-серые, часто сливающиеся друг с другом пятна. Позже они чернеют или желтеют. Во влажную погоду на них появляется бактериальный экссудат в виде капелек, который затем подсыхает. Сильно

пораженные экземпляры нередко погибают до образования семян или остаются с недоразвитыми коробочками (Никитина и др., 1975).

Возбудитель бактериального увядания и гнили (*Bacterium papaveris*) вызывает увядание многолетнего дикорастущего мака в южных районах (Краснодарский край). У больных растений может наблюдаться также потемнение стебля и жилок листьев. При сильном поражении развивается мокрая гниль всего растения.

Бактериоз стеблей (возбудитель *Erwinia carotovora*) в условиях Северо-Западного региона проявляется в начале августа и поражает, в основном, листовой аппарат. Края листьев желтеют, затем темнеют. На пожелтевших краях появляются темно-серые, темно-зеленые или коричневые пятна разнообразной формы и размеров. Такие же пятна появляются и на зеленых участках листа. Они могут возникать также в центре листа, преимущественно между жилками. Жилки становятся черными или коричневыми. При сильном поражении пятна покрывают всю поверхность листа. На больших участках стеблей образуются потемнения в виде точек, штрихов, полосок.

Возбудитель *Pseudomonas solanacearum* имеет широкий спектр хозяев и способен поражать растения из 200 различных семейств, вызывая бактериальное увядание, вилт, слизистый бактериоз, коричневую гниль. Т.Е.Вахрушевой и К.В.Никитиной (1976) на маке было выявлено заболевание, которое вызывает этот патоген. Поражаются все надземные части растений мака: на листьях и стеблях образуются расплывчатые коричневые или серые пятна; на завязях – черные маслянистые пятна. При сильном поражении коробочка может почернеть еще на стадии завязи. Внутренние ткани становятся коричнево-черными, семена темнеют, приостанавливаются в развитии и погибают.

Согласно литературным данным, на *P. somniferum* зарегистрировано 48 видов микромицетов из 17 семейств, 11 порядков, 4 отделов. Среди грибных болезней мака наиболее распространены ложная мучнистая роса или красная пятнистость мака (возбудители – *Peronospora abrorescens* (Berk.) de Bary) и черная пятнистость (возбудители – *Brachycladium papaveris*, *Dendryphon penicillatum*, *Pleospora papaveracea*), реже встречаются белая (возбудитель – *Sclerotinia sclerotiorum* Lib.) и

серая (возбудитель – *Botrytis cinerea* Pers.) гнили, чернь коробочек (возбудитель – *Alternaria brassicae* f. *somniferi* Har. et Briard). В южных районах мак может поражаться *Fusarium oxysporum*, вызывающим фузариозное увядание растений, а также мучнистой росой (возбудители *Erysiphe cruciferarum* Opiz et L.Junel, *E.orontii* var. *papaveris* Y.S.Paul et V.K.Thakur) (Поспелов, 1957; Миско, 1965, 1969; Островский и др., 1970; Вахрушева и др., 1976; Sehgal et al., 1971; Schmitt, et al., 1975; Braun, 1995).

В Испании посевы мака снотворного, выращиваемого для фармакологической и медицинской промышленности, значительно страдают из-за поражения растений возбудителями черной пятнистости (в основном *Pleospora papaveracea*) и ложной мучнистой росы (*Peronospora abrorescens*) (Munoz-Ledesma et al., 2005; Landa et al., 2007; Montes-Borrego et. al, 2009). В отдельные годы потери урожая семян и коробочек от этих болезней достигают 50–70 % (Капоор, 1995; Scott et al., 2004).

Среди грибных болезней мака на Северо-Западе России наиболее распространены ложная мучнистая роса и черная пятнистость (гельминтоспориоз), реже встречаются также белая и серая гнили, чернь коробочек (Вахрушева, 1976). Южнее мак может поражаться вертициллезом и фузариозом (Миско, 1965, 1969).

Мучнистая роса мака – широко распространенное заболевание вызывается микромицетами *E. cruciferarum* и *E.orontii* var. *papaveris*. Заболевание проявляется во второй половине вегетации культуры, развитию болезни способствует сухая теплая погода. Заболевание обнаруживается на стеблях в виде небольших матовых пятен, состоящих из мицелия гриба и конидиеспор; позднее гриб распространяется на листья, покрывая их пятнами с верхней стороны. Пятна сливаются, и налет полностью покрывает пораженные органы растений. К концу вегетации мицелий буреет, и на нем образуются заметные темно-коричневые уплотнения (плодовые тела), расположенные одиночно или группами на поверхности пораженных органов. Больные растения сильно угнетены, пораженные листья засыхают (Вахрушева и др., 1976). Помимо растений семейства *Papaveraciae*, микромицеты этих видов способны вызывать заболевания растений семейства *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*.

У микромицета *E. cruciferarum* мицелий распространяется на коробочках, стеблях, листьях, клетки мицелия имеют размер $45-75 \times 5$ мкм; конидионосцы прямые, клетки-ножки цилиндрические, удлинённые $15-50 \times 7-10$ мкм, конидии одиночные, цилиндрически-удлинённые $30-48 \times 12-21$ мкм. Клестотеции рассеянные $85-150$ мкм в диаметре, придатки многочисленные, в нижней части различной длины в $0,5-3,5$ раза длиннее диаметра клестотеция, септированные, простые гиалиновые, позднее желтоватые до коричневатых. Сумки с коротким стебельком (3)4–10(12), редко сидячие (40)50–85 $\times$ 5–45(50) мкм, содержат 2-8 спор, споры овально-эллипсоидальные (15)18–24(30) $\times$ 10–14(16) мкм (Braun, 1995).

Микромицет *E. orontii* var. *paraveris* имеет прямые конидионосцы, клетки-ножки прямые или искривлённые $40-100 \times (7,5)10-13(15)$ мкм. Конидии в коротких цепочках, овально-эллипсоидные до цилиндрических (22)25–40 $\times$ 15–23 мкм. Клестотеции $80-140$ мкм в диаметре, придатки многочисленные, в нижней части простые, редко разветвлённые, тонкостенные, гладкие, септированные окрашенные, коричневые, светлеющие к окончанию; в $0,5-2$ раза длиннее диаметра клестотеция. Сумки (5–14) на стебельках $45-75 \times 25-40$ мкм, споры овально-эллипсоидные гиалиновые до желтоватых $16-25 \times 12-15(17)$ мкм (Braun, 1995).

Пероноспороз или ложная мучнистая роса (*P. abroescens*) впервые была описана в конце XX века. Заболевание широко распространено во всех районах разведения мака (Миско, 1969). Микромицет паразитирует на растениях семейства *Papaveraciae*. Поражается надземная часть с момента появления всходов. Его развитию способствует высокая относительная влажность воздуха и температура $12-18^{\circ}\text{C}$. Заражение возможно от 2 до 30°C и влажности $44-100\%$. Мицелий распространяется по межклетникам, образуя многочисленные гаустории, которые проникают в клетки и заполняют их. На листьях с верхней стороны образуются бурые, угловатые, ограниченные жилками, или желтоватые расплывчатые пятна неправильной формы, на нижней стороне в сырую погоду наблюдается сначала сероватый скудный, позже серовато-фиолетовый обильный налет. Конидионосцы пучками (по 2–6, реже 8) выступают из устьиц, стройные с прямым длинным стволом, слегка вздутыми на конце $222,0-647,5 \times 4,3-8,7$ мкм, чаще $462,5-$

555,0 × 8,7 мкм, дихотомически разветвленные. Ветви тонкие, гибкие, извилистые, раскидистые или сжатые. Конечные ветви слегка дугообразно согнутые, реже прямые, расходящиеся под острым, прямым, редко тупым углом, на конце заостренные, короткие и толстые, 4,3–13,0 и 2,9–11,6 мкм длины и 1,4–2,6 мкм ширины. Конидии бесцветные или слегка дымчатые, почти шаровидные, широко эллипсоидальные или яйцевидные, с едва заметным плоским сосочком, 17,4–23,2 × 11,6–17,4 мкм. Оогонии желтые, с тонким бесцветной, сохраняющейся оболочкой, шаровидные, мелкие 26,1–59,2 × 23,2–58,0 мкм в диаметре. Ооспоры желтовато-бурые, шаровидной формы 20,3–40,6 мкм в диаметре (Гапоненко, 1972). При поражении всходов встречается диффузная форма проявления заболевания. У растений деформируются листья и стебли, все растение желтеет, отстаёт в росте, погибает или не образует семян.

Фузариоз или сухая корневая гниль (возбудитель *F. oxysporum*) – очаговое заболевание. Симптомы чаще всего проявляется в период бутонизации и цветения. Заболевшие растения сначала привядают, затем полностью усыхают, в области корневой шейки образуется сухая гниль, покрытая белым или желтоватым налетом, состоящим из мицелия и спор гриба (Островский и др., 1970; Вахрушева и др., 1976). Российскими учеными изучалась возможность использования видов *Fusarium* для борьбы с маком снотворным. Из целевых растений, собранных в различных регионах, было выделено 135 изолятов микромицетов, из которых по показателям патогенности и специфичности были отобраны 13 изолятов *Fusarium spp.* В полевых опытах были оценены различные препаративные формы лабораторных образцов биопрепарата на основе микромицетов. Показано, что лабораторный образец на основе *F. oxysporum* приводил к 30-40 % гибели растений мака и 50 % снижению биомассы; *F. solani* вызывал 30 % гибель растений и такую же потерю биомассы (Гасич и др., 2007, 2009). Однако, несмотря на высокий процент гибели растений мака и значительное снижение биомассы, факультативная специализация форм *F. oxysporum* и возможность ее изменения в процессе взаимодействия гриба с другими видами растений затрудняет использование микромицетов рода *Fusarium* в качестве продуцентов микогербицидов.

Во второй половине лета растения мака может поражать белая гниль (возбудитель *Sclerotinia sclerotiorum*). В нижней части стебля пораженного растения появляются темные мокнущие пятна с белым ватообразным налетом и черными крупными плодовыми телами (склероциями). Больные ткани размягчаются и загнивают.

При поражении растений возбудителем *Botrytis cinerea* развивается серая гниль. Во влажную погоду пораженные части растений (стебли, пазухи листьев, бутоны) покрываются серым налетом и засыхают. Стебли теряют прочность и ломаются, бутоны не распускаются.

На ослабленных растениях мака часто развивается чернь коробочек, вызываемая *Alternaria brassicae f. somniferi*. На незрелых коробочках появляются оливково-черные пятна различной величины, которые иногда сливаются. Во влажную погоду незначительно поражаются и зрелые коробочки. На листьях и стеблях заболевание встречается редко (Вредители и болезни..., 1970).

Возбудители грибных и бактериальных заболеваний сохраняются на растительных остатках и могут передаваться семенами с больных растений.

1.8. Черная пятнистость мака

Наиболее вредоносное заболевание растений мака – черная пятнистость или гельминтоспориоз. Это заболевание также известно под различными названиями – усыхание, ожог листьев, увядание растений мака и т.д. Возбудители черной пятнистости характеризуются высокой агрессивностью и специфичностью в отношении целевых растений, поэтому они имеют большие перспективы в качестве агентов биоконтроля (O'Neill et al., 2000; Гасич и др. 2009).

Первые сообщения о гельминтоспориозе или черной пятнистости мака появились в начале XX века (Sawada, 1917). Сильная вспышка данного заболевания была отмечена в Восточной Африке (Barbacka, 1935). При черной пятнистости поражаются как всходы, так и взрослые растения. Заболевание развивается на листья, стеблях, коробочках, семенах, реже корнях. При поражении мака возбудителем черной пятнистости в растениях снижается содержание опия, семена теряют всхожесть и их нельзя использовать для посева. Потери урожая семян мака

при сильном развитии заболевания могут достигать 50–75 % (Миско, 1965; Barbacka, 1935 Kapoor, 1995; Scott et al., 2004). В отдельные годы гибель растений от этого заболевания может составить 80–90 % (Островский и др., 1970; Дроздовская, 1977).

Возбудители черной пятнистости характеризуются узкой специализацией и приурочены только к видам рода *Papaver*. Помимо мака снотворного патогены могут поражать мак декоративный (*P. bracteatum*), мак восточный (*P. orientale*), а также мак-самосейку (*P. rhoeas*) (del Serrone et al., 1989; O'Neill et al., 2000; Glukhova et al., 2007).

В нашей стране черная пятнистость была выявлена А.Г.Поспеловым в 1931–45 гг. на территории современной Киргизии (Поспелов, 1957). Исследования Миско (1965) показали, что заболевание проявляется во всех фазах развития мака и распространено во всех районах его возделывания. Болезнь очень вредоносна, в отдельные годы посевы изреживаются на 80–90 %, снижается содержание опия, семена теряют всхожесть. Заболевание может уничтожить до 50–70 % урожая семян и коробочек мака. По данным А.Г. Поспелова (1957), в Киргизии почти ежегодно 60 % пораженных растений мака погибало.

В дальнейшем черная пятнистость была выявлена во всех районах произрастания мака (Вахрушева и др., 1976). Симптомы поражения черной пятнистостью проявляются во всех фазах развития мака. Заболевание поражает листья, стебли, коробочки и характеризуется высокой частотой встречаемости и интенсивностью развития. В фазу всходов растения выпадают в результате образования перетяжки и отмирания нижней части стебля. В фазе розетки наблюдается медленное пожелтение листьев, распространяющееся снизу вверх, и почернение корневой шейки, растения обычно погибают. В фазе стеблевания и бутонизации на листьях появляются темные угловатые пятна, на стеблях черные штрихи, плодоножки укорачиваются и искривляются, центральные бутоны засыхают, завязи деформируются, основание стебля темнеет. Пораженные растения низкорослые с пожелтевшими листьями и большим количеством стеблей. На стеблях отмечаются штрихи и вытянутые пятна, около корневой шейки – трещины.

Позже на листьях появляются темно-бурые пятна различных размеров, ограниченные жилками. На поперечном срезе стеблей заметно потемнение проводящих сосудов от наличия мицелия гриба. Корневая система пораженных растений становится стекловидно-прозрачной, затем бурой. Растения погибают от увядания, которое развивается за 2–3 дня. Во влажную погоду на пораженных листьях, стеблях, коробочках образуется оливково-черный налет спороношения гриба. При сильном развитии заболевания заболевшие растения теряют тургор, увядают и засыхают (Миско, 1963, 1965). Как показали проведенные исследования, основной источник инфекции – семена и зараженные растительные остатки, в которых инфекционное начало сохраняется в течение 4–5 лет (Островский и др., 1970).

Перитеции образуются на стеблях, расположение их соответствует местам поражения стебля гифальной стадией гриба (участкам потемневшей ткани). Образование сумчатой стадии отмечено во всех районах возделывания мака. Сумчатая стадия развивается на пораженных стеблях после перезимовки. Плодовые тела образуются в конце марта, а рассеивание аскоспор начинается в конце апреля – начале мая и продолжается в течение всего лета. Ростки из аскоспор образуют первичный мицелий, на котором формируются конидии (Дроздовская, 1977).

В условиях Северо-Запада России, начиная со второй половины июля, особенно сильно поражаются листья мака (Никитина, 1975). При установлении влажной погоды поражаются и стебли. В период цветения и после него наблюдается сильное поражение листьев – возникают черные или черно-бурые, большей частью угловатые пятна, ограниченные жилками. Во влажную погоду на их поверхности появляется бархатистый оливково-бурый или черный налет воздушного мицелия и его спороношений. В сухую погоду пятна подсыхают. Инфицированные коробочки деформируются, не вызревают. Спороношение гриба развивается как на поверхности, так и внутри коробочек.

В южных регионах России первые признаки заболевания наблюдаются в фазе розетки листьев. Пораженные листья желтеют, на них появляются мелкие красновато-бурые пятна, расположенные вдоль центральной и боковых жилок

листа. Заболевание может протекать как в локальной (листовой) форме, так и в диффузной. Пораженные растения приобретают кустовидную форму с пожелтевшими листьями и большим количеством стеблей. Стебли покрываются черными, удлиненными пятнами в виде штрихов. Также поражается корневая шейка и корни. Особенно вредоносно заболевание в фазе бутонизации и в начале образования коробочек. Бутоны засыхают, образовавшиеся коробочки теряют свою форму и становятся твердыми, мелкими, вытянутыми или согнутыми, часто лопаются. Семена в пораженных коробочках не развиваются. Основными источниками инфекции являются семена с больных растений и зараженные растительные остатки, инфекция сохраняется в почве в течение 4–5 лет. (Островский и др., 1970; Вахрушева и др., 1976).

В литературе имеются противоречивые данные, касающиеся видовой принадлежности возбудителей «гельминтоспориоза» мака. Впервые патоген был описан в 1917 году Х. Sawada (1917) как *Helminthosporium papaveris*. Позже взгляд на родовую принадлежность этого вида неоднократно пересматривался. Исследователи, впоследствии изучавшие данное заболевание (Christoff, 1930; Girzitska, 1930; Ballarin, 1950; Meffert, 1950; Milatović, 1952; Czyzewska, 1960), отмечали высокую морфологическую вариабельность *H. papaveris* или предполагали наличие нескольких видов возбудителей. Однако до недавнего времени возбудителей заболевания относили к одному виду – *Dendryphon penicillatum* (Corda) Fr. (синонимы: *Brachycladium penicillatum* Corda, *H. papaveris* Sawada, *Dendryphon papaveris* (Sawada) Sawada) (Ellis, 1971; Farr et al., 1999; O'Neill et al., 2000; Мельник, 2000; Гасич и др., 2009).

На основании изучения морфолого-культуральных свойств, а также применения молекулярных методов исследования были выделены две группы изолятов (Farr et al., 2000). Первая группа характеризовалась способностью формировать псевдотеции, хламидоспоры и *Dendryphiella*-подобные конидиеносцы. Средняя длина конидий составляла 45,6 мкм, среднее количество перегородок в конидиях – 5. Изоляты данной группы были отнесены к аскомицетному виду *Pleospora papaveracea* (De Not.) Sacc. Изоляты второй группы не образовывали

псевдотециев, формировали микросклероции и *Dendryphion*-подобные конидиеносцы. Средняя длина конидий составляла 23,0 мкм, среднее количество перегородок – 3. Эти изоляты были отнесены к виду несовершенных грибов *Dendryphion penicillatum*. Таким образом, авторы показали, что *D. penicillatum* не является стадией в жизненном цикле *P. papaveracea* (Farr et al., 1999; O'Neill et al., 2000). На основании анализа молекулярных данных *P. papaveracea* оказался более близким к группе *Alternaria*, чем к *Pleospora*. Был образован новый род *Crivellia* с типовым видом *C. papaveracea*. Бесполое изоляты рода *Crivellia* представлены 2 близкородственными видами. Был восстановлен прежний анаморфный род *Brachycladium* с видами *B. penicillatum* и *B. papaveris*, которые ранее относили к роду *Dendryphion* (Inderbitzin P. et al., 2006).

В 2006 году канадские и американские исследователи провели всестороннюю ревизию видов *Dendryphion*, которая основывалась на сравнительной морфологии, молекулярной филогении и анализе типов системы спаривания (Inderbitzin et al., 2006). Использование методов секвенирования ITS регионов рДНК и фрагментов двух белок-кодирующих генов *gpd* (ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) и *EF-1 alpha* (ген фактора элонгации трансляции 1 альфа) подтвердило предположения предыдущих исследователей о существовании именно двух близкородственных видов грибов, паразитирующих на маке (Inderbitzin et al., 2006). Также было доказано, что род *Dendryphion* имеет полифилетическое происхождение, что вынудило вернуться к использованию родового названия *Brachycladium* и обозначению анаморфных стадий возбудителей «гельминтоспориоза» мака как *B. penicillatum* Corda и *B. papaveris* (Sawada) Shoemaker et Inderb. Молекулярные и морфологические исследования подтвердили, что *B. penicillatum* является анаморфой *C. papaveracea*. Моноспоровые изоляты *C. papaveracea* содержат в своем геноме одну идиоморфу локуса типа спаривания (*mat1-1* или *mat1-2*), что свидетельствует о гетероталличности этого вида. В то же время вид *B. papaveris* является гомоталличным и все моноспоровые изоляты этого гриба имеют неполный участок *mat1-2*, спаянный с *mat1-1* (Inderbitzin et al., 2006).

Таким образом, комплексное изучение коллекции *Brachycladium*-подобных изолятов подтвердило, что в России и Украине возбудителями «гельминтоспориоза» мака являются два близкородственных морфологически сходных вида *C. paraveracea* (*B. penicillatum*) и *B. paraveris*, приспособленных к совместному существованию на видах рода *Papaver*. Изоляты *B. paraveris* были выделены большей частью из различных органов мака снотворного различного географического происхождения (Дагестан, Полтавская обл., Пензенская обл.). Изоляты *C. paraveracea* были приурочены в основном к *Papaver rhoeas* из Краснодарского и Ставропольского краев, небольшое количество изолятов этого вида также было выделено из мака снотворного (Полтавская обл.) (Гасич и др., 2013).

Довольно надежным и легко наблюдаемым признаком для различения *C. paraveracea* и *B. paraveris* является наличие/отсутствие микросклероциев в чистой культуре. Изоляты *B. paraveris* не образуют микросклероции. Наибольшая стабильность формирования микросклероциев у изолятов *C. paraveracea* отмечается на отрезках стеблей мака при люминесцентном освещении. Средняя длина спор также может использоваться для дифференциации видов. Изоляты *B. paraveris* характеризуются в среднем большей длиной спор по сравнению с изолятами *C. paraveracea*. Менее стабильным признаком является образование *Dendryphion*-подобных конидиеносцев изолятами *C. paraveracea*, которые могут формироваться при УФ освещении на отрезках стеблей мака и/или пшеницы. Надежным способом разделения двух видов оказалось определение системы спаривания с помощью ПЦР.

Все изоляты *B. paraveris* имеют колонии войлочно-бархатистые или бархатисто-войлочные с разной степенью развития воздушного мицелия, сверху от светло-бежевых до оливковых, снизу от светло-бежевых, охряных до светло- и темно-бурых. конидии в ветвящихся цепочках по 3–4 конидии в ряд от базальной до апикальной конидии (без учета боковых ответвлений). Общее количество конидий в «кустике», образовавшемся на одном конидиеносце доходило до 20–30. Габитус спороносных структур (длина и тип ветвления цепочек конидий) обоих видов был сходен. Ветвление цепочек происходило за счет образования коротких (7–25 мкм)

апикальных и боковых вторичных конидиеносцев, несущих по 1–3(–4) и 1–2 конидиогенному локусу, соответственно. Размеры конидий *B. papaveris* следующие – (10–)20–50(–79) × (4–)5–9(–12) мкм, средняя длина составляет 25,5 мкм или более (Гасич и др., 2013).

У микромицета *B. penicillatum* (syn. *C. papaveracea*, *D. penicillatum*) конидиеносцы очень разные. На стеблях они макронематные, шиловидные, до 600 мкм длину, 14–20 мкм в ширину в основании, постепенно суживающиеся к вершине до 5–10 мкм, в нижней части от темно-бурых до черно-бурых, более светлые к апикальной части, гладкие, с близкорасположенными перегородками, разветвленные к вершине. На листьях и в культуре конидиеносцы часто бывают полумакронематными, до 60 мкм в длину, 4–6 мкм в ширину, бледно-оливковые. Конидии одиночные или в цепочках, крупные, продолговато-цилиндрические с закругленные с обоих концов или обратно-булавовидные, бледно-оливковые, гладкие. Конидии на макронематных конидиеносцах обычно имеют 3 перегородки и размер 17–28 × 5–9 мкм, на листьях и в культуре они иногда достигают 60 мкм в длину и имеют до 8 перегородок (Миско, 1965, Никитина, 1975, Мельник, 2000). Массовое прорастание конидий наблюдается при температуре 22–26⁰ С, в основном, биполярно, редко одной или несколькими ростковыми гифами. (Дроздовская, 1977).

Для успешного применения возбудителей черной пятнистости мака с маком снотворным в полевых условиях необходимо знать источники инфекции, способы проникновения патогенов в растение, эффективные инфекционные дозы, а также определить оптимальные гидротермические условия для инфицирования и дальнейшего развития болезни.

Возможность применения микромицета *P. papaveracea* изучена против злостного сорняка посевов зерновых – мака-самосейки (*P. rhoeas*). Показано, что при 24-часовом росяном периоде, температуре 25⁰ С и концентрации суспензии $1,5 \times 10^6$ спор/мл, 100 % гибель растений наступала через 3 суток после обработки. Наиболее восприимчивыми к патогену оказались растения в фазе 7–11 настоящих листьев. Понижение температуры и сокращение росяного периода приводило к более низким значениям поражения и потерям биомассы. Установлено также, что

при искусственном заражении микромицет не поражал растения пшеницы и кукурузы, но вызывал реакцию сверхчувствительности у растений мака голостебельного (*Papaver nudicaule*) и мака сомнительного (*Papaver dubium*) (Del Serrone et al., 1989).

Узбекскими учеными отселектирован штамм *Pleospora papaveracea*. Опытные партии препарата на основе спор этого микромицета испытаны в полевых условиях в районах произрастания мака опийного (Киргизия, Узбекистан), и показана его высокая эффективность в отношении целевых растений. Экологическая безопасность *P. papaveracea* была подтверждена тестами на животных, 239 видах растений из 52 семейств в лабораторных и 52 видах растений из 24 семейств в полевых условиях (Glukhova et al., 2007; Глухова и др., 2008, 2010).

В течение нескольких лет учеными из университета Белтсвилла (Beltsville, MD) был проведен ряд исследований, целью которых было изучение особенностей патологического процесса *P. papaveracea* и *D. penicillatum* в лабораторных и полевых условиях (Bailey et al., 2000; O'Neill et al., 2000). Показано, что оба патогена образуют аппрессории. Наиболее агрессивным оказался *P. papaveracea*, вызывая быстрый некроз – аппрессории сформировались уже через 4 часа после обработки отдельных листьев мака конидиальной суспензией, и их количество было больше, чем у *D. penicillatum*, особенно при пониженных температурах. Было показано, что в процессе своего жизненного цикла микромицеты образуют конидии и хламидоспоры (Farr et al., 2000), а *D. penicillatum* еще и множественные микросклеротии, способные перезимовывать и заражать семена при прорастании, а также надземные части растений мака уже в фазе проростков (Bailey et al., 2000; O'Neill et al., 2000).

Добавление различных ингредиентов в состав препаративной формы может существенно повысить эффективность заражения. В условиях вегетационного опыта добавление 10 %-ого кукурузного масла в суспензию спор привело к 100 % инфицированию растений мака как *P. papaveracea*, так и *D. penicillatum*. При добавлении в суспензию спор микромицетов 0,001 % водного раствора ТВИН-20, 16,5 % растений не поражалось. При добавлении 10 %-го кукурузного масла к

споровой суспензии гибель проростков составила 57,7 % у *P. papaveracea* и 34,7 % у *D. penicillatum*. В полевом эксперименте растения обрабатывали суспензией спор с титром 2×10^5 конидий/мл из расчета 3 мл на растение. Для улучшения прилипания добавляли 0,001 % ТВИН-20 в водном растворе или 0,001 % ТВИН-20 в 10%-ом неочищенном кукурузном масле. У растений мака наблюдалось значительное поражение стеблей, листьев и коробочек. Средний вес коробочек был ниже на 20 % по сравнению с контролем. Добавление 10 % неочищенного кукурузного масла к споровым суспензиям микромицетов вызвало более высокий исходный уровень инфекции в начале сезона. Включение неочищенного кукурузного масла в препаративную форму биогербицида способствовало сохранению жизнеспособности микромицета в сухой период и его последующему распространению (Bailey et al., 2000).

Из пораженных коробочек были выделены микромицеты, идентификацию которых проводили на основании размеров конидий и присутствию или отсутствию микросклероциев. Оказалось, что в полевых условиях *D. penicillatum* производит меньшие по размеру конидии, чем *P. papaveracea*, но формирует множественные микросклероции. В ряде исследований (Bailey et al., 2000, 2004; Hebbar et al., 1997; O'Neill et al., 2000) охарактеризованы показатели роста и продуктивности пропагул *P. papaveracea* и *D. penicillatum* на различных по компонентному составу питательных средах и определена их инфекционность на растениях мака снотворного.

Биомасса микромицетов, произведенная в промышленном ферментере, состояла из темноокрашенных и неокрашенных мицелиальных фрагментов, небольшого количества конидий и хламидоспор. При прорастании конидии образовывали аппрессории на отдельных листьях мака. Было установлено, что хламидоспоры не являются основным источником инфекции, хотя способны к прорастанию и инфицированию растений мака. Большая часть мицелиальных компонентов биомассы после высушивания на воздухе в течение 6 дней оставалась активной и успешно инфицировала растения мака (Bailey et al., 2000; O'Neil et al., 2000).

Таким образом, на основании анализа результатов проведенных исследований и данных литературы можно заключить, что среди выявленных на маке снотворном патогенов наибольшие перспективы в качестве продуцента микогербицида имеют возбудители черной пятнистости, характеризующийся высокой агрессивностью и специфичностью в отношении целевого растения.

Глава 2. Материалы, объекты и методы исследований

Работа проводилась в лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР в рамках Госконтракта № 1295/13.

2.1. Материалы и объекты исследований

Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали следующие виды растений, штаммы-продуценты микробиологических препаратов и штаммы фитопатогенных и почвообитающих микромицетов комплекса ризосферы сельскохозяйственных растений (таблица 2.1.1).

Таблица 2.1.1

Виды растений, сорта и штаммы макро- и микромицетов, использованные в работе

№ штамма, сорта	Вид микроорганизма	Характеристика	Происхождение
	<i>Papaver somniferum</i> L. (семена)	Дикорастущий и в незаконных посевах	Дагестан, естественные условия, КНР (Китай)
Рашид	<i>Cucumis sativus</i> L. (семена)	Производственный гибрид	Россия, селекционный
1.39	<i>Brachycladium papaveris</i> (Sawada) Shoemaker ex Inderb.	Патент РФ № 2377774, депонирован, паспортизован	Дагестан, естественные условия
1.39-8	<i>B. papaveris</i> (Sawada) Shoemaker ex Inderb.	Паспортизован, депонирован	Моноспоровая и поддерживающая селекция из <i>B. papaveris</i> 1.39
НК-35	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq:Fr.) Kumm	Производственный бесшпоровый гибрид, в составе конверсионного субстрата	Венгрия, селекционный
	<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.	Производственный летний гибрид, в составе конверсионного субстрата	Венгрия, селекционный
675-11	<i>Trichoderma viride</i> Pers.	Депонирован, паспортизован, коллекция ГНУ ВИЗР, тест-объект для проверки антагонистической активности	Россия, Московская область. Естественные условия
923	<i>F. oxysporum</i> Schlecht.	Депонирован, паспортизован, коллекция ГНУ ВИЗР, тест-объект для проверки антагонистической активности	Россия, Ленинградская область, естественные условия (корневая гниль пшеницы и ячменя)
602-1	<i>Alternaria solani</i> (Ell. et Mart.) Sorauer	Депонирован, паспортизован, коллекция ГНУ ВИЗР, тест-объект. для проверки антагонистической активности	Россия, Ленинградская область, естественные условия

Возбудитель черной пятнистости мака (*Brachycladium papaveris* (Sawada) Shoemaker ex Inderb. (syn.: *Dendryphion papaveris* (Sawada) Sawada, *Helminthosporium papaveris* Sawada). – перспективный микогербицид для контроля мака снотворного, депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР под коллекционным номером 1.39, выделен из семян *P. somniferum*, запатентован в РФ как *Dendryphion penicillatum* 1.39 (Патент ..., 2010). Согласно новым данным, штамм отнесен к виду *Brachycladium papaveris* (Гасич и др., 2013).

В работе использовали как штамм-продуцент *B. papaveris* 1.39, так и его моноспоровые изоляты и реизоляты 2-х поколений, полученные после проведения триады Коха в вегетационных опытах на растениях мака.

Материалы исследований

Для получения и хранения чистых культур микромицетов, для лабораторных опытов *in vitro* использовали **агаризованные питательные среды**, полусинтетические и синтетические (Методы..., 1982):

- синтетическая среда Чапека: NaNO_3 – 2 г, KH_2PO_4 – 1 г, MgSO_4 – 0.5 г, KCl – 0.5 г, FeSO_4 – 0.01 г, сахароза (глюкоза, мальтоза, крахмал) – 20 г, агар-агар – 20 г, вода – 1 л (или без агара для жидкофазного культивирования);
- полусинтетические агаризованные среды на основе экстракта картофеля. Растительный субстрат предварительно измельчали и кипятили в количестве 200 г/л, в течение часа, фильтровали, восстанавливали до прежнего объема с добавлением агара-агара (20 г/л) и сахарозы (20 г/л).

Режим стерилизации для всех сред, содержащих сахара в низкомолекулярной форме 30 мин. при 0,5–0,8 атм. Для подавления роста бактерий применяли стрептомицин-сульфат – 0,2 г/л. Все ограничители роста добавляли в расплавленную и охлажденную до 40° С среду после автоклавирования, так как стерилизация среды приводит к разрушению их молекулярной структуры.

Инокулюм 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. Создание суспензий пропагул осуществляли смывом стерильной водой с чистой культуры микромицета и

определением в камере Горяева инфекционной нагрузки и ее расчетом на 1 мл суспензии.

В опытах использовали химические гербициды и прилипатель Силиплант в концентрации 0,1%.

Химические гербициды

На основе метсульфурон-метила (д.в. 600 г/кг) – Ларен, СП – в концентрациях 500, 250, 125, 62,5 мг/л по действующему веществу, соответствующие норме расхода (НР), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{8}$ НР, соответственно; метрибузина (д.в. 250 г/л) – Зонтран, ККР – в концентрациях 40, 20, 10, 5 мл/л по действующему веществу, соответствующие норме расхода (НР), $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ и $\frac{1}{8}$ НР, соответственно.

Препараты на основе метрибузина (Зонтран, ККР), способны поражать целевые растения в период вегетации от всходов до формирования органов плодоношения. При применении этого гербицида наблюдаются также деформации органов растений в относительно короткие сроки, из-за этого целевые растения приобретают нетоварный вид.

Ларен, СП относится к препаратам группы сульфонилмочевины. Действие этого гербицида на растения проявляется более замедленно по сравнению с другими гербицидами, но вследствие поражения точки роста, обработанные ими растения прекращают рост и развитие, а в дальнейшем постепенно усыхают. Эти гербициды более активно действуют на растения в ранней фазе, в более поздние периоды развития растения реагируют на них слабее.

Характеристика действующих веществ гербицидов:

ЛАРЕН, СП

1. Наименование действующего вещества по ИСО (ISO) – Метсульфурон-метил.
2. Наименование действующего вещества по ИЮПАК (IUPAC) – 2-[3-(4-метокси-6-метил-[1,3,5]триазин-2-ил)- уредосульфонил] метиловый эфир бензойной кислоты.
3. Концентрация (г/кг) – 600 г/кг.
4. Препаративная форма – суспензионный порошок (СП).

5. Химический класс – Сульфонилмочевина.

6. Спектр действия – Оказывает гербицидное действие на однолетние и некоторые многолетние двудольные сорняки.

7. Сфера применения (на каких культурах, вредный объект) – к гербициду ЛАРЕН, СП проявляют чувствительность многие виды двудольных (широколистных) сорняков.

8. Рекомендуемый регламент применения:

8.1. Норма расхода – 8 и 10 г/га (4,8 и 6 г/га д.в.).

8.2. Способ применения – сплошное опрыскивание вегетирующих растений. Расход рабочей жидкости 200-300 л/га (при наземном опрыскивании) и 25-50 л/га (при применении с помощью авиации).

8.3. Срок проведения обработки, кратность, интервалы между обработками.

Однократное за вегетационный период опрыскивание посевов в ранние фазы роста однолетних двудольных сорняков (2–4 листа) и в фазе розетки многолетних двудольных сорняков на яровых зерновых независимо от фазы роста культуры (практически начиная с фазы 2-х листьев и позднее до конца кущения культуры). Озимые зерновые обрабатываются весной в фазе кущения культуры и ранние фазы роста сорняков.

8.4. Срок ожидания – не регламентируется.

9. Действие на вредные организмы (механизм действия): в растения гербицид ЛАРЕН СП, проникает через листья и частично через корни. В чувствительных двудольных растениях действует на фермент ацетолактат синтазу (АЛС), как и другие сульфонилмочевинные гербициды. Ингибирование АЛС приводит к остановке деления клеток и роста растений. Через несколько дней после обработки проявляется хлороз и некроз поврежденных растений, а полная гибель сорняков наступает позднее.

10. Период защитного действия – обеспечивает борьбу с двудольными сорняками в течение вегетационного периода.

11. Селективность: озимая и яровая пшеница, яровой ячмень проявляют устойчивость к гербициду ЛАРЕН, СП, примененному в рекомендованных нормах

внесения, начиная с фазы 2 листьев до выбрасывания флагового листа. Избирательность действия обусловлена способностью зерновых культур быстро метаболизировать и инактивировать метсульфурон-метил.

12. Скорость воздействия: метсульфурон-метил начинает подавлять рост сорняков через несколько часов после обработки. Листья чувствительных сорняков через 1–3 недели после обработки становятся хлоротичными, и точка роста отмирает.

13. Совместимость с другими препаратами: может сочетаться с 2,4-Д (аминные соли и эфиры), 2М-4Х (аминные соли и эфиры), Дикамбой, Бромксинилом и другими распространенными гербицидами, применяющимися на зерновых культурах. Препарат можно использовать в баковых смесях или последовательно с инсектицидами или фунгицидами, зарегистрированными для использования на зерновых культурах.

ЗОНТРАН, ККР

1. Наименование действующего вещества по ИСО (ISO) – метрибузин.
2. Наименование действующего вещества по ИЮПАК (IUPAC) – 4-амино-6-(1,1-диметилэтил)-3-(метилтио)-1,2,4-триазин-5(4Н)-он.
3. Концентрация (г/л) – 250 г/л.
4. Препаративная форма – концентрат коллоидного раствора (ККР).
5. Химический класс – производное триазинов.
6. Спектр действия: селективный системный гербицид для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками.
7. Сфера применения (на каких культурах, вредный объект): испытан на картофеле, томатах посевных и рассадных.
8. Рекомендуемый регламент применения:
 - 8.1. Норма расхода – в зависимости от того, на какой культуре рекомендуется применять, норма расхода препарата колеблется от 0,4–0,6 л/га до 1,7 л/га.
 - 8.2. Способ применения – сплошное опрыскивание вегетирующих растений. Максимальная концентрация рабочего раствора – 0,5 % по препарату.

8.3. Срок проведения обработки, кратность, интервалы между обработками: в зависимости от того, на какой культуре препарат рекомендуется использовать, сроки опрыскивания отличаются. Хорошие результаты получены при использовании по вегетирующим сорнякам, но не при обработке поверхности почвы.

8.4. Срок ожидания (в днях до сбора урожая): для посевных томатов – 30 суток; для остальных культур не регламентируются.

9. Действие на вредные организмы (механизм действия): метрибузин легко абсорбируется корнями и проростками растений, но может проникать и через листовую поверхность. Перемещается акропетально. Механизм действия основан на ингибировании транспорта электронов, участвующих в процессе фотосинтеза (фотосистема II).

10. Период защитного действия: поскольку гербицид ЗОНТРАН, ККР эффективно подавляет проростки вегетирующих сорняков, его применение позволяет отодвинуть появление их второй «волны». Гербицид обеспечивает чистоту посевов от сорной растительности на срок 1 месяц в зависимости от погодных условий в течение вегетационного периода.

11. Селективность: уничтожает многие виды однолетних двудольных и некоторых злаковых сорняков. Устойчивость к препарату в рекомендованных регламентах использования проявляют картофель, томаты посевные и рассадные. Для отдельных культур выявлены различия по сортовой устойчивости.

12. Скорость воздействия – гербицид уничтожает сорняки в течение 10–20 суток при послевсходовом применении.

13. Совместимость с другими препаратами: для расширения спектра действия и снижения норм расхода допустимо применять гербицид ЗОНТРАН, ККР в смесях с другими пестицидами (Мельников и др., 1995).

Поверхностно-активное вещество (ПАВ) Силиплант

Поверхностно-активное вещество с высоким содержанием кремния и микроэлементов в доступной форме, предназначено для предпосевной обработки семян и посадочного материала, подкормок растений в период вегетации в целях

ускорения прорастания семян и роста растений, увеличения урожайности культур, качества и устойчивости растений к неблагоприятным условиям выращивания.

В состав Силипланта, кроме кремния и калия (12–21 мг/л), в легко доступной для растений хелатной форме входят следующие микроэлементы (г/л): Fe – 0,44–0,54; Mg – 0,12–0,13; Cu – 0,09–0,27; Zn – 0,74–0,87; Mn – 0,32–0,37; Mo – 0,06–0,074; Co – 0,02–0,024; B – 0,094–0,112.

Конверсионные субстраты

Для твердофазного культивирования нами были использованы отработанные в процессе жизнедеятельности съедобных макромицетов (*Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* НК-35) субстраты на основе целлюлозо-лигнинсодержащих отходов техногенной сферы (Титова и др., 2002). Кроме того, материалами служили мультikonверсионные субстраты, полученные после последовательного культивирования вешенки (*P. ostreatus* НК-35) на отработанном шии-таке отходе производства плодовых тел. Использованные для мультибио конверсии субстраты в отработанном состоянии имеют оформленный состав (таблица 2.2.1). В отработанных (конверсионных) субстратах все указанные ингредиенты находятся в переработанном предыдущим участником биоконверсии состоянии, происходит накопление водорастворимых легкоусваиваемых веществ – аминокислот, витаминов, моносахаридов и др. Превалировал в конверсионных субстратах, указанный как компонент, грибной белок в виде мицелия предыдущего участника биоконверсии, пронизывающего практически всю толщу используемого субстрата (таблица 2.2.1).

Материалами для наработки опытных партий лабораторных образцов гранулированных мультikonверсионных биопрепаратов служили полипропиленовые пакеты объемом 1 л с термоустойчивым клеевым липким слоем или без такового из двухосноориентированной полипропиленовой пленки БОПП (BOPP) 40 мкм. Использование пакетов из подобного материала продиктовано возможностью их паровой стерилизации с субстратом при 133° С (2 атм. в течение 1-го часа). Пакеты данных артикулов используют в производстве съедобных базидиомицетов *L. edodes* и *P. ostreatus* НК-35.

При проведении модельных лабораторных опытов 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, семена мака снотворного (дикого и кулинарного), лабораторные пульверизаторы и стандартный полевой опрыскиватель SOLO.

Для экстракции эндометаболитов использовали ряд растворителей: 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 элюирования использовали: гексан, диэтиловый эфир, уксусную кислоту, ацетон, н-бутанол. Проявление пятен осуществляли в УФ-свете ($\lambda = 210\text{--}440$ нм) и в парах йода.

2.2. Методы исследований

Методы создания инокулюма

Жидкие среды для глубинного культивирования использовали для получения большого количества инокулюма.

На жидких питательных средах мицелиальный инокулюм гриба получали в 750 мл колбах Эрленмейера. Для подавления роста бактерий применяли следующие антибиотики в концентрации 50 мкг/мл: полимиксин, пенициллин, стрептомицин. Питательную среду (жидкую среду Чапека, соево-глюкозные среды) объемом 100 мл стерилизовали автоклавированием 30 мин при 118° С. Культивирование проводили на орбитальной качалке в течение 5-7 суток при 180 об/мин и температуре 25±2° С.

Конверсионный субстрат засекали в чашках Петри либо 1 мл суспензии пропагул штамма-продуцента, либо блоком двухнедельной посевной культуры диаметром 10 мм. Твердофазное культивирование на субстратах проводили течение 7-и суток при температуре 25±2° С.

Повторность в сериях опытов 5–10-и кратная.

Титр жизнеспособных клеток по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) в процессе глубинного и твердофазного культивирования определяли методом серийных разведений с последующим высевом на стандартную агаризованную среду Чапека. Тем же методом определяли титр жизнеспособных клеток в лабораторных образцах различных препаративных форм. Титр жизнеспособных клеток после высушивания биомассы при 38–40° С до воздушно-сухого состояния определяли методом серийных разведений с последующим высевом на агар Чапека.

Методы исследования морфотипов штаммов *B. papaveris*

Культивирование штаммов *B. papaveris* производили на агаризованных средах Чапека, картофельно-сахарозной (КСА), и глубинным способом (среда Чапека и соево-глюкозные среды). Оценивали характер и скорость роста колоний и пеллет, текстуру мицелия, обильность и состояние спороносящих структур, споропроодуктивность колоний. Для мелкообъемного культивирования на субстратах применяли смывы с чистых культур морфотипов, выращенных на агаризованной среде Чапека, в виде суспензий пропагул штаммов *B. papaveris*. 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 характеристики габитусов мицелия и спороношения разработали специальную шкалу баллов, соответствующих их различным 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; признаки 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.

Методы получения и оценки стабильности моноспоровых изолятов

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 этого с чистой культуры исходного штамма-продуцента в асептических условиях стерильной водой смывали конидии исходного штамма и фильтровали через ватно-марлевый фильтр. Полученный фильтрат микроскопировали, стерильной пипеткой наносили по 0,1 мл на агаризованную среду Чапека и картофельно-сахарозный агар, растирали стеклянным шпателем и помещали в термостат для культивирования при 28° С до начала прорастания конидий. Через 5 суток каждую колонию, развившуюся из отдельной конидии, отсевали и инкубировали в термостате. Учитывали морфологические особенности (форма, цвет, структура и текстура колоний), скорость роста колоний, начало спороношения.

Для оценки стабильности комплекса морфолого-культуральных признаков, скорости роста и споропроодуктивности моноспоровых изолятов нами была разработана шкала 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 $K_{пр} = \pi r^2 / \pi R^2$.

Методы оптимизации питательных сред

Для оптимизации питательных сред и условий культивирования проведено выращивание отобранных перспективных штаммов в лабораторных условиях на средах и субстратах различного состава (таблице 2.2.1.). В твердофазном культивировании придерживались следующих этапов приготовления субстратов:

- Измельчение компонентов до необходимой фракции (0.5–2.5 см).
- Замачивание в воде до 20–24 ч. для насыщения субстрата влагой.
- Доведение влажности субстратной смеси до необходимых значений (70–80 %).
- Расфасовывание субстратов для мелкообъемного культивирования (чашки Петри, полипропиленовые пакеты объемом 1000 мл).
- Стерилизация субстратных смесей при 133° С в течение 1 часа с охлаждением до 25–28° С для инокуляции.
- Инокуляция чистой культурой штаммов микромицетов.
- Инкубирование при 24–26° С до полного обрастания субстрата.
- Оценка конидиогенеза.

Таблица 2.2.1

Составы питательных сред и субстратов для глубинного и твердофазного культивирования штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8

Полное и сокращенное наименование питательной среды	Состав среды	Режим стерилизации
1	2	3
Полная с пептоном, ПП	KH_2PO_4 – 2 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г; MgSO_4 – 1 г; Глюкоза – 20 г; Дрожжевой экстракт (или белково-витаминный концентрат БВК) – 1 г; Пептон – 10 г; Вода – 1 л. pH 7–7,5	0,8 атм., 30 мин.
Жидкое сусло, С	50% Неохмеленное сусло – 1 л (0.5 л сусло + 0.5 л вода). pH 7	0,8 атм., 30 мин.
Пептоно-глюкозная среда, ПГ	Пептон – 10 г; Глюкоза – 40–60 г; Вода – 1 л. pH 7–7,5	0,5 атм., 20 мин.

1	2	3
Пептоно-глюкозная с солями, ПГС	Пептон – 10 г; Глюкоза - 40-60 г; KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г, MgSO_4 – 1 г, Вода – 1 л. pH 7–7,5	0,5 атм., 20 мин.
Пептоно-сахарозная среда, ПС	Пептон – 10 г, Сахароза - 40-60 г, Вода – 1 л pH 7–7,5	0,5 атм., 20 мин.
Среда Борисова, СБ	KH_2PO_4 – 1,5 г; MgSO_4 – 0,5 г; NaCl – 3 г; Глюкоза – 20 г; Глицерин – 20 мл; Соевая мука – 7 г; Пептон – 5 г; Дрожжевой экстракт (или БВК) – 3г; Вода – 1 л. pH 7–7,5	0,8 атм., 30 мин.
Среда Борисова на яичном порошке, СБЯ	KH_2PO_4 – 1,5 г; MgSO_4 – 0,5 г; NaCl – 3 г; Глюкоза – 20 г; Глицерин – 20 мл; Яичный порошок - 25 г; Вода – 1 л. pH 7–7,5	0,8 атм., 60 мин.
Среда Сабуро, СС	Пептон – 10 г; Глюкоза – 10 г; Мальтоза – 10 г; Дрожжевой экстракт (или БВК)- 5г; Агар-агар – 15-18 г; Вода – 1 л. pH 7	0,8 атм., 30 мин.
Среда Чапека, СЧ	FeSO_4 – 0,01 г (если вода дистиллирована); KCl – 0,5 г; KH_2PO_4 – 1 г; MgSO_4 – 0,5 г; NaNO_3 – 2 г; Сахароза – 20 г; Вода – 1 л. pH 6,5–7,0	0,8 атм., 30 мин.
Синтетическая среда, ССС	Меласса – 30 мл/л; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; Мочевина – 0Б5 г/л; KH_2PO_4 – 2 г; Вода – 1 л. pH 7,0	0,8 атм., 30 мин.
Соево-глюкозная среда, СГС	1. Вода – 1 л; Соевая мука – 10 г (1 %) 2. Вода + соевая мука; Глюкоза - 40-60 г (4-6 %). pH 7-7,3.	1. 2 атм., 60 мин. 2. 0.5 атм., 20 мин.
Соево-глюкозная среда 1, СГС-1	1. Вода – 1 л, Соевая мука – 10 г (1%), KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г, MgSO_4 – 1 г. 2. Вода + соевая мука +соли, Глюкоза – 20 г (2 %). pH 7–7,3	1. 2 атм., 60 мин. 2. 0.5 атм., 20 мин.
Соево-глюкозная среда 2, СГС-2	1. Вода – 1 л, Соевая мука – 5 г (0,5%), KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г, MgSO_4 – 1 г. 2. Вода + соевая мука +соли, Глюкоза - 20 г (2 %). pH 7-7,3	1. 2 атм., 60 мин. 2. 0.5 атм., 20 мин.
Соево-глюкозная среда 3, СГС-3	1. Вода – 1 л, Соевая мука – 5 г (0,5%), KH_2PO_4 – 2 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 г, MgSO_4 – 1 г. 2. Вода + соевая мука +соли, Глюкоза - 40 г (4 %). pH 7–7,3	1. 2 атм., 60 мин. 2. 0.5 атм., 20 мин.
Конверсионный субстрат, после культивирования шиитакэ, КШС	опилки дубовые, отруби пшеничные – 10 %, CaCO_3 – 0.1 %, $\text{CaSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 % по весу 70 %-ной влажности субстрата, грибной белок (мицелий шиитакэ в толще субстрата); pH 7-7.5.	2 атм., 60 мин.
Конверсионный субстрат, после культивирования вешенки, КВС	лузга гречихи и подсолнечника (1:1), опилки смешанные – 7 %, CaCO_3 – 0.1 %, $\text{CaSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 % по весу 70 %-ной влажности субстрата, грибной белок (мицелий вешенки в толще субстрата) pH 7-7.5.	2 атм., 60 мин.
Конверсионный объединенный субстрат, КШВС	опилки дубовые, отруби пшеничные – 10 %, CaCO_3 – 0.1 %, $\text{CaSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 % по весу 70 %-ной влажности субстрата, грибной белок (мицелий шиитакэ и вешенки в толще субстрата).	2 атм., 60 мин.

Методы определения накопления биомассы при глубинном и твердофазном культивировании

Для определения интенсивности накопления биомассы при глубинном культивировании на 3-и и 5-е сутки роста из каждой колбы отбирали по 1 мл культуральной жидкости, переносили на предварительно высушенный до постоянного веса бумажный фильтр марки «красная лента» в воронку Бюхнера и отдували с помощью вакуумного насоса в колбе Бунзена. Затем влажную биомассу сушили до постоянного веса при 105° С в течение 4 часов, и определяли сухую биомассу гриба. При твердофазном культивировании для характеристики накопления биомассы использовали относительный показатель колонизации определенной доли объема субстрата.

Методы получения лабораторных образцов

Жидкие и субстратные гранулированные лабораторные образцы получали методами глубинной и твердофазной ферментации. Глубинное культивирование микромицетов проводили на среде СГС-2 в колбах объёмом 750 мм в течение 5 суток на качалке (250 оборотов/мин.) при 24–26° С. В колбу Эрленмейера с жидкой питательной средой объемом 100 мл посевной иглой вносили соскоб исходной культуры микромицета со скошенной агаризованной среды Чапека. Для получения жидкого лабораторного образца 5-суточные культуры грибов гомогенизировали с помощью блендера Vitek, фильтровали через 2 слоя марли.

Твердофазное полупромышленное мелкообъемное культивирование осуществляли в таких же термических условиях, в пластиковых пакетах объемом 1 л. Инокулюм для культивирования производили путем жидкофазной ферментации. Инокуляцию стерильных полипропиленовых пакетов с субстратом осуществляли при расклеивании угла пакета после его обработки 95 % этанолом, введением стерильного горла колбы Эрленмейера с инокулюмом, не обнажая и не касаясь субстрата в пакете, и переливанием половины культуральной жидкости в пакет. В конце инокуляции после выведения горла колбы угол пакета вновь обрабатывали 95 % этанолом, заклеивали и перемешивали вручную содержимое

пакета. После перемешивания проверяли надежность заклеивания засеянных пакетов. Повторность в сериях опытов 3-х кратная.

Качество лабораторных образцов определяли при анализе суспензий, получаемых из жидкой культуры и смывом стерильной водой с субстрата и последующим определением в камере Горяева количества инфекционных пропагул по следующей формуле:

$$N=a \times 250 \times 10^3, \text{ где}$$

a – среднее количество пропагул в одном большом квадрате камеры Горяева (среднее из 5 больших квадратов камеры), 250×10^3 – коэффициент пересчета, зависящий от объема большого квадрата (Лилли и др., 1953; Методы ..., 1982).

Методы получения растительного материала

Для получения растений мака производили посев семенами (30 шт./сосуд) на поверхность почвы. Перед посевом семена предварительно обрабатывали в 0,5%-растворе марганцево-кислого калия или в хлорном растворе (Доместос, 1:10), после чего несколько раз промывали водой и проверяли их всхожесть. Для этого семена мака выдерживали в стерильной чашке Петри на влажном фильтре в термостате при 28° С в течение 24 часов или семена смешивали с песком и высевали в хорошо увлажненную почву. Проросшие семена учитывали на 7-е сутки выдерживания при комнатной температуре (всхожесть составляла 15–50 %).

Для посева использовали пластиковые сосуды объемом 150 мл и керамические вазоны объемом 1000 мл. Весь почвенный материал был предварительно стерилизован при 133° С в течение 1-го часа. В готовую почвенную смесь вносили микроэлементную добавку (ОАО "Буйский химический завод) в количестве 10 г на 200 г почвы, для поддержания микроэлементного состава почвы и для уменьшения ее кислотности. Проростки мака получали инкубированием при комнатной температуре в стандартной лабораторной светоустановке при освещении люминесцентными лампами засеянных сосудов.

Каждый вариант опыта выполняли в 3-кратной повторности.

Методы реизоляции штаммов

В процессе опытов для завершения триады Коха проводили реизоляцию возбудителей заболеваний из погибших и больных растений. Для этого кусочки пораженной ткани помещали в марлевые мешочки и в течение часа промывали в проточной воде, затем на 30 сек. помещали в 0,1 % раствор AgNO_3 . После этого растительную ткань выдерживали 3–5 минут в стерильной воде со стрептомицином (0,1 г/100 мл) и раскладывали на агаризованную среду Чапека в чашки Петри для культивирования в условиях термостата при 25° С в течение 3–5-и суток.

Методы оценки биологической эффективности лабораторных образцов

Учет симптомов заболеваний и биологической эффективности образцов препаратов проводили через 3 суток и далее каждые 1–2-е суток до конца периода наблюдений и сбора морфометрических данных (Лакин, 1980).

Биологическую эффективность штаммов микромицетов, лабораторных образцов на их основе и их комбинаций с пониженными нормами гербицидов оценивали по комплексу показателей, характеризующих рост и развитие растений (высота, биомасса надземной части и корневой системы, площадь ассимиляционной поверхности, количество листовых ярусов), распространенность и развитие болезни, гибель растений:

- ✓ показатель распространенности болезни – количество больных растений в % от общего числа растений, обследованных на повторностях варианта – вычисляется по формуле

$$P = n/N \times 100\%, \text{ где}$$

n – количество больных растений, N – общее количество растений на вариант;

- ✓ интенсивность, или степень поражения – определяется площадью пораженной поверхности, в частности листьев, и выражается в баллах или в %:

0 = 0% признаков поражения нет;

1 = поражено до 10 % листовой поверхности;

2 = поражено 11-25% листовой поверхности;

3 = поражено 26-50 % листовой поверхности;

4 = поражено более 50 % листовой поверхности.

Учет проводили каждые 3–4 дня для выявления динамики поражения (Методические ..., 2009).

- ✓ показатель развития болезни, (индекс болезни) отражает среднюю интенсивность поражения и вычисляется как

$$R = [\sum a \times b / NK] \times 100\%, \text{ где}$$

$\sum a \times b$ – сумма произведений числа больных организмов (a) на соответствующий им балл поражения (b), N – общее количество просмотренных организмов (здоровых и больных), K – высший балл шкалы учета;

- ✓ потери биомассы, определяемые по формуле

$$G = [(A - a) / A] \times 100\%, \text{ где}$$

A – биомасса здоровых растений, а – биомасса больных организмов;

- ✓ гибель растений вычисляется по формуле

$$\Gamma = n / N \times 100\%, \text{ где}$$

n – количество погибших растений, N – общее количество растений на вариант;

- ✓ потери ассимиляционной поверхности листьев растений определяли при помощи палетки. Для этого из прозрачного материала изготовили круглую палетку, которая представляет собой сеть взаимно перпендикулярных линий, проведенных через 5 мм. Площадь листа определяется подсчетом клеток палетки, наложенной на лист. Доли клеток, рассекаемых контуром на части, учитываются приблизительно (Никитин, 2003).

Методы оценки влияния химических гербицидов на жизнеспособность штаммов *B. papaveris*

Определяли параметры роста гриба на средах, содержащих различные концентрации гербицидов. Ежедневно оценивали прирост колоний микромицета. Каждый вариант опыта был заложен в десяти повторностях. В качестве показателя влияния различных доз гербицидов использовался линейный рост колоний, включающий лаг-фазу (адаптивную фазу) медленного роста, фазы ускоренного и экспоненциального роста и старение. Для определения линейного роста изучаемый

гриб высевали в центр поверхности агаризованной питательной среды с добавлением гербицидов в различных концентрациях. Через определенные промежутки времени (1–2-е суток) измеряли диаметр колоний в двух взаимноперпендикулярных направлениях от точки инокулирования до конца зоны роста мицелия.

Расчетные параметры линейного роста мицелия, представленные в работе:

- ✓ среднее суточное увеличение диаметра колонии (средний суточный прирост), вычисляемое как средняя разность ежесуточных диаметров колонии (в мм);
- ✓ дифференциальная скорость роста мицелия, представляемая как производная функции приращения диаметра в единицу времени (мм/сут.), (Методы..., 1982).

Методы обработки растений лабораторными образцами и химическими гербицидами

- ✓ опрыскивание проростков мака жидким инокулюмом, полученным как при глубинном культивировании, так и смывом с агаризованных культур штамма-продуцента и субстратов: растения в фазе семядолей, 3-х недельных проростков в фазе 1-3 настоящих листьев со всех сторон тщательно обрабатывали при помощи лабораторного пульверизатора с мелким распылением жидкости и стандартного опрыскивателя SOLO; расход рабочей суспензии составлял 40 мл/м²;
- ✓ опрыскивание проростков мака смесями лабораторных образцов и химических гербицидов в пониженных концентрациях при помощи лабораторного пульверизатора с мелким распылением жидкости и стандартного опрыскивателя SOLO; расход рабочей суспензии составлял 40 мл/м²;
- ✓ до- и после всходовое внесение в почву инокулюма, полученного при твердофазном культивировании;
- ✓ обработка гербицидами в различных концентрациях в фазе 2-3 настоящих листьев при помощи лабораторного пульверизатора с мелким распылением жидкости и стандартного опрыскивателя SOLO; расход рабочего раствора различных концентраций гербицидов составлял 40 мл / 1 м².

Растворы гербицидов и прилипателя определенных концентраций получали путем разведений маточных растворов, полученных из навесок препаратов, соответствующих стандартным нормам расхода на 1 га площади обработки.

В процессе выполнения опытов отмечали симптомы заболеваний, распространенность и развитие болезней по стандартным формулам.

Варианты и схема опытов совместного применения лабораторных образцов и химических гербицидов в пониженных концентрациях, а представлены ниже.

Варианты опыта:

1. Контроль;
2. Жидкий лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 (норма расхода биопрепарата 100 мл/м²);
3. Гранулированный лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 (норма расхода биопрепарата 10 г/м²);
4. Гербицид Ларен, СП (2,5 г/га - ¼ НР);
5. Гербицид Ларен, СП (5г/га - 1/2 норма расхода);
6. Гербицид Зонтран, ККР (0,425 л/га - ¼ НР);
7. Гербицид Зонтран, ККР (0,85 л/га - ½ НР);
8. Гранулированный лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 + Ларен, СП (2,5 г/га - ¼ НР);
9. Гранулированный лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 + Ларен, СП (5 г/га - ½ НР);
10. Гранулированный лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 + Зонтран, ККР (0,425 л/га - ¼ НР);
11. Гранулированный лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 + Зонтран, ККР (0,85 л/га - ½ НР);
12. Гербицид Ларен, СП (10 г/га - НР);
13. Гербицид Зонтран, ККР (1,7 л/га - НР)

Схема опыта

№ п/п	Вариант опыта
1	контроль
	защитка

2	Жидкий лабораторный образец на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8
	защитка
3	Гранулированный лабораторный образец на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8
	защитка
4	Ларен, СП ¼ НР
	защитка
5	Ларен, СП ½ НР
	защитка
6	Зонтран, ККР ¼ НР
	защитка
7	½ Зонтран, ККР
	защитка
8	Гранулированный лабораторный образец + Ларен, СП ¼ НР
	защитка
9	Гранулированный лабораторный образец + ½ Ларен, СП
	защитка
10	Гранулированный субстратный лабораторный образец + Зонтран, ККР ¼ НР
	защитка
11	Гранулированный лабораторный образец + Зонтран, ККР ½ НР
	защитка
12	контроль
13	Зонтран, ККР, НР
14	защитка
15	Ларен, СП, НР

Варианты и схема опытов последовательной обработки проростков мака различными лабораторными образцами и химическими гербицидами в пониженных концентрациях, а также их комбинациями представлены ниже.

Варианты опыта:

1. Контроль;
2. Лабораторные образцы на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 (гранулированный лабораторный образец за 30 суток до посева мака с нормой расхода 2кг/10 м², смыв с гранулированного лабораторного образца – суспензия пропагул – для опрыскивания проростков мака в фазе семядольных листьев, норма расхода 10 мл/м²; жидкая препаративная форма в виде суспензии пропагул для опрыскивания проростков мака в фазе 1-2 настоящих листьев норма расхода 100 мл/м²);
3. Лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (1,25 г/га - ⅛ НР) последовательно;
4. Лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (2,5 г/га - ¼ НР) последовательно;

5. Лабораторные образцы на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (5 г/га - $\frac{1}{2}$ НР) последовательно;
6. Лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,2125 л/га - $\frac{1}{8}$ НР) последовательно;
7. Лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,425 л/га - $\frac{1}{4}$ НР) последовательно;
8. Лабораторный образец на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,85 л/га - $\frac{1}{2}$ НР) последовательно;
9. Гербицид Ларен, СП (1,25 г/га - $\frac{1}{8}$ НР) однократно;
10. Гербицид Ларен, СП (2,5 г/га - $\frac{1}{4}$ НР) однократно;
11. Гербицид Ларен, СП (5 г/га - $\frac{1}{2}$ НР) однократно;
12. Гербицид Ларен, СП (10 г/га – НР) однократно;
13. Гербицид Зонтран, ККР (0,2125 л/га - $\frac{1}{8}$ НР) однократно;
14. Гербицид Зонтран, ККР (0,425 л/га - $\frac{1}{4}$ НР) однократно;
15. Гербицид Зонтран, ККР (0,85 л/га - $\frac{1}{2}$ НР) однократно;
16. Гербицид Зонтран, ККР (1,7 л/га – НР) однократно.

Схема опыта

№ п/п	Вариант
1	КОНТРОЛЬ
2	Лабораторные образцы (ЛЮ) на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно защитка
3	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП $\frac{1}{8}$ НР последовательно защитка
4	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно+ Ларен, СП $\frac{1}{4}$ НР последовательно Защитка
5	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП $\frac{1}{2}$ НР последовательно защитка
6	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР - $\frac{1}{8}$ НР последовательно защитка
7	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР - $\frac{1}{4}$ НР последовательно защитка
8	Лабораторные образцы на основе штамма <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР последовательно

	защитка
9	Гербицид Ларен, СП - $\frac{1}{8}$ НР однократно
	защитка
10	Гербицид Ларен, СП $\frac{1}{4}$ НР однократно
	защитка
11	Гербицид Ларен, СП $\frac{1}{2}$ НР однократно
	защитка
12	Гербицид Ларен, СП – полная норма – 10 г/га однократно
	защитка
13	Гербицид Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР однократно
	защитка
14	Гербицид Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР однократно
	защитка
15	Гербицид Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР однократно
	защитка
16	Гербицид Зонтран, ККР НР однократно
	защитка
17	КОНТРОЛЬ

Методы выделения и характеристики основного активного компонента метаболитного комплекса

Субстрат, проросший мицелием *B. papaveris* 1.39, экстрагировали 6-кратным объемом метанола (масса/объем), затем 750 мл нативного раствора экстрагировали равным объемом н-бутанола при энергичном перемешивании на механической мешалке при комнатной температуре в течение 1 ч. Экстракцию повторили половинными объемами растворителей. Объединенные экстракты выпарили на роторном испарителе при 45–50°C досуха. В обоих случаях получили желтые аморфные порошки (в случае нативного раствора осадок имел выраженный зеленый оттенок). Из метанольного и бутанольного сухих экстрактов получили 1%-й и 10%-й растворы для оценки их фитотоксической активности.

Для выявления активных фракций по показателям фитотоксичности на семенах мака осадки из мицелия и нативного раствора растворяли в метаноле и наносили на хроматографические пластинки (силуфол-254). Хроматографирование проводили в системе н-бутанол – уксусная кислота – вода (3:1:1). Проявление пятен проводили в УФ-свете (фильтр N5) и в парах йода. Каждую из полученных фракций снимали с пластинки метанолом.

Выделенный порошок экстрагировали дважды 150 мл гексана и дважды 100 мл ацетона. После удаления гексана и ацетона выделенный продукт для очистки

растворяли в 3 мл ацетона и вносили в колонку, наполненную молселектом ($\varnothing 1,5$ см, высота слоя 10 см), предварительно набухшего в течение 12 часов в системе метанол–хлороформ–вода (2:1:2). Колонку проливали ацетоном. Процесс хроматографии контролировали ТСХ. Объединенные фракции, имеющие $R_f=0,90$, выпаривали досуха (Кирхнер, 1981).

Для получения 10%-го раствора к 200 мг метанольного и бутанольного выпаренных досуха экстрактов постепенно добавляли 2 мл воды. Для получения 1%-го раствора к 0,5 мл 10%-го раствора добавили 4,5 мл воды. Образцы субстратного мицелия массой 2 г экстрагировали при комнатной температуре 150 мл этанола в течение 1 ч при энергичном перемешивании на механической мешалке. Экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр красная лента и выпарили досуха на роторном испарителе при температуре 45–50° С. Получили темно-коричневое масло, которое кристаллизовали путем затирания со 100 мл гексана. Контроль состава экстрактов субстратного мицелия проводили методом ТСХ в системе н-бутанол–уксусная кислота–вода (3 : 1 : 1). Проявление пятен осуществляли в УФ-свете и в парах иода (Кирхнер, 1981).

Методы оценки фитотоксичности компонентов метаболитного комплекса штаммов-продуцентов для семян и проростков мака

При твердофазном культивировании образцы 5, 7 и 10-суточных культур (штамм *B. papaveris* 1.39, реизоляты 1-го и 2-го поколений) весом 200 г каждый помещали в стеклянный стакан и экстрагировали 150 мл этанола, перемешивая в течение 1 ч. Затем пропускали через бумажный фильтр. Полученный экстракт выпаривали до получения водного слоя (3–4 мл). Остаток экстрагировали 60 мл гексана, затем отбирали по 10 мл раствора каждого образца и выпаривали в бюксе при комнатной температуре. Для получения рабочего раствора добавляли по 4 мл воды или 4 мл 50%-го метанола и тщательно перемешали.

При жидкофазном культивировании отбирали по 200 мг выпаренных досуха метанольного и бутанольного экстрактов. Для получения 10 % рабочего раствора постепенно добавляли 2 мл воды, для получения 1% раствора из 10 % раствора отбирали 0,5 мл и добавляли 4,5 мл воды.

Фитотоксичность компонентов метаболитного комплекса оценивали по потерям всхожести и энергии прорастания семян мака и огурца под воздействием растворителей и экстрактов. 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. Затем их помещали в стерильные чашки Петри на увлажненные стерильной водой фильтры и выдерживали в термостате при 25–28° С в течение 24–72 ч, после чего определяли всхожесть. Контролем служила водопроводная вода. В вариантах, где использовали 100 %-й бутанольный и метанольный экстракты, фильтр с нанесенным на него экстрактом предварительно высушивали в течение 1 ч. Смыв экстрактов осуществляли эфиром, после нанесения на фильтр его высушивали в течение 2,5 ч. Учет количества проросших семян проводили через сутки. Повторность 10-кратная.

Методы выявления антагонистической активности компонентов метаболитного комплекса

Антагонистическую активность компонентов метаболитного комплекса и гексановых экстрактов субстратного мицелия 5, 7 и 10-суточных культур оценивали с использованием метода лунок (Методы..., 1982). Экстракты (эфирный и гексановый) выпаривали на воздухе при комнатной температуре досуха, определяли количество полученного вещества и растворяли сначала в 50%-м этаноле, потом в воде до концентрации 2 мг/мл. Полученные растворы для тестирования вносили в лунки на газон тест-культур по 0,1 мл. В качестве тест-культур использовали микромицеты *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium culmorum*, *Alternaria solani* и *Trichoderma viride*. Диаметр зоны подавления роста тест-культур вокруг лунок измеряли на 3-и сутки опыта. Повторность 10-кратная.

Методы изучения патологического процесса

Патогенез на маке снотворном при его поражении *B. papaveris* изучали на проростках растений. Посев растений мака производили семенами (20 шт./сосуд) на поверхность почвы в лабораторные сосуды объемом 200 г, наполненные смесью земли и песка (1:1). Первую инокуляцию растений мака проводили в фазе семядолей смывом с агаризованной среды культуры штамма-продуцента. На корневую шейку

каждого растения при помощи лабораторной пипетки наносили по 1 мл смыва с титром $2,1 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Повторную обработку проводили на 7-10 дневных проростках в фазе 1- 3 настоящих листьев жидким инокулюмом, полученным при глубинном культивировании. На корневую шейку растения при помощи лабораторной пипетки наносили по 2 мл культуральной жидкости с титром $5,6 \times 10^6$ КОЕ/мл. После обработки растения помещали в лабораторную светоустановку при 20-23°C и естественной влажности. Каждый вариант опыта выполняли в 3-кратной повторности. Контрольные растения проливали водопроводной водой. Первый учет провели через 7 дней после обработки, последующие учеты проводили каждый день в течение двух недель.

Для подтверждения патологического процесса проводили микроскопическое исследование пораженных проростков при помощи светового и электронного сканирующего микроскопов. Для электронной сканирующей микроскопии использовался микроскоп Evo E40 (Carl Zeiss, Германия), который позволяет исследовать препараты без фиксации. Фрагменты корневой шейки 3-х недельных проростков мака длиной 1-3 мм на 7 сутки после заражения *B. paraveris* отмывали в течение 30 мин. в проточной воде и переносили на предметный столик микроскопа, где и анализировались при 400–1000-кратном увеличении.

Статистическая обработка экспериментальных данных

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. Направленная селекция на технологичность и агрессивность штаммов *B. papaveris* 1.39

Концепция Н. И. Вавилова о гетерогенности вида у грибов или системе вида, состоящей из различного количества форм (типов), рас или штаммов со специфическими свойствами (вирулентности, агрессивности, экологическим показателям, образованию физиологически активных веществ и т.п.) – признана в середине прошлого века (Хохряков, 1959; Горленко, 1975). Структура грибных популяций отличается от популяционной структуры высших эукариот клональностью вследствие нерегулярности или отсутствия полового процесса, а также невозможности генетической рекомбинации, обусловленной полиморфизмом генов вегетативной несовместимости (Дьяков и др., 1995). Любой морфологический вид как совокупность интерстерильных групп представлен рядом морфотипов, различия между которыми укладываются в норму реакции для каждого клона. Изменения функциональных свойств, происходящие у грибов, обычно коррелируют с их культуральными и морфологическими признаками (Ремнева и др., 1968; Промышленная ..., 1989; Сергеев и др., 2003). Наличие и количество морфотипов обусловлено уровнем изменчивости популяции, типом развития и жизненной стратегии вида микромицета (Левитин, 1986; Дьяков, 1992; Иванюк и др., 1996; Феофилова и др., 2009). Поэтому на основании характеристики морфотипов штамма *B. papaveris* 1.39 нами осуществлялся отбор по таким значимым в контроле целевых растений мака признакам как технологичность и агрессивность. Способности к стабильно быстрому росту и максимальной споропродуктивности на доступных и дешевых субстратах, входящих в понятие технологичности штамма, мы добивались с помощью методов моноспоровой селекции штамма *B. papaveris* 1.39 и оптимизации питательных субстратов при глубинном и твердофазном культивировании. Высокой агрессивности – способности за кратчайший период времени в субоптимальных условиях вызывать патологический процесс и размножаться с высокой интенсивностью споруляции в тканях растения-хозяина – мы добивались осуществлением триады Коха, заражая целевые растения мака в

разные фазы их развития, и поддерживающей селекцией отобранных штаммов *B. papaveris* 1.39.

3.1. Морфотипы штамма фитопатогенного гриба *B. papaveris* 1.39 и их патогенность

При анализе морфологических и культуральных особенностей штамма *B. papaveris* 1.39 выявлены несколько морфотипов, отличающихся скоростями роста и интенсивностью споруляции при твердофазном культивировании на синтетических питательных средах (агаризованная среда Чапека) (рисунок 3.1.1). Полученные морфотипы могут быть охарактеризованы как медленно растущий многоспоровый, многоспоровый, быстрорастущий среднеспоровый, среднеспоровый, малоспоровый

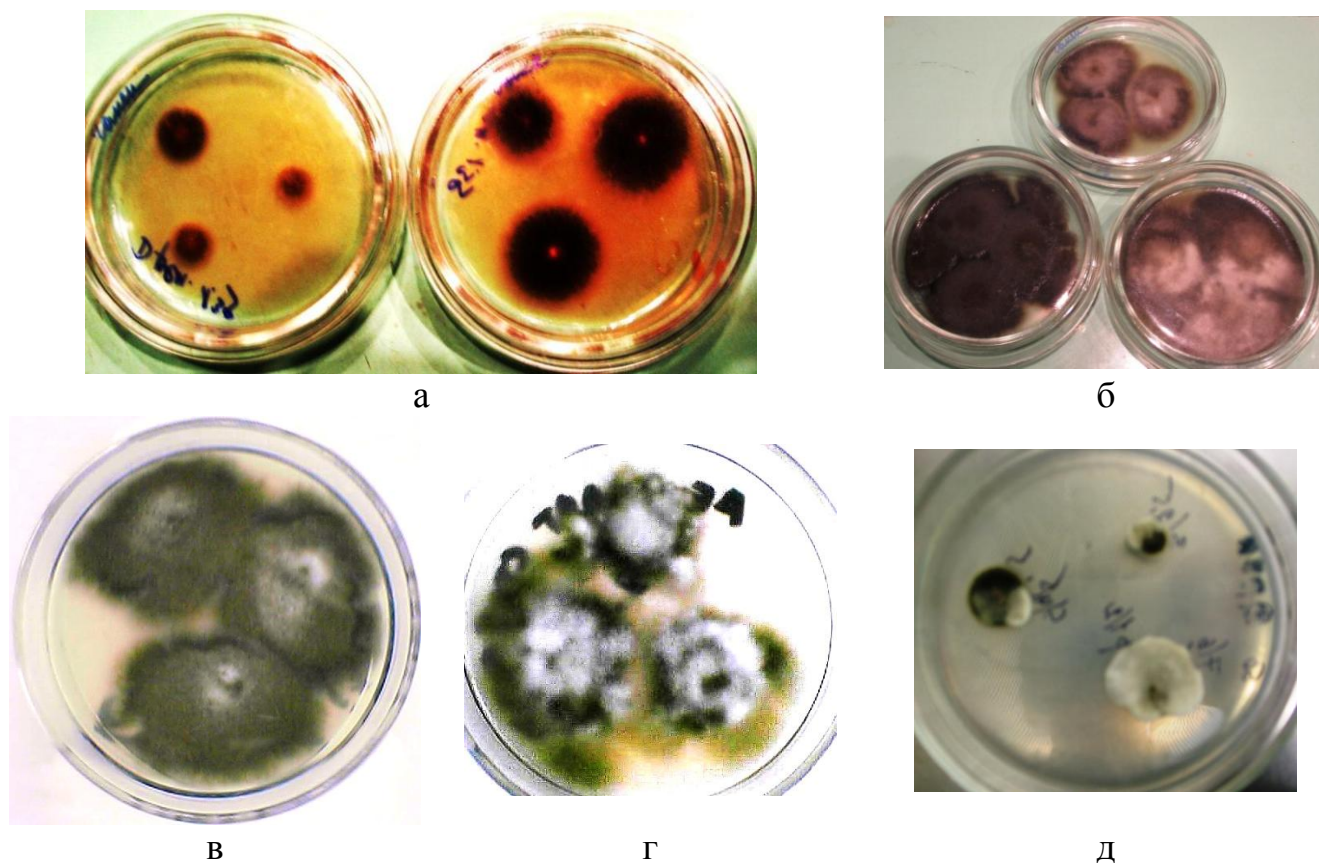
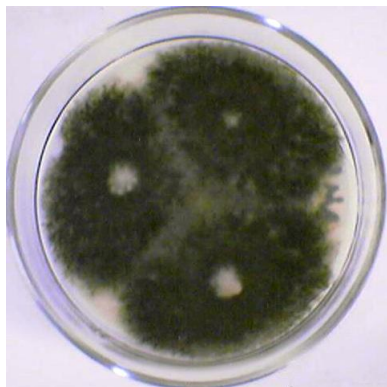


Рис. 3.1.1. Морфотипы штамма *B. papaveris* 1.39 на агаризованной среде Чапека: а – различающиеся по скорости роста; б – различной спородуктивности; в – многоспоровый морфотип; г – малоспоровый морфотип; д – соматические мутации многоспорового морфотипа.

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 этих морфотипов выявляется 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 (рисунки 3.1.2–5).



а



б



в



г

Рис. 3.1.2. Развитие многоспорового морфотипа штамма *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании: а – на агаре Чапека; б – на зерновых отходах мицелиального производства вешенки; на конверсионных отходах производства шиитакэ: в – изолят 1-го поколения; г – изолят 2-го поколения.



а



б

Рис. 3.1.3. Развитие малоспорового морфотипа штамма *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании: а – на конверсионных отходах производства шиитакэ (КШС); б – на мультиконверсионных отходах производства шиитакэ и вешенки (КШВС).

Развитие всех морфотипов *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании на конверсионных естественных субстратах происходит по быстрорастущему среднеспоровому морфотипу, что подтверждается сходством габитусов мицелия и спороношения (рисунки 3.1.2–5).



Рис. 3.1.4. Габитус мицелия и споронии много孢ного морфотипа штамма *B. paraveris* 1.39 (7-е сутки культивирования) при жидкофазной и твердофазной ферментации: а – на агаризованной среде Чапека, увеличение $\times 640$; на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): б – КШС, увеличение $\times 640$; в – на конверсионных отходах производства вешенки (КВС), увеличение $\times 640$; г – на соево-глюкозной среде, увеличение $\times 640$.



Рис. 3.1.5. Габитус мицелия и споронии мало孢ного морфотипа штамма *B. paraveris* 1.39 (7-е сутки культивирования) при жидкофазной и твердофазной ферментации: а – на агаризованной среде Чапека, увеличение $\times 1600$; на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): б – КШС, увеличение $\times 640$; в – КВС, увеличение $\times 640$; г – на соево-глюкозной среде, увеличение $\times 640$.

Развитие штамма *B. paraveris* 1.39 в глубинной культуре также наблюдали по среднеспоровому морфотипу (рисунки 3.1.4–5).

Полученный при жидкофазной и твердофазной ферментации инокулом испытывали на проростках мака для выявления различий в патогенности различных морфотипов, использованных при наработке лабораторных образцов. Прежде всего, подтвердили агрессивность морфотипов *B. paraveris* 1.39 после их жидкофазной

ферментации на соево-глюкозной среде и получения на основе этого инокулюма различных лабораторных образцов в виде: КЖ – культуральной жидкости, содержащей мицелий и конидии; ВБ – влажной биомассы, полученной после центрифугирования культуральной жидкости (3 000 об/мин.); СБ – биомассы гриба, высушенной при 37° С в течение 48 часов до воздушно-сухого состояния; ВБ+КМЦ – влажной биомассы, смешанной с карбоксиметилцеллюлозой (1:1); СБ+КМЦ – высушенной биомассы, смешанной с карбоксиметилцеллюлозой (1:1). Опрыскивание 3-х недельных проростков мака 1 % суспензиями вышеперечисленных лабораторных образцов биопрепарата с титрами $\times 10^6$ КОЕ/мл вызвало гибель 8–46 % проростков и снижение в 1,1–1,5 раза высоты и 1,5–3 раза веса надземной части растений мака (рисунок 3.1.6, таблица 3.1.1).



Рис. 3.1.6. Биологическая эффективность лабораторных образцов на основе штамма *B. paraveris* 1.39.

Гибель растений мака была максимальной после их обработки культуральной жидкостью гриба, а также 1 % суспензией высушенной биомассы штамма *B. paraveris* 1.39 (таблица 3.1.1). Никаких различий в габитусе культуры штамма исследованных морфотипов не выявлено, поскольку они развивались при получении жидкофазного инокулюма по одному морфотипу, лабораторные образцы были стандартизованы по титру ($\times 10^6$ КОЕ/мл).

Таблица 3.1.1

Биологическая эффективность лабораторных образцов
на основе штамма *B. papaveris* 1.39

Вариант опыта	Высота растения, см	Вес растения, г	Гибель растений, %
Контроль (без обработки)	30,8	3,3	8,3
КЖ	22,8	1,9	45,8
ВБ	26,3	1,9	8,3
СБ	23,0	1,2	41,7
ВБ+КМЦ	27,1	2,1	16,7
СБ+КМЦ	27,9	1,9	20,8
НСР _{0.5}	5,4	0,5	12,1

Примечание: КЖ – культуральная жидкость, содержащая мицелий и споры гриба; ВБ – влажная биомасса, полученная после центрифугирования культуральной жидкости (3 000 об/мин.); СБ – биомасса гриба, высушенная при 37° С в течение 48 часов до воздушно-сухого состояния; ВБ+КМЦ – влажная биомасса, смешанная с карбоксиметилцеллюлозой (1:1); СБ+КМЦ – высушенная биомасса, смешанная с карбоксиметилцеллюлозой (1:1).

Из пораженных растений мака реизолировали *B. papaveris* 1.39 на КСА, и культивировали изоляты 2-го поколения для завершения триады Коха при заражении ими целевых объектов. При твердофазном культивировании на агаре Чапека вновь получили описанные ранее морфотипы. Далее их выращивали в глубинной культуре для получения инокулюма с титром $\times 10^6$ КОЕ/мл, которым обрабатывали 3-х недельные проростки *P. somniferum*. Данные по завершению триады Коха представлены на рисунке 3.1.7. Биологическая эффективность составила 15,8–17,3 % для всех морфотипов, что связано с развитием по среднеспоровому морфотипу при жидкофазной ферментации и снижением агрессивности изолятов 2-го поколения при их пассировании через восприимчивое растение (рисунок 3.1.7).

При твердофазной ферментации на конверсионных субстратах все морфотипы развивались как быстрорастущий среднеспоровый. Средние скорости роста при твердофазном культивировании изолятов 1-го и 2-го поколений *B. papaveris* 1.39, выделенных из пораженных растений *P. somniferum*, имели весьма сходные значения, находящиеся в пределах ошибки измерений (рисунок 3.1.8).



а



б



в

Рис. 3.1.7. Биологическая эффективность лабораторных образцов, полученных жидкофазной ферментацией морфотипов изолятов 2-го поколения штамма *B. papaveris* 1.39 (слева): а – быстрорастущий многоспоровый; б – среднеспоровый; в – малоспоровый; справа – контроль (без обработки).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3.1.8, скорости роста изолятов 2-го поколения в 1.3 раза ниже, чем эти показатели у изолятов 1-го поколения, хотя эти различия не достоверны. На конверсионных субстратах изоляты 1-го поколения развивались лучше, чем на синтетической агаризованной среде Чапека, что объясняется большим количеством и разнообразием доступных органических веществ для их развития. Различия в скоростях роста штамма-продуцента на конверсионных субстратах незначительны (рисунок 3.1.8).

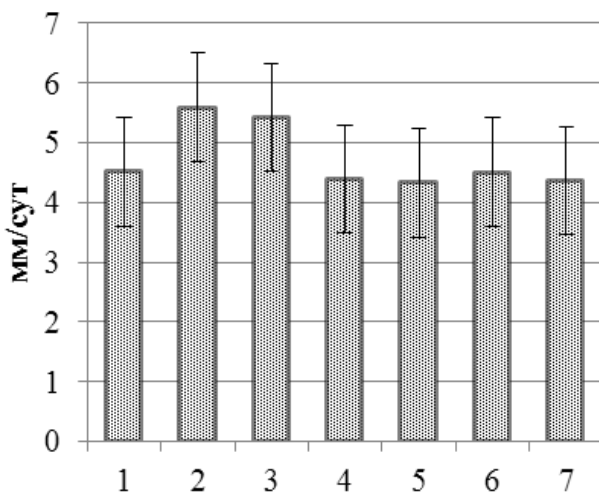


Рис. 3.1.8. Средние скорости роста при твердофазном культивировании изолятов 1-го и 2-го поколений *B. papaveris* 1.39, выделенных из пораженных растений *P. somniferum*: 1 – изолят 1-го поколения на агаризованной среде Чапека; 2 – изолят 1-го поколения на КВС; 3 – изолят 1-го поколения на КШС; 4 – изолят 2-го поколения из пораженного стебля мака на агаризованной среде Чапека; 5 – изолят 2-го поколения из пораженного листа мака на агаризованной среде Чапека; 6 – изолят 2-го поколения на КВС; 7 – изолят 2-го поколения на КШС.

Динамика скоростей роста изолятов 2-х поколений штамма *B. papaveris* 1.39 представлена на рисунке 3.1.9. Как видно из графиков, изоляты 2-го поколения характеризуются невысокими, но стабильными скоростями роста и более длительной лаг-фазой (рисунок 3.1.9).

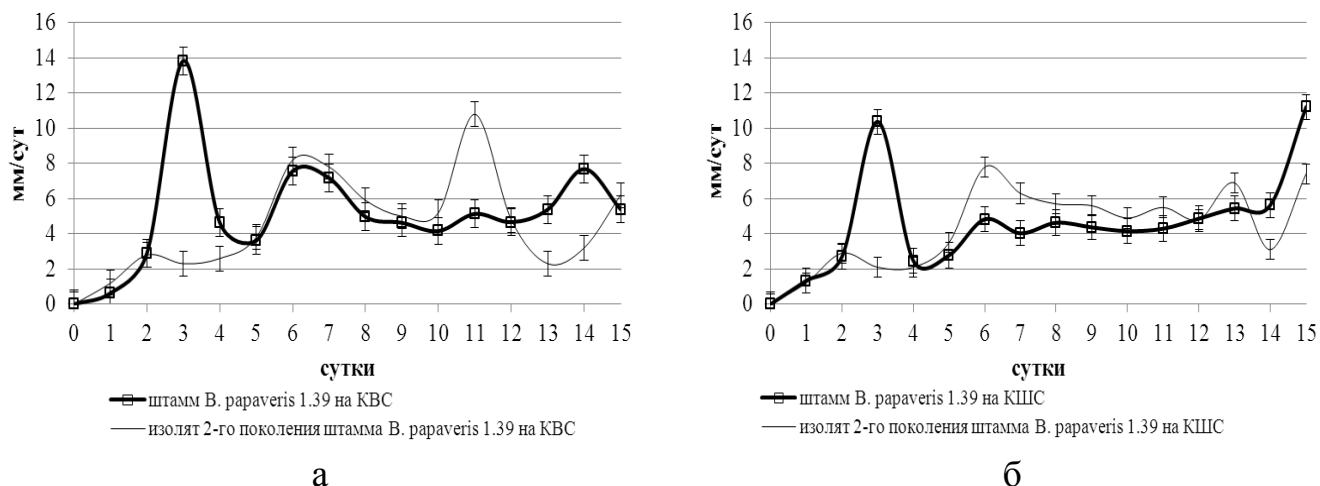


Рис. 3.1.9. Динамика скорости роста штамма *B. papaveris* 1.39 и его изолятов 2-го поколения на конверсионных субстратах: а – на КВС, б – на КШС.

Биологическая эффективность лабораторных образцов на основе изолятов 2-х поколений штамма *B. papaveris* 1.39, полученных твердофазной мультибиоконверсией отходов сельского хозяйства и промышленности, в отношении растений мака при посевсходовом внесении, представлена в таблицах 3.1.2–3 и рисунке 3.1.10.

Данные представленные на рисунке 3.1.10 свидетельствуют об отсутствии достоверных отличий в биологической эффективности различных морфотипов изолятов 2-х поколений штамма *B. papaveris* 1.39 – 80,3, 80,9, 78,8 %, соответственно (рисунок 3.1.10). Агрессивность изолятов 2-го поколения всех морфотипов несколько ниже исходного штамма *B. papaveris* 1.39 (рисунок 3.1.10).

Как видно из данных таблицы 3.1.2, агрессивность реизолированной культуры *B. papaveris* 1.39 практически не отличалась от исходного штамма. В течение периода наблюдений отмечено незначительное нарастание процесса отмирания угнетенных растений, и биологическая эффективность через 1,5 месяца после начала опыта составила 76,7–91,7 %.

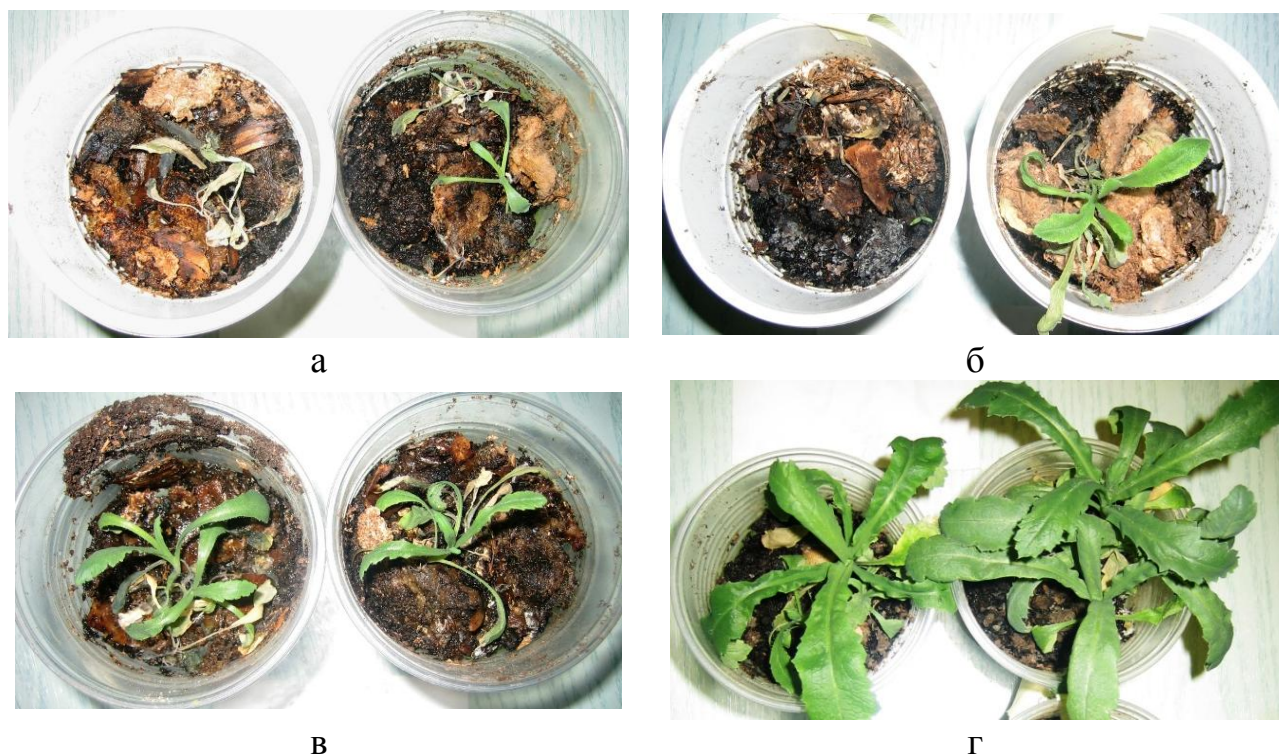


Рис. 3.1.10. Биологическая эффективность конверсионных лабораторных образцов на основе изолятов 1-го (слева) и 2-го (справа) поколений штамма *B. papaveris* 1.39: а – быстрорастущий многоспоровый морфотип; б – среднеспоровый морфотип; в – малоспоровый морфотип; г – контроль (без обработки).

Обеспечение высокой влажности воздуха не привело к существенной интенсификации развития микоза и увеличению гибели растений мака. Разница в этих вариантах опыта не превышала 5–8 %, и лишь в одном случае достигла 12 %.

Таблица 3.1.2
Сравнительная биологическая эффективность штамма *B. papaveris* 1.39 и его изолята 2-го поколения в отношении растений мака

Варианты опыта	Биологическая эффективность, %					
	Через 1 неделю		Через 3 недели		Через 6 недель	
	Гибель	Угнетение	Гибель	Угнетение	Гибель	Угнетение
Контроль без заражения	0	0	0	0	0	0
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39, 100 % влажность воздуха, стимуляция заражения	81,6	16,7	88,3	8,3	91,7	4,9
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39, без стимуляции заражения	73,4	21,7	80,0	13,4	83,3	6,7
Изолят 2-го поколения штамма <i>B. papaveris</i> 1.39, 100 % влажность воздуха. стимуляция заражения	69,9	23,4	78,3	8,4	81,7	3,4
Изолят 2-го поколения штамма <i>B. papaveris</i> 1.39, без стимуляции заражения	63,4	23,4	70,0	13,3	76,7	6,7

Данные по оценке влияния изолята 2-го поколения штамма *B. papaveris* 1.39 на биометрические показатели роста и развития растений мака представлены в таблице 3.1.3. Во всех вариантах отмечено значительное уменьшение биомассы (в 3,5–7 раз), высоты (в 2 раза), длины корня угнетенных растений (в 1,6–1,8 раза). Стимуляция заражения обеспечением высокой влажности воздуха не оказала существенного влияния на биометрические показатели роста и развития растений мака (таблица 3.1.3).

Таблица 3.1.3

Влияние изолята 2-го поколения штамма *B. papaveris* 1.39
на биометрические показатели роста и развития растений мака

Варианты опыта	Средняя высота растений, см	Средняя длина корня, см	Средняя сухая биомасса растений, г
Контроль без заражения	10,4	3,6	0,14
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39, 100 % влажность воздуха, стимуляция заражения	5,0	2,0	0,02
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39, без стимуляции заражения	5,1	2,3	0,03
Изолят 2-го поколения штамма <i>B. papaveris</i> 1.39, 100 % влажность воздуха. стимуляция заражения	5,0	2,1	0,03
Изолят 2-го поколения штамма <i>B. papaveris</i> 1.39, без стимуляции заражения	5,2	2,3	0,04
НСР _{0,5}	4,0	1,4	0,11

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что все морфотипы и изоляты 2-х поколений штамма *B. papaveris* 1.39 способны вызывать высокую гибель растений мака после применения в виде культуральной жидкости, влажной и высушенной биомассы, а также конверсионных лабораторных образцов, полученных мультибиоконверсией отходов сельского хозяйства и промышленности. Агрессивность штамма высока и достаточно стабильна, биологическая эффективность в лабораторных условиях достигала 80–90 % независимо от условий относительной влажности воздуха.

3.2. Моноспоровые изоляты штамма *B. papaveris* 1.39 и их патогенность

Для стабилизации штамма *B. papaveris* 1.39 и повышения агрессивности в отношении целевого растения было проведено выделение моноспоровых изолятов. Методом серийных разведений суспензии конидий на агаризованной питательной среде из исходного штамма и его реизолятов 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 мицелия и состоянии реверса колоний (таблица 3.2.1).

Наилучшие показатели в стабильности морфолого-культуральных признаков обнаружили моноспоровые изоляты под номерами 2, 6, 8, 10, 19 и 21 (таблица 3.2.1).

По стабильности комплекса морфолого-культуральных признаков, скорости роста и споропродуктивности были отобраны семь вышеперечисленных наиболее стабильных и продуктивных моноспоровых изолятов для наработки инокулюма на их основе, оценки патогенности и агрессивности на проростках мака (моноспоровые изоляты под номерами 1, 2, 6, 8, 10, 19 и 21). Все эти изоляты отнесены к быстрорастущим, по скорости роста практически не отличающимся от исходного штамма *B.papaveris*1.39 (таблица 3.2.2).

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
3	неровный	Клочковатая, опушенная, в центре темная зона	бесцветный	3
4	ровный	Клочковатая, опушенная	бесцветный	3
5	ровный	Клочковатая, опушенная	бесцветный	3
6	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная	Темный	3
7	ровный	Однородная, обильно-опушенная, иногда концентрические кольца светлого мицелия по краям и в центре колонии	бесцветный	3
8	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре обширное светлое пятно из воздушного мицелия	Темный	4
9	ровный	Неоднородная, по всей поверхности обширные плотные светлые пятна воздушного мицелия	бесцветный	3
10	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотная светлая зона, иногда концентрические кольца	равномерно Темный	3
11	неровный	Равномерно-клочковатая, слабо-опушенная	бесцветный	5
12	ровный	Клочковатая, опушенная	бесцветный	5
13	ровный	Клочковатая, опушенная	бесцветный	5
14	ровный	Равномерно-клочковатая, слабо-опушенная, в центре светлое пятно из воздушного мицелия	бесцветный	3
15	ровный	Неоднородная, клочковатая, обильно-опушенная полностью покрыта воздушным мицелием	бесцветный	5
16	неровный	Равномерно-клочковатая, слабо-опушенная	бесцветный	-
17	ровный	Равномерно-клочковатая, слабо-опушенная	бесцветный	3
18	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная	бесцветный	3
19	ровный	Клочковатая, опушенная, иногда с небольшим пятном светлого мицелия в центре	темный, иногда серый	3
20	неровный	Клочковатая, опушенная	бесцветный	5
21	ровный	Однородная, клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотный светлый мицелий	темный, иногда серый	3
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39	ровный	Клочковатая, обильно-опушенная, в центре плотный светлый мицелий	Темный	4

Таблица 3.2.2

Показатели I этапа селекции моноспоровых изолятов *B. papaveris* 1.39

№ изолята	Уровень стабильности морфолого-культуральных признаков*	Начало спороношения (сутки)	Средняя скорость роста, мм/сут	K _{пр} **
1	1	5	4,41	0,54
2	3	3	4,31	0,53
3	2	3	0,77	0,49
4	1	3	1,08	0,33
5	2	3	1,08	0,33
6	3	3	4,68	0,33
7	1	3	0,58	0,15
8	4	4	6,14	0,47
9	1	3	1,02	0,39
10	1	3	4,58	0,62
11	2	5	0,54	0,72
12	3	5	0,63	0,87
13	3	5	1,02	0,77
14	1	3	1,17	0,86
15	1	5	0,88	0,51
16	1	6	0,71	0,78
17	1	3	0,63	0,64
18	2	3	1,33	0,71
19	4	3	3,85	0,72
20	1	5	0,54	0,72
21	3	3	4,12	0,88
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39	2	3	6,11	0,72

Примечание. *Уровни стабильности морфолого-культуральных признаков: 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. **K_{пр} – коэффициент продуктивности колонии.

Споропродуктивность полученных моноспоровых изолятов сравнима со споропродуктивностью исходного штамма, а у изолятов под номерами 2 и 19 превышает этот показатель у *B. papaveris* 1.39 (таблица 3.2.3).

Таблица 3.2.3

Титры конидиальных суспензий моноспоровых изолятов штамма *B. papaveris* 1.39

№ изолята	Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39	21	10	2	1	8	19	6
Титр конидий, КОЕ/мл	2,0×10⁶	1,1×10 ⁶	1,8×10 ⁶	4,0×10⁶	3,2×10 ⁶	2,0×10⁶	2,9×10⁶	1,8×10 ⁶

Патогенность отобранных моноспоровых изолятов *B. papaveris* 1.39 (под номерами 1, 2, 6, 8, 10, 19 и 21) оценивали в вегетационных опытах в виде конидиальных суспензий, полученных смывом с агаризованной среды Чапека. Динамика гибели проростков мака в контроле и под воздействием моноспоровых изолятов исходного штамма *B. papaveris* 1.39 представлена на рисунках 3.2.1–8.

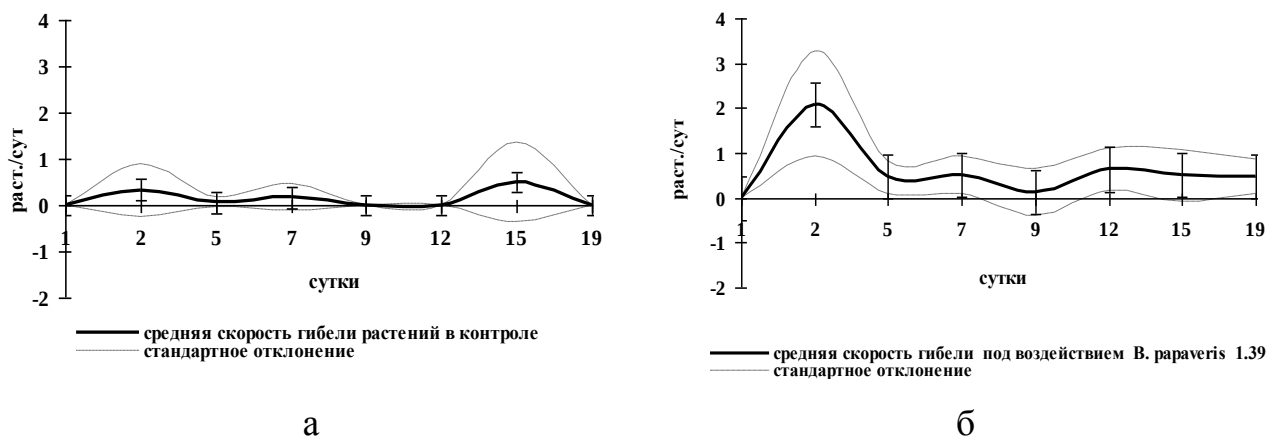
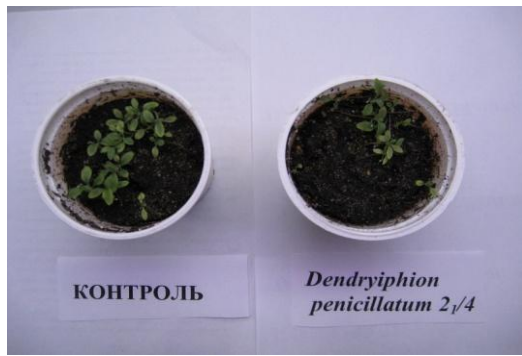


Рис. 3.2.1. Динамика гибели растений мака: а – в контроле от естественных причин; б – после обработки конидиальной суспензией исходного штамма *B. papaveris* 1.39 (вегетационные опыты).

Средняя скорость гибели растений мака в контроле от естественных физиологических причин достигала своего максимума к 15 суткам. Даже в этот период она не превышала одного растения в сутки. Похожие значения средней скорости гибели показывали старение и естественную убыль растений к концу вегетационного опыта. В других вариантах у растений мака наблюдали общую угнетенность, отставание в росте, различия в габитусе по сравнению с контрольными растениями. Общая ассимиляционная поверхность листьев во всех вариантах опыта была меньше, чем в контроле (рисунки 3.2.1–8).

Средняя скорость гибели растений мака под воздействием всех семи отобранных моноспоровых изолятов исходного штамма-продуцента микогербицида *B. papaveris* 1.39 достигала максимума уже на 2 сутки, что может свидетельствовать о токсическом эффекте в патогенезе основного штамма-продуцента и моноспоровых изолятов (рисунки 3.2.1–8).



а



Б



В

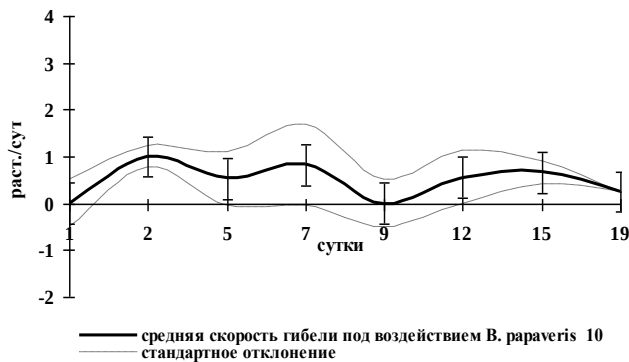
Рис. 3.2.2. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята 2 штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).



а



Б



В

Рис. 3.2.3. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята 10 штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).

Воздействие моноспоровых изолятов **1**, **6** и **10** практически не меняло габитуса выживших проростков мака, а количество хлорозов от токсического действия этих изолятов был минимальным, хотя по достаточно высоким интегральным значениям кривой гибели инокулированных проростков изолят **6** был близок к высокотоксичным изолятам **8**, **19** и **21** (рисунки 3.2.3, 4, 5). Выжившие 3-х недельные проростки развивались под его воздействием хуже, чем под воздействием изолятов **1**, **2** и **10** (рисунки 3.2.2–5).

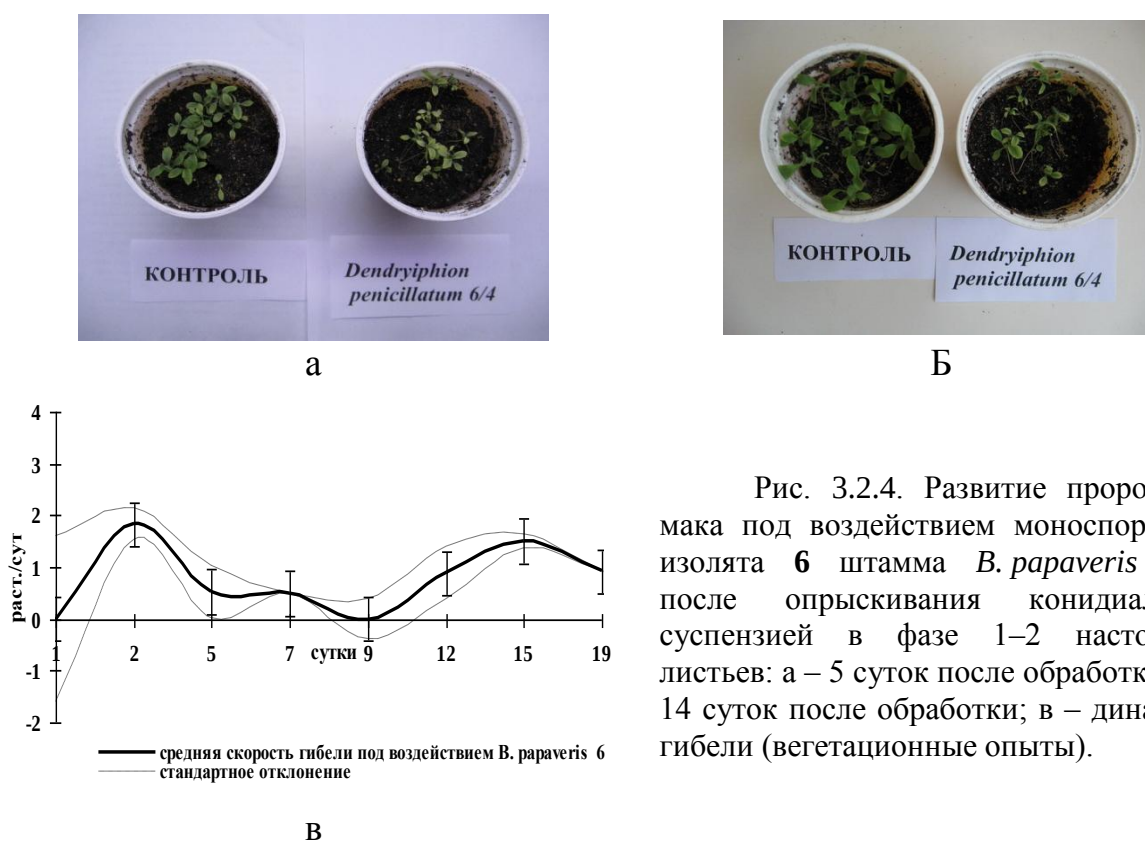


Рис. 3.2.4. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята **6** штамма *B. papaveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели (вегетационные опыты).

Как видно из рисунков, изоляты **8** и **1** проявляют наивысшую агрессивность и фитотоксичность (рисунки 3.2.5, 7).

Воздействие изолята **19** выражалось в высокой стабильной скорости гибели проростков мака в течение опыта, начиная со вторых суток после опрыскивания растений (рисунки 3.2.6).



а



б



в

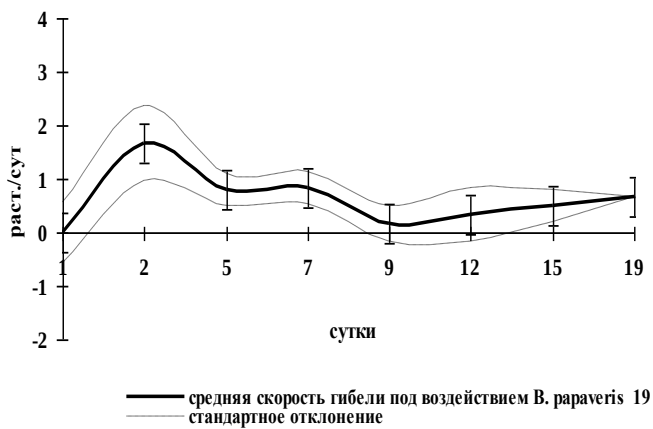
Рис. 3.2.5. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята **1** штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).



а

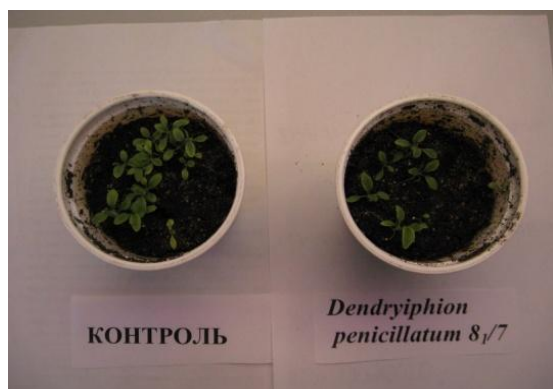


б



в

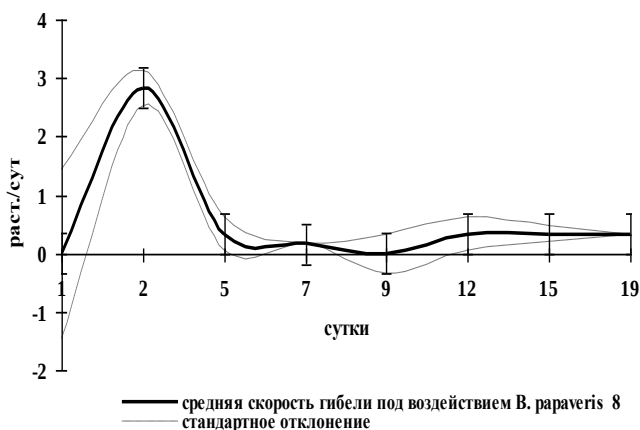
Рис. 3.2.6. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята **19** штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).



а



б



в

Рис. 3.2.7. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята **8** штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).



а



б



в

Рис. 3.2.8. Развитие проростков мака под воздействием моноспорового изолята **21** штамма *B. paraveris* 1.39 после опрыскивания конидиальной суспензией в фазе 1–2 настоящих листьев: а – 5 суток после обработки; б – 14 суток после обработки; в – динамика гибели мака (вегетационные опыты).

Развития 3-х недельных проростков мака под воздействием моноспоровых изолятов **19, 8, 2 и 21** исходного штамма *B. papaveris* 1.39 после опрыскивания в фазе 1-2 настоящих листьев практически не наблюдалось. На ослабленных выживших растениях мака было больше хлоротичных участков, в большинстве случаев хлорозами было занято более 50 % листовых пластинок (рисунки 3.2.2, 6–8).

При ликвидации опыта учитывали следующие показатели: высота, вес растений; площадь листовой поверхности; площадь поражения хлорозами каждого листа и растения в целом. Для характеристики вредоносности поражения, вызванного воздействием моноспоровых изолятов, учитывали распространенность и развитие болезни (таблица 3.2.4).

Как видно из таблицы 3.2.4, все отобранные продуктивные моноспоровые изоляты исходного 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 %. Потери в ассимиляционной поверхности листьев были выше под воздействием каждого из семи отобранных моноспоровых изолятов, чем под воздействием исходного штамма *B. papaveris* 1.39. Моноспоровые изоляты **1 и 21** по большинству показателей эффективности наиболее близки к исходному штамму-продуценту.

Биологическую эффективность оценивали по количеству погибших проростков и растений мака и представляли как % выпадов растений в результате их гибели в вариантах опытов (таблица. 3.2.4). Показана высокая биологическая эффективность двух моноспоровых изолятов штамма *B. papaveris* 1.39 – **8 и 19** – на 3-х недельных проростках мака. Охарактеризована динамика увядания и гибели растений, достигающая 90,2 и 88,3 % для каждого из изолятов, соответственно (табллица 3.2.4).

Сравнение показателей, оцененных для характеристики воздействия исходного штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и семи отобранных моноспоровых изолятов, позволило охарактеризовать уровень вредоносности каждого из изолятов, а также выявить наиболее перспективные для дальнейших исследований и разработки новых препаративных форм для биоконтроля мака. Из данных,

представленных в таблице 3.2.4 видно, что вредоносность моноспоровых изолятов **8** и **19** по большинству показателей превышает вредоносность исходного штамма *B. papaveris* 1.39.

Таблица 3.2.4

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

Варианты опыта различные моноспоровые изоляты <i>B. papaveris</i> 1.39	Потери, в ...%			Распростра- ненность болезни, %	Развитие болезни, %	Гибель растений, %
	высо- те	ярусах	ассимиля- ционной поверхности листьев			
Штамм <i>B. papaveris</i> 1.39	<u>10,3</u>	<u>11,6</u>	<u>12,4</u>	<u>61,3</u>	<u>28,2</u>	<u>75,5</u>
8	99,5	7,4	99,1	59,7	23,6	90,2
19	28,4	18,5	14,0	34,3	14,6	88,3
10	13,6	7,4	15,5	78,2	36,6	72,6
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
1	1,5	7,4	16,9	56,3	34,9	74,6
21	20,2	7,4	19,5	81,1	38,7	70,7
Контроль (без обработки)	0	0	0	0	0	9,8
НСР _{0.5}	22,4	20,8	26,7	21,5	20,0	16,8
НСР _{0.5} %	100	100	100	74,3	69,8	99,9

Для II этапа селекции на целевую биологическую эффективность были отобраны моноспоровые изоляты под номерами **8** и **19**. В серии вегетационных опытов по реизоляции патогенов и подтверждению триады Коха для моноспоровых изолятов *B. papaveris* 1.39 были получены изоляты 2-го поколения **8** и **19** (рисунок 3.2.9).

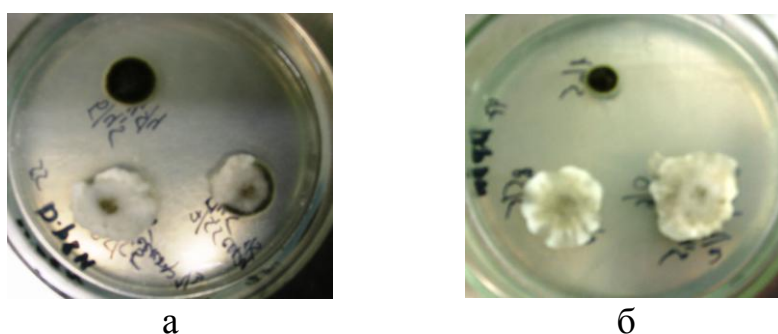


Рис. 3.2.9. Морфотипы моноспоровых изолятов штамма *B. papaveris* 1.39 на агаризованной среде Чапека (5-е сутки культивирования): а – изолят 8, 2-е поколение; б – изолят 19, 2-е поколение.

Изоляты **8** и **19** 2-х поколений выявили наличие следующих морфотипов: быстрорастущих многоспорового, среднеспорового и малоспорового. Как и в случае

исходного штамма *B. papaveris* 1.39, последние выявлены лишь при твердофазном культивировании на синтетической агаризованной среде Чапека. Лишь на этой питательной среде наблюдали выщепление малоспорового морфотипа в виде секторов колоний много- и среднеспоровых морфотипов (рисунок 3.2.9).

Завершением триады Коха для моноспоровых изолятов **8** и **19** исходного штамма *B. papaveris* 1.39 выявили их патогенность для проростков мака: изоляты 2-го поколения не уступали в агрессивности исходному штамму-продуценту. Эффективность применения изолятов 2-го поколения **8** и **19** достигала 75–79 % (рисунки 3.2.10–11).



а

б

в

Рис. 3.2.10. Биологическая эффективность воздействия изолятов **19** штамма *B. papaveris* 1.39 2-х поколений после опрыскивания конидиальной суспензией проростков мака в фазе 2–3 настоящих листьев (25 суток – вегетационный опыт): а – контроль без обработки (слева), изоляты 19 1-го поколения (справа); б – изоляты 19 1-го поколения (слева), изоляты 19 2-го поколения (справа); в – исходный штамм *B. papaveris* 1.39 (слева), изоляты 19 2-го поколения (справа).

Существенных различий в агрессивности между изолятами **19** 1-го и 2-го поколений не выявлено (рис. 3.2.10). Фитотоксичность, выражающаяся в развитии хлорозов листового аппарата целевых растений, была практически на одном уровне у изолятов 1-го и 2-го поколений и значительно выше у изолятов 2-х поколений по сравнению с фитотоксичностью исходного штамма *B. papaveris* 1.39 (рисунок 3.2.10).



а

б

в

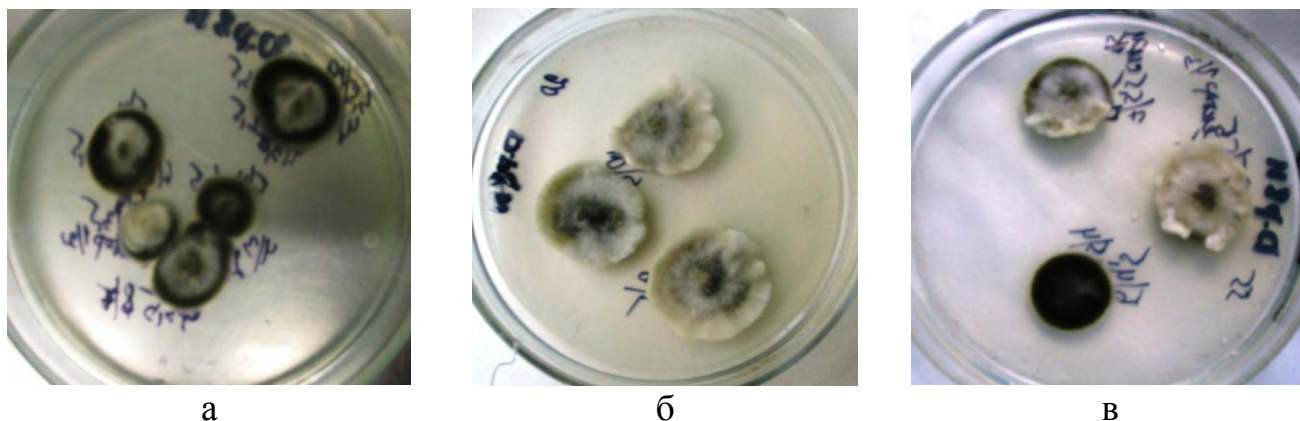
Рис. 3.2.11. Биологическая эффективность по сравнению с контролем без обработки (слева) воздействия изолятов **8** штамма *B. papaveris* 1.39 2-х поколений после опрыскивания конидиальной суспензией проростков мака в фазе 2–3 настоящих листьев (25 суток – вегетационный опыт): а – исходный штамм *B. papaveris* 1.39 (справа); б – изоляты **8** 1-го поколения (справа); в – изоляты **8** 2-го поколения (справа).

Изоляты **8** штамма *B. papaveris* 1.39 2-х поколений более эффективно подавляли растения мака, вызывая их гибель, после применения в фазе 2–3 настоящих листьев, чем изоляты **19** штамма *B. papaveris* 1.39 2-х поколений (рисунок 3.2.11). Биологическая эффективность применения изолята **8** 1-го поколения значительно была выше эффективности применения изолята **8** 2-го поколения – 90,2 и 79,3 %, соответственно (таблица 3.2.4; рисунок 3.2.11).

На основе анализа полученных результатов опытов для дальнейшей работы был отобран наиболее морфологически стабильный, агрессивный, вредоносный и технологичный изолят **8** 1-го поколения. В дальнейшей работе этот штамм-продуцент получил маркировку *B. papaveris* 1.39-8.

3.3. Морфотипы отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 и их патогенность

Как и в случае исходного родительского штамма *B. papaveris* 1.39, при исследовании морфологических и культуральных особенностей отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 выявлено несколько морфотипов, отличающихся интенсивностью споруляции при твердофазном культивировании на синтетической агаризованной среде Чапека (рисунок 3.3.1). Полученные морфотипы охарактеризованы как многоспоровый, среднеспоровый, и малоспоровый



а

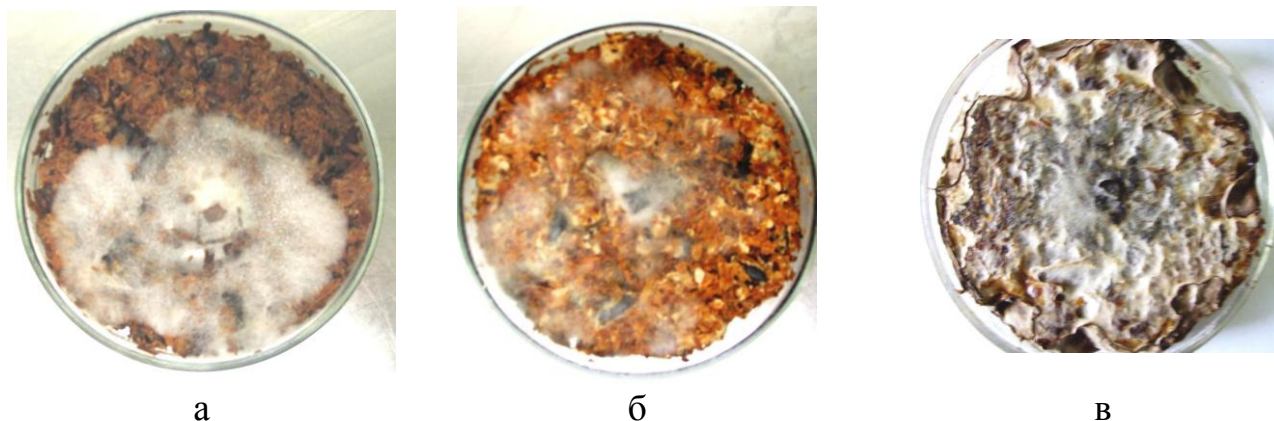
б

в

Рис. 3.3.1. Морфотипы отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 на агаре Чапека (5-е сутки культивирования): а – среднеспоровый; б – малоспоровый; в – многоспоровый и соматические мутации среднеспорового.

При пересевах наблюдалось выщепление стерильных секторов в колониях среднеспоровых морфотипов, изменение скоростей роста в сторону их уменьшения. Каждый из выявленных морфотипов был способен расти по иному типу (рисунок 3.3.1).

При твердофазном и глубинном культивировании на искусственных и естественных питательных субстратах получали развитие только среднеспорового морфотипа (рисунки 3.3.2, 3.3.5).



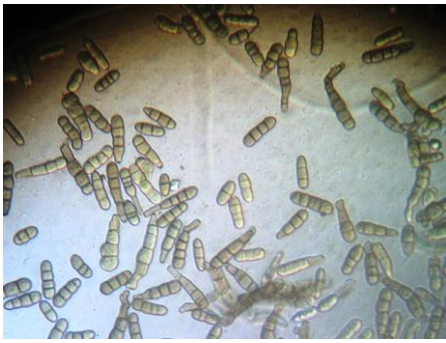
а

б

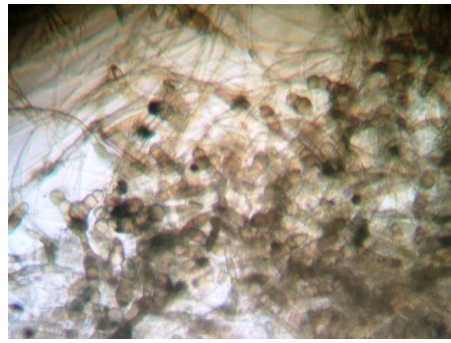
в

Рис. 3.3.2. Развитие морфотипов штамма *B. papaveris* 1.39-8 при твердофазном культивировании на конверсионных отходах: а – малоспорового на КСШ; б – малоспорового на КШВС; в – многоспорового на КСШ.

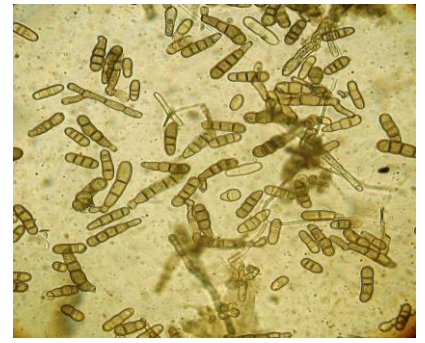
Истинность морфотипов штамма *B. papaveris* 1.39-8 доказывали идентичностью габитусов мицелия и спороношения при жидкофазной на соево-глюкозной среде и твердофазной ферментациях на агаризованной среде Чапека и конверсионных субстратах различного состава (рисунки 3.3.2–5).



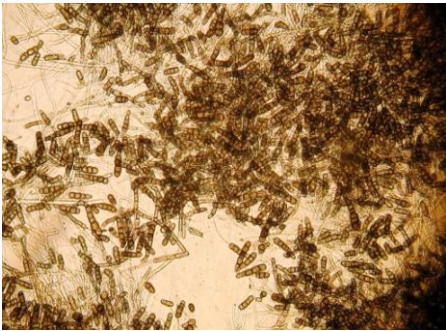
а



б



в



г

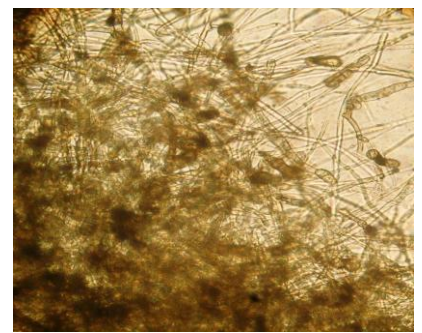
Рис. 3.3.3. Габитус мицелия и спороношения многоспорового морфотипа штамма *B. papaveris* 1.39-8 (7-е сутки культивирования) при жидкофазной и твердофазной ферментации: а – на соево-глюкозной среде, увеличение $\times 640$; б – на агаризованной среде Чапека, увеличение $\times 640$; на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): в – КШС, увеличение $\times 640$; г – КВС, увеличение $\times 320$.



а



б



в



г

Рис. 3.3.4. Габитус мицелия и спороношения малоспорового морфотипа 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 агаризованной среде Чапека, увеличение $\times 1600$; на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): в – КШС, увеличение $\times 640$; г – КВС, увеличение $\times 640$.



Рис. 3.3.5. Габитус мицелия и спороношения среднеспорового морфотипа штамма *B. papaveris* 1.39-8 (7-е сутки культивирования) при жидкофазной ферментации на соево-глюкозной среде, увеличение $\times 640$.

Наработанный методами жидкофазной и твердофазной ферментации инокулюм испытывали на проростках мака для выявления различий в патогенности морфотипов, использованных в наработке лабораторных образцов. Для подбора эффективной инфекционной дозы и оценки биологической активности лабораторных образцов на основе отселектированного штамма гриба *B. papaveris* 1.39-8 против растений мака была проведена серия модельных лабораторных опытов. Проростки мака в фазе семядолей опрыскивали водными суспензиями микромицета. Для более длительного сохранения на листьях к жидкому образцу добавляли прилипатель Силиплант в концентрации 0,1 %. В контроле растения обрабатывали водой. Гранулированный лабораторный образец на основе конверсионного субстрата после культивирования ши-и-таке (КШС) вносили в почву под проростки мака в фазе 1–2-х настоящих листьев (на 7 суток позже, чем в вариантах с использованием жидкого лабораторного образца). Симптомы поражения целевых растений и активность лабораторных образцов представлены на рисунке 3.3.6.



а



б



в

Рис. 3.3.6. Воздействие на проростки мака различных лабораторных образцов на основе *B. papaveris* 1.39-8 (обработка в фазе семядолей, 25 суток опыта; контроль – справа): а – жидкого; б – жидкого лабораторного образца + Силиплант 0,1 %; в – гранулированного лабораторного образца.

Влияние проведенных обработок оценивали по биометрическим показателям роста и развития выживших растений мака во всех вариантах опытов. Данные по оценке эффективности различных лабораторных образцов на основе *B. papaveris* 1.39-8 представлены в таблицах 3.3.1–2.

Таблица 3.3.1

Влияние лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 на проростки и растения мака (вегетационный опыт)

Варианты опыта	Потери в..., %				
	высоте	биомассе	длине корня	листовых ярусах	ассимиляционной поверхности листьев
Контроль без обработки	0	0	0	0	0
жидкий лабораторный образец*	54,4	62,8	19,2	37,5	74,5
жидкий лабораторный образец + Силиплант 0,1 %*	13,1	0	20,5	21,4	0
гранулированный лабораторный образец**	56,5	63,2	18,7	49,2	56,7
НСР 0.5	28,8	41,4	17,3	22,1	36,2
НСР 0.5%	74,3	73,6	78,9	71,3	76,5

Примечание: * – обработку проводили в фазе семядолей, ** – обработку проводили в фазе 2–3-х настоящих листьев.

Как видно из представленных на рисунке 3.3.6 и в таблице 3.3.1 данных, состояние выживших растений мака после обработок жидким лабораторным образцом к окончанию опыта характеризовалось максимальными потерями ассимиляционной поверхности листьев (74,5 %) и 60 %-ми потерями биомассы, по сравнению с контролем. Потери в длине корня достигли 20 %, в листовых ярусах – 49 %, отставание в росте было более 50 % по сравнению с контролем (рис. 3.3.6; табл. 3.3.1). После внесения гранулированного лабораторного образца под растения в фазе 2–3-х настоящих листьев штамм-продуцент развивался в почве и активно синтезировал активный комплекс веществ, воздействующих на проростки и вызывающие их гибель. Потери в биомассе, высоте растений и ярусах листьев составили 63,2 %; 56,5 %; 49,2 %, соответственно. Накопление метаболитов в почве приводило к увеличению количества погибших растений на 6–12-е сутки после применения в фазе 2–3-х настоящих листьев гранулированного лабораторного образца (рис. 3.3.6). Габитус выживших проростков сильно отличался от контроля:

фаза развития проростков в контроле соответствовала развитию 6–8-и настоящих листьев (рис. 3.3.6).

На 3-и сутки после обработки проростков мака жидким лабораторным образцом на основе отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 около четверти всех обработанных растений (24,1 %) несли симптомы поражения, погибли 28,1 % проростков. Со временем увеличивалось количество выпадов: растения с симптомами поражения постепенно погибали, через 3 недели после обработки распространенность микоза выживших растений составила 66,7 %, развитие – 21,8 %. Гибель растений в доле от их общего начального количества в опыте составила 33,3 % (табл. 3.3.2).

Таблица 3.3.2

Биологическая эффективность лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 на проростках и растениях мака (вегетационный опыт)

Варианты опыта	Титр, КОЕ/мл	Гибель растений, %	Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %
Контроль без обработки	-	0	0	0
жидкий лабораторный образец*	10 ⁶	33,3	66,7	21,8
жидкий лабораторный образец + Силиплант 0.1 %*	10 ⁶	30,9	26,8	10,8
гранулированный лабораторный образец**	10 ⁶	21,4	23,8	12,1
НСП 0.5		17,3	12,8	8,1
НСП 0.5 %		61,2	60,1	60,1

Примечание: * – обработку проводили в фазе семядолей, ** – обработку проводили в фазе 2–3-х настоящих листьев.

Гранулированный лабораторный образец вносили в почву под проростки мака в фазе 2–3-х настоящих листьев, т.е. позже жидкого лабораторного образца более чем на 7 суток. Но и в этом случае обработка была эффективной: через 2 недели после обработки в фазе 7–10 настоящих листьев распространенность поражения выживших растений составляла 23,8 %, развитие – 12,1 %. Гибель растений мака достигла 21,4 % (таблица 3.3.2). Можно предположить, что усиление биологической эффективности связано с периодами интенсивного синтеза токсинов штаммом-продуцентом в процессе его развития.

Добавление прилипателя Силиплант 0.1 % к жидкому лабораторному образцу на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 снижало его воздействие на развитие

наземных органов растений мака: потерь в биомассе и ассимилирующей поверхности листьев выживших растений не выявлено; распространенность и развитие поражения выживших проростков мака составили 26,8 % и 10,8 %, соответственно. Количество погибших растений достигло 30,9 %, но добавление прилипателя снижало проявление поражения проростков, позволяя им оправиться от токсического шока и продолжать развитие (рисунок 3.3.6; таблица 3.3.1–2).

3.4. Особенности комплекса активных эндометаболитов мицелия штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8

Антагонистическая и фитотоксическая активность штаммов микроорганизмов, обеспечивающие им конкурентоспособность, обуславливаются синтезом в качестве вторичных метаболитов биологически активных веществ (БАВ) различной природы, а также их воздействием на восприимчивые организмы (Osbourn, 1996; Карпунина и др., 2003). Поскольку продукты вторичного метаболизма не являются необходимыми для вегетативного роста культуры, они выделяются в окружающую среду как экзометаболиты или сохраняются в талломе в качестве эндометаболитов (Кузнецов, 1972; Новикова, 2005; Коломбет, 2006; Kozlovsky, 2007; Thrane, 2007). Их многообразие обусловлено низкой субстратной специфичностью ферментов вторичного метаболизма и получением с помощью одного фермента нескольких промежуточных или конечных продуктов в зависимости от доступных источников питания (Беккер, 1963; Штарк и др., 2003).

Воздействие вторичных метаболитов на восприимчивые организмы происходит на молекулярном уровне, обуславливая изменения их жизнедеятельности на клеточном, организменном и популяционном уровнях (Backhouse et al., 1989; Horionuchi et al., 1994; Карпунина и др., 1997, 2003; Hong et al., 1999). Вторичный метаболизм можно использовать в разработке микробиологических систем контроля вредных объектов, в том числе, нежелательной растительности, а также для создания биопрепаратов на основе метаболитных комплексов штаммов микроорганизмов разного спектра действия (Тулемисова, 1990; Тулемисова и др., 1990; Новикова, 2005; Коломбет, 2006; Новикова и др., 2006). К нежелательной растительности относятся и

наркотикосодержащие растения, среди которых наиболее значимым является мак снотворный.

Образование некрозов на листьях и стеблях растений мака обусловлено токсинами патогенного микромицета, поступающими в клетки хозяина. У растительных клеток нарушается полупроницаемость пограничных слоев, что приводит к потере влагоудерживающей способности плазмы и далее к нарушению водного баланса растения и увяданию (Миско, 1973; Bailey et al., 2000, 2004). До сих пор выделения активных компонентов метаболома агрессивных штаммов *B. papaveris* не проводилось, и природа токсинов не изучалась (O'Neill et al., 2000; Патент..., 2010). Нами впервые проведено выделение эндометаболитов мицелия штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при глубинном и твердофазном культивировании на отходах техногенной сферы, первично конвертированных съедобными макромицетами; выявлены активные фракции комплекса эндометаболитов и проведена их первичная идентификация. При выделении эндометаболитов предварительно провели экспресс-оценку фитотоксичности для проростков огурца растворителей в разной концентрации и суммарных экстрактов биомассы микромицета. Как следует из данных таблицы 3.4.1., метанол оказывал угнетающее действие на проростки огурца только без разведения в 100%-й концентрации. При нанесении суммарного метанольного экстракта биомассы гриба на фильтр и последующем выпаривании растворителя угнетающего действия не было отмечено. Бутанол был нетоксичен только в 1%-й концентрации при короткой экспозиции его воздействия на семена огурца до появления проростков. При увеличении времени воздействия фитотоксичность 1%-го бутанола и экстрактов биомассы мицелия 1%-м бутанолом возрастала (таблицы 3.4.1).

При хроматографировании осадка экстракта субстратного мицелия, полученного этанольной экстракцией проросшего мицелием субстрата, было выявлено 6 хроматографических фракций: $R_f = 0.1, 0.2, 0.35, 0.6, 0.8, 0.9$. Для выявления активных компонентов каждую фракцию снимали с пластинки метанолом, а 2%-й метанольный раствор оценивали на фитотоксическую активность.

Фитотоксичность растворителей и экстрактов биомассы *B. papaveris* 1.39
для проростков огурца

Варианты опыта	Время экспозиции, ч	Потери всхожести, % от контроля	Потери в энергии прорастания, % от контроля
Контроль (вода)	0,5	—	—
	3	—	—
	5	—	—
Метанол, 1%	0,5	0	15,8
	3	0	34,4
	5	0	0
Метанол, 5%	0,5	0	0
Метанол, 10%	0,5	0	0
	3	0	47,5
	5	0	0
Метанол, 100%	0,5	100	100
Бутанол, 1%	0,5	0	0
	3	0	50,8
	5	33,3	36,5
Бутанол, 100%, фильтр	0,5	11,1	95,6
	3	12,5	96,7
Экстракт биомассы с 1%-м метанолом	0,5	0	0
	3	0	0
	5	0	0
Экстракт биомассы с 1%-м бутанолом	0,5	0	0
	3	0	0
	5	11,1	46,2
Экстракт биомассы со 100%-м метанолом (фильтр)	0,5	0	0
Экстракт биомассы со 100%-м бутанолом (фильтр)	0,5	11.1	98,3

Было получено 2,3 г порошка желтого цвета. Выделенный порошок был тщательно экстрагирован дважды 150 мл гексана и дважды 100 мл ацетона. ТСХ в системе н-бутанол–уксусная кислота–вода (3 : 1 : 1) показала, что в гексан и ацетон переходит, главным образом, вещество с $R_f = 0.85–0.9$, а в следовых количествах остаются компоненты с $R_f = 0.6$ и 0.8 (после экстракции вещества гексаном и ацетоном), которые не проявляли фитотоксичности. После удаления гексана и ацетона выделенный продукт для очистки растворили в 3 мл ацетона и внесли в колонку, наполненную молселектом (диаметр – 1.5 см, высота слоя – 10 см), предварительно набухшего в течение 12 ч в системе метанол–хлороформ–вода

(2 : 1 : 2). Вещество с сорбента элюировали ацетоном. Хроматографические фракции анализировали методом ТСХ в системе н-бутанол–уксусная кислота–вода (3 : 1 : 1). Фракции, содержащие вещество с $R_f = 0.9$, объединяли и выпаривали досуха на ротаторном испарителе при температуре 45–50° С. В результате получили 0,15 г хроматографически чистого вещества. Оценка фитотоксичности показала, что угнетение прорастания семян мака и огурца, а также дальнейшего развития проростков наблюдалось только после их замачивания в экстрактах фракции $R_f = 0.85–0.9$ (таблица 3.4.2). Остальные соединения не проявили фитотоксичности.

Таблица 3.4.2

Фитотоксичность активной хроматографической фракции метаболитного комплекса *B. papaveris* 1.39 для проростков мака и огурца (4-часовая экспозиция семян)

Варианты опыта	Потери всхожести, % от контроля		Потери в энергии прорастания, % от контроля
	мак	огурец	мак
Контроль (вода)	–	–	–
Смыв с мицелия (фильтр)	0	0	23.2
1%-й метанольный экстракт фракции	30	0	100
10%-й метанольный экстракт фракции	100	100	100
1%-й бутанольный экстракт фракции	66	0	56.5
10%-й бутанольный экстракт фракции	22	30	0

Примечание: характеристика хроматографической подвижности активной фракции $R_f = 0.85–0.90$.

Изучение физико-химических и биологических свойств фракции в области $R_f = 0.85–0.9$ выявило ряд особенностей выделенного эндометаболита. Вещества этой фракции ($R_f = 0.85–0.9$) имели интенсивную зеленую флюоресценцию в УФ-свете. Выделенный продукт был индикатором: в нейтральной и кислой средах имел желтый цвет, в щелочной – розовый. В нейтральной и кислой средах в УФ-спектре имел сильное поглощение в области 210–230 нм и максимум поглощения при 285 и 375 нм, в щелочной среде – максимумы поглощения при 268–270, 285–290 и 440 нм. Вещество хорошо растворимо в гексане, ацетоне, этилацетате; умерено растворимо в низших спиртах; нерастворимо в воде. Соединение слабо активно в отношении *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*, несколько более активно в отношении *A. flavus*.

На основании совокупности имеющихся физико-химических и биологических данных выделенное вещество отнесено к бензохинонам (Дженкинс и др., 1949;

Вредные., 1954; Thomson, 1971). Полученный эндотоксин использовали в качестве контроля при ТСХ гексановых экстрактов глубинного и субстратного мицелия штамма *B. papaveris* 1.39, его моноспоровых изолятов, реизолятов двух поколений. Во всех случаях наблюдали на хроматограммах наличие одного основного пятна ($R_f = 0.85-0.9$) с максимумом поглощения в области 272–278 нм, идентичного бензохинону. Антагонистическая активность наблюдалась только у гексановых экстрактов. При растворении маслянистого продукта первичной экстракции в 50 %-м этаноле антагонистической активности не наблюдалось.

Антагонистическая активность 10-ти суточной культуры субстратного мицелия представлена на рисунке 3.4.1. После 10 суток культивирования изолята 8 2-го поколения экстракты субстратного мицелия превышали контроль по антагонистической активности против *A. solani* в 2 раза, против *F. culmorum* – в 1,2 раза, против *T. viride* – в 1,3 раза (рисунок 3.4.1).

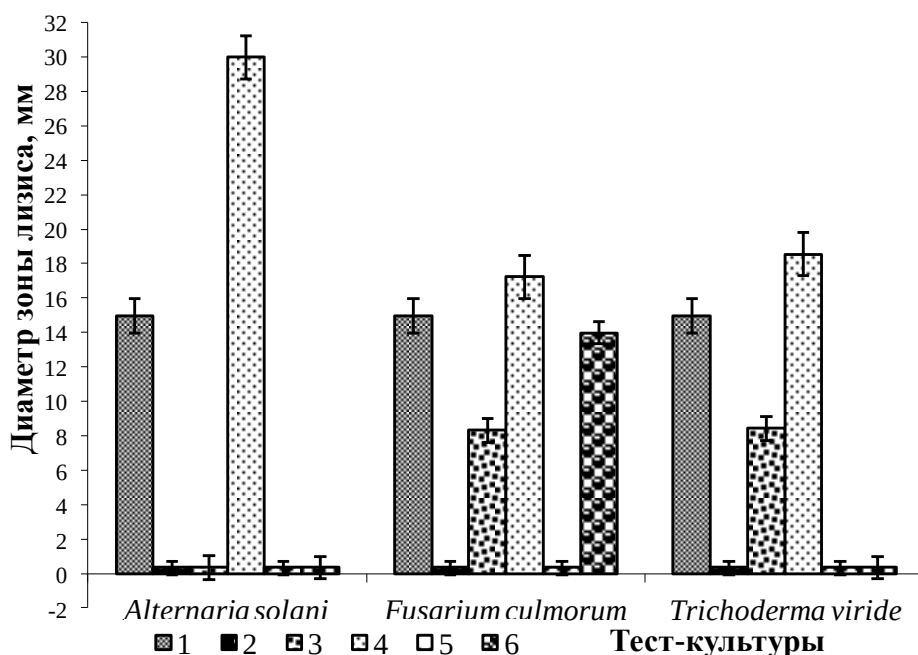


Рис. 3.4.1. Антагонистическая активность эндометаболитов 10-суточной культуры субстратного мицелия штамма *B. papaveris* 1.39 и его изолятов 2 поколений: 1 – контроль (50%-й этанол), 2 – *B. papaveris* 1.39, 3 – изолят 8 (1-е поколение), 4 – изолят 8 (2-е поколение), 5 – изолят 19 (1-е поколение), 6 – изолят 19 (2-е поколение).

Антагонистическая активность 5-суточной культуры субстратного мицелия штамма *B. papaveris* 1.39, его моноспоровых изолятов, реизолятов двух поколений против *Alternaria solani*, *Fusarium culmorum* и *Trichoderma viride* была ниже уровня

контроля – 50 %-го этанола. Экстракты 7-суточной культуры изолятов 8 и 19 2-го поколения по антагонистической активности против *A. solani* и *F. culmorum* находились на уровне контроля.

Оценка фитотоксичности компонентов метаболитного комплекса глубинного и субстратного мицелия штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и его изолятов разных поколений, полученных разными системами экстракции и растворения экстрактов, для семян и проростков мака в лабораторных условиях выявила некоторые особенности. Прежде всего, это общая тенденция к возрастанию фитотоксичности всех экстрактов пропорциональному времени культивирования штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и его изолятов разных поколений (рисунок 3.4.2).

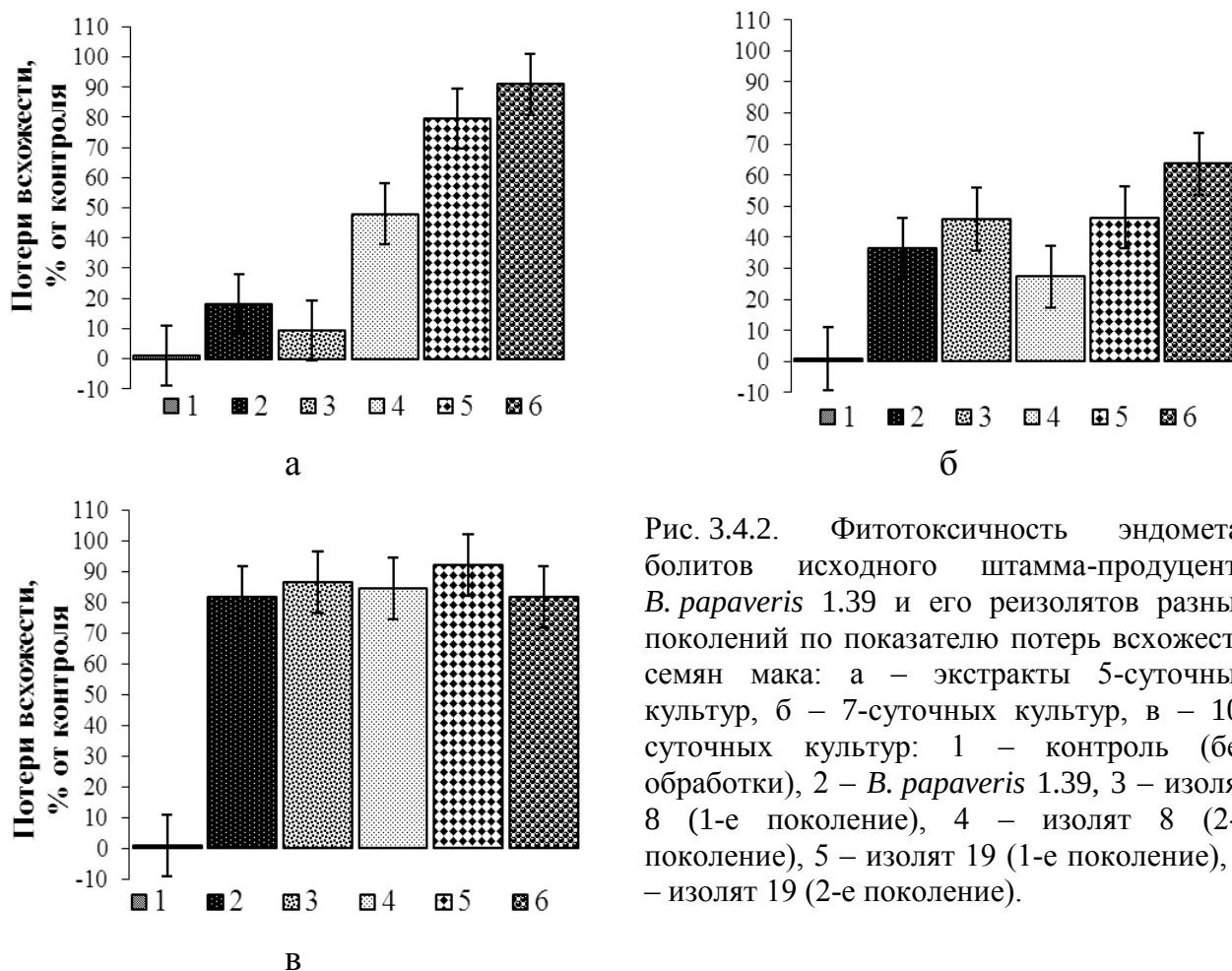


Рис. 3.4.2. Фитотоксичность эндометаболитов исходного штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и его реизолятов разных поколений по показателю потерь всхожести семян мака: а – экстракты 5-суточных культур, б – 7-суточных культур, в – 10-суточных культур: 1 – контроль (без обработки), 2 – *B. papaveris* 1.39, 3 – изолят 8 (1-е поколение), 4 – изолят 8 (2-е поколение), 5 – изолят 19 (1-е поколение), 6 – изолят 19 (2-е поколение).

Величина и скорость усиления фитотоксичности экстрактов зависели от системы экстракции и метода приготовления растворов компонентов метаболитного комплекса штаммов. При сравнении фитотоксичности эндометаболитов исходного

штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39 и его реизолятов разных поколений по показателю потерь всхожести семян целевых растений выявлено их нарастание, пропорциональное времени культивирования, общее для всех штаммов (рисунок 3.4.2). Фитотоксичность экстрактов культур реизолятов двух поколений превышала этот показатель у исходного штамма-продуцента при всех сроках их культивирования. Максимальные потери всхожести семян мака наблюдались при воздействии экстрактов 10-суточных культур реизолята 19 2-го поколения; минимальные – при воздействии экстрактов 5-суточных культур реизолята 8 1-го поколения (рисунок 3.4.2).

Скорость усиления фитотоксичности экстрактов культуры только реизолята 8 1-го поколения превышала этот показатель у исходного штамма-продуцента (рисунок 3.4.3 а).

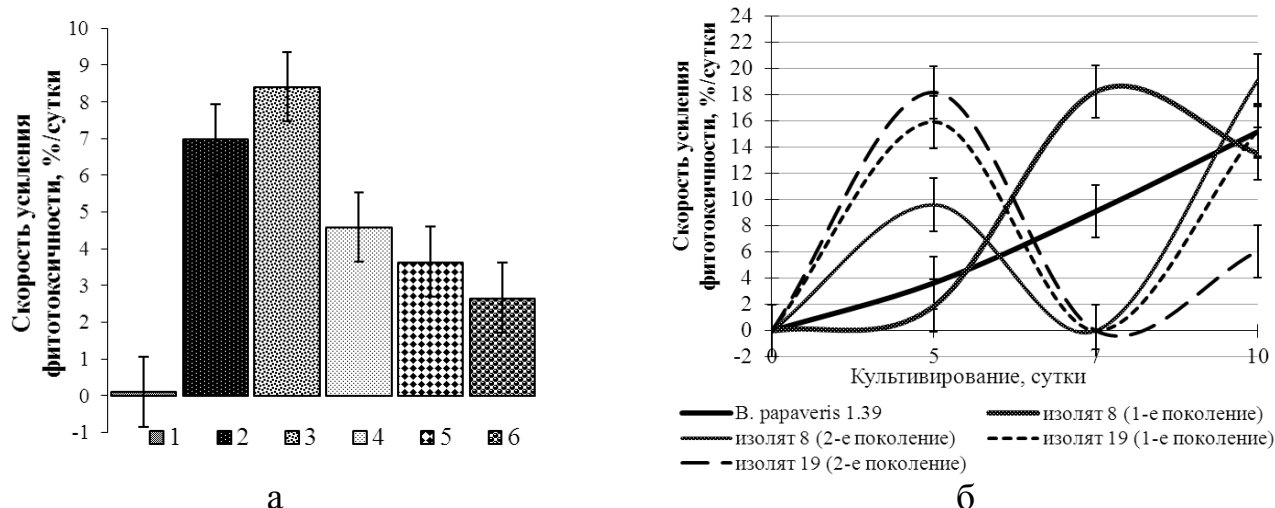


Рис. 3.4.3. Динамика фитотоксичности (а): 1 – контроль (без обработки), 2 – *B. papaveris* 1.39, 3 – изолят 8 (1-е поколение), 4 – изолят 8 (2-е поколение), 5 – изолят 19 (1-е поколение), 6 – изолят 19 (2-е поколение); и скорости усиления фитотоксичности (б) комплекса эндометаболитов исходного штамма *B. papaveris* 1.39 и его реизолятов разных поколений.

Кривая скорости усиления фитотоксичности выявила наличие пиков усиления фитотоксичности экстрактов 5–7-суточных культур реизолятов *B. papaveris* 1.39 разных поколений, чего не наблюдалось у экстрактов культур исходного штамма-продуцента (рисунок 3.4.3 б). Скорость усиления фитотоксичности *B. papaveris* 1.39 постоянно нарастает, т. е. накопление комплекса активных в отношении целевого

растения метаболитов культурой исходного штамма-продуцента на первично конвертированных шии-таке субстратах происходит с ускорением.

Таким образом, штамм-продуцент *B. papaveris* 1.39 усиленно накапливает комплекс токсичных для целевого растения вторичных метаболитов в процессе своего развития на конвертированном съедобными грибами субстрате. Реизоляты исходного штамма характеризуются волнообразным накоплением токсичных для целевого растения вторичных эндометаболитов, связанным со спороношением. После спороношения при лизисе мицелия эндотоксин высвобождается, а после прорастания спор и дальнейшем росте мицелия происходит образование новых вторичных метаболитов в период новой волны спороношения. В технологическом плане, по показателю выработки токсичных эндометаболитов с исходным штаммом-продуцентом сравним лишь реизолят 8 2-го поколения (рисунок 3.4.3 б). Активный эндотоксин мицелия по совокупности имеющихся физико-химических и биологических данных отнесен к бензохинонам.

В дальнейшем нами оценивалась фитотоксичность комплекса БАВ, вырабатываемых в разные сроки культурой штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39-8 на конвертированном *L. edodes* субстрате – основы субстратного гранулированного лабораторного образца. Поскольку *B. papaveris* 1.39-8 при культивировании на синтетической агаризованной питательной среде Чапека характеризовался наличием 3 морфотипов, условно обозначенных нами как много-, средне- и малоспоровые, были выявлены различия в накоплении токсических для целевого растения метаболитов при культивировании морфотипов на отработанных в производстве съедобных грибов субстратах (рисунок 3.4.4).

При оценке фитотоксичности метаболитных комплексов морфотипов штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39-8 по показателю потерь всхожести семян мака выявлена тенденция их увеличения, пропорциональная воздействию экстрактов длительных культур морфотипов (рисунок 3.4.4). Метанольные экстракты 5–7-и суточных культур морфотипов часто не проявляли фитотоксичности (рисунок 3.4.4 а, в). Максимальные потери всхожести семян мака зарегистрированы при воздействии экстракта 10-и суточной культуры среднеспорового морфотипа

(рисунок 3.4.4 е), минимальные – при воздействии экстрактов разновозрастных культур многоспорового морфотипа (рисунок 3.4.4 а, б, в, г, е).

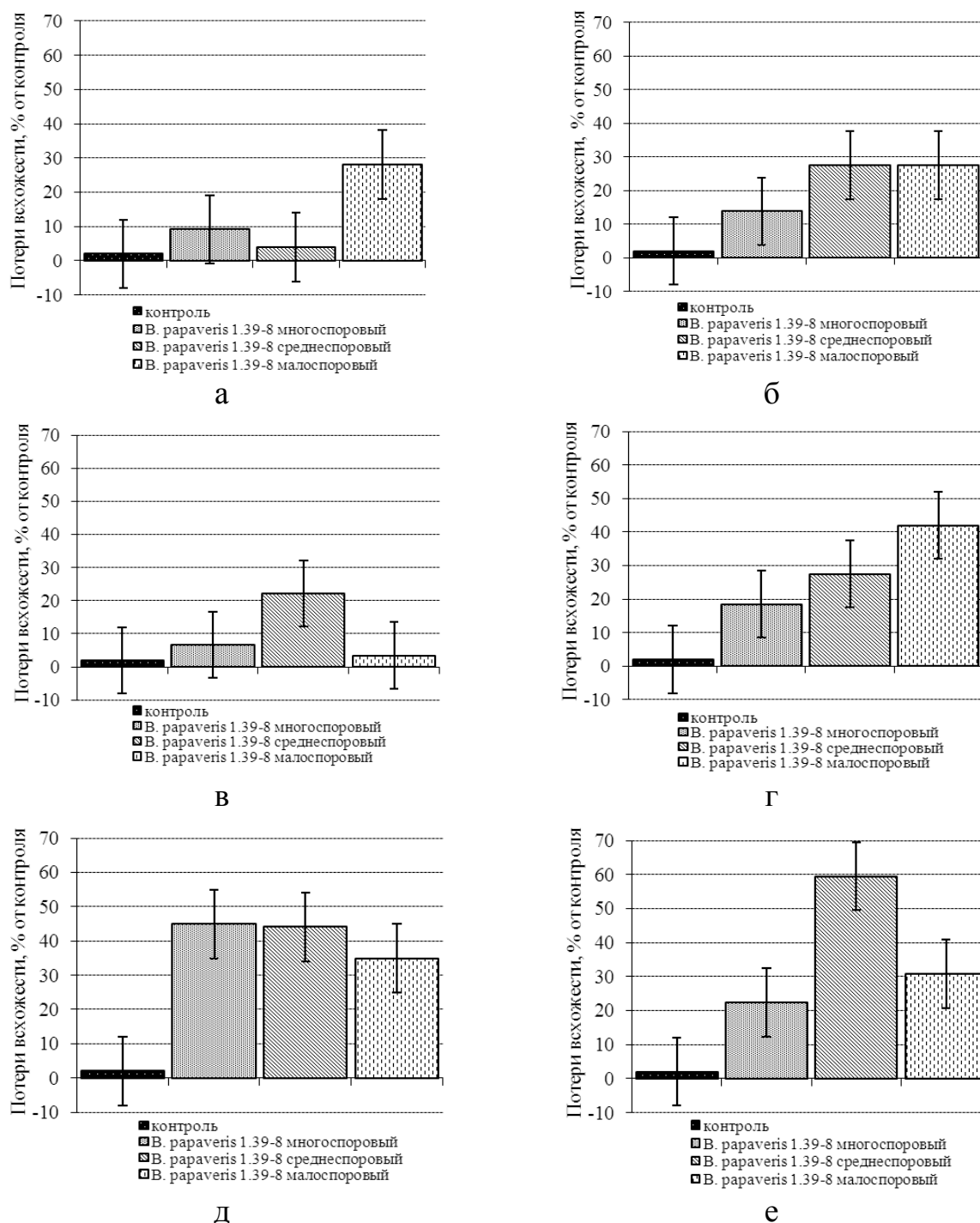


Рис. 3.4.4. Фитотоксичность комплекса метаболитов субстратного гранулированного лабораторного образца на основе различных морфотипов *B. papaveris* 1.39-8 для проростков мака (потери всхожести семян мака, % от контроля) под воздействием: а – метанольного экстракта БАВ (5-и суточная культура); б – водного экстракта БАВ (5-и суточная культура); в – метанольного экстракта БАВ (7-и суточная культура); г – водного экстракта БАВ (7-и суточная культура) д – метанольного экстракта БАВ (10-и суточная культура); е – водного экстракта БАВ (10-и суточная культура).

Кривые скорости усиления фитотоксичности выявили перманентный характер усиления фитотоксичности экстрактов культур морфотипов *B. papaveris* 1.39-8, что наблюдалось у экстрактов культур исходного штамма-продуцента (рисунок 3.4.5).

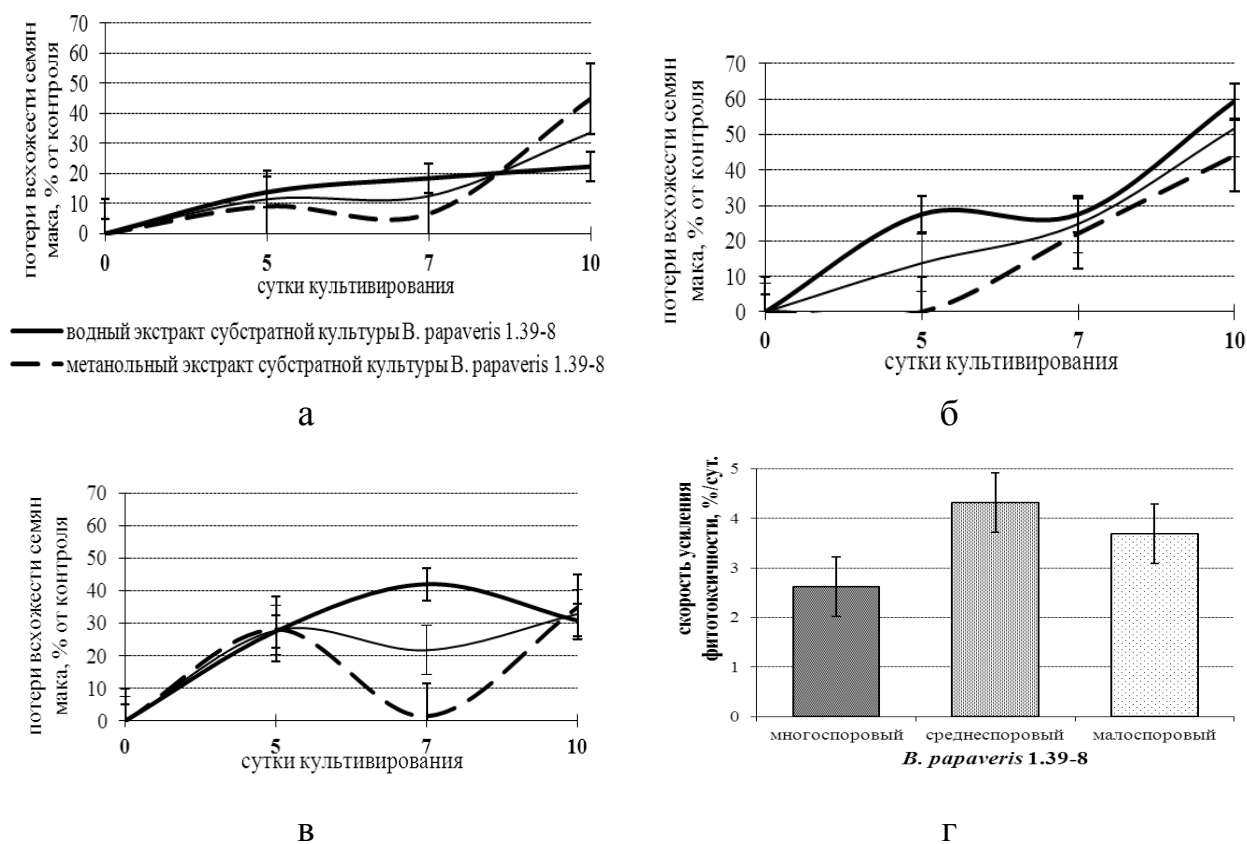


Рис. 3.4.5. Динамика фитотоксичности для проростков мака (потери всхожести семян, % от контроля) водного и метанольного экстрактов комплекса метаболитов субстратного гранулированного лабораторного образца на основе многоспорового (а), среднеспорового (б) и малоспорового (в) морфотипов *B. papaveris* 1.39-8, а также скорость усиления их фитотоксичности (г).

Скорость усиления фитотоксичности морфотипов *B. papaveris* 1.39-8 постоянно нарастает, т.е. накопление комплекса активных в отношении целевого растения метаболитов морфотипами на первично конвертированных шии-таке субстратах происходит с различиями в ускорении синтеза БАВ. Таким образом, все морфотипы штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39-8 накапливают комплекс токсичных для целевого растения вторичных метаболитов в процессе своего развития на конвертированном съедобными грибами субстрате, причем это накопление, как и у исходного штамма *B. papaveris* 1.39, перманентно. Синусоидальный характер кривых усиления фитотоксичности свидетельствует о

незначительных различиях в накоплении вторичных метаболитов культурами морфотипов, связанных с их физиологическими особенностями (рисунок 3.4.5).

Среднеспоровый морфотип наиболее усиленно накапливает токсические для целевого растения мака БАВ (рисунок 3.4.5). Скорость усиления фитотоксичности экстрактов культур ни одного из морфотипов не превышала таковую исходного штамма-продуцента, но была наибольшей у среднеспорового морфотипа *B. papaveris* 1.39-8 (рисунки 3.4.3, 3.4.5).

Таким образом, усиленная выработка токсичных для мака вторичных метаболитов, по крайней мере, достигающая параметров исходного штамма *B. papaveris* 1.39 – предмет дальнейшей направленной селекции штамма *B. papaveris* 1.39-8.

Глава 4. Патогенез на маке снотворном при его поражении

штаммами *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8

Черную пятнистость или «гельминтоспориоз» считают наиболее вредоносным заболеванием мака в местах, где он произрастает и выращивается. Заболевание было описано в нескольких европейских странах, а также в США, Индии и Японии. «Гельминтоспориоз» представляет собой группу заболеваний, возбудителями которых являются, по крайней мере, два вида грибов, поражающие различные органы растений (чаще листья, стебли и коробочки, реже корни). Кроме того, известно бессимптомное поражение семян мака этими же патогенами (Del Serrone, et al., 1989; Farr et al., 1999; Bailey et al., 2000, 2004; O'Neill et al., 2000; Гасич и др., 2009). Возбудители этого заболевания изучаются и как объекты борьбы в системе защиты культуры мака от болезней, и как основа для создания микогербицидов против сорных видов мака и нелегальных посевов мака снотворного (Павлюшин и др., 2013).

Впервые это вредоносное заболевание в нашей стране 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). Установлено, что в нескольких регионах России и на Украине возбудителями заболевания 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).

Микромицеты этих видов неоднократно рассматривались в качестве возможных продуцентов биогербицида для контроля незаконных посадок мака снотворного. Для их успешного применения в полевых условиях необходимо знать источники инфекции и способы проникновения патогенов в растение, а также определить экологический оптимум инфицирования и дальнейшего развития болезни.

Был проведен ряд исследований, целью которых было изучение особенностей патологического процесса этих микромицетов в лабораторных и полевых условиях (Bailey et al., 2000). В лабораторных опытах обработанные конидиальной суспензией листья были помещены в чашки Петри на разные температурные режимы (7–13°C, 10–18°C, 16–24°C, или 21–29°C), световой режим составлял приблизительно 10 часов темноты и 14 часов естественного света. Оказалось, что оба патогена образуют аппрессории, способствующие проникновению мицелия возбудителя в растение через эпидермальный слой. *P. rapaveracea* был более агрессивным, вызывая быстрый некроз – аппрессории сформировались уже через 4 часа после обработки отдельных листьев мака конидиальной суспензией и, их количество было больше, чем у *D. penicillatum*, особенно при пониженных температурах.

Исследования, проведенные Миско (1973) и другими учеными (Дроздовская, 1977; Farr et al., 1999; Bailey et al., 2000; O'Neill et al., 2000), позволили понять, как протекает патологический процесс в пораженном растении. При прорастании семян естественно зараженных растений в зародыше развивается мицелий. Гифы на мицелии растут беспорядочно, быстро образуют аппрессории, с помощью которых проникают в клетки. В тканях происходит интерцеллюлярный рост гриба, вследствие чего стенки клеток набухают и лизируются. Мицелий распространяется по межклеточному пространству в мезофилле листьев. При повышенной влажности конидиеносцы выходят на поверхность через эпидермальные клетки между сосудистыми проводящими пучками. Конидиеносцы образуют массу конидий в виде серовато-оливкового налета в зоне некротического пятна. Образование некротических пятен на листьях и стеблях свидетельствуют о наличии в клетках токсинов, которые выделяет патоген. Токсины, с одной стороны, снижают водоудерживающую силу плазмы, а с другой – нарушают полупроницаемость ее пограничных слоев. Повреждение пограничных слоев делает невозможным сохранение нормального осмотического давления и ведет к снижению тургора. Тургесцентность тканей листа обуславливается тем, что полупроницаемость пограничных слоев плазмы препятствует проникновению веществ из клетки, имеющей более высокое осмотическое давление, в

транспирационный ток, идущий через клеточные стенки. При нарушении полупроницаемости сахара, минеральные соли и другие вещества плазмы переходят в транспирационный ток, и тургор исчезает. Этим можно объяснить нарушение водного баланса растений под действием токсинов патогенов, вызывающих трахеомикозы (Миско, 1973).

На поперечном срезе тканей растения заметно потемнение проводящих пучков от мицелия гриба. При микроскопическом исследовании видно побурение клеток паренхимы, примыкающих к сосудистым проводящим пучкам. Побурению ткани предшествует поражение клеток, расположенных вблизи гиф гриба. При поражении соседних клеток буреет непораженная прилегающая ткань, что выражается в образовании некротических пятен. При температуре 18–21° С растение-хозяин отвечает на заражение образованием обширных желто-зеленых зон, пятна при этом уменьшаются (Миско, 1973).

В университете Бетсвилла группа ученых проводила исследования по выявлению способности вызывать заболевания растений мака микромицетами *D. penicillatum* изолят Cf96 и *P. papaveracea* изолят B96. Было выявлено, что оба микромицета оказались патогенными для целевых растений. Так, 18-и дневные проростки *Papaver somniferum* были обработаны суспензией спор с титром 4×10^5 спор/мл и помещены в условия 100 % влажности на 24 часа. Как показал эксперимент, проростки оказались высоковосприимчивыми к обоим болезнетворным микроорганизмам – некротические пятна на листьях появились спустя 48 часов после обработки. На 5-е сутки все растения, обработанные суспензией спор *P. papaveracea* B96, погибли; 87–93 % проростков, обработанных суспензией *D. penicillatum* Cf96, были некротизированы. На 8-е сутки после обработки была отмечена полная гибель проростков во всех вариантах.

Восьминедельные растения мака также были обработаны суспензиями с различными концентрациями спор ($\times 10^5$, $\times 10^6$ и $\times 10^7$ спор/мл). Растения были помещены в условия 100 % влажности на 24 часа. Через 48 часов после обработки во всех вариантах на листьях растений мака появились хлорозы, и позднее некрозы. На некротических пятнах было отмечено спороношение. Спустя 8 суток после

нанесения конидиальной суспензии *P. papaveracea* B96 с титром $\times 10^5$ спор/мл все растения погибли, а в вариантах, обработанных суспензией *D. penicillatum* Cf96 ($\times 10^6$ спор/мл), растения оказались менее восприимчивы, и было отмечено 90 % погибших растений (O'Neill et al., 2000).

В условиях защищенного грунта патологический процесс, вызываемый *P. papaveracea* B96 и *D. penicillatum* Cf96, активно изучали в также в университете Бетсвилла. Было показано, что добавление 10 %-го кукурузного масла в суспензию спор приводит к 100 %-му инфицированию растений мака микромицетами. При добавлении водного раствора ТВИН-20 в концентрации 0,001 % к любому болезнетворному микроорганизму 16,5 % растений мака не поражалось. При добавлении 10 %-го кукурузного масла к споровой суспензии гибель рассады составила 57,7 % у *P. papaveracea* и 34,7 % при добавлении к *D. penicillatum*. В полевом эксперименте растения обрабатывали суспензией спор с титром 2×10^5 спор/мл, расход составил 3 мл/растение. Для улучшения прилипания добавляли 0.001 % ТВИН-20 в водном растворе или 0.001 % ТВИН-20 в 10%-ом неочищенном кукурузном масле. Обработка *P. papaveracea* и *D. penicillatum* вызвала значительное повреждение стеблей, листьев и коробочек. При этом средний вес коробочек снижался на 20 % по сравнению с контролем. Добавление 10 %-го неочищенного кукурузного масла в суспензию спор микромицетов способствовало высокому начальному уровню инфекции на ранних фазах развития, а также сохранению жизнеспособности в сухой период и активному распространению болезнетворного микроорганизма (Bailey et al., 2000). Из пораженных коробочек были выделены патогены, идентификация их проводилась на основании размеров конидий, присутствия или отсутствия микросклероциев. *D. penicillatum* производит меньшие по размеру конидии, чем *P. papaveracea*, но формирует множественные микросклероции. *D. penicillatum* и *P. papaveracea* в процессе своего жизненного цикла образуют конидии и хламидоспоры (Farr et al., 2000), способные заразить надземные части растений мака, а также семена при прорастании, инфицируя корни, зачаточные листья, а впоследствии ствол и коробочки (Meffert, 1950; O'Neill et al., 2000). Кроме того, *P. papaveracea* формирует на растительных остатках перитеции: способные

заражать проростки мака весной аскоспоры образуются после перезимовки (Глухова и др., 2010). Микросклеротии *D. penicillatum* способны перезимовывать и заражать растения мака на стадии проростка в полевых условиях (Bailey et al., 2000; O'Neill et al., 2000). При исследовании патогенеза *D. penicillatum* и *P. papaveracea* на маке-самосейке (*P. rhoeas*) показано, что наиболее восприимчивы проростки в фазе 7–11 настоящих листьев: обработка суспензиями, содержащими 1.5×10^6 спор/мл *D. penicillatum* и *P. papaveracea*, при 24-часом росном периоде и температуре 25° С, приводила к гибели 100 % проростков через 3-е суток после обработки (Del Serrone et al., 1989).

В лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР изучали патогенез штаммов *B. papaveris*. Условия, благоприятные для возникновения и развития заболевания, были следующие: ранняя, наиболее уязвимая из-за незрелости системы придаточных корней фаза развития растений – от семядолей до 1–2-х настоящих листьев; влажность 90–100 % и температура 22–26 °С не менее 24 часов, высокие концентрации интактного инокулята ($\times 10^6$ КОЕ/мл). Наблюдались массовое прорастание конидий одной или несколькими ростковыми гифами, развитие мицелия и образование некрозов в местах его соприкосновения с растительной тканью, а также дальнейшее развитие мицелия патогена на некротизированных участках (Павлюшин и др., 2013).

Нами было продолжено изучение патологического процесса на проростках и растениях мака (рисунок 4.1). Корневая шейка проростков мака в фазе семядолей была обработана культуральной жидкостью *B. papaveris* 1.39-8, содержащей мицелий и конидии ($\times 10^6$ КОЕ/мл). Первые учеты симптомов поражения начинали фиксировать на 7-е сутки после инокуляции. Первая обработка привела к образованию перетяжек на корневой шейке проростков, разрыву эпидермиса и побурению – некротизации – тканей паренхимы (рисунок 4.1).

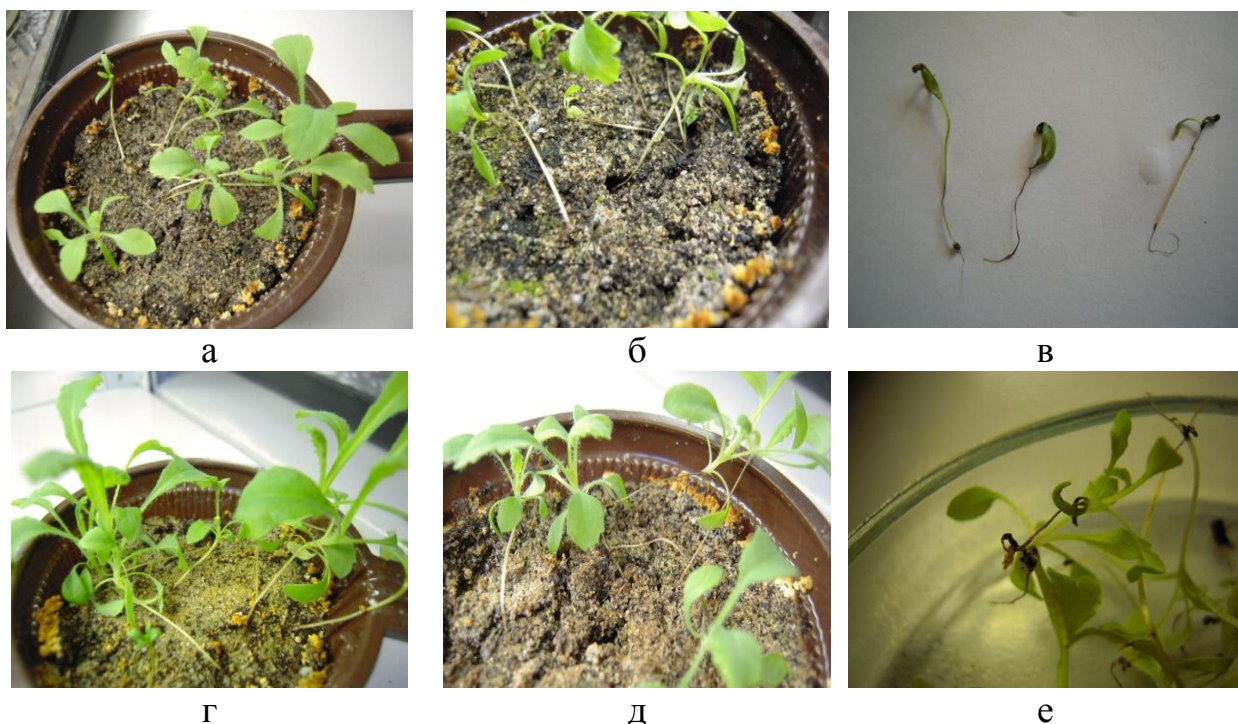


Рис. 4.1. Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – контроль без обработки 7-е сутки; б – пораженные проростки мака на 7-е сутки после первой обработки; в – погибшие проростки на 7-е сутки после первой обработки; г – контроль без обработки 18-е сутки; д – пораженные проростки мака на 5-е сутки после второй обработки; е – погибшие проростки на 5-е сутки после второй обработки.

Повторную обработку 7–10-и дневных проростков проводили культуральной жидкостью отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 в фазе 1–3 настоящих листьев.

Динамика гибели проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8 представлена на рисунке 4.2. Гибель растений мака была отмечена на 2-е сутки, что свидетельствует о токсическом эффекте в патогенезе штамма-продуцента. Максимальное количество погибших растений отмечали на 8-е сутки, после обработки, скорость гибели составила 3–4 растения/сутки. После второй обработки к 14-м суткам фиксировали максимальное количество погибших растений мака: максимальная гибель растений была отмечена уже на 5-е сутки после обработки – скорость гибели составила 5–6 растений/сутки (рисунки 4.1, 4.2).

Сравнение средних скоростей гибели растений мака под воздействием штаммов *B. papaveris* 1.39 и *B. papaveris* 1.39-8, а также моноспорового изолята 8 исходного штамма *B. papaveris* 1.39 представлены на рисунке 4.2.

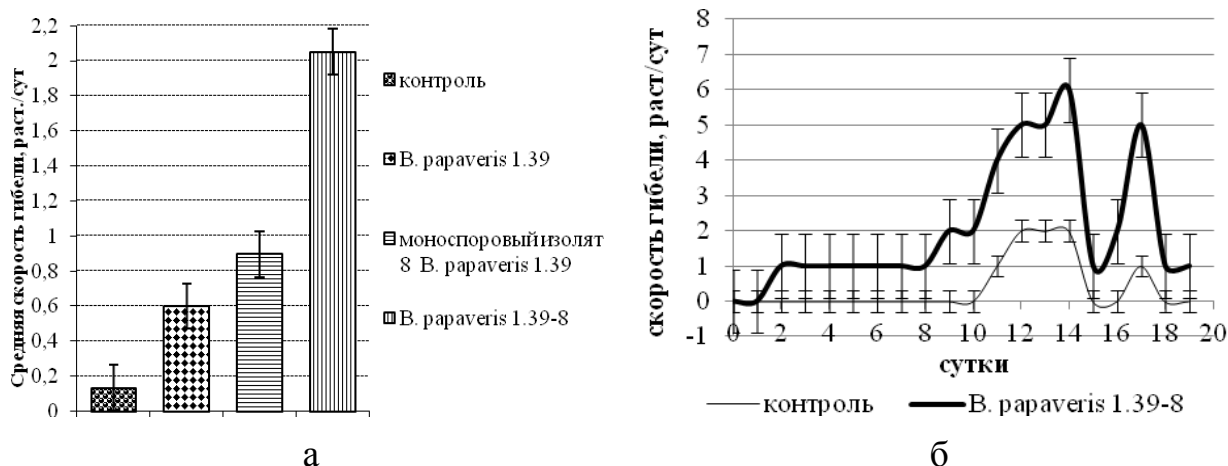
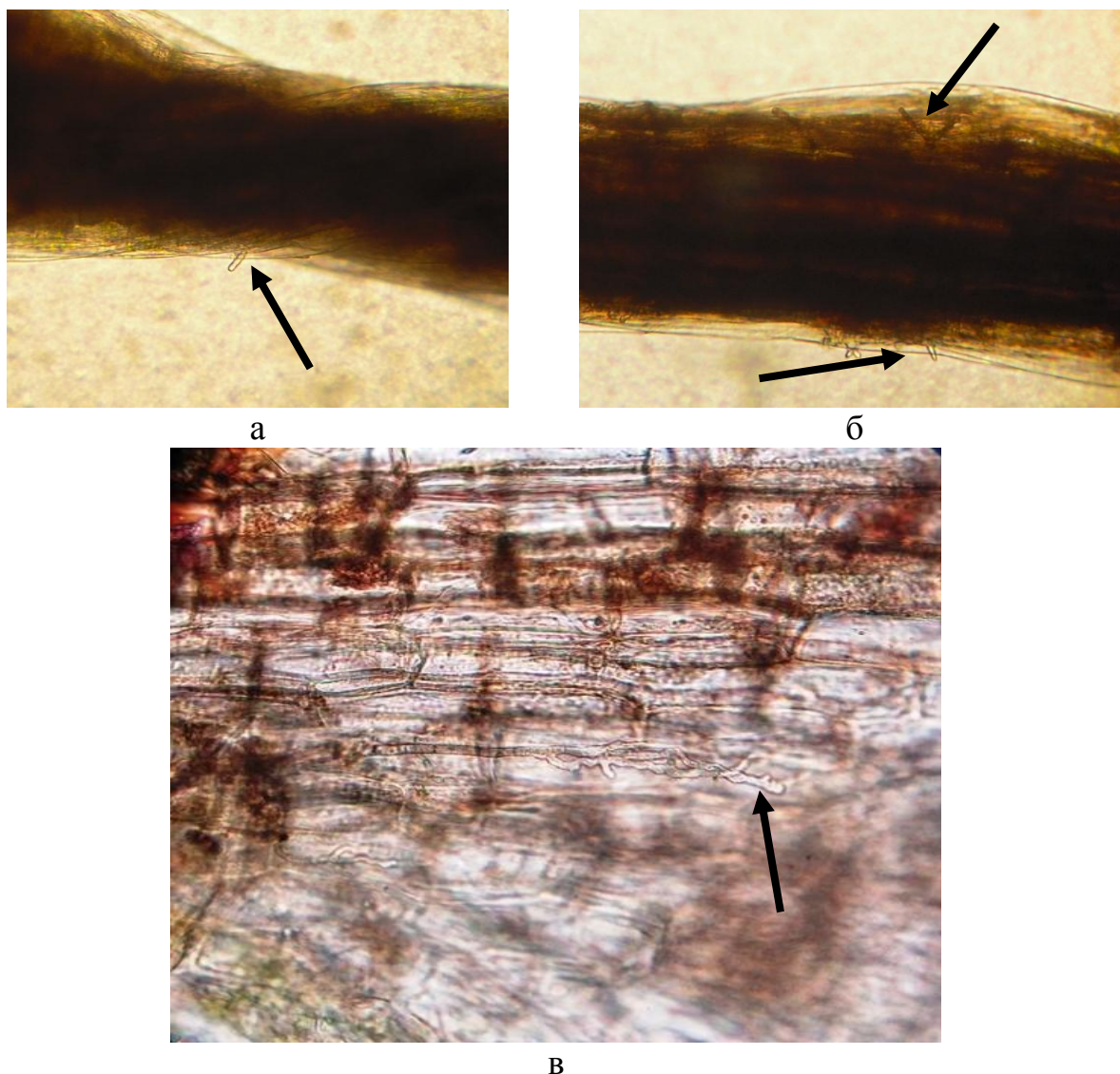


Рис. 4.2. Сравнительная скорость гибели (а) и динамика гибели проростков мака (б) под воздействием различных штаммов *B. papaveris*.

Наиболее эффективным было воздействие штамма *B. papaveris* 1.39-8, приводящее к максимальной скорости гибели проростков мака, которая была в 2,3–3,4 раза выше по сравнению с таковой под воздействием исходного штамма и в 15,3 раза выше, чем в контроле (рисунок 4.2 а). Воздействие штамма *B. papaveris* 1.39-8 на целевое растение было перманентным в течение всего опыта, что прослеживается в кривых скорости гибели проростков мака (рис. 4.2 б). Динамика гибели от естественных причин в контроле без обработки практически повторяет таковую под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8, интегральные значения которой в 4 раза выше (рисунок 4.2 б).

При микроскопическом исследовании в тканях корневой шейки были заметны прорастающие конидии, под эпидермисом виден мицелий патогена, распространяющийся по межклеточному пространству. Наблюдали конидиогенез в растительной ткани, прорастание конидий в некротизированных участках перекрученной корневой шейки проростков мака (рисунок 4.3).



в

Рис. 4.3. Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – перекрученная пораженная корневая шейка с ростовой мицелиальной трубкой, увеличение $\times 320$; б – перекрученная пораженная корневая шейка с конидиеносцами под и на поверхности эпидермиса, увеличение $\times 320$; в – мицелий в некротизированной ткани стебля, увеличение $\times 640$.

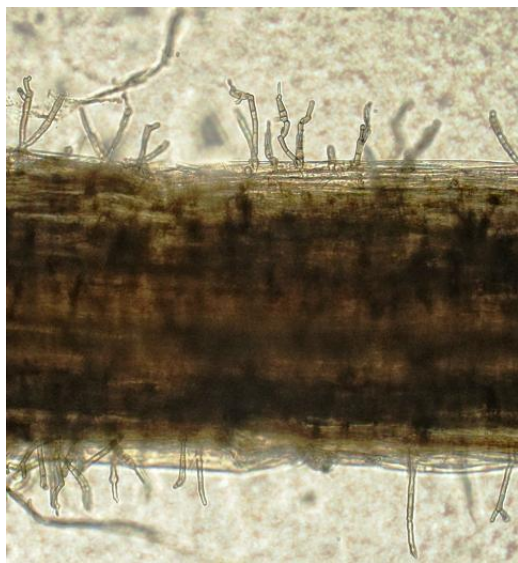
В отмирающих клетках ткани растения начинался конидиогенез и формирование новых мицелиальных ростковых гиф для дальнейшего распространения поражения на здоровые участки проростков мака (рисунок 4.4).



а



б



в

Рис. 4.4. Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – конидиогенез в растительной ткани, увеличение $\times 320$; б – множественные конидиеносцы на поверхности пораженного стебля, увеличение $\times 640$; в – мицелиальные ростковые трубки и множественные конидиеносцы в растительной ткани и на поверхности пораженного стебля, увеличение $\times 320$.

Мицелий штамма *B. papaveris* 1.39-8, продвигаясь по межклетникам стебля проростков и достигая живой ткани с обилием хлорофилловых зерен, вызывал резорбцию хлорофилла, вакуолизацию и последующее отмирание клеток растительной паренхимы (рисунок 4.5). Дальнейшее развитие мицелия микромицета происходило уже в отмирающих и мертвых клетках растительной ткани, по-видимому, с употреблением в качестве источников питания продуктов разложения последних. При распаде тканей проростков конидии и мицелий инокулята *B. papaveris* 1.39-8 оказывался в почве.

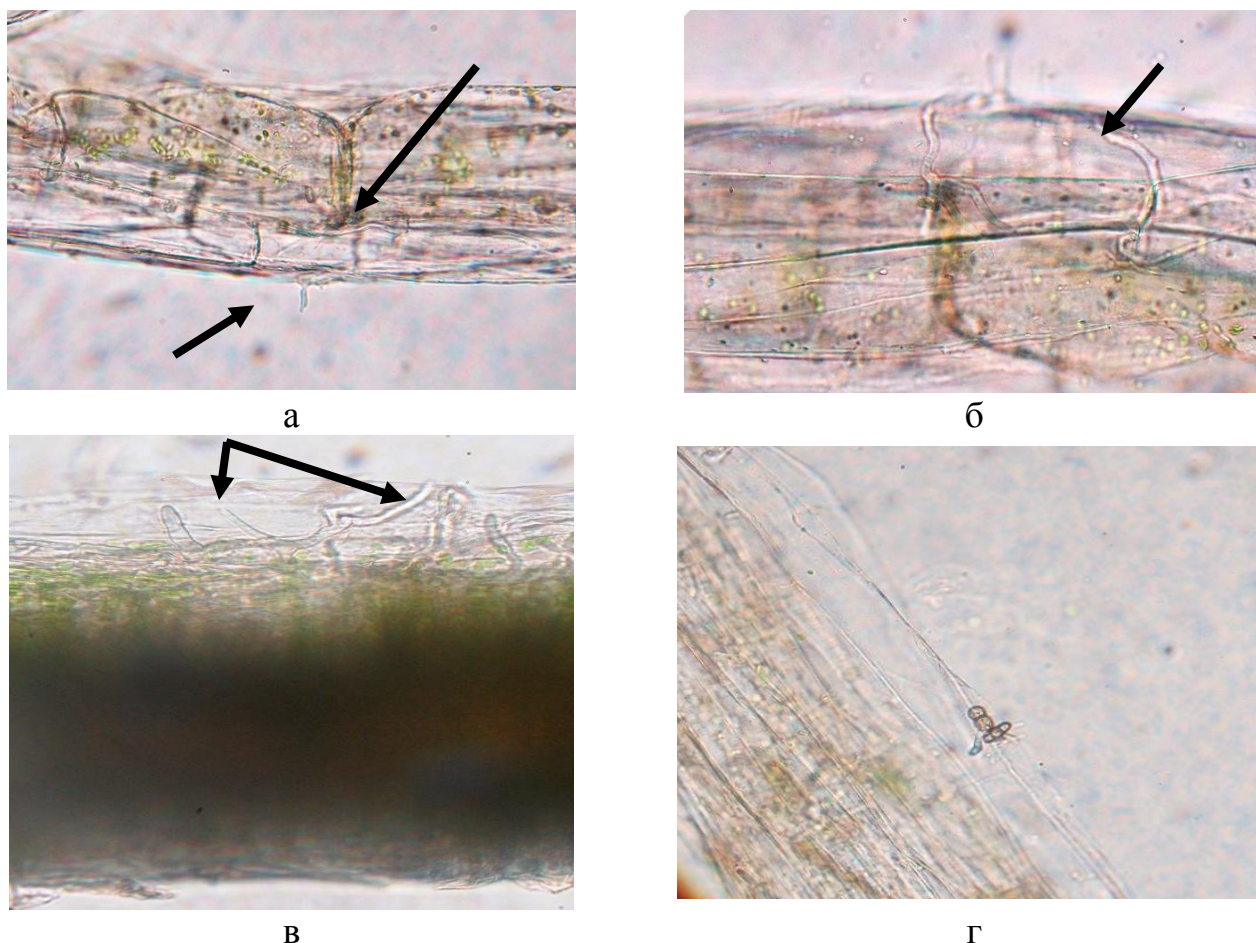


Рис. 4.5 Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – мицелий патогена в пораженной ткани и на поверхности эпидермиса, увеличение $\times 320$; б – мицелий патогена в пораженной ткани, увеличение $\times 640$; в – мицелий под эпидермисом, увеличение $\times 640$; г – прорастающая конидия на поверхности стебля, увеличение $\times 320$

Исследования на электронном уровне патогенеза на проростках мака подтвердили результаты, полученные на световом уровне (рисунок 4.6).

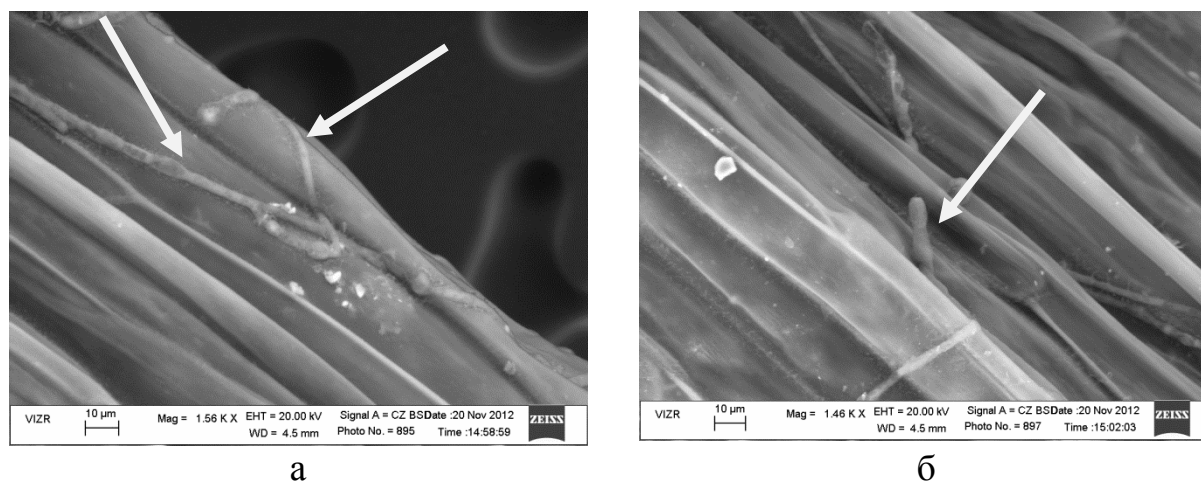


Рис. 4.6. Развитие поражения проростков мака под воздействием штамма *B. papaveris* 1.39-8: а – распространение мицелия по поверхности пораженного стебля; б – прорастающая конидия на пораженной корневой шейке.

Таким образом, показано, 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. В некротизированных участках растительной ткани формируется разветвленный мицелий и множественные конидиеносцы с конидиями, служащими для дальнейшего распространения поражения на здоровые участки проростков мака. На поверхности пораженных участков также формируются конидиеносцы с конидиями. В процессе развития поражения стебель в области корневой шейки проростков скручивается, далее ткань некротизируется с образованием перетяжки. В этом месте наблюдали переламывание стебля и последующую гибель растений. Поскольку в период от фазы семядолей до формирования первого настоящего листа наблюдали поражение по типу увядания (псевдосистемное поражение), а при инокулировании растений мака в более поздние фазы развития – по типу пятнистости с формированием хлорозов и некрозов листьев и стебля, наиболее уязвимы растения мака в фазу семядолей.

Глава 5. Оптимизация питательных сред и условий культивирования отселектированных штаммов *B. papaveris*

Для получения препаративных форм на основе *B. papaveris*, в течение длительного времени сохраняющих жизнеспособность клеток штамма-продуцента и высокую целевую активность, необходим подбор питательных сред, сбалансированных по основным источникам питания, и оптимизация условий культивирования. В разработке технологий создания и применения биопрепаратов этапы оптимизации питательных сред и условий культивирования являются основными (Новикова, 2005). Биопрепараты получают различными технологическими приемами с использованием жидких питательных сред и твердых субстратов (Коломбет, 2006). Глубинное культивирование считается более технологичным, так как контролируемые условия процесса ферментации позволяют получать стандартизованный конечный продукт. Имеются некоторые трудности в разработке методов глубинного культивирования микромицетов-продуцентов биопрепаратов, позволяющих получить вегетативную биомассу грибов с элементами конидиального спороношения. При ферментации на твердом субстрате у микромицетов в полной мере реализуется программа конидиогенеза. При твердофазной ферментации отсутствует этап сушки, что делает такие технологии энергосберегающими и менее трудоемкими (Коломбет, 2006). Кроме того, использование твердых субстратов в производстве биопрепаратов на основе микромицетов позволяет решать важную проблему промышленной биотехнологии – пополнение ресурсов дешевого и доступного сырья за счет использования отходов сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности (Титова, 1998; Заика, 2006). Отходы лесоперерабатывающей промышленности непосредственно не могут быть использованы микромицетами из-за высокого содержания в них лигнин-целлюлозного комплекса – наиболее труднодоступной для разрушения части растительных отходов. Эти источники питания становятся доступными после их первичной ферментации макромицетами, способными к активному разложению лигноцеллюлозного комплекса (Краснопольская, 1991). В процессе первичной биоконверсии таких субстратов происходит обогащение малоценных грубых

растительных отходов грибным белком и легкоусвояемыми углеводами, используемыми при вторичной биоконверсии микромицетами (Краснопольская, 1991, Заика, 2006).

В настоящее время основное внимание исследователи уделяют изучению особенностей роста и развития *B. papaveris* при глубинном культивировании и с точки зрения подбора условий для накопления большого количества биомассы и спор (Hebbar et al., 1997; Bailey et al., 2004; Glukhova et al., 2007). Вопросы увеличения скорости роста микромицета-продуцента, динамики накопления споровой массы и сохранения жизнеспособности пропагул *B. papaveris* в современной литературе практически не освещены.

Запатентованный штамм *Brachycladium penicillatum* (= *D. penicillatum*) 1.39 (последний недавно определен как *B. papaveris* (Гасич и др., 2013) предназначен для борьбы с незаконными посевами мака. Штамм проявляет высокую микогербицидную активность, достигающую 98,6 % при искусственном заражении целевых растений суспензией с титром 3×10^5 спор/мл и 24-часовом росном периоде (Гасич и др., 2010). Штамм *B. papaveris* 1.39 был получен в лаборатории микологии и фитопатологии ГНУ ВИЗР в результате скрининга коллекции культур микромицетов, выделенных из образцов пораженных органов мака снотворного, собранных на территории России. Штамм депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР в Санкт-Петербурге.

Культурально-морфологические особенности штамма *B. papaveris* 1.39, а также его рост и развитие на стандартных жидких и агаризованных средах, используемых в лабораторной практике, охарактеризованы сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии ГНУ ВИЗР. Было показано, что штамм хорошо растет на агаризованных средах, таких, как картофельно-сахарозная (КСА) и среда Чапека. При росте на агаризованной среде Чапека колонии микромицета сверху и снизу имеют оливково-бурый цвет, по текстуре вначале бархатистые, затем войлочно-бархатистые. Гифы воздушного мицелия гриба септированные, ветвящиеся, гладкостенные, бесцветные, толщиной 2,5–5 мкм; гифы субстратного мицелия образованы вздутыми клетками, 7–9,5 мкм толщиной, извилистые,

древовидно разветвленные, бледно-оливковые. Конидиеносцы простые или с несколькими веточками, иногда коленчатые, бледно-оливковые, $2,5-3(6) \times 18-39(60)$ мкм. Конидии одиночные или в цепочках, цилиндрические с закругленными концами или обратно-булавовидные, бледно-оливковые, гладкие, с 1–5-ю (обычно с 3-мя) перегородками, $5,5-9 \times 15-40$ мкм. На конидиях часто формируются вторичные конидиеносцы, они обычно коленчато-изогнутые, с несколькими рубчиками, $3,5-5 \times 9,5-19,5$ мкм.

Изучение роста и развития гриба на жидких питательных средах позволило выявить наилучшие по усвояемости источники углерода и азота. Максимальный рост отмечали на среде Чапека с мальтозой, менее активно микромицет развивался при добавлении сахарозы и глюкозы, а наибольшая интенсивность спороношения ($3,2 \times 10^5$ спор/мл) была выявлена на средах с сахарозой и глюкозой. Из источников азота лучше всего микромицет усваивал нитрат натрия и пептон. Кроме того, были определены оптимальная температура для роста и хранения культуры гриба. Максимальная скорость роста отмечена при температуре $24-28^\circ \text{C}$, как при жидкофазном, так и при твердофазном культивировании. Хранение штамма в пробирках на скошенном КСА при температуре $5-8^\circ \text{C}$ без потери активности возможно в течение 1,5 лет (Гасич и др., 2009; Патент..., 2010).

В исследованиях по обоснованию возможностей получения биопрепаратов на основе отселектированных штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 мы особое внимание обращали на их технологичность. Для этого определяли возможности быстрого получения большого количества жизнеспособного и качественного инокулюма (спор, фрагментов мицелия) на доступных и дешевых субстратах, а также сохранность высоких титров жизнеспособных клеток в течение длительного времени. Оптимизацию питательных субстратов проводили при жидкофазной и твердофазной ферментациях в несколько этапов.

5.1. Динамика роста и развития штаммов фитопатогенного гриба *B. papaveris* 1.39 на лабораторных и промышленных питательных средах

На первом этапе оценивали скорости изменения биомассы и количества жизнеспособных единиц родительского штамма *B. papaveris* 1.39 в глубинной

культуре, а также динамику скорости роста и споропродуктивность при твердофазном культивировании (рис. 5.1.1–2).

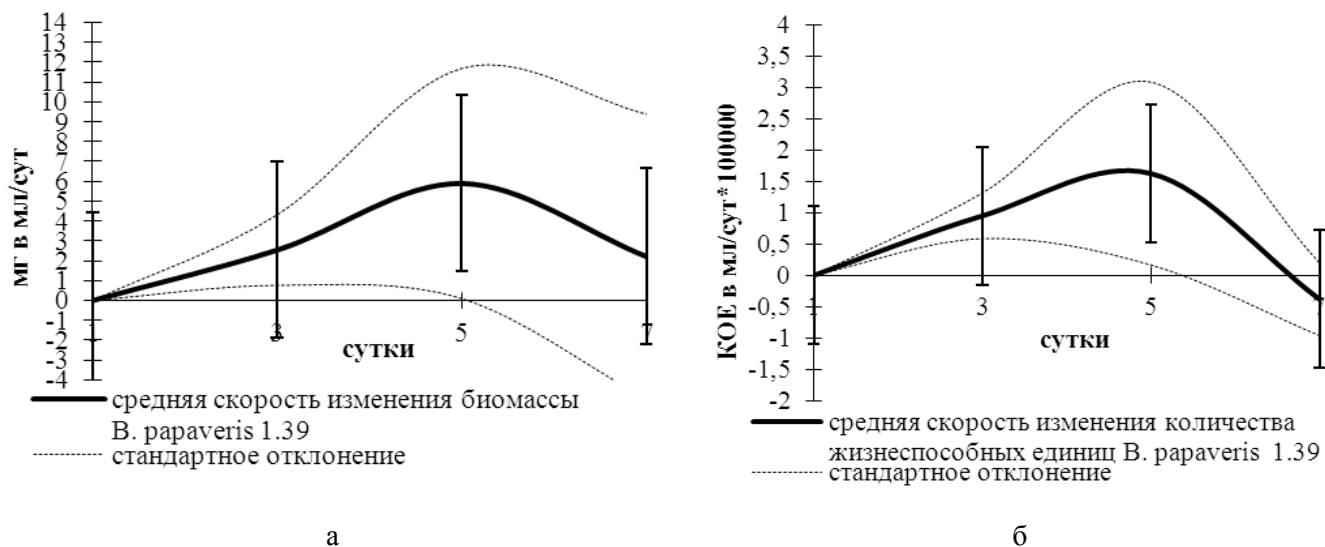


Рис. 5.1.1. Динамика средней скорости изменения биомассы *B. paraveris* 1.39 (а) и количества жизнеспособных единиц (б) в глубинной культуре на среде Чапека.

Развитие *B. paraveris* 1.39 в глубинной культуре на среде Чапека происходит с максимальной скоростью накопления биомассы к 5-м суткам. Четко прослеживается цикл развития от лаг-фазы в течение двух суток до начала апоптоза на восьмые сутки (рисунок 5.1.1 а). Сходная динамика роста и развития отмечена у многих микромицетов при культивировании на искусственных питательных средах (Лили и др., 1953; Промышленная ..., 1989; Коломбет, 2006). Это подтверждается динамикой средней скорости изменения количества жизнеспособных пропагул штамма (рисунок 5.1.1 б). При сравнении данных отмечается сходство развития микромицета по разным показателям (рисунок 5.1.1 а, б).

Сходный характер развития выявлен для штамма *B. paraveris* 1.39 при выращивании на агаре Чапека с той разницей, что максимальную скорость роста культура достигает к 9-м суткам, а цикл развития завершает – к 14-м. Возрастание средней скорости роста штамма после 15-х суток культивирования обусловлено началом массового прорастания и пролиферации конидий. На агаризованной среде Чапека, как и при глубинном культивировании на этой же среде, наблюдалась стабильность колонизации среды, спороношения, типичное нормальное состояние мицелия и спороношения в течение всего периода наблюдений.

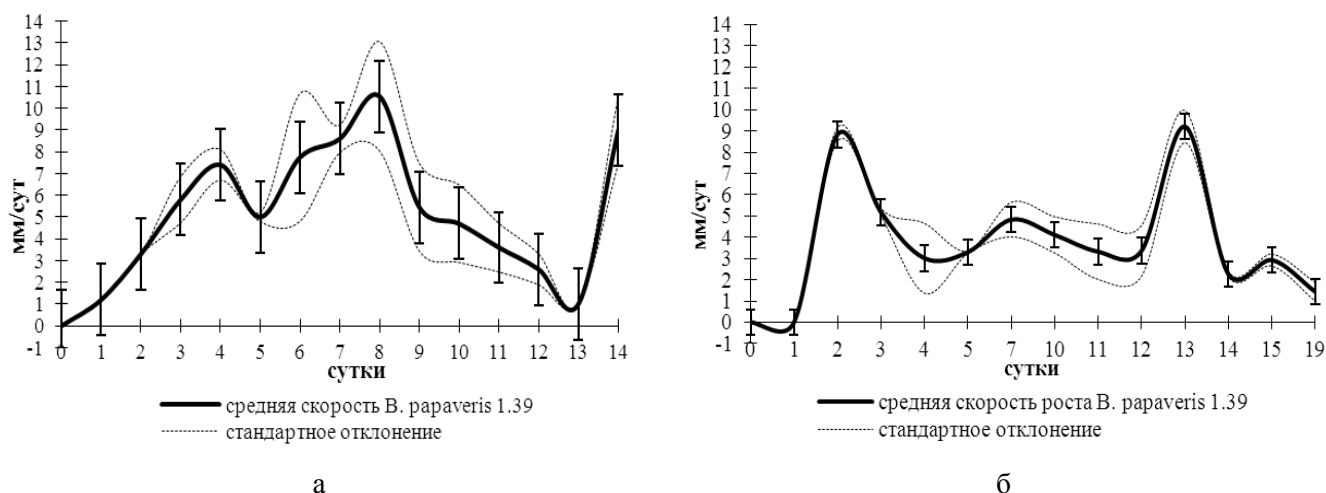


Рис. 5.1.2. Динамика средней скорости роста штамма *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании: а – на агаризованной среде Чапека; б – на отходах культивирования съедобных грибов (конверсионных субстратах).

Вторичная биоконверсия отходов техногенной сферы с помощью штамма *B. papaveris* 1.39 происходит практически с той же скоростью колонизации субстратов, как и агаризованных питательных сред (рисунок 5.1.2 б). Гриб развивается как на поверхности, так и в толще первично конвертированных съедобными макромицетами отходов, с волнообразной споруляцией, начиная со 2-х суток культивирования. В развитии *B. papaveris* 1.39 на конвертированных отходах четко прослеживается явление диауксии (Крыницкая и др., 2003) (рисунок 5.1.2 б). Все конверсионные субстраты содержат в своем составе как легко усваиваемые компоненты (моно и олигосахариды – продукты первичной биоконверсии съедобными базидиомицетами), так и трудно усваиваемые белковые и полисахаридные фракции, наличие которых обусловлено природой конвертируемых субстратов и биохимией мицелия макромицетов. В течение первых двух суток роста к концу первой экспоненциальной фазы происходит утилизация легкодоступной низкомолекулярной углеводной фракции – продуктов первичной биоконверсии субстратов базидиомицетами, после чего следует фаза замедления роста культуры. Подобное явление характерно для развития большинства микроорганизмов и описано в литературе как тропофаза, или фаза сбалансированного роста, характеризующаяся тем, что в культуре происходит быстрое накопление биомассы, сопровождаемое интенсивным потреблением основных компонентов субстрата.

Следующая фаза несбалансированного роста – идиофаза – характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период происходит развитие организма и образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать автолитические процессы, что и приводит к снижению общего количества биомассы. Кроме того, в этот период происходит дерепрессия многих ферментов, что обеспечивает переход к потреблению высокомолекулярной фракции углеводов и белков (Лили и др., 1953; Беккер, 1963; Промышленная ..., 1989; Крыницкая и др., 2003, Коломбет, 2006). В связи с этим, к 12-м суткам роста *B. papaveris* 1.39 на конвертированных отходах техногенной сферы наблюдается наступление новых лаг- и экспоненциальных фаз роста, а на кривой динамики скорости роста – новый пик, почти повторяющий первый. Скорость роста в идиофазе на субстратах в 1.5 – 2 раза ниже, чем на агаризованных питательных средах. В тропофазе наблюдаются близкие значения скорости роста штамма при выращивании на конвертированных отходах и агаризованных питательных средах. Увеличение скорости роста зависит от доступности питательных компонентов субстратов (рисунок 5.1.2). Споропродукция *B. papaveris* 1.39 при глубинном культивировании на порядок выше, чем при твердофазном, как на агаризованных питательных средах, так и на конвертированных отходах – значения титров $1,5 \times 10^5$ КОЕ/мл, $0,2 \times 10^5$ КОЕ/мл и $0,3 \times 10^5$ КОЕ/г соответственно (рисунки 5.1.1 б; 5.1.3).

Таким образом, нами выявлены возможности использования и определен технологический потенциал питательных сред различного состава для глубинного и твердофазного культивирования штамма *B. papaveris* 1.39.

На следующем этапе исследований проводили подбор и оптимизацию питательных субстратов, а также условий культивирования для обеспечения максимальной скорости роста и интенсивности споропродуктивности исходного и отселектированного штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8.

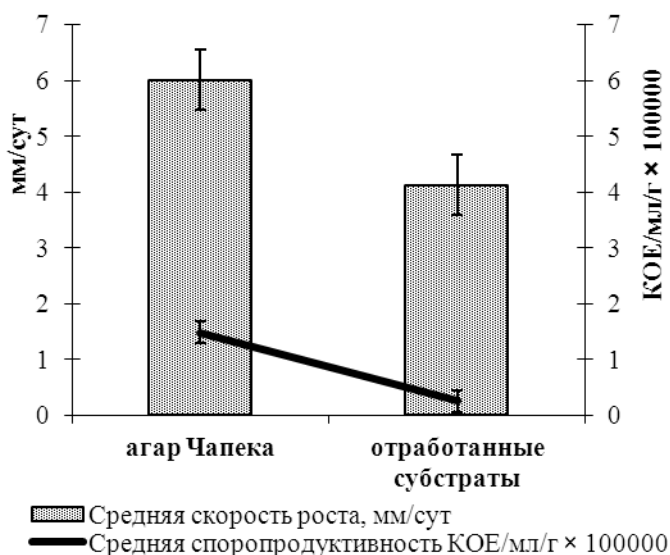


Рис. 5.1.3. Средняя скорость роста и споропродуктивность штамма *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании на стандартной агаризованной среде Чапека и субстратах после культивирования съедобных грибов.

5.2. Подбор и оптимизация питательных сред и условий культивирования отселектированных штаммов *B. papaveris*

Для характеристики состояния культуры штаммов, их роста и развития нами была введена шкала габитусов мицелия (от 1-го до 6-и баллов) и спороношения (от 1-го до 4-х баллов). Оценку развития штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 по приведенной шкале осуществляли в культуральной жидкости при глубинной ферментации и в смывах с агаровых сред и конверсионных субстратов при твердофазной ферментации.

Шкала габитусов мицелия и спороношения

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; признаки 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.

Данные о составе, режимах стерилизации и особенностях питательных сред и субстратов для глубинного и твердофазного культивирования штаммов *B. papaveris* – родительской формы 1.39 и отселектированного 1.39-8 показаны в главе 2 в таблице 2.1.1.

На рисунке 5.2.1 показано развитие штамма *B. papaveris* 1.39 к 7-м суткам культивирования на питательных средах различного состава при жидкофазной ферментации. К 7-м суткам наблюдалось торможение роста, вакуолизация и грануляция содержимого мицелия, прорастание большинства конидий или их лизис. Скрининг всех вышеописанных питательных субстратов выявил активный рост на них биомассы гриба. Однако были отмечены некоторые различия в динамике накопления последней и интенсивности спорообразования в зависимости от состава используемых сред. Наилучшие показатели в динамике изменения габитусов мицелия и спороношения были получены при развитии штамма *B. papaveris* 1.39 на питательных средах СГС-серии (рисунок 5.2.2). Невысокие баллы габитусов мицелия и спороношения *B. papaveris* 1.39 на средах ПП, С, СБ, СС, СЧ, ПГ выявили их низкую технологичность для глубинной ферментации и получения максимального количества биомассы и споропродуктивности. Состояние мицелия, соответствующее баллу 6, и максимальное спороношение получено при выращивании штамма *B. papaveris* 1.39 на соево-глюкозных питательных средах (СГС-серия). Максимальное спорообразование отмечено на 3-и сутки культивирования (рисунок 5.2.2).



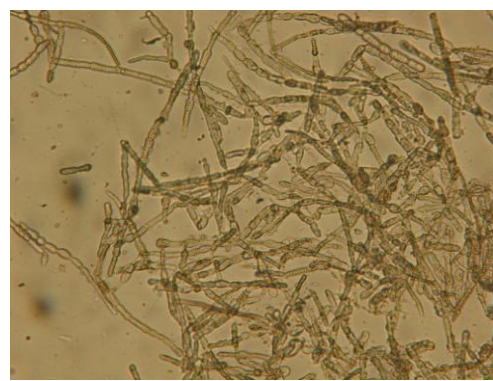
а



б



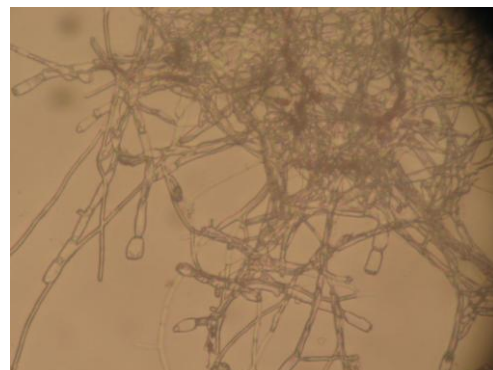
в



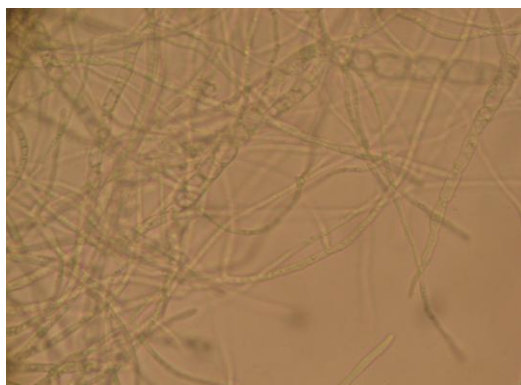
г



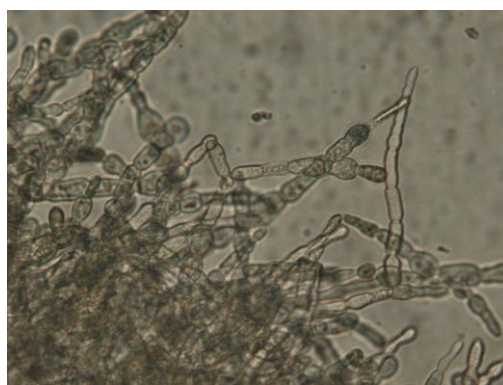
д



е



ж



з

Рис. 5.2.1. Развитие штамма *B. paraveris* 1.39 на жидких питательных средах различного состава (7-е сутки культивирования): а – ПП, увеличение $\times 160$; б – ПП, увеличение $\times 640$; в – С, увеличение $\times 1600$; г – СБ, увеличение $\times 640$; д – СС, увеличение $\times 640$; е – СЧ, увеличение $\times 640$; ж – ПГ, увеличение $\times 640$; з – СГС, увеличение $\times 640$.

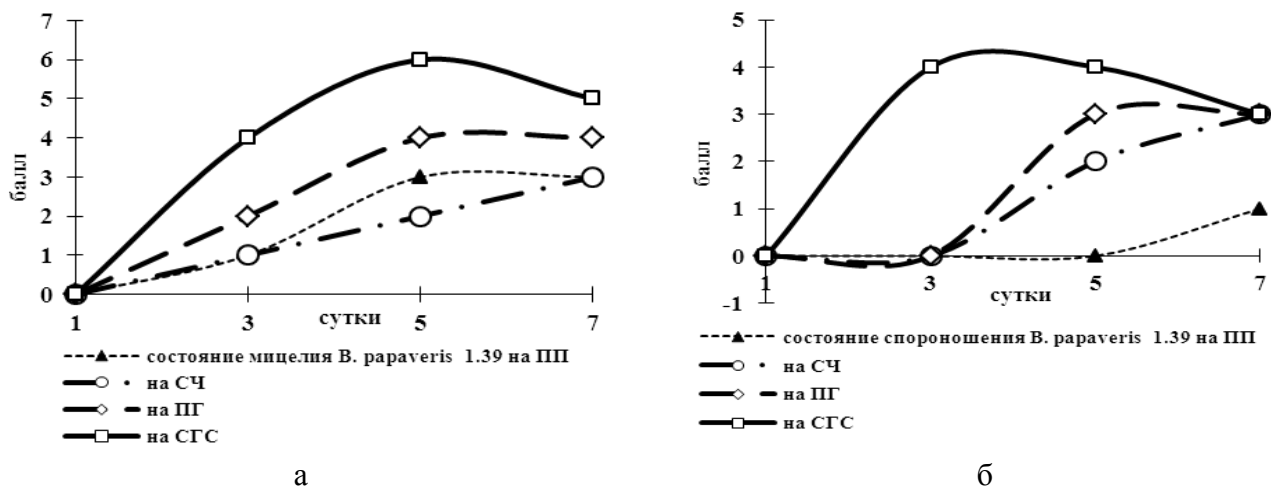


Рис. 5.2.2. Динамика изменения габитусов мицелия (а) и спороношения (б) *B. papaveris* 1.39 в глубинной культуре на питательных средах различного состава: ПП – полная с пептоном; СЧ – среда Чапека; ПГ – пептоно-глюкозная среда; СГС – соево-глюкозные среды.

На 4-х питательных средах (С – жидкое сусло; СБ – среда Борисова; СБЯ – среда Борисова на яичном порошке; СС – среда Сабуро; СЧ – среда Чапека) наблюдали постоянный прирост биомассы в течение срока наблюдений, хотя этот прирост был минимальным и не превышал 1,5–2 мг/мл/сутки (рисунок. 5.2.3).

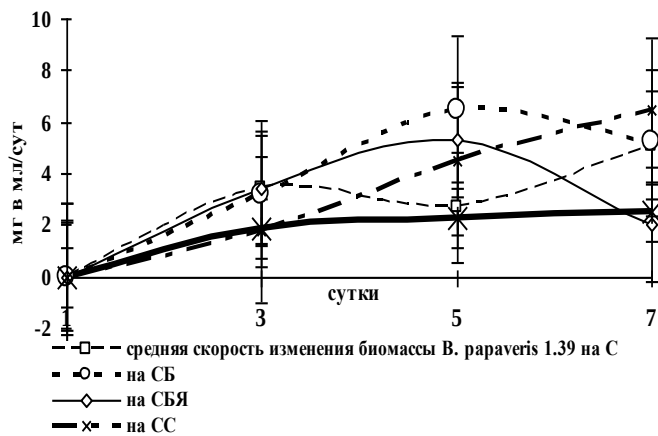


Рис. 5.2.3. Динамика изменения биомассы *B. papaveris* 1.39 в глубинной культуре на питательных средах различного состава: С – жидкое сусло; СБ – среда Борисова; СБЯ – среда Борисова на яичном порошке; СС – среда Сабуро; СЧ – среда Чапека.

Введение минеральных солей в состав питательной среды (ССС – синтетическая среда с солями) приводило к некоторому увеличению накопления биомассы *B. papaveris* 1.39 (рисунок 5.2.4).

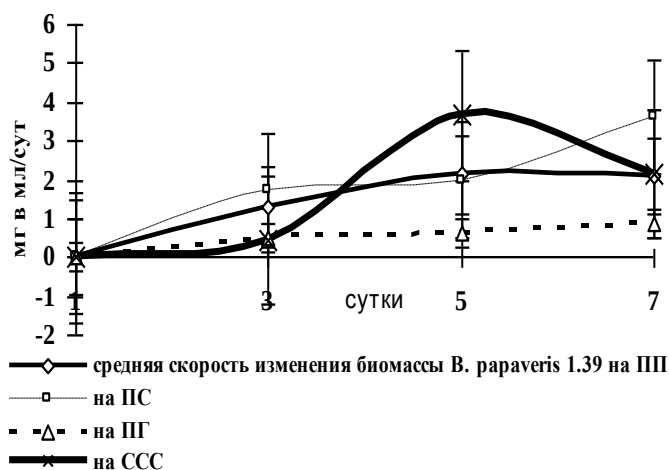


Рис. 5.2.4. Динамика изменения биомассы *B. papaveris* 1.39 в глубинной культуре на питательных средах различного состава: ПП – полная с пептоном; ПС – пептоно-сахарозная среда; ПГ – пептоно-глюкозная среда; ССС – синтетическая среда с солями.

Максимальная скорость накопления биомассы отмечена на СГС второй модификации (СГС-2), содержащей набор минеральных солей. Она в 1,5–6 раз превышала средние скорости накопления биомассы микромицетом на СГС-серии и других питательных средах (рисунок 5.2.5). Оптимизированная по солевого составу питательная среда для глубинного культивирования *B. papaveris* 1.39 позволяла получать максимальный выход биомассы мицелия и высокий титр спор ($\times 10^5$ КОЕ/мл) в процессе роста штамма. Эти данные подтверждаются высокой стабильностью накопления биомассы микромицета в течение цикла развития на СГС-2, чего не наблюдается на других средах той же серии (рисунок 5.2.5).

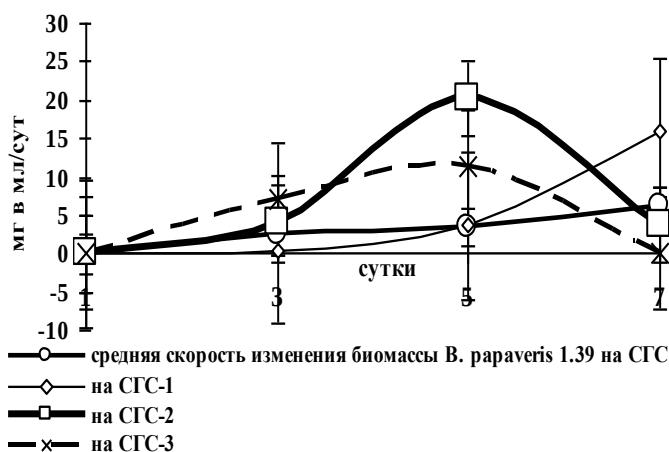


Рис. 5.2.5. Динамика изменения биомассы *B. papaveris* 1.39 в глубинной культуре на соево-глюкозных питательных средах различного состава (СГС; СГС-1; СГС-2; СГС-3).

Динамика средней скорости нарастания биомассы штамма-продуцента на других питательных средах сходна: в 8 из 13 случаев на исследованных питательных средах наблюдается максимум средней скорости к 5-м суткам. Увеличение количества минеральных солей в составе питательных сред приводило к

стабилизации накопления биомассы и споропродукции *B. papaveris* 1.39 (рисунок 5.2.3–4).

В таблице 5.2.2 приведены данные по накоплению биомассы родительского штамма *B. papaveris* 1.39 к 3-м и 5-ти суткам жидкофазной ферментации. Как видно из таблицы, штамм *B. papaveris* 1.39 активно развивается на большинстве из исследованных сред.

Таблица 5.2.2

Влияние состава питательной среды на накопление биомассы штаммом *B. papaveris* 1.39 при глубинном культивировании

Наименование питательной среды	Масса сухого мицелия (мг/мл)	
	3-и сутки	5-е сутки
Полная с пептоном, ПП	4,6	10,6
Жидкое сусло, С	6,8	12,2
Пептоно-глюкозная среда, ПГ	1,1	2,3
Пептоно-глюкозная с солями, ПГС	3,4	7,4
Пептоно-сахарозная, ПС	0,7	3,2
Среда Борисова, СБ	6,4	19,4
Среда Борисова на яичном порошке, СБЯ	6,9	17,5
Среда Сабуро, СС	3,6	12,6
Среда Чапека, СЧ	3,8	8,4
Синтетическая среда, ССС	2,7	6,2
Соево-глюкозная среда, СГС	5,8	36,5
Соево-глюкозная среда с солями 1, СГС-1	0,9	8,2
Соево-глюкозная среда с солями 2, СГС-2	7,9	48,5
Соево-глюкозная среда с солями 3, СГС-3	14,5	37,5
Стандартная ошибка	0,9	3,8

Медленнее всего микромицет образует биомассу на пептонной среде, среде Сабуро и среде Чапека. Наиболее активно – на средах Борисова и соево-глюкозных средах. Накопление биомассы к 5-м суткам культивирования составило 19,4 мг/мл и 48,5 мг/мл, соответственно. Наибольшее количество мицелиальной массы (48,5 мг/мл) отмечено при развитии штамма *B. papaveris* 1.39 на соево-глюкозной питательной среде с солями (СГС-2) (таблица 5.2.2).

Таким образом, штамм *B. papaveris* 1.39 развивается с типичным для вида спороношением в глубинной культуре на средах разного состава в течение 7-ми

суток с лаг-фазой до двух суток и началом апоптоза на 8-е сутки. Для глубинного культивирования оптимальны соево-глюкозные питательные среды (СГС-серия), на которых споропродуктивность максимальна уже на 3-и сутки культивирования. СГС-2 с добавлением солей обеспечивает максимальный выход биомассы и высокий титр спор ($\times 10^5$ КОЕ/мл). Кроме того, повышение содержания неорганических солей в составе питательной среды для глубинного культивирования приводит к стабильности в накоплении биомассы и споропродукции.

На рисунке 5.2.6 показано развитие отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 к 7-м суткам культивирования на питательных средах различного состава при жидкофазной ферментации.

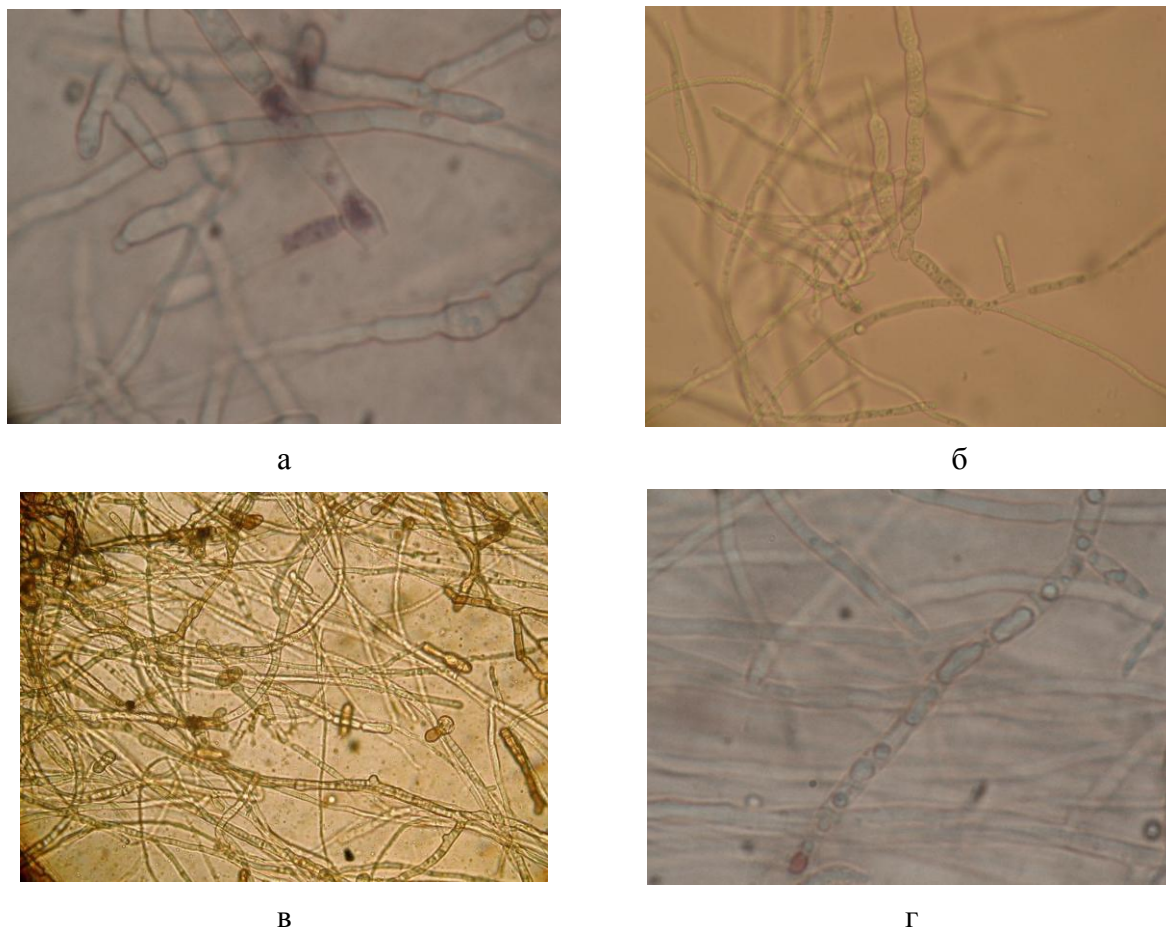


Рис.5.2.6. Развитие *B. papaveris* 1.39-8 на жидких питательных средах различного состава (7-е сутки культивирования): а – ПГ, увеличение $\times 1600$; б – ССС, увеличение $\times 640$; в – СЧ, увеличение $\times 320$; г – СГС, увеличение $\times 640$.

Опираясь на данные, полученные при оптимизации сред и условий жидкофазной ферментации для развития родительского штамма *B. papaveris* 1.39,

скрининг всех вышеописанных питательных сред не проводили. В опыты вошли, наряду с оптимизированными для родительского штамма питательными средами СГС-серии, контрольные синтетические среды (СЧ – среда Чапека и ССС – синтетическая среда с солями) и пептон содержащие среды (ПП – полная с пептоном; ПС – пептоно-сахарозная среда; ПГ – пептоно-глюкозная). Как и в случае родительского штамма, в развитии *B. papaveris* 1.39-8 на всех исследованных средах наблюдался максимум роста к 5-м суткам культивирования. К 7-м суткам наблюдали торможение роста, вакуолизацию и грануляцию содержимого мицелия (рисунок 5.2.6).

В таблице 5.2.3 представлены данные по накоплению биомассы отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 к 3-м и 5-ти суткам жидкофазной ферментации на различных питательных средах. Активнее всего рост и развитие штамма *B. papaveris* 1.39-8 происходит на оптимизированной соево-глюкозной среде с солями (СГС-2). Увеличение количества неорганических солей в составе питательных сред приводило к стабилизации накопления биомассы и споропродукции *B. papaveris* 1.39-8 (таблица. 5.2.3).

Таблица 5.2.3

Влияние состава питательных сред на динамику накопления биомассы отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 при глубинном культивировании

Наименование питательной среды	Масса сухого мицелия (мг/мл)	
	3-и сутки	5-е сутки
Полная с пептоном, ПП	4,5	7,6
Пептоно-глюкозная среда, ПГ	3,8	6,9
Пептоно-сахарозная, ПС	6,2	10,3
Среда Чапека, СЧ	5,8	9,6
Синтетическая среда, ССС	6,6	11,2
Соево-глюкозная среда, СГС	7,4	12,5
Соево-глюкозная среда с солями 1, СГС-1	17,4	29,1
Соево-глюкозная среда с солями 2, СГС-2	27,2	44,8
Соево-глюкозная среда с солями 3, СГС-3	8,4	14,3
Стандартная ошибка	2,5	4,2

Характеристика мицелия и спороношения микромицета *B. papaveris* 1.39-8 на разных сроках культивирования, на некоторых питательных средах представлена в таблице 5.2.4.

Таблица 5.2.4

Особенности развития штамма *B. papaveris* 1.39-8 на различных питательных средах

Среда	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
Полная с пептоном, ПП	Мицелий тонкий, почкующийся. Концы гиф окрашены слабо. Спор нет. Мелкие пеллеты. Культуральная жидкость (КЖ) не окрашена, мицелиальное кольцо не окрашено.	Мицелий тонкий, ветвистый, негранулированный. Края гиф сильно утончены. Спор нет. Есть почкующиеся дрожжеподобные структуры. КЖ не окрашена, мицелиальное кольцо плотное, волосистое, спороношение необильное. Мелкие пеллеты. Хламидоспоры.	Мицелий волосистый, фрагментированный. Единичные хламидоспоры. На мицелиальном кольце – интенсивное спорообразование, есть конидии. КЖ не окрашена.
Среда Чапека, СЧ	Мицелий разного диаметра, почкующийся, паутинистый, не гранулированный, спор нет. КЖ не окрашена, мицелиальное кольцо не окрашено.	Мицелий длинный, очень ветвистый, почкующийся, не гранулированный. Много зрелых конидий (3-5 перегородки), прорастают. Хламидоспор не много, зрелые. КЖ не окрашена. Мицелиальное кольцо черное от обилия конидий.	Мицелий слабый, ветвистый. Много конидий на конидиеносцах. Конидии с перегородками. КЖ не окрашена
Пептоно-глюкозная среда, ПГ	Мицелий почкующийся, ветвистый, не гранулированный, тонкий. Спор нет. Мелкие пеллеты. Мицелиальное кольцо паутинистое, не окрашено. КЖ не окрашена.	Мицелий толстый, ветвистый, септированный, обильный, почкующийся. Конидии с 2–5 перегородками, содержимое зернистое. Хламидоспоры единичные, КЖ не окрашена. Мицелиальное кольцо мощное, волосистое, с обильным спороношением. Много спороносящих пеллет.	Мицелий мощный, дрожжеподобный, волосистый, фрагментированный, содержимое гранулированное. Хламидоспоры в небольшом количестве. Конидий нет. Много пеллет веретеновидной формы. КЖ не окрашена.
Соево-глюкозная среда с солями 2, СГС-2	Аморфная споромицелиальная масса. Мицелий тонкий, шнуровидный, спор нет. Мицелиальное кольцо мощное, ватобразное, не окрашено. КЖ не окрашена	Мицелий очень лохматый, длинный, ветвистый, но тонкий, почкующийся, присутствуют вакуоли. Есть дрожжеподобные структуры. Грануляция в гифах. КЖ не окрашена. Мицелиальный валик мощный, волосистый, со спороношением. Пеллет нет.	Мицелиально-споровая масса активно поверхностно спороносит. Мощный волосистый мицелиальный валик с обильным спороношением. КЖ не окрашена.

Спорообразование микромицета наблюдали на всех исследованных средах, но наиболее активно штамм *B. papaveris* 1.39-8 образовывал конидии на пептоно-глюкозной и соево-глюкозной средах (СГС-2): к 5-м суткам культивирования титр

жизнеспособных единиц гриба составил $4,6 \times 10^5$ КОЕ/мл для пептоно-глюкозной и $6,6 \times 10^5$ КОЕ/мл для СГС-2. Следует отметить, что при глубинном культивировании на всех средах СГС-серии, в отличие от других питательных сред, титр жизнеспособных единиц сохранялся и на 7-е сутки (таблица. 5.2.5).

Таблица 5.2.5

Влияние состава питательной среды на споропродуктивность
штамма *B. papaveris* 1.39-8 в глубинной культуре

Среда	Титр жизнеспособных единиц гриба (КОЕ/мл $\times 10^5$)		
	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
Пептоно-глюкозная, ПГ	1,1	1,7	-
Пептоно-глюкозная с солями, ПС	2,9	4,6	-
Соево-глюкозная среда, СГС	1,4	1,8	-
Соево-глюкозная среда с солями 1, СГС-1	1,6	3,6	3,2
Соево-глюкозная среда с солями 2, СГС-2	1,7	6,6	6,0
Соево-глюкозная среда с солями 3, СГС-3	2,7	6,6	3,5
Стандартная ошибка	0,3	0,9	0,8

Данные по различиям в средней скорости накопления биомассы при жидкофазной ферментации на питательных средах различного состава родительского и отселектированного штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 представлены на рисунке 5.2.7. Сравнение средних скоростей роста штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при глубинном культивировании показывает, что наиболее активно микромицеты накапливают биомассу на оптимизированной по минеральному и углеводному составу соево-глюкозной среде 2-ой модификации (СГС-2) (рисунок 5.2.7). Кроме того, как было показано выше в таблице 5.2.5, именно на этой среде фиксировали максимальную споропродуктивность штамма *B. papaveris* 1.39-8, а также его наиболее стабильную и высокую споропродукцию (сохранение самого высокого титра КОЕ/мл для штамма *B. papaveris* 1.39-8) (таблица 5.2.5).

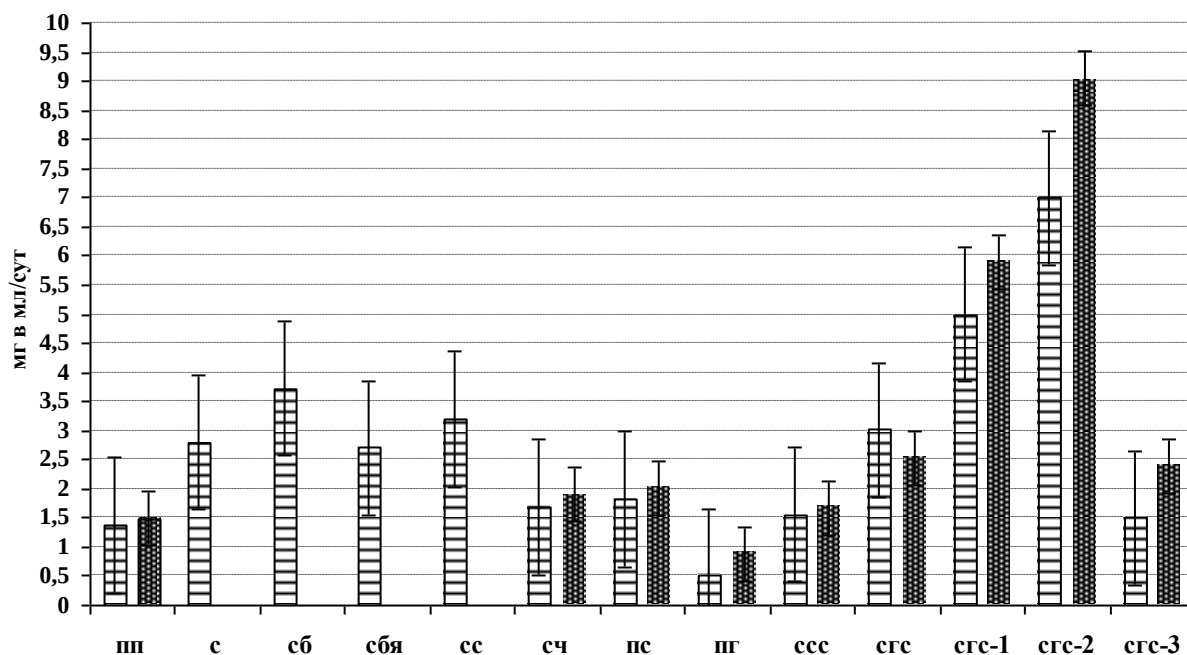


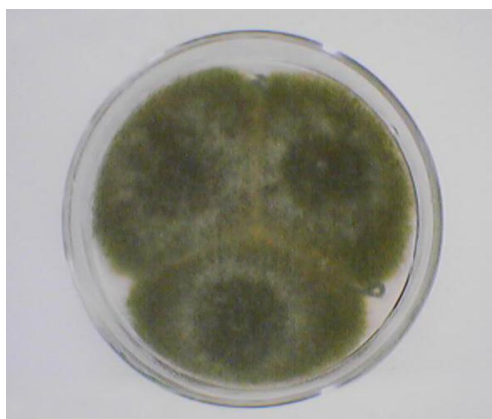
Рис. 5.2.7. Средняя скорость накопления биомассы штаммами *B. paraveris* 1.39 и 1.39-8 в глубинной культуре на питательных средах различного состава: ПП – полная с пептоном; С – жидкое сусло; СБ – среда Борисова; СБЯ – среда Борисова на яичном порошке; СС – среда Сабуро; СЧ – среда Чапека; ПС – пептоно-сахарозная среда; ПГ – пептоно-глюкозная среда; ССС – синтетическая среда с солями; СГС – соево-глюкозные среды в 4 модификациях (СГС; СГС-1; СГС-2; СГС-3).

Таким образом, на основании анализа данных проведенных исследований в дальнейшей работе для получения лабораторных образцов биопрепарата на основе отселектированного штамма *B. paraveris* 1.39-8 методом жидкофазной ферментации использовали оптимальную соево-глюкозную питательную среду с солями (СГС-2).

Результаты оценки вторичной биоконверсии смесей субстратов после культивирования съедобных грибов с помощью родительского штамма *B. paraveris* 1.39 выявили возможность эффективного использования первично конвертированных ксилотрофами отходов сельского хозяйства и лесоперерабатывающей промышленности. Для оптимизации составов конверсионных субстратов и условий твердофазной ферментации на них родительского и отселектированного штаммов *B. paraveris* 1.39 и 1.39-8 производили их культивирование на промышленных субстратах, первично конвертированных вешенкой (*Pleurotus ostreatus*) и шиитаке (*Lentinus edodes*) в искусственном возделывании последних для получения плодовых тел. Кроме того, оценивали потенциал дважды конверсионных субстратов, используя первично

конвертированные *L. edodes* субстраты для выращивания и получения на них плодовых тел *P. ostreatus*. В качестве контроля использовали синтетическую агаризованную среду Чапека и картофеле-сахарозный агар (КСА).

Рост и развитие родительского штамма *B. papaveris* 1.39 при твердофазном культивировании показаны на рисунке 5.2.8.



а



б



в



г

Рис. 5.2.8. Развитие штамма *B. papaveris* 1.39 на агаризованных питательных средах и конверсионных субстратах различного состава: а – агаризованная среда Чапека; б – КШС; в – КВС; г – КШВС.

Как видно из рисунка 5.2.8, штамм *B. papaveris* 1.39 активно колонизируют промышленные конверсионные отходы, прорастая в толщу субстрата и образуя воздушный и субстратный мицелий. Развитие штамма сопровождается волнообразной споруляцией, начинающейся с третьих суток культивирования. Смыв микромицета с субстрата и его последующее микроскопирование показывают

наличие хорошо развитого мицелия и множество конидий штамма *B. papaveris* 1.39 (рисунок 5.2.9).



а



б



в

Рис. 5.2.9. Габитус мицелия и спороношения штамма *B. papaveris* 1.39 (7-е сутки культивирования) на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): а – КШС, увеличение $\times 640$; б – КВС, увеличение $\times 1600$; в – КШВС, увеличение $\times 320$.

После формирования первой волны спороношения штамма наступает период массового прорастания конидий и дальнейшая колонизация конверсионных субстратов. По мере освоения конверсионных субстратов наступает новая волна спороношения штамма *B. papaveris* 1.39: этот процесс фиксировали в смывах мицелия и спороношения родительского штамма с поверхности конверсионных отходов промышленного грибоводства (рисунок 5.2.9). Габитус мицелия и интенсивность спороношения при твердофазной ферментации на агаровых питательных средах штамма *B. papaveris* 1.39 соответствовал таковому при жидкофазной ферментации на средах того же состава.

Рост и развитие отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 при твердофазном культивировании на агаризованных питательных средах и

конверсионных отходах промышленного культивирования съедобных макромицетов показаны на рисунке 5.2.10.

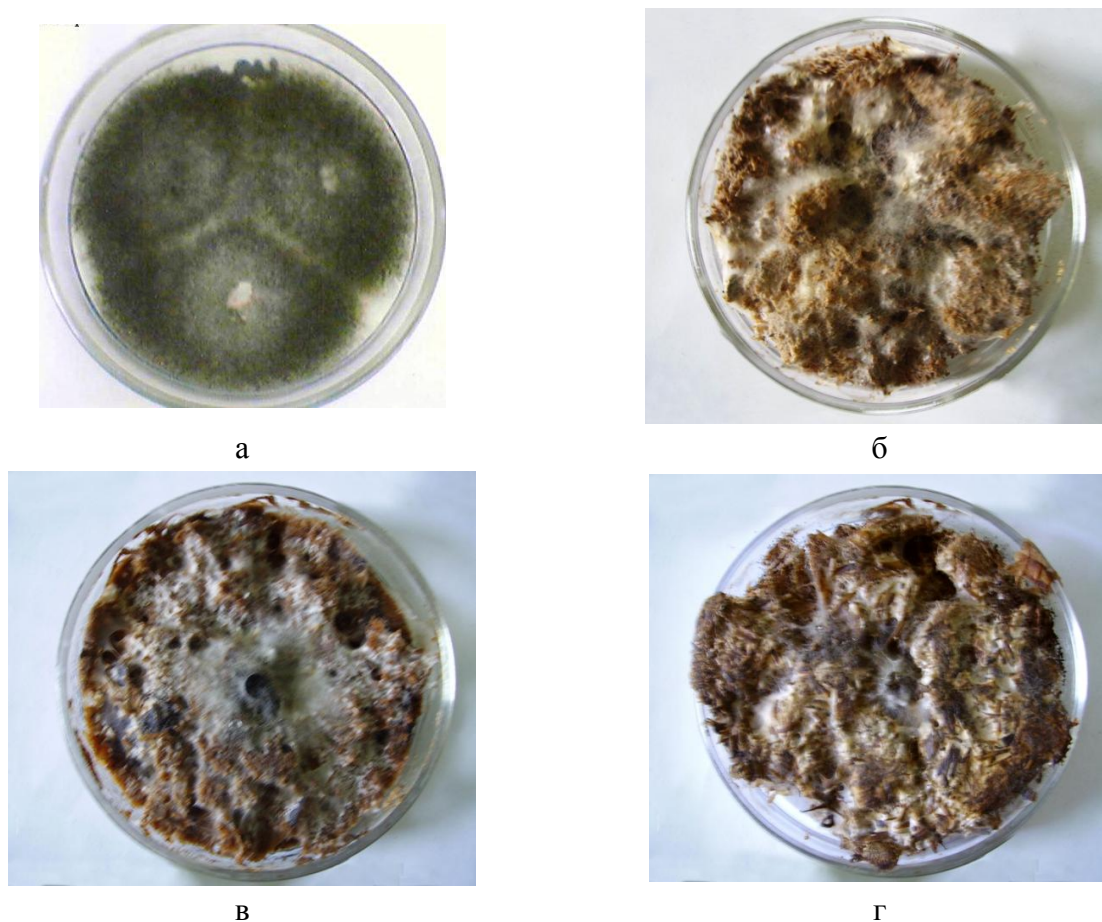


Рис. 5.2.10. Развитие штамма *B. papaveris* 1.39-8 на питательных средах и конверсионных субстратах различного состава: а – агаризованная среда Чапека; б – КШС; в – КВС; г – КШВС.

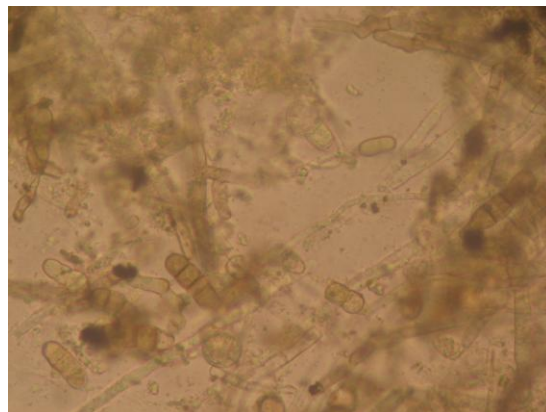
Как и в случае родительского штамма, *B. papaveris* 1.39-8 активно колонизирует промышленные конверсионные отходы, прорастая в толщу субстрата и образуя воздушный и субстратный мицелий. И в данном случае развитие штамма сопровождается волнообразной споруляцией, начинающейся с третьих суток культивирования. Смывы мицелия и спороношения с субстрата показали наличие обильного мицелия и множества зрелых конидий штамма *B. papaveris* 1.39-8 (рисунок 5.2.11).

Сходные процессы массового прорастания конидий и дальнейшей колонизации конверсионных субстратов наблюдали в процессе развития *B. papaveris* 1.39-8 (рисунок 5.2.11). Габитус мицелия и спороношения при

твёрдофазной ферментации на агаровых питательных средах штамма *B. papaveris* 1.39-8 также вполне соответствовал таковым при жидкофазной ферментации на средах того же состава.



а



б



в

Рис. 5.2.11. Габитус мицелия и спороношения штамма *B. papaveris* 1.39-8 (7-е сутки культивирования) на конверсионных субстратах различного состава (смыв с субстрата): а – КШС, увеличение $\times 1600$; б – КВС, увеличение $\times 320$; в – КШВС, увеличение $\times 640$.

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).

Данные по динамике скоростей роста *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при твёрдофазной ферментации представлены на рисунке 5.2.12.

При развитии мицелия гриба на синтетической среде короткая лаг-фаза и высокая первоначальная скорость роста на 2–3-и сутки роста свидетельствует о питании микромицета на инокуляте. Максимальная скорость в контроле на агаризованных питательных средах наблюдается на 5–6-е сутки. Как видно из

рисунка 5.2.12, штаммы *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8, вторично конвертирующие субстраты после выращивания съедобных грибов, характеризуются достаточно высокими, близкими к контрольным, но не стабильными скоростями роста. Оба штамма выявили диауксию при развитии на конверсионных субстратах, наиболее выраженную при вторичной биоконверсии первично конвертированных шии-таке субстратов: было отмечено 2 четко выраженных пика на 3–5-е и на 15–16-е сутки роста (рисунок 5.2.12).

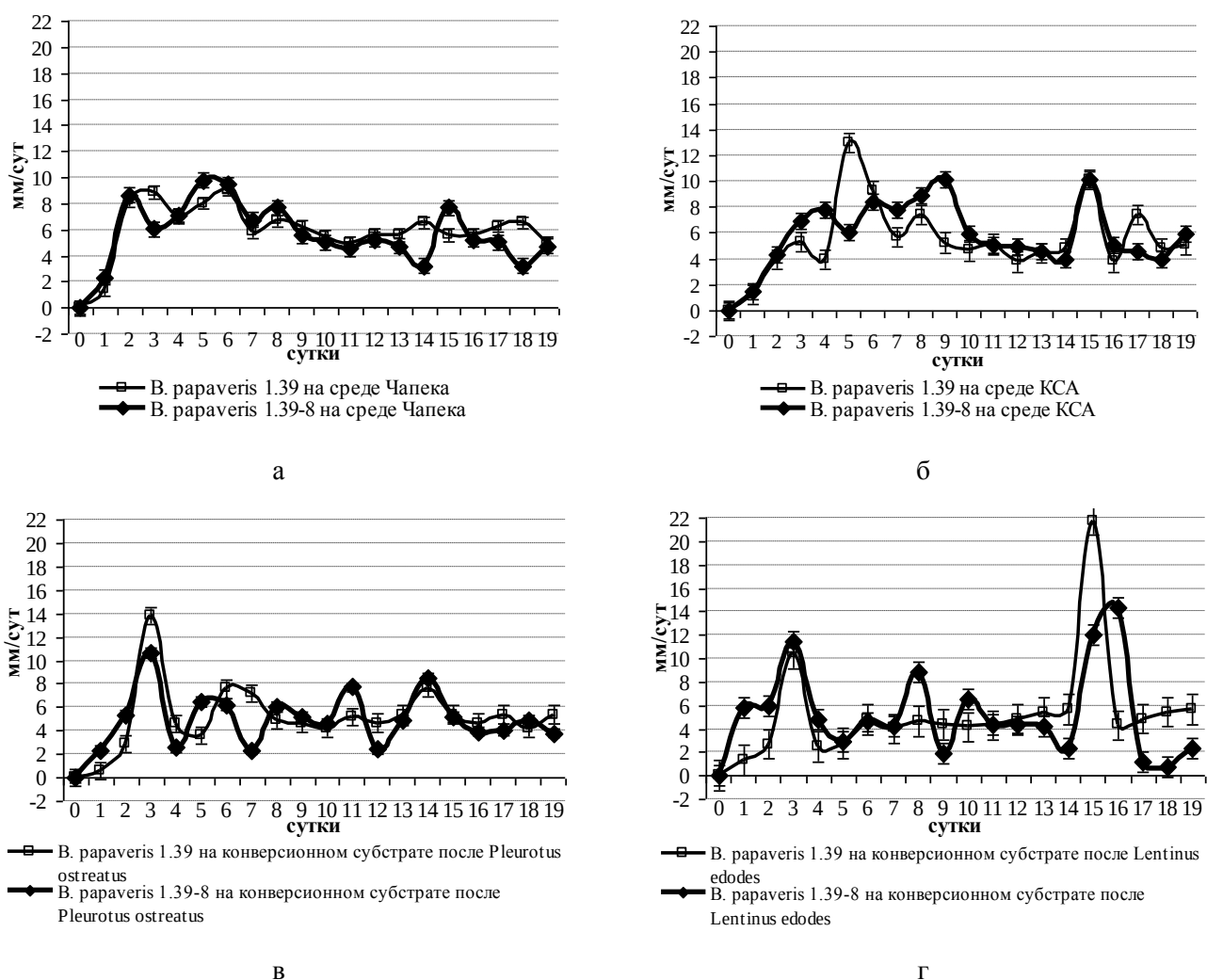


Рис. 5.2.12. Динамика средней скорости роста (мм/сут) штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8: а – на агаризованной среде Чапека; б – на агаризованной картофельно-сахарозной среде (КСА); в – на субстрате, первично конвертированном вешенкой (*P. ostreatus*) – КВС; г – на субстрате, первично конвертированном шии-таке (*L. edodes*) – КШС.

Максимальную скорость роста обоих штаммов наблюдали на 3-и сутки при выращивании на субстрате, первично конвертированном вешенкой (*P. ostreatus*), и

на 15-е сутки – на субстрате, первично конвертированном шии-таке (*L. edodes*). Различия в скоростях роста *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 большей частью находятся в пределах ошибки измерений, но по интегральным значениям кривых динамики скоростей роста *B. papaveris* 1.39-8 немного превосходит родительский штамм для всех исследованных субстратов (рисунок 5.2.12). Средние скорости роста штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при выращивании их, как на синтетических питательных средах, так и на промышленных отработанных субстратах находятся в пределах ошибки измерений (рисунок 5.2.13.)

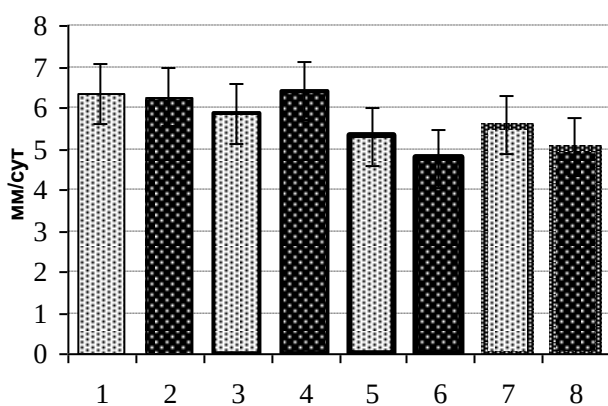


Рис. 5.2.13. Средняя скорость роста (мм/сут) штаммов: 1 – *B. papaveris* 1.39, 2 – *B. papaveris* 1.39-8 на агаризованной среде Чапека; 3 – *B. papaveris* 1.39, 4 – *B. papaveris* 1.39-8 на КСА; 5 – *B. papaveris* 1.39, 6 – *B. papaveris* 1.39-8 на промышленном субстрате после *P. ostreatus* – КВС; 7 – *B. papaveris* 1.39, 8 – *B. papaveris* 1.39-8 на промышленном субстрате после *L. edodes* – КШС.

Как видно из представленных на рисунке 5.2.14 данных, споропродуктивность штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при вторичной биоконверсии с их помощью отработанных промышленных субстратов, практически одинакова и не превышает контрольные значения. Обращает на себя внимание перманентный характер спорообразования обоих штаммов на конверсионных субстратах, особенно выраженный при культивировании на отходах промышленного производства вешенки. Это явление показывает диауксийный тип твердофазной ферментации конверсионных субстратов и волнообразную споруляцию до истощения их доступных питательных компонентов. Спородуктивность штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при твердофазной ферментации на синтетических агаризованных питательных средах имеет максимум, особенно выраженный у родительского штамма (рисунок 5.2.14).

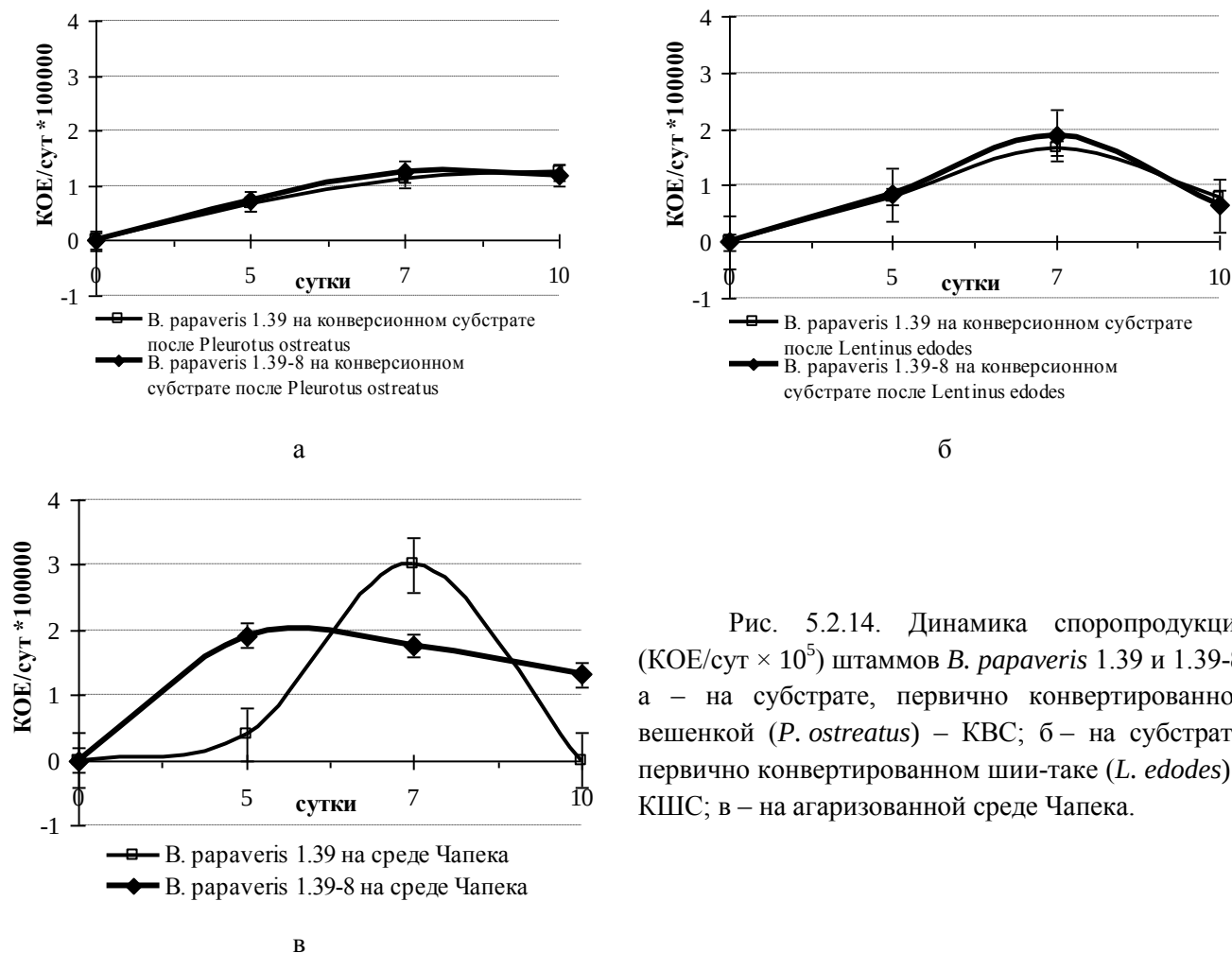


Рис. 5.2.14. Динамика споропродукции ($\text{КОЕ/сут} \times 10^5$) штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8: а – на субстрате, первично конвертированном вешенкой (*P. ostreatus*) – КВС; б – на субстрате, первично конвертированном шиитаке (*L. edodes*) – КШС; в – на агаризованной среде Чапека.

Сравнение средних скоростей споропродукции при твердофазной ферментации штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 на агаризованной среде Чапека и конверсионных субстратах различного состава представлено на рисунке 5.2.15.

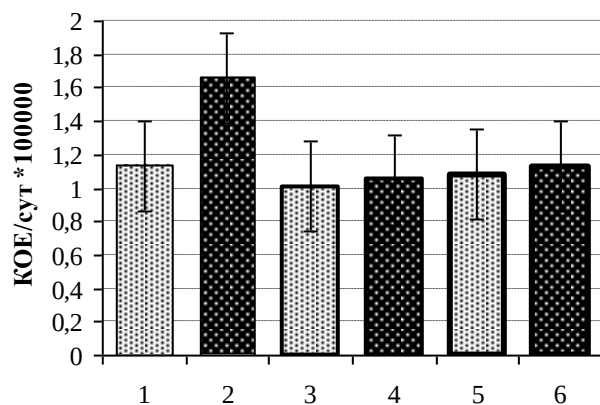


Рис. 5.2.15. Средняя скорость споропродукции ($\text{КОЕ/сут} \times 10^5$) штаммов: 1 – *B. papaveris* 1.39, 2 – *B. papaveris* 1.39-8 на агаре Чапека; 3 – *B. papaveris* 1.39, 4 – *B. papaveris* 1.39-8 на промышленном субстрате после *P. ostreatus* – КВС; 5 – *B. papaveris* 1.39, 6 – *B. papaveris* 1.39-8 на промышленном субстрате после *L. edodes* – КШС.

Как видно из представленных на рисунке 5.2.15 данных, споропродуктивность штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 на конверсионных субстратах находится в пределах ошибки измерений, и только на синтетическом агаре Чапека штамм *B. papaveris* 1.39-8 превосходит по споропродуктивности практически в 2 раза родительский штамм *B. papaveris* 1.39. Общая споропродуктивность штаммов-продуцентов при твердофазной и жидкофазной ферментациях на оптимизированных субстратах и средах практически одинакова, стабильна и достигает $5-7 \times 10^5$ КОЕ/мл (г) (таблица 5.2.5, рисунок 5.2.15).

Таким образом, в процессе оптимизации питательных субстратов и условий культивирования отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 были выявлены высокие технологические потенциалы соево-глюкозной питательной среды с солями (СГС-2) для жидкофазной ферментации и конверсионных отходов производства *L. edodes* для твердофазной ферментации, обеспечивающие скорости роста штамма 9,1 мг/мл/сут и 5,2 мм/сут; споропродуктивность $6,6 \times 10^5$ КОЕ/мл и $5,4 \times 10^5$ КОЕ/г соответственно.

Для получения лабораторных образцов биопрепаратов на основе отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 в дальнейшей работе использовали соево-глюкозную питательную среду с солями (СГС-2) и конверсионные субстраты после *L. edodes*.

Глава 6. Биологическая эффективность лабораторных образцов и опытных партий биопрепаратов на основе штаммов *B. 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 не только в модельных вегетационных, но 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; Штерншис, 2006; Шипилова и др., 2011; Павлюшин и др., 2013). Выявление возможностей и оценка эффективности совместного и последовательного применения биопрепаратов и гербицидов привело к формированию интегрированного биологического метода контроля нежелательной растительности, совмещающего различные биологические и химические средства, а также позволяющего существенно снизить нормы расхода и кратность обработок (Исаева, 1985, 1987; Christy et al., 1993; Гасич, 1995; Gressel et al., 1997; Новикова и др., 2003; Штерншис, 2006; Гасичи др., 2007; Маханькова и др., 2009; Долженко и др., 2010, 2012; Gressel, 2010; Бурлакова, 2012). Исследованиями сотрудников ГНУ ВИЗР отобраны перспективные химические гербициды из группы сульфонилмочевин, а также на основе метрибузина, характеризующиеся высокой избирательностью и фитотоксичностью, способные поражать целевые растения в период вегетации от всходов до формирования органов плодоношения (Бурлакова, 2010, 2012; Бурлакова и др., 2012, Павлюшин и др., 2013). Потенциал совместного или последовательного применения химических и биогербицидов может быть успешно реализован в случае совместимости различных групп препаратов, когда химические гербициды не оказывают негативного действия на агентов биоконтроля (Павлюшин и др., 2013). Разделение во времени применения биологических и химических средств позволяет снизить негативное действие и обеспечить значительное нарастание эффективности обработок с потерей биомассы и

ассимиляционной поверхности листьев целевых растений до 100 % (Павлюшин и др., 2013).

При оценке биологической эффективности лабораторных образцов биопрепаратов на основе отселектированных штаммов *B. 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 *B. papaveris* 1.39-8 и гербицидов. При этом оценивали показатели скорости роста штамма-продуцента, вредоносности поражений, биометрические показатели развития и гибели растений мака.

6.1. Оценка эффективности лабораторного образца на основе штамма *B. papaveris* 1.39 против мака снотворного в полевых условиях

Для подбора оптимальной инфекционной дозы и оценки биологической эффективности лабораторного образца жидкой препаративной формы на основе штамма *B. papaveris* 1.39 против растений мака была проведена серия полевых мелкоделяночных опытов. Растения мака опрыскивали водными суспензиями гриба с различной концентрацией инфекционных единиц микромицета: $\times 10^3$ – $\times 10^5$ КОЕ/мл. Симптомы поражения целевых растений представлены на рисунке 6.1.1.



а



б



в

Рис. 6.1.1. Симптомы поражения мака снотворного на 7-е сутки после опрыскивания водной суспензией пропагул *B. papaveris* 1.39 с титром $\times 10^5$ КОЕ/мл (полевой опыт): а – контроль; б – хлорозы; в – некрозы листовой поверхности.

После обработки на всех розетках листьев у растений мака появились хорошо заметные хлорозы (2–4 балла) и некрозы (2–4 балла). Распространенность микоза мака через 7 суток после обработки растений достигла 19,2–50,6 %, а развитие болезни – 8,5–21,8% в зависимости от инфекционной дозы (таблица 6.1.1).

Таблица 6.1.1

Эффективность лабораторного образца жидкой препаративной формы на основе штамма *B. papaveris* 1.39 против мака снотворного в полевых условиях
(опытное поле ГНУ ВИЗР)

Вариант опыта, титр КОЕ/мл	Распространенность болезни, %	Развитие болезни, %
10^5	50,6	21,8
10^4	48,2	20,2
10^3	19,2	8,5
Контроль (без обработки)	0	0
НСР _{0,5}	4,4	2,3

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что штамм-продуцент *B. papaveris* 1.39 эффективно заражает растения мака в полевых условиях и может с успехом использоваться в системах контроля нежелательной растительности. Максимальная из примененных инфекционных доз ($\times 10^5$ КОЕ/мл) была недостаточной для полного подавления роста и развития растений мака. Для увеличения эффективности подавления целевых растений исследовали возможности комплексного использования биологических средств и химических гербицидов на основе метсульфурон-метила (Ларена, СП) и метрибузина (Зонтрана, ККР) в полных и сниженных нормах расхода.

6.2. Воздействие различных доз гербицидов на отселектированные штаммы

B. papaveris 1.39 и 1.39-8

Влияние различных доз гербицидов на отселектированные штаммы *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 оценивали в лабораторных условиях при выращивании микромицетов на агаре Чапека с добавлением концентраций гербицидов, соответствующих следующим нормам расхода (НР): $\frac{1}{8}$ НР; $\frac{1}{4}$ НР; $\frac{1}{2}$ НР; полная норма расхода, НР. Воздействие гербицидов оценивали по изменениям средней

скорости роста штаммов. Динамика скоростей роста *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при воздействии различных доз гербицидов представлена на рисунках 6.2.1–6.2.8.

Из данных, представленных на рисунках 6.2.1; 6.2.3; 6.2.5; 6.2.7 следует, что все исследованные гербициды во всех оцениваемых концентрациях подавляли рост и развитие штаммов *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8. Показано, что эффект воздействия не зависит ни от действующего вещества, ни от дозы гербицида (различия в степени подавления роста микромицета находятся в пределах ошибки измерений). Штамм-продуцент *B. papaveris* 1.39-8 оказался более устойчивым к воздействию гербицидов по сравнению с родительским штаммом *B. papaveris* 1.39: снижение скорости роста под воздействием различных доз Зонтрона, 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 (рис. 6.2.1; 6.2.3; 6.2.5; 6.2.7). Следует отметить, что к 11 суткам опыта у штамма *B. papaveris* 1.39 было отмечено прекращение роста под воздействием различных доз Ларена, СП и у обоих штаммов-продуцентов - под воздействием различных доз Зонтрона, ККР (рисунки 6.2.2; 6.2.4; 6.2.6).

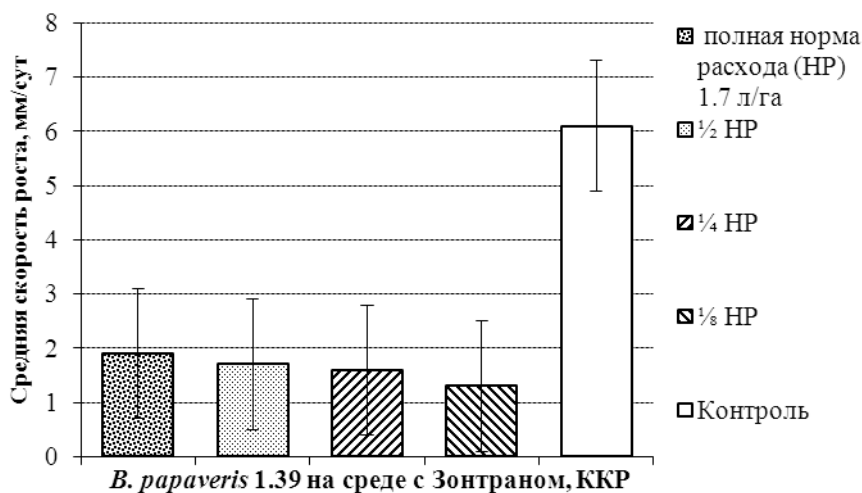


Рис 6.2.1. Средняя скорость роста штамма *B. papaveris* 1.39 на агаре Чапека с добавлением Зонтрона, ККР.



Рис 6.2.2. Динамика средней скорости роста штамма *B. paraveris* 1.39 на агаре Чапека с добавлением Зонтрона, ККР: а – контроль (без гербицида); б – полная норма расхода (НР) 1.7 л/га; в – $\frac{1}{2}$ НР; г – $\frac{1}{4}$ НР; д – $\frac{1}{8}$ НР.

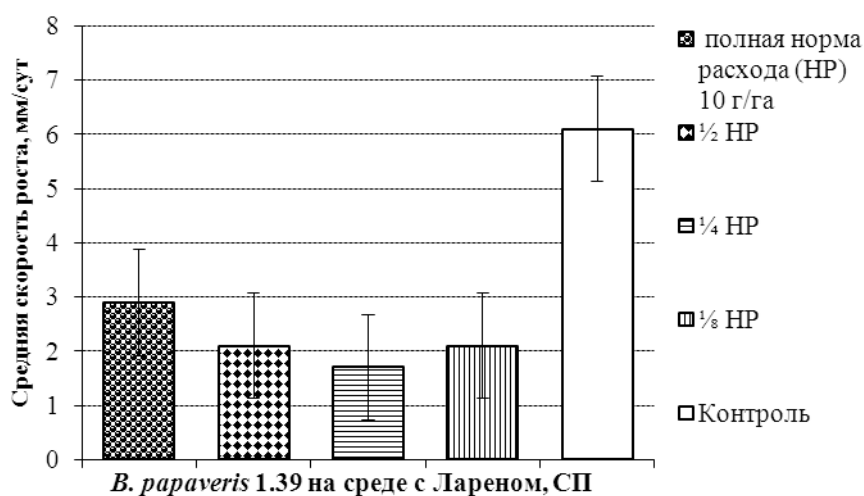


Рис 6.2.3. Средняя скорость роста штамма *B. paraveris* 1.39 на агаре Чапека с добавлением Ларена, СП.



Рис 6.2.4. Динамика средней скорости роста штамма *V. papaveris* 1.39 на агаре Чапека с добавлением Ларена, СП: а – контроль (без гербицида); б – полная норма расхода (НР) 10 г/га; в – $\frac{1}{2}$ НР; г – $\frac{1}{4}$ НР; д – $\frac{1}{8}$ НР.

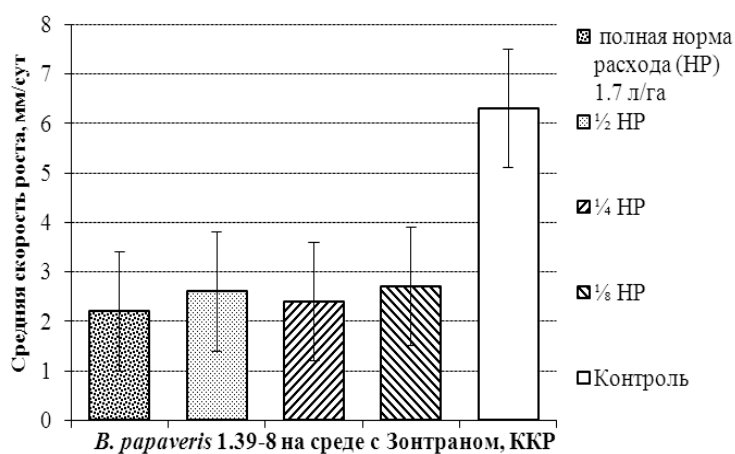
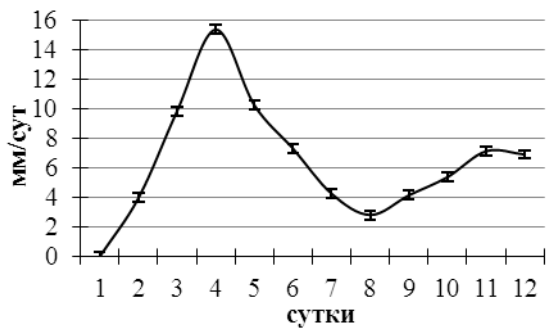
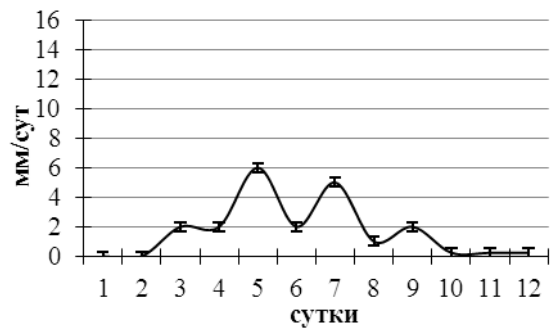


Рис 6.2.5. Средняя скорость роста штамма *V. papaveris* 1.39-8 на агаре Чапека с добавлением Зонтрана, ККР.



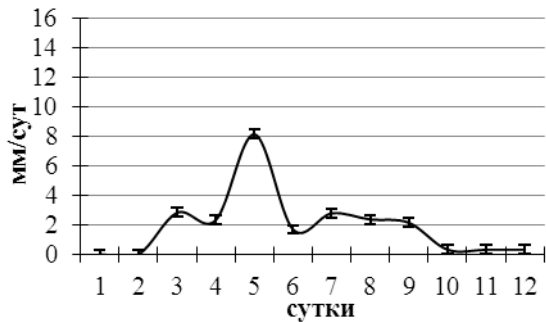
— Средняя скорость роста *V. paraveris* 1.39-8

а



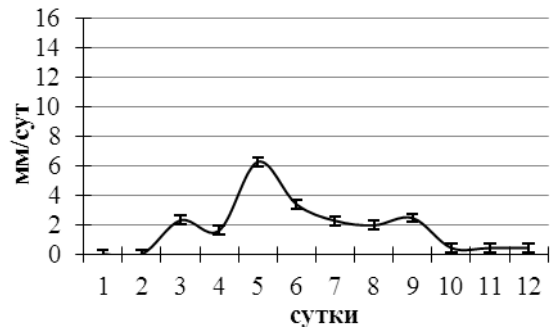
— Средняя скорость роста *V. paraveris* 1.39-8

б



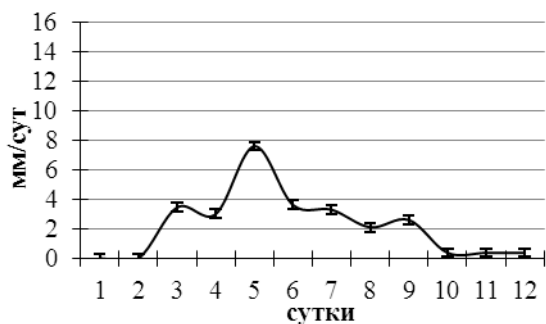
— Средняя скорость роста *V. paraveris* 1.39-8

в



— Средняя скорость роста *V. paraveris* 1.39-8

г



— Средняя скорость роста *V. paraveris* 1.39-8

д

Рис 6.2.6. Динамика средней скорости роста штамма *V. paraveris* 1.39-8 на агаре Чапека с добавлением Зонтрана, ККР: а – контроль (без гербицида); б – полная норма расхода (НР) 1.7 л/га; в – $\frac{1}{2}$ НР; г – $\frac{1}{4}$ НР; д – $\frac{1}{8}$ НР.

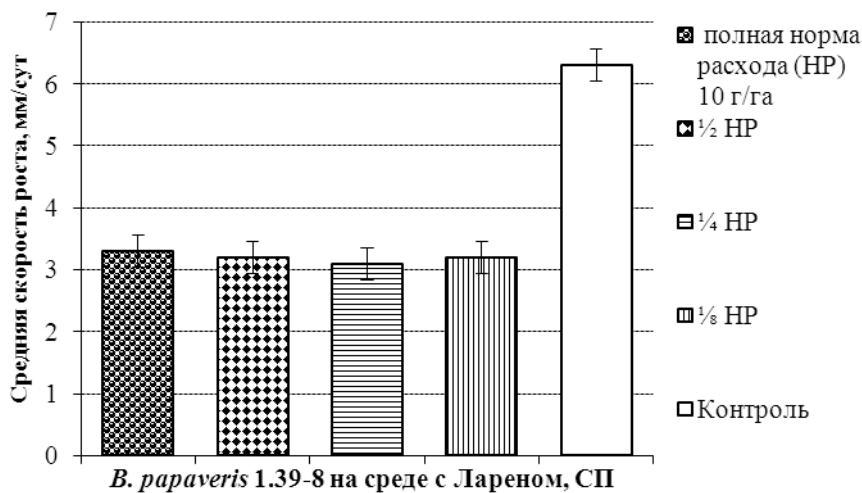


Рис 6.2.7. Средняя скорость роста штамма *V. paraveris* 1.39-8 на агаре Чапека с добавлением Ларена, СП.



а



б



в



г



д

Рис 6.2.8. Динамика средней скорости роста штамма *B. papaveris* 1.39-8 на агаре Чапека с добавлением Ларена, СП: а — контроль (без гербицида); б — полная норма расхода (НР) 10 г/га; в — 1/2 НР; г — 1/4 НР; д — 1/8 НР.

Динамика скоростей роста *B. papaveris* 1.39 и 1.39-8 при воздействии различных доз гербицидов характеризовалась специфичностью (рисунки 6.2.2; 6.2.4; 6.2.6; 6.2.8). Интегральные значения кривых скоростей роста штамма *B. papaveris* 1.39-8 во всех случаях выше таковых родительского штамма *B. papaveris* 1.39 под воздействием соответствующих доз гербицидов (рисунки 6.2.2; 6.2.4; 6.2.6; 6.2.8). Кроме того, штамм *B. papaveris* 1.39-8 продолжал расти и развиваться после завершения опыта под воздействием различных доз гербицида Ларен, СП, что свидетельствует о возможности его применения совместно с данным гербицидом

для достижения синергидного эффекта в подавлении растений мака снотворного (рисунок 6.2.8).

6.3. Оценка биологической эффективности различных форм лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 совместно с химическими гербицидами против мака снотворного в полевом опыте

Для оценки биологической эффективности использования штамма *B. papaveris* 1.39-8 совместно с химическими гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в сниженных нормах расхода использовали лабораторные образцы жидкой и гранулированной препаративных форм. В полевых испытаниях применили однократную обработку образцами биопрепарата на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8: опрыскивание растений мака в фазе 2–3 настоящих листьев при норме расхода рабочей жидкости 1000 л/га. Титр рабочего раствора жидкой формы биопрепарата составлял $1,1 \times 10^6$ КОЕ/мл, смыва с гранулированной формы – $1,2 \times 10^6$ КОЕ/мл. В контроле растения обрабатывали водой.

Для оценки возможности повышения биологической эффективности обработок для приготовления суспензий использовали гербициды на основе концентраций действующих веществ (д.в.) метсульфурон-метила (НР – 100 г/л) – 0,5 и 1 мл/10м² и метрибузина (НР – 250 г/л) – 1 и 2 мл/10м² при нормах расхода рабочей жидкости 50 и 200 мл/10м².

Биологическую эффективность водных суспензий лабораторных образцов препаративных форм и смесей гриба с пониженными концентрациями гербицидов оценивали по комплексу показателей, характеризующих рост и развитие растений (высота, масса надземной части и корневой системы, площадь ассимиляционной поверхности листьев, сроки наступления цветения и плодоношения), вредоносность поражений (распространенность и развитие болезни), их гибель. Учет симптомов поражения и эффективности образца проводили на 7-е сутки после обработки и начала опыта в течение 14-и суток.

Проведенные наблюдения выявили выраженный фитотоксический эффект биопрепарата, заключающийся в существенном угнетении роста и развития целевых растений. Особенно ярко фитотоксический эффект на маке был выражен в варианте

опыта с использованием лабораторного образца жидкой препаративной формы, содержащей живые клетки штамма-продуцента и комплекс биологически активных соединений. Полученные результаты соответствуют данным, полученными другими исследователями, которые показывают, что некоторые фитопатогенные виды микромицетов не только вызывают заболевания, но могут выделять химические вещества, влияющие на рост и развитие растений, содействовать их восприимчивости к воздействию гербицидов (Kropp et al., 2006; Smith et al., 2006; Boyette et al., 2007; Duke et al., 2007;).

Еженедельные учеты показали, что в течение всего периода растения мака в контроле быстро росли и развивались. Листья имели интенсивную зеленую окраску, признаков болезней, угнетения роста и развития мака не отмечали. К окончанию опыта наблюдались бутонизация и цветение растений (таблица 6.3.1, рисунок 6.3.1).

В опытных вариантах целевые растения уже на 7-е сутки после опрыскивания суспензиями лабораторных образцов биопрепарата начали отставать в росте и развитии по сравнению с растениями в контроле.

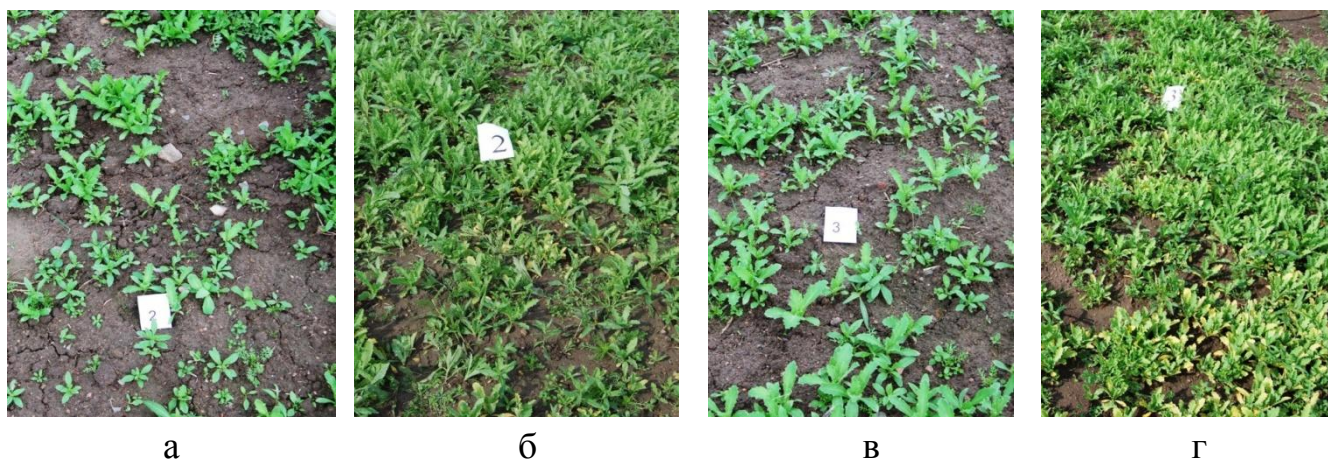


Рис. 6.3.1. Биологическая эффективность однократного применения лабораторных образцов биопрепарата на основе *V. papaveris* 1.39-8:

- жидкий лабораторный образец: а - 7-е; б – 14-е сут;
- гранулированный лабораторный образец: в – 7-е; г – 14-е сут после применения.

Учет, проведенный на 14-е сутки после обработки, показал, что в вариантах с применением лабораторных образцов обеих препаративных форм наблюдалось существенное угнетение роста и развития растений. На листьях отмечены многочисленные хлорозы (1–3-й балл поражения) и некрозы (2–3-й балл

поражения), хотя и не было зарегистрировано полной гибели растений мака. В варианте опыта с использованием жидкой препаративной формы потери в росте составили 44 %, в биомассе – 64,3 % по сравнению с контролем. В обоих вариантах опыта бутонизации и цветения мака до окончания опыта не наблюдали.

Таблица 6.3.1

Биологическая эффективность лабораторных образцов препаративных форм на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 на растениях мака в полевых условиях

Варианты опыта	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Гибель растений, %	Потери в..., %	
			высоте	биомассе
Контроль (без обработки)	-	18.0	0	0
жидкий лабораторный образец	1.1×10^6	6.1	44.0	63.4
НСП 0.5%		-	40.4	100
гранулированный лабораторный образец *	1.2×10^6	11.7	27.9	0
НСП 0.5%			45.5	0

Примечание: *использовали водную суспензию пропагул гриба, 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 (рисунок 6.3.2, таблица 6.3.2).

Проведенные исследования показали, что опрыскивание растений мака водной суспензией, полученной путем смыва пропагул гриба с гранулированной препаративной формы, в смеси с пониженными концентрациями гербицида Ларен, СП существенно усилило биологическую эффективность биопрепарата. В этих вариантах опыта у всех растений наблюдались обширные хлорозы и некротическое поражение листьев на всех листовых ярусах, растения были в значительной степени угнетены (рисунок 6.3.3).

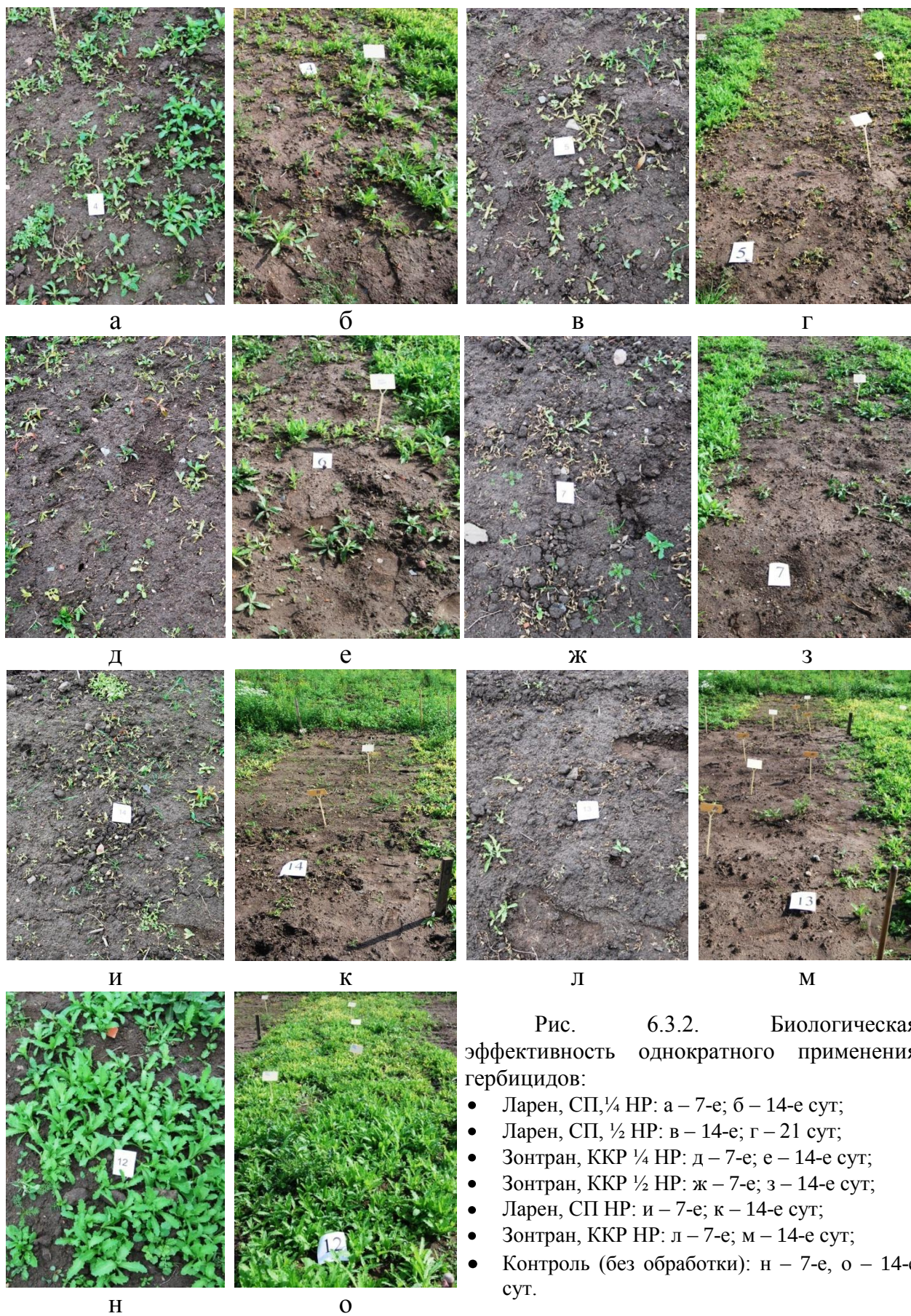


Рис. 6.3.2. Биологическая эффективность однократного применения гербицидов:

- Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР: а – 7-е; б – 14-е сут;
- Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР: в – 14-е; г – 21 сут;
- Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР: д – 7-е; е – 14-е сут;
- Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР: ж – 7-е; з – 14-е сут;
- Ларен, СП НР: и – 7-е; к – 14-е сут;
- Зонтран, ККР НР: л – 7-е; м – 14-е сут;
- Контроль (без обработки): н – 7-е, о – 14-е сут.

При этом потери в росте составили 63,2–73,8 %, в биомассе 39,7–82,5 % по сравнению с контролем. Гибель растений достигла 94,2–99,4 % (таблица 6.3.3). В дальнейшем растения мака не отрастали.

Таблица 6.3.2

Биологическая эффективность различных концентраций гербицидов
Ларен, СП и Зонтран, ККР в полевых условиях на растениях мака

Варианты опыта	Гибель растений, %	Потери в..., %					
		высоте	НСР _{0.5}	НСР _{0.5} %	биомассе	НСР _{0.5}	НСР _{0.5} %
Контроль (без обработки)	18,0	0	0	100	0	0	100
Ларен, СП, ¼ НР	89,2	79,1	2,7	29,1	81,9	11,6	68,3
Ларен, СП, ½ НР	99,4	92,9	2,1	24,9	99,3	11,4	54,7
Ларен, СП, НР	100	100	1,9	23,7	100	11,4	55,2
Зонтран, ККР ¼ НР	90,4	70,9	2,8	29,5	77,7	11,8	65,3
Зонтран, ККР ½ НР	100	100	1,9	23,7	100	11,4	59,1
Зонтран, ККР НР	100	100	1,9	23,7	100	11,4	59,3

Совместное применение биопрепарата и сниженных норм расхода гербицидов позволяет снизить пестицидную нагрузку на биоценоз при сохранении высокой биологической эффективности обработок (таблица 6.3.3).

Таблица 6.3.3

Биологическая эффективность лабораторных образцов препаративных форм на основе штамма *B. paraveris* 1.39-8 и их смесей с гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в полевых условиях на растениях мака

Варианты опыта	Гибель растений, %	Потери в..., %					
		высоте	НСР _{0.5}	НСР _{0.5} %	биомассе	НСР _{0.5}	НСР _{0.5} %
Контроль (без обработки)	18,0	0	0	100	0	0	100
Гранулированный ЛО* + Ларен, СП, ¼ НР	71,6	73,8	2,6	27,4	39,7	12,2	52,6
гранулированный ЛО* + Ларен, СП, ½ НР	92,9	63,2	3,4	54,6	82,5	11,5	65,9
Гранулированный ЛО* + Зонтран, ККР, ¼ НР	99,4	94,0	2,2	25,7	98,7	11,4	74,5
гранулированный ЛО* + Зонтран, ККР, ½ НР	100	100	1,9	23,7	100	23,7	87,2

Примечание: * использовали водную суспензию спор гриба, полученную смывом с гранулированной препаративной формы.

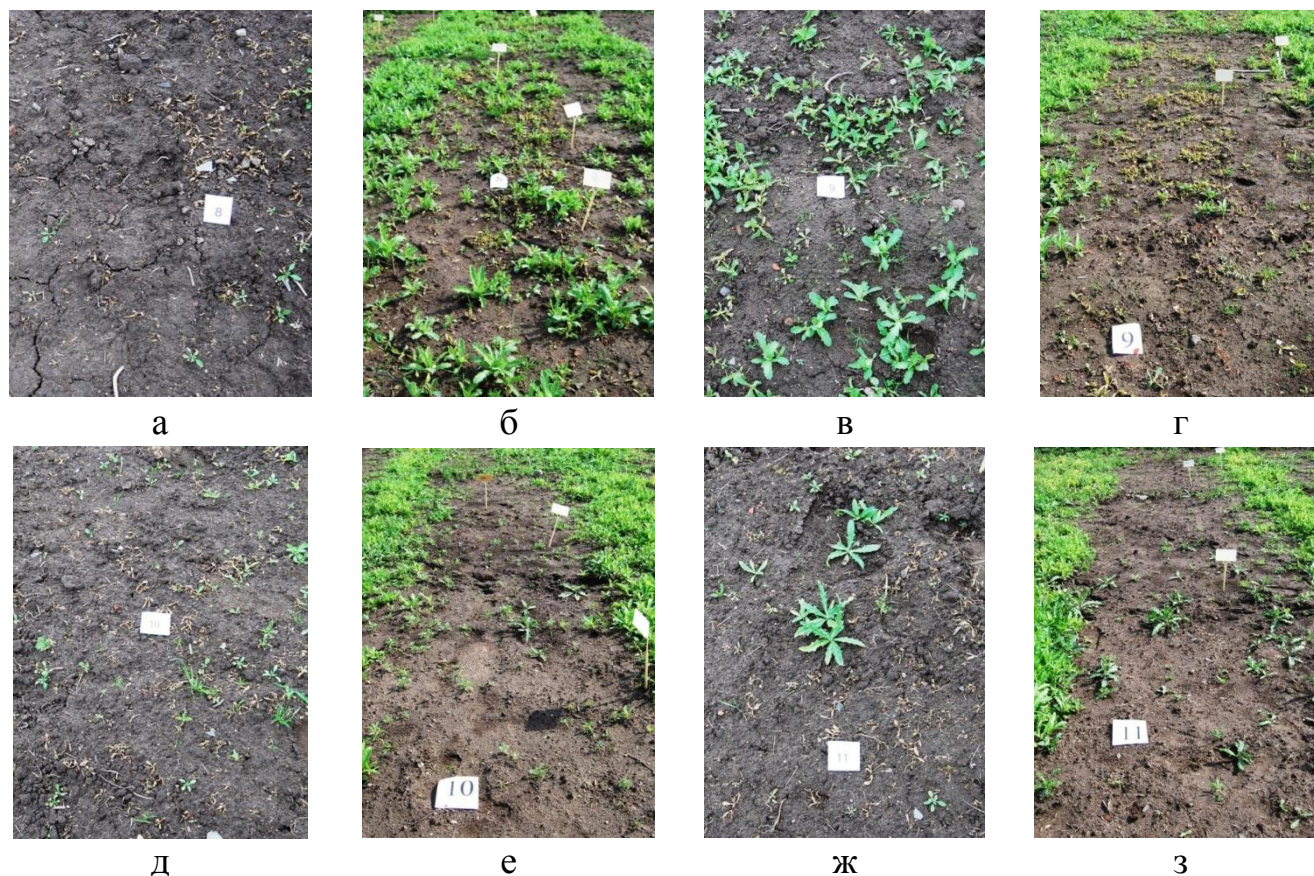


Рис.6.3.3. Биологическая эффективность совместного применения гранулированной препаративной формы биопрепарата на основе *B. papaveris* 1.39-8 и гербицидов:

- гранулированный лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР: а – 7-е; б – 14-е сут;
- гранулированный лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР: в – 7-е; г – 14-е сут;
- гранулированный лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР: д – 7-е; е – 14-е сут;
- гранулированный лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР: ж – 7-е; з – 14-е сут после применения.

Эффективным также было применение смесей суспензии гриба, полученной смывом с гранулированной препаративной формы, и гербицида Зонтран, ККР в сублетальных дозах. В этих вариантах опыта были отмечены обширные листовые некрозы (4-й балл поражения) и увядание растений мака (рисунок 6.3.3). В варианте с использованием смыва с гранулированной препаративной формы на основе *B. papaveris* 1.39-8 и Зонтраном, ККР $\frac{1}{4}$ НР гибель растений мака достигла 91,2 % уже на 7-е сутки и 99,4 % – на 14-е сутки после обработки. Биологическая эффективность в этом варианте соответствовала эффективности применения гербицида Зонтран, ККР в полной норме расхода (таблица 6.3.2).

Таким образом, полевые опыты показали, что на культуре мака применение смесей лабораторных образцов биопрепарата и сублетальных доз гербицидов Ларена, СП и Зонтрана, ККР существенно усиливало биологическую эффективность

обработки. Потери в росте составили 63,2–73,8 %, в биомассе – 39,7–82,5 % по сравнению с контролем. Гибель растений достигала 94,2–99,4 %, что соответствовало эффективности гербицида Зонтран, ККР при полной норме расхода. Полученные данные выявили перспективность использования биопрепарата на основе *B. papaveris* 1.39-8 для подавления роста и развития растений мака и его эффективность в смесях с сублетальными дозами гербицидов Ларен, СП и Зонтран, ККР.

6.4. Особенности и эффективность последовательного применения различных лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 и гербицидов против мака снотворного

Для оценки возможности уменьшения ингибирования роста и развития штамма-продуцента препаратами Ларен, СП и Зонтран, ККР были охарактеризованы особенности и оценена эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе *B. papaveris* 1.39-8 и гербицидов в модельных вегетационных опытах. Для лучшего удерживания клеток возбудителя на растениях мака при обработках жидкой препаративной формой использовали прилипатель Силиплант в концентрации 0,1 %.

Обработку жидкой формой лабораторного образца проводили при прорастании мака до фазы семядолей. Внесение гранулированной формы лабораторного образца и различных доз гербицидов позволило уточнить периоды ожидания эффекта для био- и химических гербицидов в условиях вегетационного опыта. Результаты представлены на рисунках 6.4.1–6.4.10.

Эффективность последовательного применения биопрепаратов и гербицидов оценивали по показателю скорости гибели целевых объектов – проростков мака. Обработка гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в пониженных концентрациях, проведенная в фазе 2–3-х настоящих листьев после опрыскивания лабораторными образцами биопрепарата в фазе семядолей, привела к полному искоренению растений мака к 21-м суткам после обработки во всех вариантах в разные фазы развития (рисунок 6.4.1–2).



а



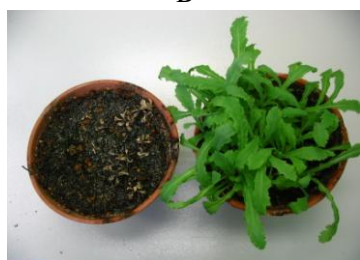
б



в



г



д



е



ж



з



и



к



л



м



н

Рис. 6.4.1. Воздействие на проростки мака последовательно примененных биопрепаратов и гербицида Ларен, СП (контроль без обработки – справа; обработка биопрепаратом на основе *B. papaveris* 1.39-8 и прилипателя Силиплант 0.1 % в фазе семядолей, гербицидом – в фазе 2–3-х настоящих листьев, 25-е сутки опыта):

- а – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1%;
- в – Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР;
- г – Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- д – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР;
- е – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1%;
- ж – Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР;
- з – Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- и – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР;
- к – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1%;
- л – Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР;
- м – Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- н – Ларен, СП, НР.

В вариантах с использованием прилипателя Силиплант 0.1 % показатели гибели проростков мака относительно контроля были несколько ниже в течение всего времени проведения опыта.

Последовательное применение даже значительно пониженных концентраций химических гербицидов ($\frac{1}{8}$ НР) после воздействия лабораторного образца на основе *B. papaveris* 1.39-8 в фазе семядолей мака приводило к полной гибели проростков к 25-м суткам опыта. Кроме того, выявлено, что гибель растений наступала в разные сроки их развития. Выжившие и больные проростки к моменту обработки гербицидами были отмечены, в основном, в вариантах опыта без применения прилипателя, поэтому они погибли в течение 5–7-и суток после применения любых концентраций гербицидов. В случаях применения прилипателя Силиплант 0.1 % выжившие проростки практически не имели симптомов поражения *B. papaveris* 1.39-8 и к моменту обработки гербицидами достигли фазы 2–3-х настоящих листьев. Гибель проростков целевых растений в вариантах опыта с прилипателем наступала в последующие 5–7 суток в фазе 3–4-х настоящих листьев и при воздействии любой концентрации гербицида (рисунок 6.4.1–2).

Было также отмечено сокращение периода ожидания для действия низких концентраций гербицидов и гибель проростков в более короткие сроки их воздействия по сравнению с высокими концентрациями. Это подтверждается и в серии вегетационных опытов по оценке эффективности применения различных концентраций гербицидов Ларен, СП и Зонтран, ККР совместно с прилипателем Силиплант 0.1 % и без него (рисунок 6.4.1–2).

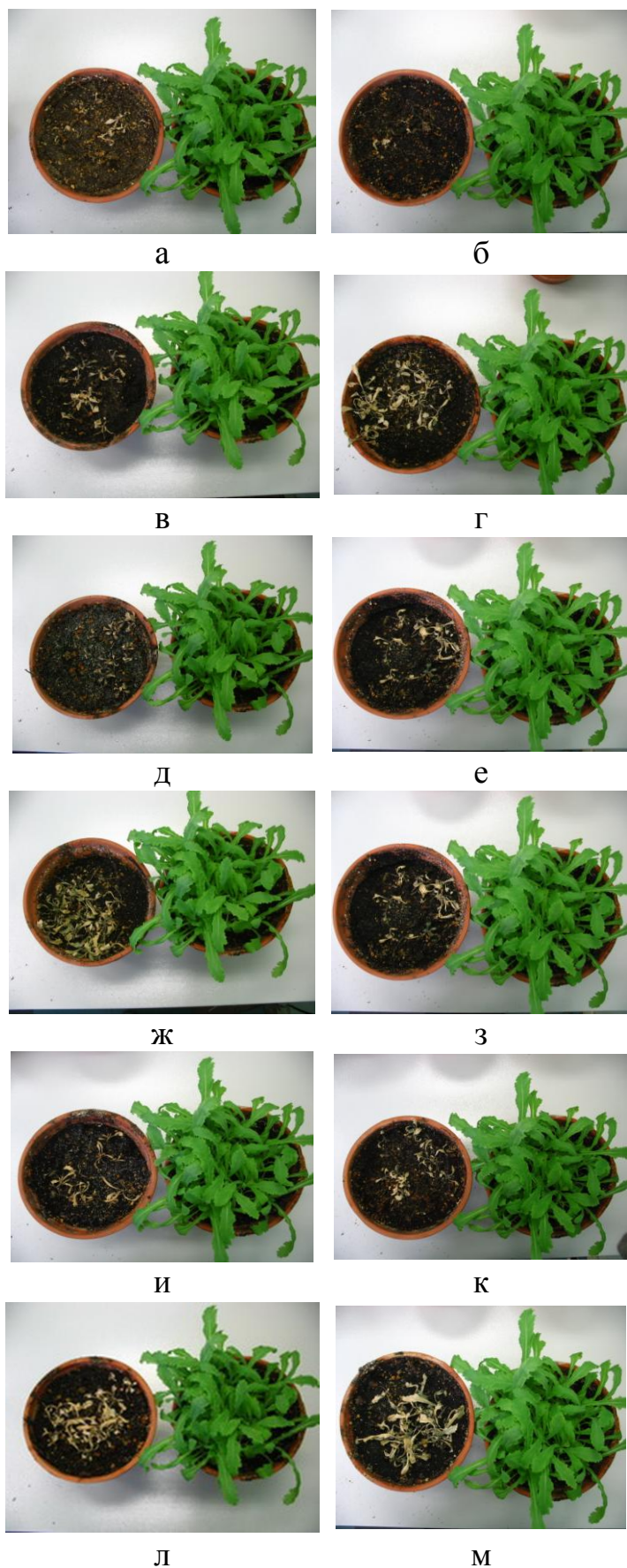


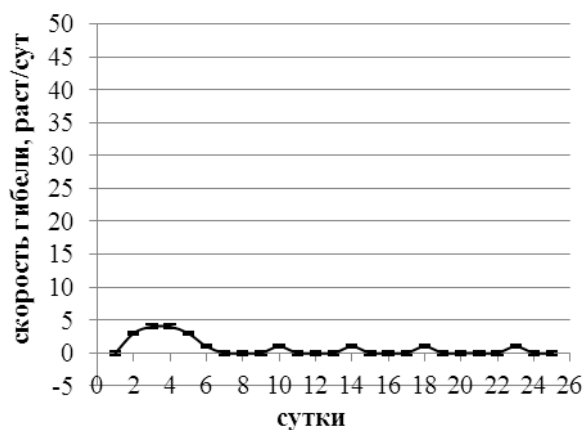
Рис. 6.4.2. Воздействие на проростки мака последовательно примененных биопрепаратов и гербицида Зонтран, ККР (контроль без обработки – справа; обработка биопрепаратом на основе *B. papaveris* 1.39-8 и прилипателя Силиплант 0.1 % в фазе семядолей, гербицидом – в фазе 2–3-х настоящих листьев, 25-е сутки опыта):

- а – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1%;
- в – Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР;
- г – Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- д – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР;
- е – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1%;
- ж – Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР;
- з – Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- и – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР;
- к – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1%;
- л – Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР;
- м – Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1 %;
- н – Зонтран, ККР НР.

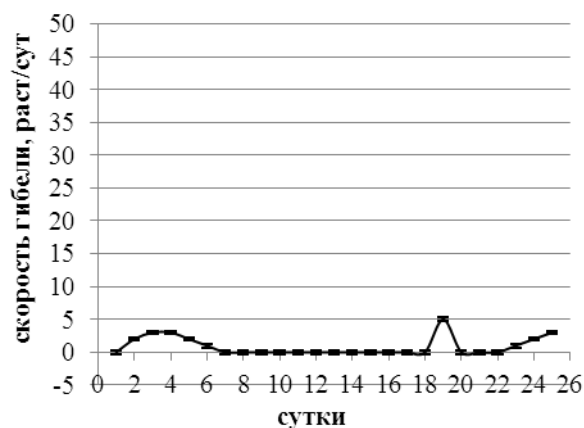


н

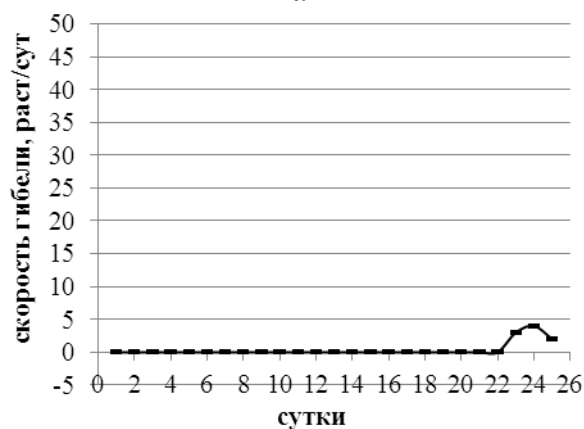
Необходимо отметить, что динамика гибели проростков мака под воздействием различных препаративных форм на основе *B. papaveris* 1.39-8 практически одинакова во все фазы развития целевых растений с максимумом гибели на 3–5-е сутки после применения лабораторного образца. Использование прилипателя Силиплант, 0,1% привело к снижению эффективности его применения (рисунок 6.4.3).



а



б

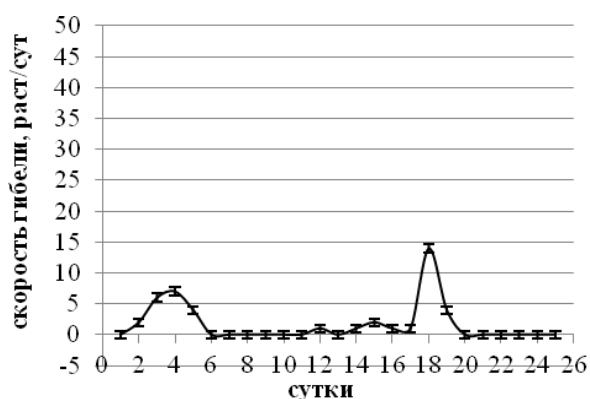


в

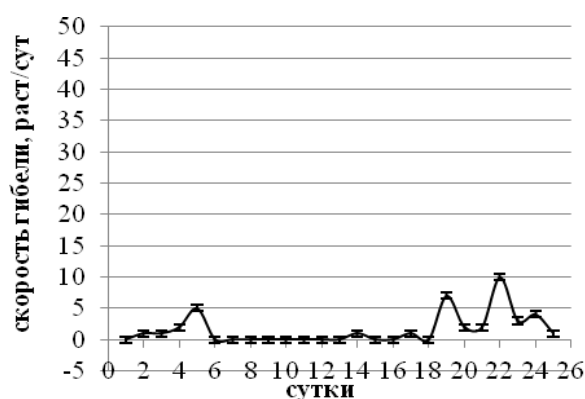
Рис. 6.4.3. Скорость гибели проростков мака при обработке биопрепаратом на основе *B. papaveris* 1.39-8:

- а – жидкий лабораторный образец (в фазе семядолей);
- б – жидкий лабораторный образец + Силиплант 0,1% (в фазе семядолей);
- в – гранулированный лабораторный образец (в фазе 3-х настоящих листьев).

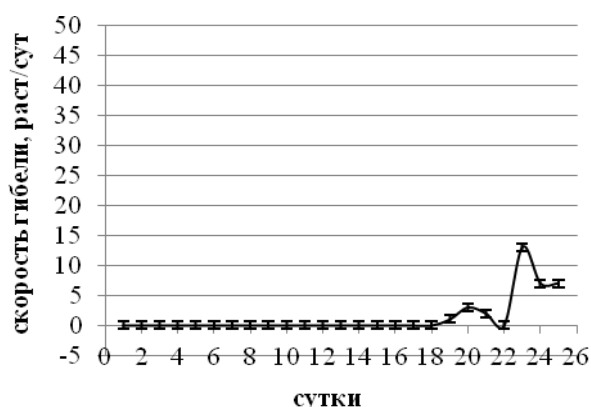
При последовательном применении жидких лабораторных образцов и химических гербицидов наблюдали их независимое воздействие на целевые растения (рисунки 6.4.4–10).



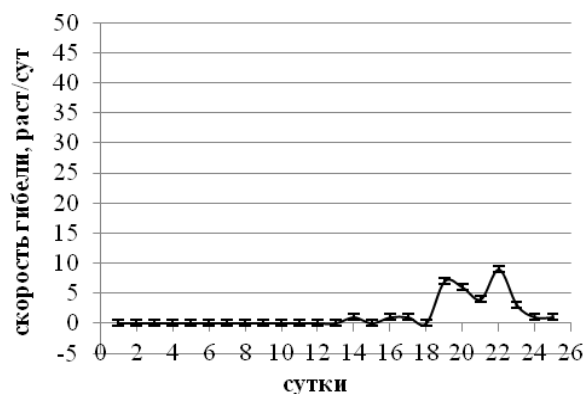
а



б



в



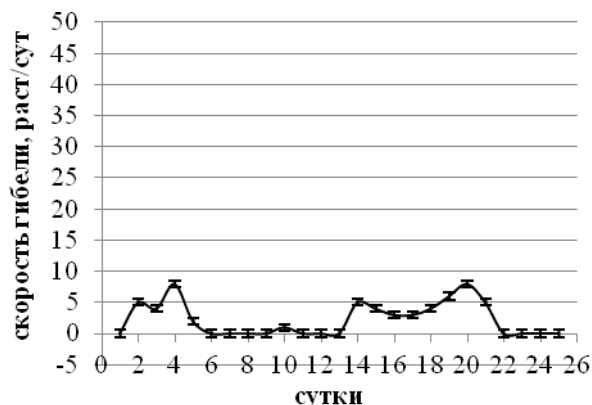
г

Рис. 6.4.4. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *V. papaveris* 1.39-8 с добавлением прилипателя Силиплант 0.1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Ларен, СП (в фазе 2-3 настоящих листьев):

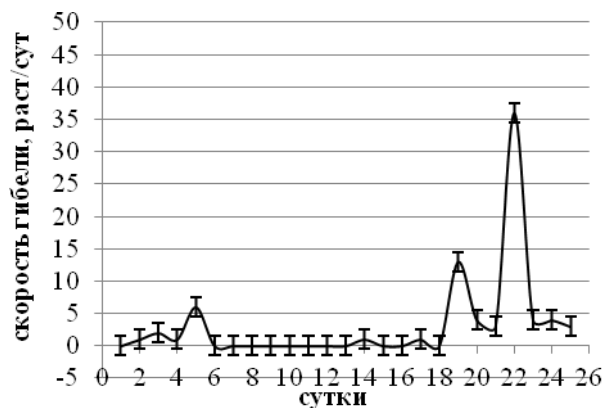
- а – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1%;
- в – Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР;
- г – Ларен, СП, $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0.1 %.

То есть первый пик гибели наблюдали на 3–5-е сутки после применения лабораторного образца на основе *V. papaveris* 1.39-8, второй максимум, наиболее значительный по интегральным показателям, наступал после воздействия гербицидов (рисунки 6.4.4–10).

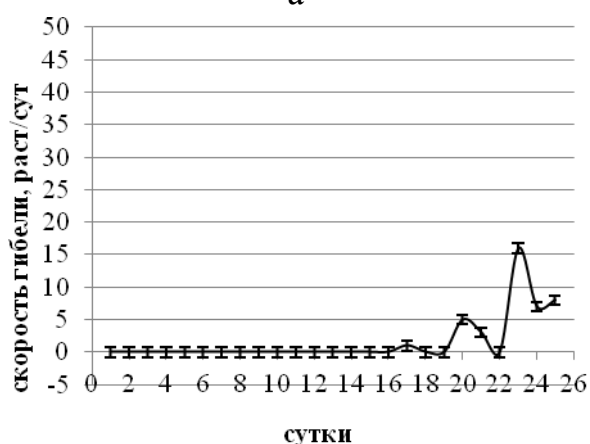
Применение в качестве прилипателя Силипланта 0,1% в большинстве случаев несколько снижало биологическую эффективность обработок и приводило к нивелированию синергидного эффекта (рисунки. 6.4.4–10).



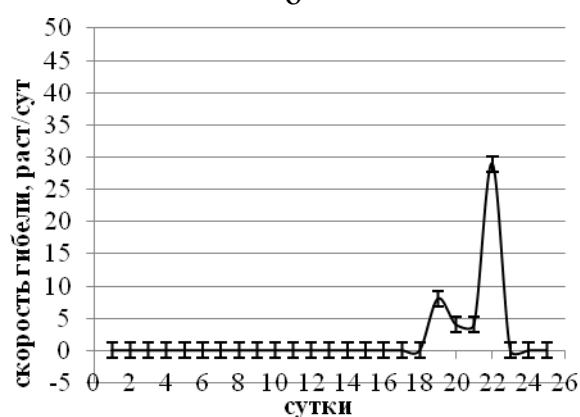
а



б



в



г

Рис.6.4.5. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *V. papaveris* 1.39-8 с добавлением прилипателя Силиплант 0.1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Ларен, СП (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1%;
- в – Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР;
- г – Ларен, СП, $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0.1 %.

Выявлен синергидный эффект воздействия пониженных концентраций гербицидов после применения лабораторного образца на основе *V. papaveris* 1.39-8, выражающийся в наиболее высоких интегральных показателях гибели растений мака (рис. 6.4.4–10), так как под воздействием лабораторного образца биопрепарата происходила не только гибель проростков, но их ослабление за счет развития заболевания, вызванного микромицетом. К моменту применения гербицидов у большинства растений наблюдали признаки микоза (рисунки 6.4.1–2).

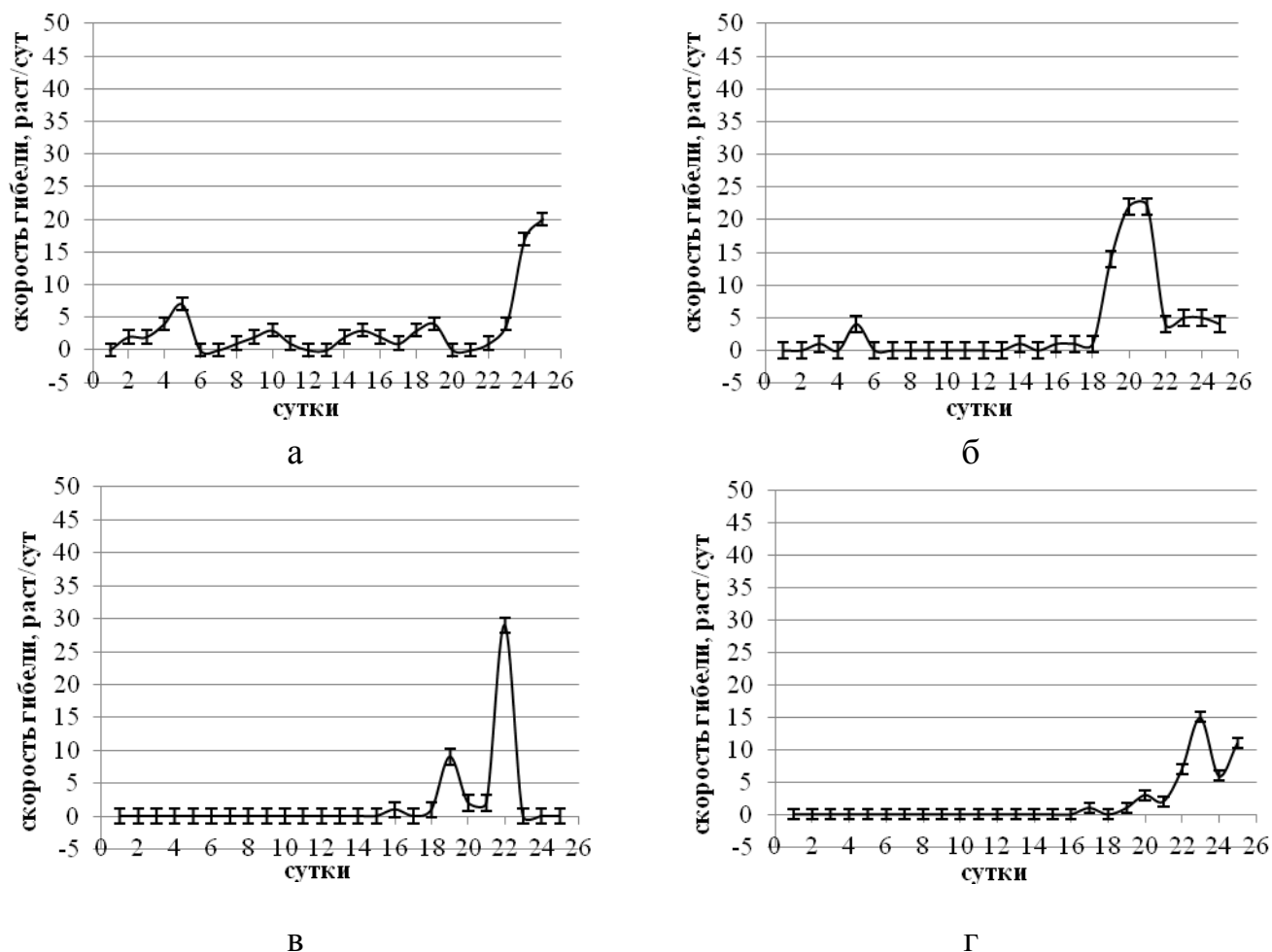
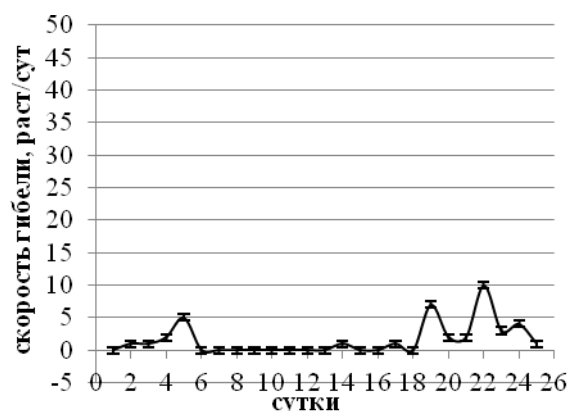


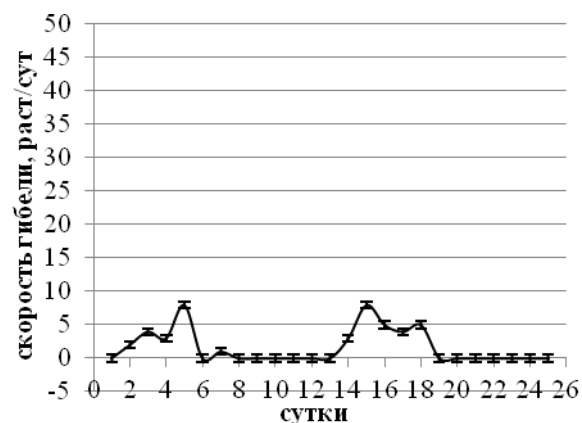
Рис. 6.4.6. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *B. papyaveris* 1.39-8 с добавлением прилипателя Силиплант 0.1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Ларен, СП (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1%;
- в – Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР;
- г – Ларен, СП, $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0.1 %.

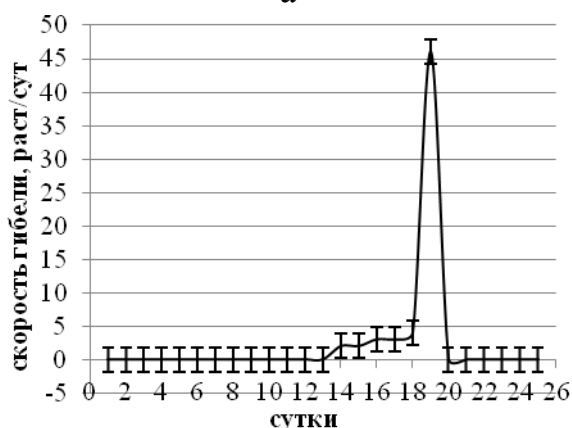
Ослабление растений вследствие развития микоза существенно повышало эффективность гербицида, что приводило к полной гибели растений через более короткий период ожидания, нежели при воздействии даже полных гектарных норм расхода без обработки биопрепаратом (рисунки 6.4.4–10). Увеличение концентрации гербицида, применяемого последовательно, приводило к снижению синергидного эффекта за счет воздействия повышенных доз гербицида на штамм-продуцент и более поздней и неполной гибели практически здоровых растений (рисунки 6.4.1–2).



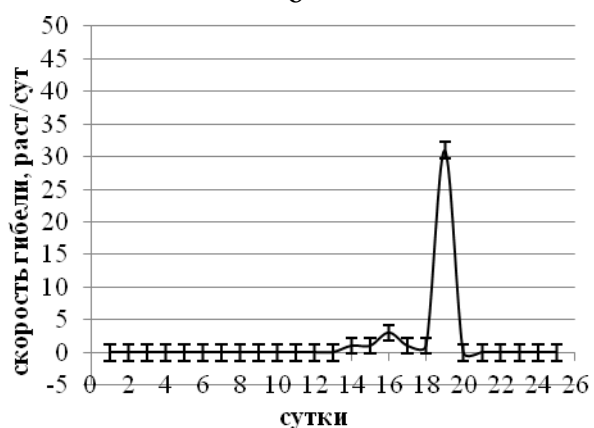
а



б



в



г

Рис. 6.4.7. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *B. papaveris* 1.39-8 с добавлением прилипателя Силиплант 0,1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Зонтран, ККР (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0,1%;
- в – Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР;
- г – Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР + Силиплант 0,1 %.

Поскольку период ожидания у гербицида Зонтран, ККР гораздо меньше, чем у гербицида Ларен, СП максимум гибели растений мака под воздействием любых его концентраций отмечали уже со 2–4-х суток после применения (рисунки. 6.4.7–10).

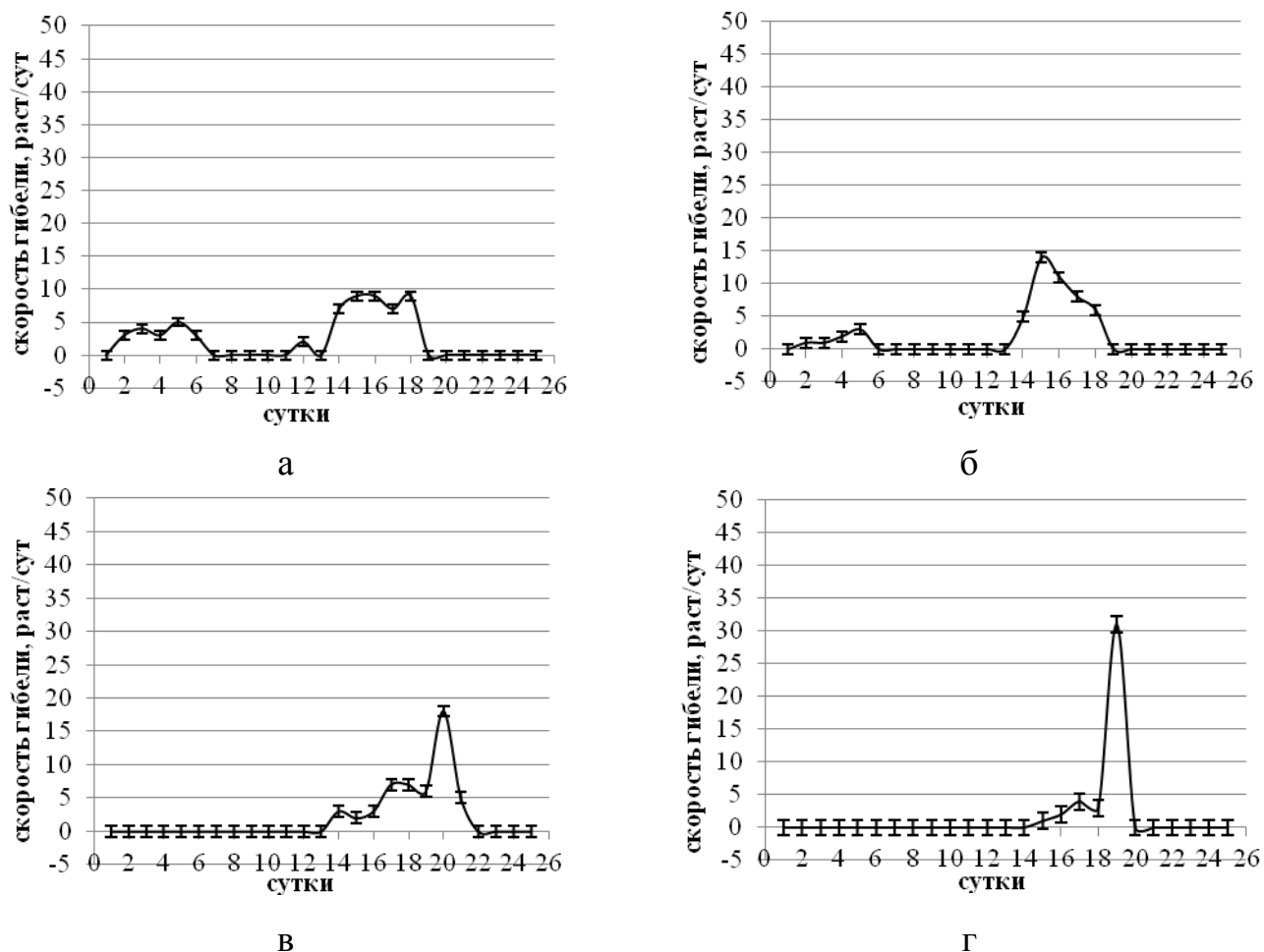


Рис. 6.4.8. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *B. papaveris* 1.39-8 с добавлением прилипателя Силиплант 0,1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Зонтран, ККР (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0,1%;
- в – Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР;
- г – Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР + Силиплант 0,1 %.

Следует отметить, что повторные пики нарастания биологической эффективности, наблюдаемые через 11–12 суток после обработки лабораторными образцами биопрепарата, на 1–2-е суток опережали обработку растений гербицидами. 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 *B. papaveris* 1.39-8 позволит существенно повысить эффективность их последовательного применения (рисунки 6.4.4–10).

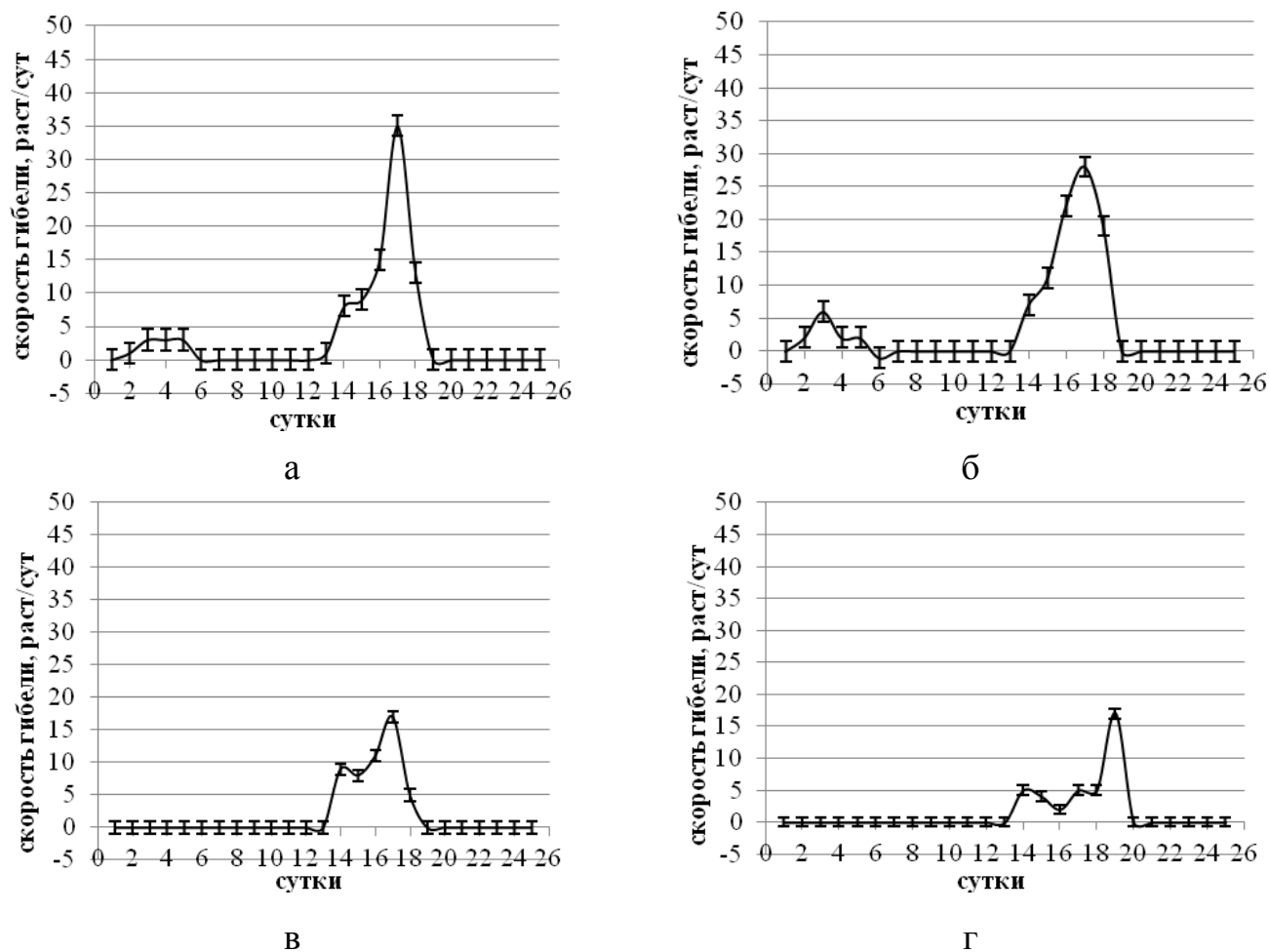


Рис. 6.4.9. Скорость гибели проростков мака при последовательной обработке жидким лабораторным образцом на основе *B. papaveris* 1.39-8 и с добавлением прилипателя Силиплант 0,1 % (в фазе семядолей) и гербицидом Зонтран, ККР (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР;
- б – жидкий лабораторный образец + Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0,1%;
- в – Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР;
- г – Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР + Силиплант 0,1 %.

К особенностям последовательного применения жидкого и гранулированного лабораторных образцов и химических гербицидов можно отнести более высокую эффективность низких доз химических гербицидов на фоне стабильности воздействия *B. papaveris* 1.39-8. Воздействие высоких концентраций гербицидов приводит к падению эффективности *B. papaveris* 1.39-8 и способствует увеличению длительности периода, предшествующего их гибели (рисунки 6.4.1–10).

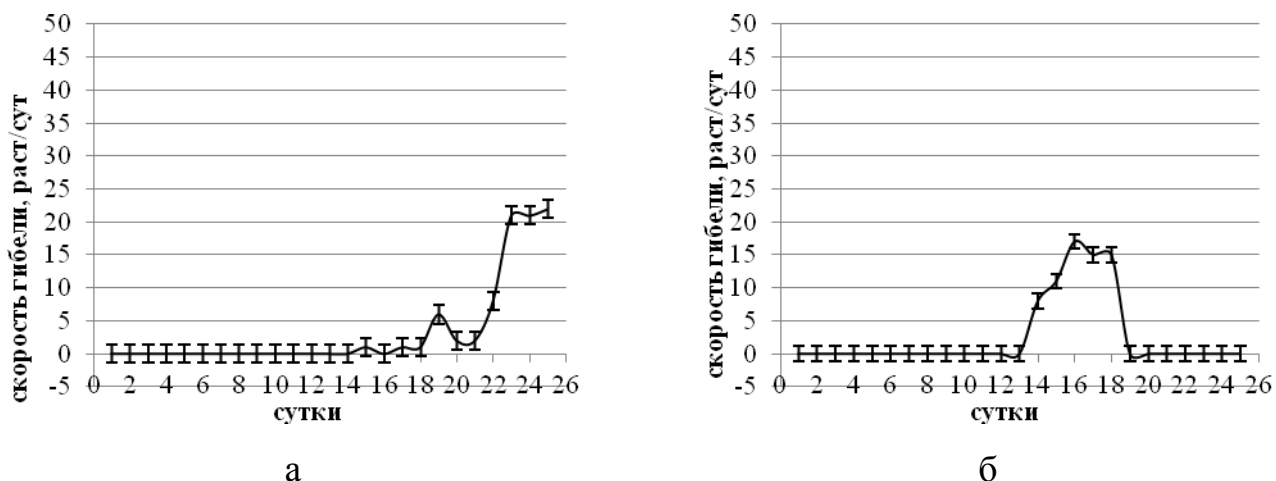


Рис. 6.4.10. Скорость гибели проростков мака при обработке гербицидами Ларен, СП и Зонтран, ККР в полной норме расхода (в фазе 2-3 настоящих листьев):

- а – Ларен, СП НР;
- б – Зонтран, ККР НР.

На динамику гибели проростков и растений мака добавление прилипателя Силиплант 0,1 % не оказывало существенного влияния ни в одном из вариантов опыта (рисунки 6.4.1–10).

Таким образом, в условиях модельных вегетационных опытов выявлено, что наиболее эффективна последовательная обработка проростков мака жидкой препаративной формой на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 и гербицидами Зонтран, ККР и, особенно, Ларен, СП в пониженных концентрациях.

6.5. Биологическая эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 и пониженных концентраций гербицидов в отношении растений мака в полевых условиях при разных технологиях внесения

Существенное влияние на эффективность подавления нежелательной растительности оказывает не только нормы расхода биологических и химических гербицидов, но и технология их применения. Совместное применение биологических и химических гербицидов возможно как в виде баковых смесей, так и при последовательных обработках. Для оптимизации способов применения различных средств подавления растений мака в условиях мелкоделяночного полевого опыта была оценена эффективность последовательного применения

лабораторных образцов жидкой и гранулированной препаративных форм на основе отселектированного штамма *B. papaveris* 1.39-8 и сниженных норм расхода гербицидов при разных технологиях внесения.

Предварительно в серии вегетационных опытов была определена наиболее уязвимая фаза развития целевого растения мака – фаза семядолей. После прохождения этой фазы развития эффективность применения лабораторных образцов заметно снижалась. В связи с этим, заблаговременное внесение микромицета в почву до прорастания семян и увеличение кратности обработок позволило обеспечить необходимый уровень инфекционного фона и высокую биологическую эффективность образцов препаративных форм на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 в полевых условиях (опытное поле ГНУ ВИЗР).

На первом этапе было проведено довсходовое внесение в почву лабораторного образца гранулированной препаративной формы на основе *B. papaveris* 1.39-8 для обеспечения обильного развития гриба на гранулах субстрата и образования комплекса токсичных для целевого растения вторичных метаболитов. После появления всходов, в фазах 1–2-го и 3–4-го настоящих листьев проростки мака были обработаны жидкой препаративной формой. Таким образом, увеличение кратности обработок в ранние фазы развития мака в три раза, существенно повысило эффективность (таблица 6.5.1).

Во всех вариантах опыта наблюдали сильное угнетение, потери в росте и гибель растений. Тем не менее, гибель растений после трехкратной обработки лабораторными образцами биопрепарата составила только 13,8% при достаточно высокой распространенности микоза – 79,1%.

По сравнению с контролем, трехкратная обработка лабораторными образцами на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 снизила высоту растений на 63,7%.

Последующее использование пониженных концентраций гербицидов повысило распространенность болезни до 100% и гибель мака до 35–40%. соответственно.

Таблица 6.5.1

Биологическая эффективность последовательного применения гербицида Ларен, СП после трехкратной обработки образцами препаративных форм на основе штамма *B. 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..., %		
				высоте	биомассе	ассимиляционной поверхности листьев
Контроль (без обработки)	9,52	23,28	0,98	0	0	0
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8	13,72	79,11	25,02	63,67	66,33	72,04
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/8 НР	<u>35,31</u>	<u>100</u>	<u>8,57</u>	<u>82,42</u>	<u>84,42</u>	<u>68,76</u>
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/4 НР	<u>29,64</u>	<u>100</u>	<u>8,03</u>	<u>90,67</u>	<u>86,96</u>	<u>83,65</u>
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Ларен, СП 1/2 НР	40,42	100	7,61	85,72	78,74	100
НСП 0.5	18,7	56,6	4,4	48,3	47,3	48,7
НСП 0.5%	62,7	59,7	60,5	62,3	63,3	60,1

Примечание: *ЛО – лабораторные образцы на основе *B. papaveris* 1.39-8.

Таблица 6.5.2

Биологическая эффективность последовательного применения гербицида Зонтран, ККР после трехкратной обработки образцами препаративных форм на основе штамма *B. 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..., %		
				высоте	биомассе	ассимиляционной поверхности листьев
Контроль (без обработки)	9,52	23,28	0,98	0	0	0
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8	13,72	79,11	25,02	63,67	66,33	72,04
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/8 НР	13,59	93,99	4,56	74,75	76,92	46,48
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/4 НР	13,72	93,64	4,41	33,45	53,15	70,46
ЛО* <i>B. papaveris</i> 1.39-8 + Зонтран, ККР 1/2 НР	10,49	95,57	5,46	63,43	85,85	64,59
НСП 0.5	7,7	53,9	2,9	36,1	42,6	38,2
НСП 0.5%	59,8	65,4	72,3	61,4	60,3	62,3

Примечание: *ЛО – лабораторные образцы на основе *B. papaveris* 1.39-8.

Последующая обработка растений Лареном, СП усиливала потерю высоты всходов до 82,4–91 %, а Зонтраном, ККР – до 33–75 % в зависимости от примененной концентрации гербицида (таблицы 6.5.1–2).

Потеря биомассы после обработки растений лабораторными образцами на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 при трехкратном применении достигла высоких значений и составила 66,3%, что практически соответствовало эффективности гербицидов по этому показателю.

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 6.5.3).

Таблица 6.5.3

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 бработки)	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
НСР 0,5%	75,7	59,9	60,6	60,4	59,6

Примечание: * – в контроле указывается заболеваемость растений мака любой этиологии.

Еще более высокую биологическую эффективность в отношении растений мака показало последовательное применение лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 и пониженных концентраций гербицидов. В вариантах опыта с последовательным применением гербицида Ларен, СП в 1/8 НР и 1/4 НР потери в биомассе составили 84,4–87 %, соответственно. Применение более высокой концентрации гербицида Ларен, СП было менее эффективным. В вариантах с

обработкой растений мака гербицидом Зонтран, ККР в $1\frac{1}{8}$ НР потери в биомассе составили 76,9 %. Применение более высоких концентраций гербицида в сочетании с трехкратной обработкой биопрепаратом привело к повышению эффективности. При использовании Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР потери биомассы составили только 53,2 %, при Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР – 85,9 % (таблицы 6.5.1–2).

Ассимиляционная поверхность листьев мака при трехкратном применении лабораторного образца на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 сократилась на 72 %. При последовательном применении лабораторного образца биопрепарата и пониженных концентраций гербицида Ларен, СП ассимиляционная поверхность снизилась на 83,7–100 %. Последовательное применение Зонтрана, ККР после лабораторного образца *B. papaveris* 1.39-8, было менее эффективным: ассимиляционная поверхность снизилась только на 46,5–70,5% по сравнению с контролем (без обработки) (таблицы 6.5.1–2).

Трехкратное последовательное применение образцов препаративных форм на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 вызывало хлорозы и некрозы листьев, угнетение роста и гибель растений мака. Распространённость болезни достигала 79 %, гибель растений – 13,7 %. Снижение биомассы мака за период наблюдения составило 66,3% (таблица 6.5.1; рисунок 6.5.1).

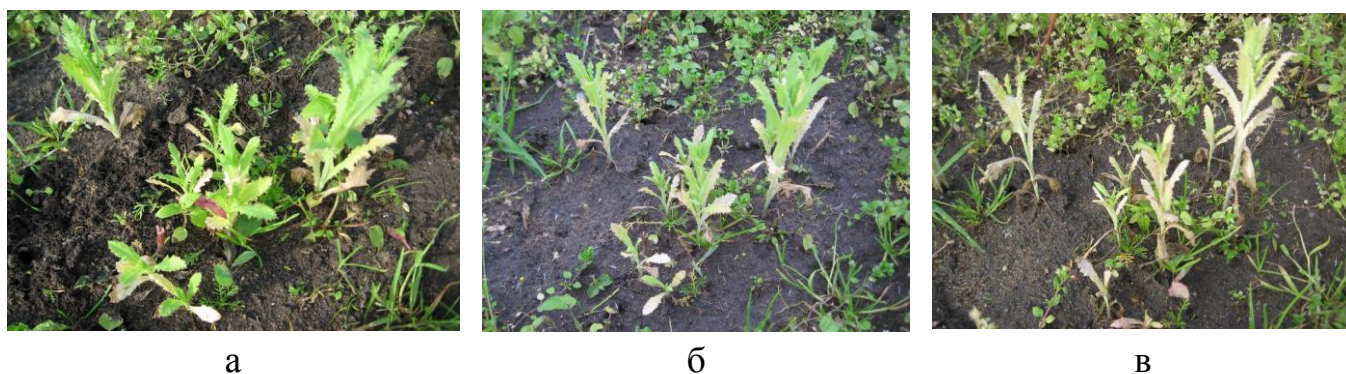


Рис. 6.5.1. Биологическая эффективность последовательного трехкратного применения лабораторных образцов разных препаративных форм на основе *B. papaveris* 1.39-8: а – 30-е сут; б – 37-е сут; в – 44-е сутки после применения.

Симптомы поражения мака при последовательном применении пониженных концентраций гербицида Ларен, СП (1,25–2,5–5,0 г/га) на фоне трехкратного применения образцов биопрепарата в первые две недели учётов проявлялись сильнее, чем при отдельном применении тех же концентраций гербицида. Ту же

картину поражения наблюдали в вариантах опытов, начиная с 14-и суток после применения гербицида (рисунок 6.5.2).



Рис. 6.5.2. Биологическая эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе *V. paraveris* 1.39-8 и Ларена, СП:

- Ларен, СП $\frac{1}{8}$ НР: а – 14-е, б – 21-е, в – 28-е сут.;
- Ларен, СП $\frac{1}{4}$ НР: г – 14-е, д – 21-е, е – 28-е сут.;
- Ларен, СП $\frac{1}{2}$ НР: ж – 14-е, з – 21-е, и – 28-е сутки после применения гербицида.

Однократное применение гербицида Ларен, СП (600 г/кг) при пониженных концентрациях (1,25–2,5–5,0 г/га) привело к возникновению хлорозов и некрозов листьев, наблюдали торможение роста целевых растений (рисунок 6.5.3).

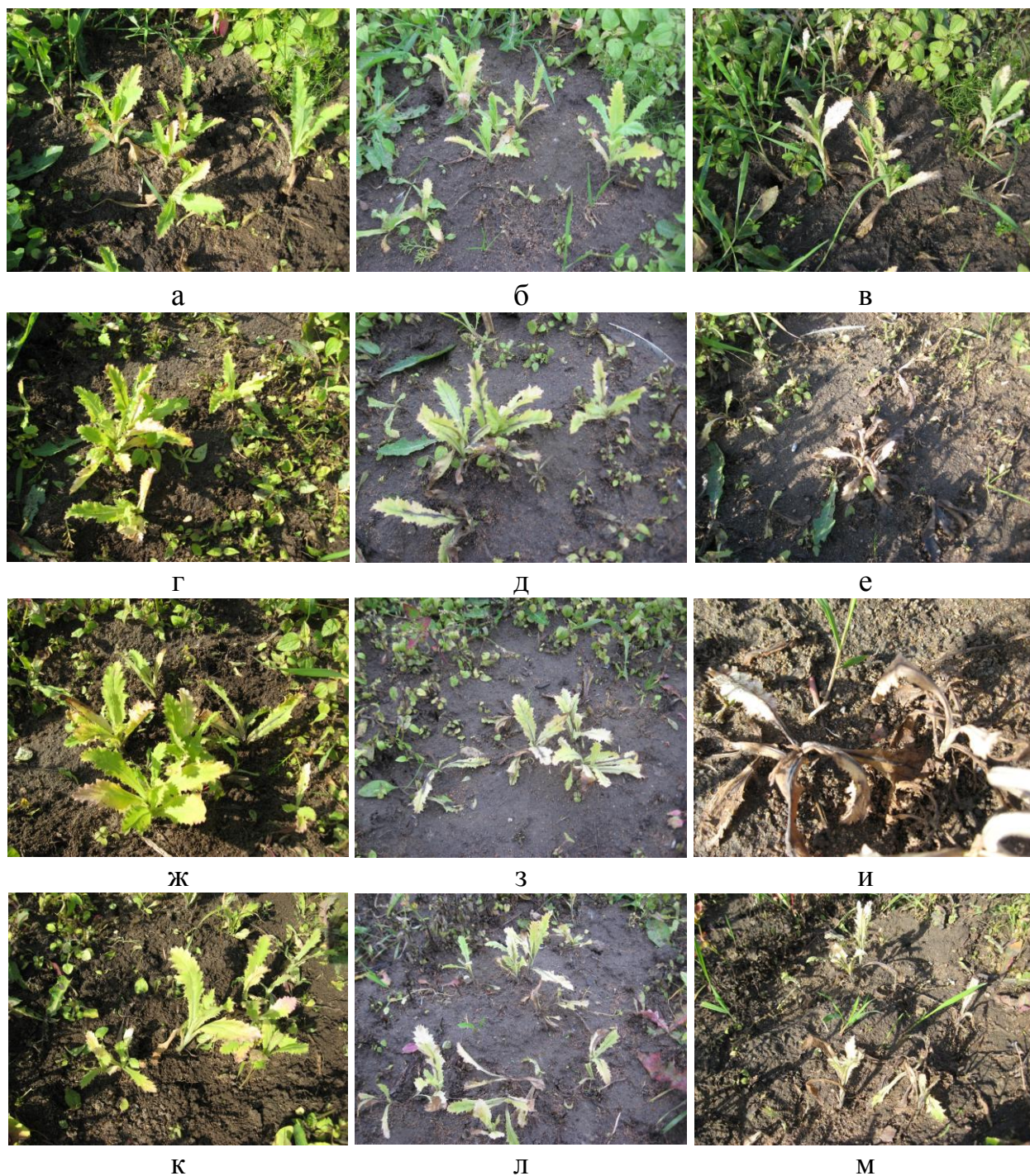


Рис. 6.5.3. Биологическая эффективность однократного применения Ларена, СП:

- Ларен, СП $\frac{1}{8}$ НР: а – 14-е, б – 21-е, в – 28-е сут.;
- Ларен, СП $\frac{1}{4}$ НР: г – 14-е, д – 21-е, е – 28-е сут.;
- Ларен, СП $\frac{1}{2}$ НР: ж – 14-е, з – 21-е, и – 28-е сут.;
- Ларен, СП НР: к – 14-е, л – 21-е, м – 28-е сутки после применения гербицида.

Уже с 21 суток после применения $\frac{1}{2}$ НР Ларена, СП наблюдалась симптоматически одна и та же картина поражения. Во всех вариантах усиление выраженности симптомов поражения завершалось полной гибелью растений мака к 40-м суткам после обработки (рисунок 6.5.3).

Последовательное применение пониженных концентраций гербицида Зонтран, ККР (0,212–0,425–0,85 л/га) после трехкратного применения биопрепарата были менее эффективны, и по степени выраженности симптомов поражения мака заметно не отличалось от варианта с отдельным применением тех же концентраций гербицида Зонтран, ККР (рисунки 6.5.4–5).

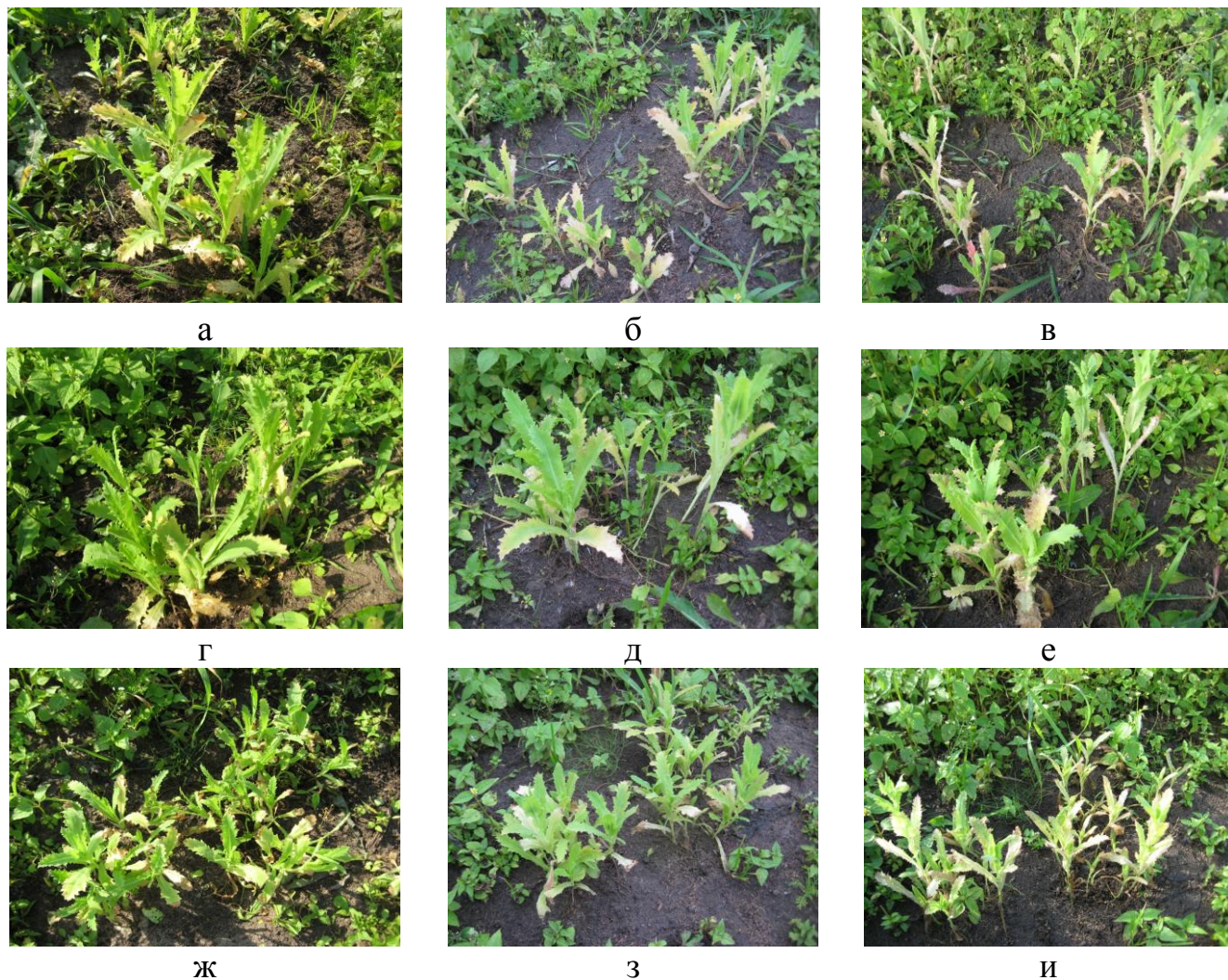
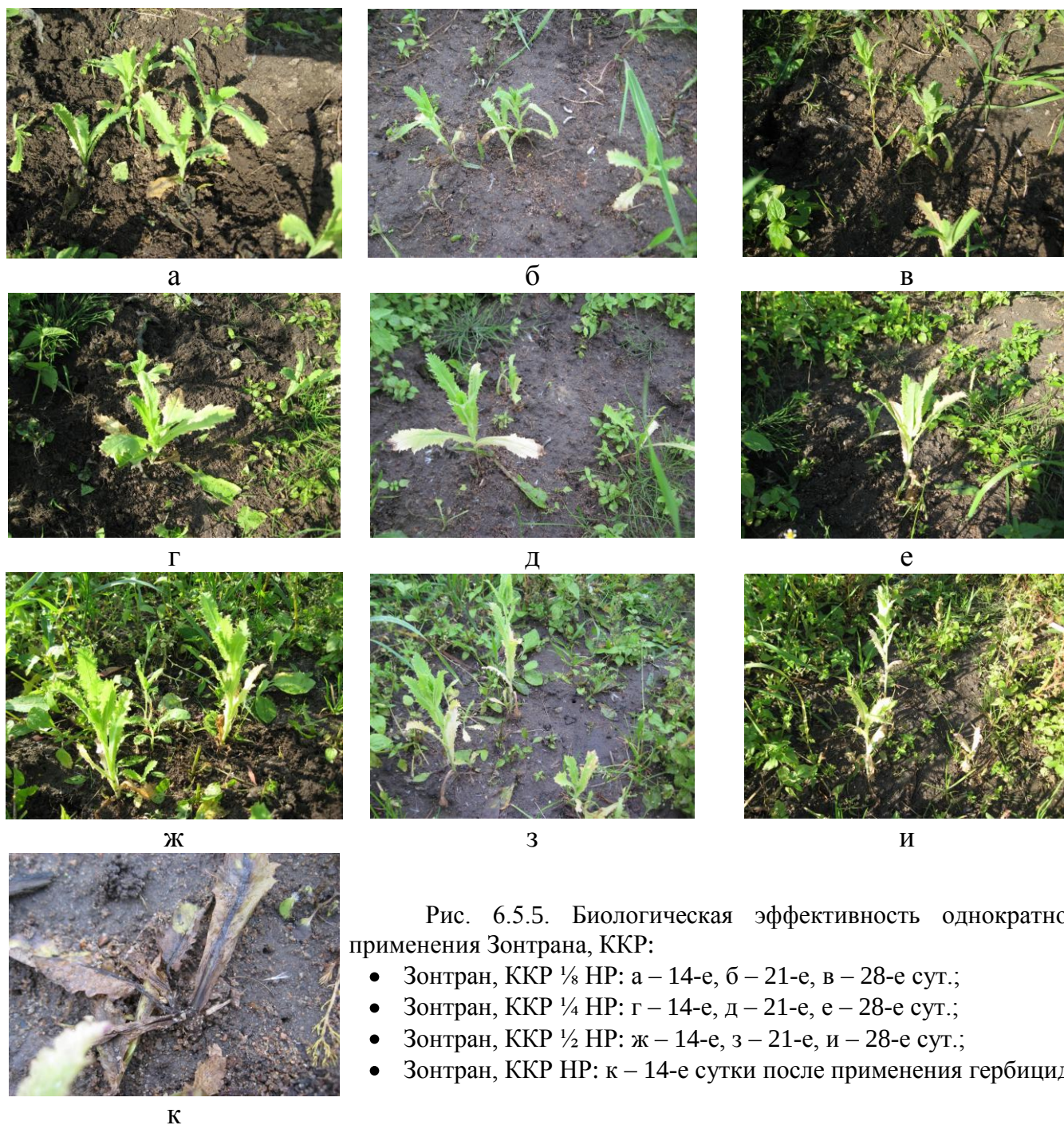


Рис. 6.5.4. Биологическая эффективность последовательного применения лабораторных образцов на основе *B. paraveris* 1.39-8 и Зонтрана, ККР:

- Зонтран, ККР $\frac{1}{8}$ НР: а – 14-е, б – 21-е, в – 28-е сут.;
- Зонтран, ККР $\frac{1}{4}$ НР: г – 14-е, д – 21-е, е – 28-е сут.;
- Зонтран, ККР $\frac{1}{2}$ НР: ж – 14-е, з – 21-е, и – 28-е сутки после применения гербицида.

Однократное применение гербицида Зонтран, ККР (250 г/л) было эффективным лишь в полной норме расхода (1,7 л/га), при пониженных концентрациях (0,212–0,425–0,85 л/га) вызывало хлорозы и некрозы листьев, общее

угнетение растений. Уже с 14-х суток в этих вариантах опыта наблюдалась полная гибель целевых растений в фазе 3-4 настоящих листьев (рисунок 6.5.5).



В контроле целевые растения хорошо росли и развивались на протяжении всего периода наблюдений, хотя были отмечены незначительные выпады. К моменту завершения опыта наблюдались повсеместные бутонизация и цветение растений мака (рисунок 6.5.6).

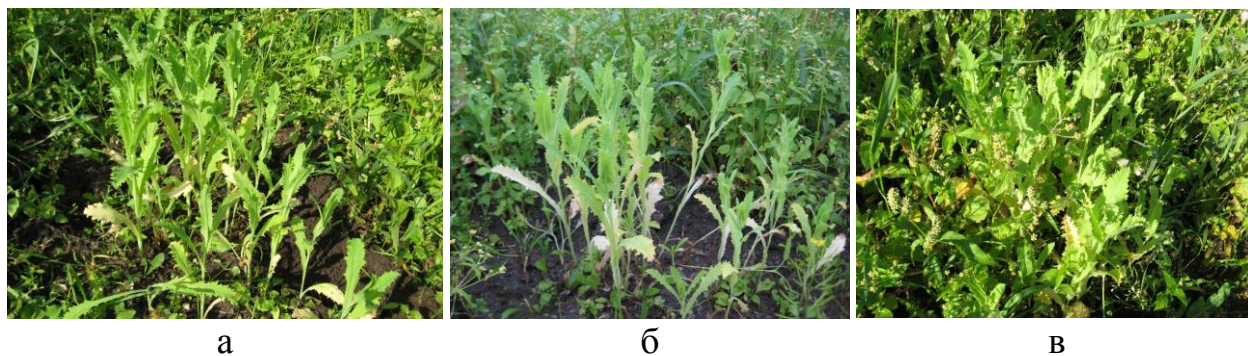


Рис. 6.5.6. Контроль (без обработки): а – 21-е, б – 37-е, в – 44-е сутки учета.

Сравнение вариантов опытов на материале, собранном с экспериментальных учетных площадок представлено на рисунках 6.5.7–8.



Рис. 6.5.7. Сравнительная эффективность трехкратного последовательного применения образцов препаративных форм на основе *V. papaveris* 1.39-8, различных доз гербицида Ларен, СП отдельно и после лабораторных образцов биопрепарата (44-е сутки после применения гербицида).

Как видно из рисунка 6.5.7., при последовательном воздействии на проростки мака лабораторных образцов на основе *V. papaveris* 1.39-8 и различных доз гербицида Ларен, СП очевидно проявление синергидного эффекта: поражение целевых растений привело к полной некротизации ассимилирующих поверхностей на ранних этапах развития. Воздействие гербицида без применения лабораторных образцов приводило к образованию обширных хлорозов и частичной некротизации ассимилирующего аппарата растений. Воздействие лабораторных образцов на основе *V. papaveris* 1.39-8 выражалось в значительном снижении биометрических показателей роста и развития целевых растений, и также в образовании обширных хлорозов и частичной некротизации их ассимилирующих поверхностей.

Наблюдали значительные потери в габитусе растений и серьезные поражения во всех вариантах опытов по сравнению с контролем без обработок (рисунки 6.5.7–8).



Рис. 6.5.8. Сравнительная эффективность трехкратного последовательного применения образцов препаративных форм на основе *B. papaveris* 1.39-8, различных доз гербицида Зонтран, ККР отдельно и после лабораторных образцов биопрепарата (44-е сутки после применения гербицида).

Данный рисунок подтверждает, что любые концентрации Зонтрана, ККР подавляют активность штамма-продуцента *B. papaveris* 1.39-8: при последовательном применении различных доз гербицида наблюдали снижение эффективности воздействия лабораторных образцов на его основе, выражающееся в частичной ремиссии целевых растений и дальнейшем их развитии при воздействии пониженных концентраций Зонтрана, ККР (рисунок 6.5.8).

Проведенные полевые испытания выявили эффективность применения лабораторных образцов на основе штамма *B. 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. При совместном применении лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 происходило подавление развития штамма-продуцента, и целевые растения подвергались действию различных концентраций гербицидов. Показатели развития растений мака и их гибели были схожими с таковыми под воздействием соответствующих доз чистых гербицидов (Ларена, СП и Зонтрана, ККР): потери

высоты растений составили 74 % и 79 %, 91 % и 99 %; биомассы – 83 % и 82 %, 99 % и 100 % соответственно. Гибель растений достигла 93 % и 99 %, 91 % и 99 % соответственно. При последовательном применении лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 и химических гербицидов наблюдали сокращение до 2–4-х суток периода ожидания, независимое воздействие на целевые растения каждого из примененных средств подавления и синергидный эффект пониженных концентраций Ларена, СП после применения лабораторных образцов биопрепарата. Уже к 14-м суткам после применения Ларена, СП и Зонтрона, ККР потери высоты растений составили 91 % и 75 %; биомассы – 87 % и 86 %, ассимиляционной поверхности листьев – 99 % и 71 %, соответственно. Гибель растений достигла 40 % и 14 %, соответственно. Под воздействием лабораторных образцов на основе штамма *B. papaveris* 1.39-8 происходила не только гибель проростков, но их ослабление за счет развития заболевания, вызванного микромицетом, поэтому к моменту применения гербицида большинство растений (79 %) 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. Воздействие высоких концентраций гербицидов приводило к падению эффективности *B. papaveris* 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 Зонтрона, ККР и особенно Ларена, СП, совмещенное во времени с максимальным нарастанием биологической эффективности лабораторных образцов на основе *B. 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 *B. 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 Зонтрона, ККР при полной норме расхода и приводила к полному искоренению целевых растений мака.

Выводы

1. В результате направленной селекции штамма *B. papaveris* 1.39, выделенного из пораженных черной пятнистостью растений мака, получен стабильный высоко агрессивный в отношении целевых растений штамм *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. 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 использованной литературы

1. Базилевская, Н. А. Основные ботанико-систематические группы мака / Н. А. Базилевская // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1931. – Т. 25, вып. 5. – С. 577-714.
2. Беккер, З. Э. Физиология грибов и их практическое использование / З. Э. Беккер. – М. : МГУ, 1963. – 68 с.
3. Берестецкий, А. О. Микобиота бодяка полевого и родственных ему видов на территории европейской части России / А. О. Берестецкий // Микология и фитопатология. – 1997. – Вып. 31, № 4. – С. 31-45.
4. Берестецкий, А. О. Патогенные микромицеты на бодяке щетинистом (*Cirsium setosum* (Willd.) Bess.) и осоте полевом (*Sonchus arvensis* L.) и биологические особенности потенциальных агентов биоконтроля – грибов *Septoria cirsii* Niessl. и *Ascochita tussilaginis* Oud.: автореферат дисс. канд. биол. наук : 03.00.24 : защищена 13.01.00 / Берестецкий Александр Олегович. – СПб., 1999. – 20 с.
5. Бурлакова, Ю. В. Эффективные гербициды для борьбы с коноплей *Cannabis sativa* L. / Ю. В. Бурлакова // Тез. докл. конф. мол. уч. асп. «Генетические ресурсы растений и селекции». – СПб, 2010. – С. 163-167.
6. Бурлакова, Ю. В. Биологическая эффективность химических средств подавления конопли дикорастущей *Cannabis ruderalis* Janisch / Ю. В. Бурлакова, Т. А. Маханькова // Защита и карантин растений. – 2012. – № 4. – С. 40.
7. Бурлакова, Ю. В. Биологическое обоснование использования гербицидов и фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. var. *culmorum* для подавления растений конопли: автореферат дисс. канд. биол. наук : 06.01.07 : защищена 17.05.12 / Юнна Валерьевна Бурлакова. – СПб, 2012. – 19 с.
8. Вахрушева, Т. Е. Болезни мака / Т. Е. Вахрушева, К. В. Никитина // Цветоводство. – 1976. – №9. – С. 22.

9. Веселовская, М. А. Мак, его классификация и значение как масличной культуры / М. А. Веселовская // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1933. – Прил. 56 – С. 207-212.
10. Веселовская, М. А. Мак (изменчивость, классификация, эволюция) / М. А. Веселовская // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1975. – Т. 55, вып. 1. – С. 175-223.
11. Вредители и болезни мака масличного и меры борьбы с ними : методические материалы. – М., 1970. – 22 с.
12. Вредные вещества в промышленности: справ. для химиков, инженеров и врачей / под общ. ред. Н. В. Лазарева. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л. : Химия. Ч. 1: Органические вещества –1954. – 810 с. : ил.
13. Всемирный атлас распространения наркотиков / пер. с фр. Н. Матяш : НИИ наркологии Минздрава России. Лаборатория геополитики наркотиков. – М. : Путь, 1999. – 223 с.
14. Гапоненко, Н. И. Семейство *Peronosporaceae* Средней Азии и южного Казахстана / Н. И. Гапоненко. – Ташкент, 1972. – 341 с.
15. Гасич, Е. Л. Материалы к изучению микофлоры сорняков европейской части России // Тез. докл. Всерос. науч.-произв. совещания «Состояние и пути совершенствования интегрированной защиты посевов сельскохозяйственных культур от сорной растительности». – Пущино, 1995. – С. 41.
16. Гасич, Е. Л. Изучение микрофлоры некоторых сорных растений и оценка эффективности потенциальных агентов биоконтроля [Текст] / Е. Л. Гасич, А. О. Берестецкий, Ю. А. Титова // Тез. докл. Всерос. съезда по защите растений «Защита растений в условиях реформирования АПК: экономика, эффективность, экологичность». – СПб, 1995. – С. 301-302.
17. Гасич, Е. Л. Микобиота сорных растений – изучение и использование (основные итоги исследований лаборатории микологии и фитопатологии им. А. А. Ячевского за 1993-2007 гг. / Е. Л. Гасич, А. О. Берестецкий // Приложение к журналу «Вестник защиты растений». – СПб., 2007. – С. 101-118.

18. Гасич, Е. Л. Микробиота мака и возможность использования микромицетов для борьбы с ним / Е. Л. Гасич, А. О. Берестецкий, Л. Б. Хлопунова и др. // Вестник защиты растений. – 2009 – № 3. – С. 54.
19. Гасич Е. Л. Таксономически значимые признаки *Crivellia papaveracea* и *Brachycladium papaveris* – патогенов мака, обнаруженных в России и Украине / Е. Л. Гасич, Ф. Б. Ганнибал, А. О. Берестецкий и др. // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47 – вып. 4 – С. 240-251.
20. Гасымов, Н. В. Международные принципы сотрудничества государств в борьбе с преступностью / Н. В. Гасымов // Российский следователь. – 2002. – № 6. – С. 21-23.
21. Глобализация наркобизнеса: угрозы для России и других стран с переходной экономикой / отв. ред. А. Н. Глинкин. – М. : ИЛА, 1999. – 139 с.
22. Глухова, Л. А. Определение экологической безопасности аскомицета *Pleospora papaveracea* (de Not) Sacc. методом центрифужного филогенетического скрининга к широкому кругу растений / Л. А. Глухова, А. А. Адукаримов // Современная микология в России : Материалы II съезда микологов России. Национальная академия микологии. – М., 2008. – Т. 2. – С. 174.
23. Глухова, Л. А. Исследование персистентности штамма – киллера гриба *Pleospora papaveracea* (de Not) Sacc. – агента биологического контроля нелегальных посевов *Papaver somniferum* L. в естественных полевых условиях Узбекистана / Л. А. Глухова, А. А. Адукаримов // Паразитизм и симбиоз. – 2010 – №1 – С. 96.
24. Гойман, Э. Инфекционные болезни растений / Э. Гойман – М. : ИЛ, 1954. – 608 с.
25. Горленко, М. В. Возбудители бактериальных пятнистостей томатов и мака / М. В. Горленко, И. В. Воронкевич // Микробиология. – 1949. – Т. 18, вып. 3 – С. 257-262.
26. Горленко, М. В. Определитель болезней цветочно-декоративных растений / М. В. Горленко. – Минск, 1969. – 210 с.

27. Горленко, М. В. Некоторые вопросы географии и биологии грибов [Текст] / М. В. Горленко // Бюл. Московского об-ва исп. природы. отд. биологии. – 1975. – Т. 80, № 2. – С. 30-35.
28. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / Минсельхоз России. – М., 2013. – 636 с.
29. Дженкинс, Г. Химия органических лекарственных препаратов / Г. Дженкинс, У. Хартунг. – М. : ИЛ., 1949. – 740 с.
30. Долженко, В. И. Перспективы использования биологических средств в борьбе с коноплей / В. И. Долженко, Ю. В. Бурлакова // Научное обеспечение развития АПК в условиях реформирования. – СПб., 2010. – С. 88-90.
31. Дроздовская, Л. С. О биологии возбудителя гельминтоспориоза мака / Л. С. Дроздовская // Бюл. Гл. ботанического сада. – 1977 – Вып. 103. – С. 99-102.
32. Дьяков, Ю. Т. Жизненная стратегия фитопатогенных грибов и их эволюция / Ю. Т. Дьяков // Микология и фитопатология. – 1992. – Т. 26, вып. 4. – С. 319-325.
33. Дьяков, Ю. Т. Вегетативная несовместимость у фитопатогенных грибов / Ю. Т. Дьяков, А. В. Долгова. – М. : МГУ, 1995. – 161 с.
34. Емельянов, Т. Анатомия всемирной наркоимперии / Т. Емельянов // РФ сегодня. – 2002. – № 13. – С. 54-61.
35. Заика, Н. А. Эколого-биологическое обоснование скрининга грибов рода *Trichoderma* для получения и использования биопрепаратов на растительных субстратах : автореф. дис. ... канд. биол. наук : / Надежда Андреевна Заика. – Красноярск, 2006. – 17 с.
36. Иванюк, В. Г. Структура популяции *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Gront – возбудителя альтернариоза картофеля и ее динамика в условиях Белоруссии / В. Г. Иванюк, А. Н. Палилова // Микология и фитопатология. – 1996. – Т. 30, вып. 3. – С. 66-74.

37. Исаева, Л. И. Биологическая борьба с сорной растительностью (обзор) / Л. И. Исаева // Достижения науки и передовой опыт в сельском хозяйстве. – 1972. – № 12. – С. 11-16.
38. Исаева, Л. И. Биологический метод борьбы с сорными растениями / Л. И. Исаева // Земледелие. – 1985. – № 1. – С. 61.
39. Исаева, Л. И. Нетрадиционные методы борьбы с сорняками в овощеводстве / Л. И. Исаева // Плодоовощное хозяйство. – 1987. – № 4. – С. 62-67.
40. Карпунина, Л. В. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств белков-агглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий / Л. В. Карпунина, Е. Г. Пономарева, Е. Ф. Соболева, В. Е. Никитина // Биотехнология. – 1997. – Т. 3, № 1. – С. 10-13.
41. Карпунина, Л. В. Бактерицидные свойства лектинов азотфиксирующих бацилл / Карпунина Л. В., Мельникова У. Ю., Суслова Ю. В., и др. // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 343-347.
42. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2 т. / Ю. Кирхнер. – М. : Мир, 1981. – Т. 1. – 615 с.
43. Коломбет, Л. В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней: дисс. ... докт. биол. наук : 03.00.24, 03.00.23 / Любовь Васильевна Коломбет. – М. : МГУ, 2006. – 353 с. – Библиогр.: 288-338 с.
44. Кудрявцев, Н. А. Подбор химических средств уничтожения растений, содержащих наркотические вещества / Н. А. Кудрявцев, Т. А. Рожмина, А. А. Кабунин, И. И. Плужникова // Селекция против наркотиков : Материалы II Международной конференции. – Пенза, 2007. – С. 127.
45. Краснопольская, Л. М. Утилизация растительных отходов дереворазрушающими грибами рода вешенка / Л. М. Краснопольская, А. И. Сафрай, А. Д. Тищенко и др. // Достижения биотехнол.-агропром. комплекса. – Черновцы. – 1991. – 108 с.

46. Крыницкая, А. Ю. Влияние соотношений углеводных фракций питательной среды на физиологическую активность микроорганизмов рода *Bacillus* / А. Ю. Крыницкая, Ю. В. Глазырина, В. С. Гамаюрова // Структура и динамика молекулярных систем. – 2003. – Т. 2. – № 10. – С. 267 – 270.
47. Кузнецов, В. Д. Изучение изменчивости актиномицетов – продуцентов антибиотиков и других биологически активных веществ // Антибиотики. – 1972. – Т. 17, № 7. – С. 666-671.
48. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1980. – 294 с.
49. Левитин, М. М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов / М. М. Левитин. – Л. : «Агропромиздат», 1986. – 208 с.
50. Лилли, В. Физиология грибов / В. Лилли, Г. Барнетт – М.: ИЛ, 1953. – 532 с.
51. Маханькова, Т. А. Эффективность химических и биологических препаратов для подавления растений конопли *Cannabis sativa* L. / Т. А. Маханькова, Ю. В. Бурлакова // Материалы научной конференции «Проблемы защиты растений в условиях современного сельскохозяйственного производства. – СПб., 2009. С. 17-19.
52. Мельник, В. А. Определитель грибов России. Класс *Hyphomycetes*. Вып. 1. Темноокрашенные гифомицеты (сем. *Dematiaceae*) / В. А. Мельник. – СПб: Наука, 2000. – 371 с.
53. Мельников, Н. Н. Пестициды и регуляторы роста растений: Справочное издание / Н. Н. Мельников, К. В. Новожилов, С. Р. Белан. – М. : Химия, 1995. – 576 с.
54. Методы экспериментальной микологии : Справочник / под ред. В. И. Билай. – Киев : Наукова думка, 1982. – 552 с.
55. Методические указания по полевому испытанию гербицидов в растениеводстве. – М.: ВНИИЭСХ, 1981. – 46 с.
56. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве – СПб., 2009. – 378 с.

57. Миско, Л. А. Гельминтоспориоз мака / Миско Л. А. // Защита растений. – 1963. – №10. – С. 56.
58. Миско, Л. А. Гельминтоспориоз мака лекарственного и меры борьбы с ним в лесостепной зоне левобережья Украины: автореферат дисс. канд. биол. наук 06.01.07. защищена 21 июня 1965 / Л. А. Миско – Киев, 1965. – 20 с.
59. Миско, Л. А. Пероноспороз мака в условиях Лесостепи Украины / Л. А. Миско // Тр. V Всесоюзного совещания по иммунитету растений. – Киев, 1969. – С. 32-34.
60. Миско, Л. А. Изменения в тканях растения мака при поражении гельминтоспориозом / Л. А. Миско // Бюл. Главного ботанического сада. – 1973. – Вып. 87 – С. 110-112.
61. Никитин, А. В. Определение площадей земельных участков : Учеб. пособие / А. В. Никитин. – Хабаровск : Изд-во ДВГУПС, 2003. – 60 с.
62. Никитина, К. В. Грибные и бактериальные болезни мака в Ленинградской области / К. В. Никитина, Т. Е. Вахрушева // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1975. – Т. 55, вып. 1. – С. 224-229.
63. Новикова, И. И. Альтернативные методы защиты сельскохозяйственных культур от вредных организмов / И. И. Новикова, И. В. Бойкова, В. А. Павлюшин // Агротехнический метод в защите растений от вредных организмов : материалы 2 Всерос. научно-практич. конф. – Краснодар, 2002. – С. 97-98.
64. Новикова, И. И. Новые биопрепараты, перспективные для защиты растений-интродуцентов от вредителей и болезней / И. И. Новикова, И. В. Бойкова // Биологическое разнообразие. Интродукция растений : материалы 3-й международ. науч. конф. – СПб., 2003. – С. 444-445.
65. Новикова, И. И. Биоценотическое значение микробов-антагонистов в фитосанитарной оптимизации агроэкосистем / И. И. Новикова // Биол. ср-ва защиты растений, технологии их изготовления и применения. – СПб., 2005. – С. 303-330.

66. Новикова, И. И. Биологические особенности и компонентный состав активного комплекса штамма *Streptomyces chrysomallus* P-21 – антагониста фитопатогенных грибов / И. И. Новикова, Ю. Д. Шенин, И. В. Бойкова // Вестник защиты растений. – 2006. – № 1. – С. 13–21.
67. Орел, Л. В. Сравнение химических и биологических методов борьбы с сорными растениями / Л. В. Орел // Научно-техн. бюл. – 1991. – № 3. – С.46-52.
68. Островский, Н. И. Основные вредители и болезни мака / Н. И. Островский, Л. С. Дроздовская // Защита растений. – 1970. – №11. – с. 21.
69. Павлюшин, В. А. Биологические основы создания комплексных технологий подавления мака и конопли / В. А. Павлюшин, Ю. А. Титова, А. П. Дмитриев, и др. // Вестник защиты растений. – 2013. – № 1. – С. 3-18.
70. Патент № 2377774 Российская федерация, МПК A01N 63/00. Штамм гриба *Dendryphion penicillatum* (Corda) Fr. 1.39, обладающий микогербицидной активностью против мака снотворного. Гасич Е. Л., Хлопунова Л. Б., Бильдер И. В.; заявитель и правообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (RU) . – № заявки 20088129979; заявлено 21.07.2008; опубликовано 10.01.2010, бюл. № 1. – 6 с.
71. Попов, М. Г. Семейство *Papaveraciae* Juss. – Маковые / М. Г. Попов // Флора СССР. – М.-Л. : Из-во АН СССР, 1937. – Т. 7. – С. 573-717.
72. Пospelов, А. Г. Грибная флора Киргизской ССР / А. Г. Пospelов, Н. Г. Запромeтов, А. А. Домашева. – Фрунзе : Из-во АН Кир. ССР, 1957. – Вып.1. – 129 с.
73. Плохинский, Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М. : МГУ, 1970. – 368 с.
74. Плохинский, Н. А. Математические методы в биологии / Н. А. Плохинский. – М. : МГУ, 1978. – 266 с.
75. Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. – М. : Высшая школа, 1989. – 688 с.
76. Ремнева, З. И. Внутривидовая неоднородность *Macrosporium solani* Ell. et Mart. – возбудителя ранней пятнистости картофеля / З. И. Ремнева,

- В. Г. Иванюк // Микология и фитопатология. – 1968. – Т. 2 – вып. 3. – С. 202-209.
77. Русанова, Е. П. Разработка нового метода получения биологически активных соединений на основе типового штамма *Streptomyces werraensis* 1365T / Е. П. Русанова, Т. А. Алехова, Г. Б. Федорова, Г. С. Катруха // Прикл. биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36. – № 3. – С. 312-316.
78. Сергеев, А. Ю. Грибковые инфекции / А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев. – М. : Бином, 2003. – 440 с.
79. Сухоруков, К. Т. О действии ядов на плазму и физиологические процессы растений / К. Т. Сухоруков // Бюл. Главного ботанического сада. – 1957. – Вып. 28. – С. 54-56.
80. Титова, Ю. А. Утилизация отходов сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности съедобными грибами – путь к ресурсосберегающей технологии / Ю. А. Титова // Тез. докл. междунар. науч.-техн. конф. «Ресурсосберегающие технологии пищевых производств» (12 – 14 апреля 1998 г.). – СПб., 1998. – С. 146.
81. Титова, Ю. А. Двухэтапная биоконверсия отходов с помощью *Pleurotus ostreatus* и *Trichoderma harzianum* / Ю. А. Титова, Л. Б. Хлопунова, Д. В. Коршунов // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36. – вып. 5. – С. 64 – 70.
82. Титова, Ю. А. Триходермин на основе вторичной биоконверсии отходов и его эффективность против болезней огурца / Ю. А. Титова, И. И. Новикова, Л. Б. Хлопунова, Д. В. Коршунов // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36. – вып. 4. – С. 76 – 80.
83. Транснациональный наркобизнес: новая глобальная угроза / Отв. ред. А. Н. Глинкин. – М.: Российская политическая энциклопедия, 2002. – 263 с.
84. Тулемисова, К. А. Микробиологические методы защиты растений / К. А. Тулемисова // Вест. АН Каз. ССР. – 1990. – № 6. – С. 29–36.
85. Тулемисова, К. А. Антибиотики – основа для создания биопрепаратов комплексного воздействия на фитопатогены / К. А. Тулемисова,

- Л. П. Мамонова // II Симпоз. стран-членов СЭВ по микробным пестицидам. – М. – 1990. – С. 61–63.
86. Феофилова, Е. П. Видовой состав мицелиальных грибов, поражающих пищевые продукты / Е. П. Феофилова, Л. С. Кузнецова, Я. Э. Сергеева, Л. А. Галанина // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 1. – С. 128-133.
87. Хохряков, М. К. Изменчивость фитопатогенных грибов / М. К. Хохряков // Наследственность и изменчивость растений, животных и микроорганизмов : тр. конф., посвященной 40-летию Великой Октябрьской социалистической революции (8–14 октября 1957 г.). – 1959. – Т. 1. – С. 433-439.
88. Шеберстов, В. В. Мак снотворный (опийный) / В. В. Шеберстов, А. И. Баньковский, Н. Д. Матвеев, Я. А. Алешкина. – М. : Медгиз, 1955. – 16 с.
89. Шипилова, Н. П. Биологические особенности гриба *Sclerotinia sclerotiorum*, выделенного из конопли / Н. П. Шипилова, А. П. Дмитриев // Вестник защиты растений. – 2011. – №1. – С. 20-26.
90. Штарк, О. Ю. Продуцирование антифунгальных метаболитов *Pseudomonas chlororaphis* при росте на различных источниках питания / О. Ю. Штарк, А. И. Шапошников, Л. В. Кравченко // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 5. – С. 645-650.
91. Штерншис, М. В. Роль и возможности биологической защиты растений / М. В. Штерншис // Защита и карантин растений. – 2006. – № 6. – С. 14 – 17.
92. Черепанов, С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С. К. Черепанов. – Л.: Наука, 1995. – 1000 с.
93. Чмутов, К. В. Хроматография / К. В. Чмутов. – М. : Химия, 1978. – 127 с.
94. Abbas, H. K. Influence of unrefined corn oil and surface-active agents on the germination and infectivity of *Alternaria helianthi* / H. K. Abbas, G. H. Egley // Biocontrol Sci. Technol. – 1996. – Vol. 6, № 4. – P. 531-538.

95. Abbas, H. K. Biological control and use of adjuvants against multiple seeded cocklebur (*Xanthium strumarium*) in comparison with several other cocklebur types / H. K. Abbas, B. J. Johnson, D. J. Pantone, R. Hines // Biocontrol Sci. Technol. – 2004. – Vol. 14, № 8. – P. 855-860.
96. Amsellem, Z. Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms / Z. Amsellem, N. K. Zidack, P. C. Quimby e.a. // Crop Protection. – 1999. – Vol. 18, № 10. – P. 643-649.
97. Backhouse, D. Ultrastructure of antagonism of *Sclerotium cepivorum* by *Bacillus subtilis* / D. Backhouse, A Stewart // J. Phytopathol. – 1989. – Vol. 124. – P. 207-214.
98. Bailey, B. A. Evaluation of infection processes and resulting disease caused by *Dendryphon penicillatum* and *Pleospora papaveracea* on *Papaver somniferum* / B. A. Bailey, C. Apel-Birkhold, N. R. O'Neill e.a. // Phytopathology. – 2000. – V.90, N. 7. – P. 699-709.
99. Bailey, B. A. Nep1 protein from *Fusarium oxysporum* enhances biological control of opium poppy by *Pleospora papaveracea* / B. A Bailey, C. Apel-Birkhold, O. O. Akingbe e.a. // Phytopathology. – 2000. – V. 90, N. 8. – P. 812-818.
100. Bailey, B. A. Influence of adjuvants on disease development by *Pleospora papaveracea* on opium poppy (*Papaver somniferum*) / B. A. Bailey, N. R. O'Neill, J. D. Anderson // Weed Sci. – 2004 – V. 52, N. 3. – P. 424-432.
101. Bailey, B. A. Production of *Pleospora papaveracea* biomass in liquid culture and its infectivity on opium poppy (*Papaver somniferum*) / B. A. Bailey, K. P. Hebbar, R. D. Lumsden e.a. // Weed Sci. – 2004. – V. 52, N. 1. – P. 91-123.
102. Ballarin, C. Untersuchungen über *Helminthosporium papaveris* / C. Ballarin // Phytopathol. Z. – 1950. – Bd. 16. – P. 399-442.
103. Barbacka, K. *Helminthosporium* na maku uprawnym (*Helminthosporium papaveri* K. Sawada) = Helminthosporiosis of cultivated poppy / K. Barbacka : Mem. Inst. Nat. Polonais Econ. Rurale Pulawy – 1935. – No. 242. – P. 88.

104. Boyette, C. D. Biocontrol efficacy of *Colletotrichum truncatum* for hemp sesbania (*Sesbania exaltata*) is enhanced with unrefined corn oil and surfactant / C. D. Boyette, R. E. Hoagland, M. A. Weaver // Weed Biol. Manag. – 2007. – Vol. 7, № 1. – P. 70-76.
105. Braun, U. The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe / U. Braun. – Stuttgart, Jena, 1995. – 338 p.
106. Cartwright, R.D. Biological limitations of *Protomyces gravidus* as a mycoherbicide for giant ragweed, *Ambrosia trifida* / R.D. Cartwright, G.E. Templeton // Plant Disease. – 1988. – Vol. 72. – P. 580 – 582.
107. Charudattan, R. Bioherbicides. The role of plant pathogens in integrated pest management / R. Charudattan // Proc. 10th EWRS (European Weed Research Society). –Poznan, 1997. – P. 144.
108. Christy, A. L. Synergizing Weed Biocontrol Agents with Chemical Herbicides / A. L. Christy, K. A. Herbst, S. J. Kostka e.a. // Pest Control with Enhanced Environmental Safety – Washington, 1993. – P. 87-100. – (ACS Symposium Series. Vol. 524.).
109. Christoff, A. Some plant diseases new to Bulgaria / A. Christoff // Sci. Zemledelie. – 1930. – V. 11. – P. 3-6.
110. Churchill, B. W. Mass production of microorganisms for biological control. Biological Control of Weeds with Plant Pathogens / B. W. Churchill. – New York : J. Wiley. – 1982. – P. 139-156.
111. Connick, W. J. Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process / W. J. Connick, C. D. Boyette, J. R. McAlpine // Biol. Control. – 1991. – Vol. 1, № 4. – P. 281-287.
112. Czyzewska, S. Niektóre dane z biologii grzyba *Helminthosporium papaveris* Hennings, stadium doskonałe *Pleospora papaveracea* (Wint.) de Not = Some data on the biology of the fungus *Helminthosporium papaveris* Henn., imperfect stage of *Pleospora papaveracea* (Wint.) de Not) / S. Czyzewska, H. Zarzycka // Acta Agrobot. – 1960 – № 10 – P. 41-51.

113. Daigle, D. J. Invert emulsions: carrier and water source for the mycoherbicide, *Alternaria cassia* / D. J. Daigle, W. J. Connick, P. C. Quimby, e.a. // Weed Technol. – 1990. – Vol. 4, № 2. – P. 327-331.
114. Daigle, D. J. Formulating atoxigenic *Aspergillus flavus* for field release / D. J. Daigle, P. J. Cotty // Biocontrol Sci. Technol. – 1995. – Vol. 5, № 2. –P. 175-184.
115. Del Serrone, P. Pathogenicity and host specificity of *Pleospora papaveracea*, a candidate for biological control of poppy (*Papaver rhoeas*) / P. Del Serrone, T. Annesi // VII Intern. Symp. Biol. control of weeds. – Rome, 1989. – P. 465–469.
116. Duke, S. O. Interactions of synthetic herbicides with plant disease and microbial herbicides / S. O. Duke, D. E. Wedge, A. L. Cerdeira, M. B. Matallo // Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management – Dordrecht : Springer, 2007. – P. 277-296.
117. Ellis, M. B. Dematiaceous hyphomycetes /M. B. Ellis. – England: CABI Publishing, 1971. – 608 p.
118. Farr, D. F. Morphological and molecular studies on *Dendryphon penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, pathogens of *Papaver somniferum* / D. F. Farr, O. N. R.'Neill, P. B. van Berkum // Mycologia. – 1999. – Vol. 92 – P. 145-153.
119. Flachs, K. Krankheiten und Schädlinge an Ölpflanzen = Diseases and pests of oil-poppy / K. Flachs // Nachr. Schädlingsbekämpfung. – 1936 – № 11. – 130-148.
120. Girzitska, Z. K. Conidien von *Pleospora papaveracea* Sacc. = Conidial stage of *Pleospora papaveracea* Sacc. / Z. K. Girzitska // Rev. Appl. Mycol. – 1930. – № 9. – 488.
121. Glukhova, L. A. Killer-strain of *Pleospora papaveracea* (De Not.) Sacc. – biological control agent of illegal crops *Papaver somniferum* L. / L. A. Glukhova, A. A. Abdukarimov // XV Congress of European Mycologists : abstracts; St.-Petersburg, Russia, September 16-21. – St. Petersburg : Treeart LLC , 2007. – P 248.

122. Gressel, J. Synergized mycoherbicides for resistance management / J. Gressel, Z. Amsellem, S. D. Michaeli, A. Sharon // Weed and crop resistance to herbicides /– Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1997. – P. 267-273.
123. Gressel, J. Herbicides as Synergists for Mycoherbicides, and Vice Versa / J. Gressel // Weed Sci. – 2010 – V. 58, № 3 – P. 324-328.
124. Greaves, M. P. Formulations of microbial herbicides / M. P. Greaves, L. Dutton, J. Lawrie // Asp. Appl. Biol. – 2000. – № 57. – P. 171-178.
125. Harman, G.E. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control / G.E. Harman, X. Jin, T.E. Stasz e.a. // Biol. control. – 1991. – Vol.1. – P.23-28.
126. Hasan, S. Plant pathogens and biological control of weeds / S. Hasan // Plant pathologist pocketbook. – Kew, Surrey, UK : CMI, 1983. – P. 269-274.
127. Hebbar, K. P. Fermentation and formulation of *Dendryphon penicillatum*, a potential mycoherbicide of *Papaver somniferum*. (Abstr.) / K. P. Hebbar, N. R. O'Neill, B. A. Bailey, R. D. Lumsden // Phytopath. – 1997. – Vol. 87 – P 41.
128. Hong R. Investigation of *Bacillus subtilis* antagonistic activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* / R. Hong, C. Wei-Liang // J. Zhejiang Univ. Agr. Life Sci. – 1999. – Vol. 25, N 6. – P. 573–577.
129. Horionuchi, S. A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus* / S. Horionuchi, T. Beppu // Mol. Microbiol. – 1994. – Vol. 12, N 6. – P. 859–864.
130. Jackson, M.A. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules / M. A. Jackson, D. A. Schisler // Mycol. Res. – 1995. – Vol. 99, № 7. – P. 879-884.
131. Inderbitzin, P. Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: The heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic, species with a *Brachycladium papaveris* asexual state [Text] / P. Inderbitzin, R. A. Shoemaker, N. R. O'Neill e.a. // Can. J. Bot. – 2006. – Vol. 84, № 8. – P. 1304-1326.

132. Kapoor, L. D. Opium Poppy : Botany, Chemistry and Pharmacology / L. D. Kapoor. – Binghampton, NY, USA : The Haworth Press, 1995. – 329 p.
133. Kluth, S. Interactions between the rust fungus *Puccinia punctiformis* and ectophagous and endophagous insects on creeping thistle / S. Kluth, A. Kruess, T. Tschardt // Journal of Applied Ecology. – 2001. – Vol.38. – P. 548–556.
134. Kozlovsky, A. G. Biologically active secondary metabolites of *Penicillium* species isolated from usual and unusual habitats: searching, isolation, structure elucidation / A. G. Kozlovsky // XV Congress of European Mycologists : abstracts : St. Petersburg, Russia. September 16–21. – St. Petersburg : Treeart LLC , 2007. – P. 280.
135. Kremer, R. J. The role of bioherbicides in weed management / R. J. Kremer // Biopest. Int. – 2005 – Vol. 1, № 3. – P. 127-141.
136. Kropp, B. R. The effect of surfactants and some herbicides on teliospore viability in *Puccinia thlaspeos* (Schub.) / B. R. Kropp, H. Darrow // Crop Protection. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 369-374.
137. Kruess, A. Indirect interaction between a fungal plant pathogen and a herbivorous beetle of the weed *Cirsium arvense* / A. Kruess // Oecologia. – 2002. – Vol. 130, № 4. – P. 563-569.
138. Landa, B. B. Phylogenetic analysis of downy mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in plant and seed detection of *Peronospora arborescens* / B. B. Landa, M. Montes-Borrego, F. J. Munoz-Ledesma, R. M. Jimenez-Diaz // Phytopathology – 2007. – V. 97, № 11 – P. 1380-1390.
139. Leth, V. *Phomopsis cirsii*: a potential biocontrol agent of *Cirsium arvense* / V. Leth, J. Netland, C. Andreassen // Weed Research. – 2008. – Vol. 48, № 6. – P. 533-541.
140. Mahuku, G. S. Influence of sucrose, mucin and xanthan gum on spore germination of ten different fungi / G. S. Mahuku, P. H. Gudwin // Eur. J. Plant Pathol. – 1998. – Vol. 104, № 8. – P. 849-852.
141. McPartland, J.M. Hemp diseases and pests: management and biological control / J.M. McPartland, R.C. Clarke, D.P. Watson // An Advanced Treatise. –

Wallingford: CAB International, 2000. – 251 p.

142. Meffert, M.-E. Ein beitrage zur biologie und morphologie der erregere der parasitären blatttdurre des mohns / M.-E. Meffert // Z. Parasitenk. – 1950. – Bd. 14. – S. 442-498.

143. Milatović, I. Study of the fungus *Pleospora calvescens* (Fr.) Tulasne on poppy / I. Milatović – Belgrade, Yugoslavia : U.S. Dep. Agricult Nat. Sci. Found., 1952.– 13 p.

144. Montes-Borrego, M. Role of oospores as primary inoculum for epidemics of downy mildew caused by *Peronospora arborescens* in opium poppy crops in Spain / M. Montes-Borrego, B. B. Landa, J. A. Navas-Cortes, F. J. Munoz-Ledesma // Plant Path. – 2009. – Vol. 58, № 6. – P.1092-1103.

145. Mraz, F. Vliv ýkodliveho pusobeni houby *Helminthosporium papaveris* Hennig na vynosy Maku v Karlovy Vary letech 1957 a 1958 = Influence of the harmful effect of the fungus *H. papaveris* on poppy yields in the region of Karlovy Vary in the years 1957 and 1958 / F. Mraz // Cesk. Akad. Zemed. Sborn. –1960. – № 33. – P. 1083-1094.

146. Munoz-Ledesma, F. J. First report of downy mildew of opium poppy caused by *Peronospora arborescens* in Spain / F. J. Munoz-Ledesma, R. M. Jimenez-Díaz // Plant Disease. – 2005. – Vol. 89, № 3. – P. 338.

147. O'Neill, N. R. *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum* / N. R. O'Neill, J. C. Jennings, B. A. Bailey, D. F. Farr // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90, № 7. – P. 691-698.

148. Osbourn, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack / A. E. Osbourn // Plant Cell. – 1996. – Vol. 8, N 10. – P. 1821-1831.

149. Pat. 5074902 (US), Int. Cl.⁵ A01N 63/04. Granular products containing fungi encapsulated in a wheat gluten matrix for biological control of weeds / W. J. Connick, C. D. Boyette. – 560791; Filed Jun 30, 1990; Date of Pat. Dec 24, 1991. – 5 p.

150. Pat. US 6248321 B1, Int. Cl.⁷ A01N 63/04. Encapsulation of microparticles

in teardrop shaped polymer capsules of cellular size / R.S. Winder, J.J. Wheeler; Her Majesty The Queen in Right of Canada, as represented by The Minister of Natural Resources, Canadian Forestry Service. – 09/229901; Filed Jan 14, 1999; Date of Pat. Jun 19, 2001. – 18 p.

151. Peng, G. Interactions of *Pyricularia setariae* with Herbicides for Control of Green Foxtail (*Setaria viridis*) / G. Peng, K. N. Byer // Weed Technology. – 2005. – V. 19, № 3. – P. 589-598.

152. Peschken, D. P. Biocontrol of the Weed Canada Thistle (*Cirsium arvense*): Releases and Development of the Gall Fly *Urophora cardui* (Diptera: Tephritidae) in Canada / D. P. Peschken, D. B. Finnamore, A. K. Watson // Canadian Entomologist. – 1982. – Vol. 114, № 4. – P. 349-357.

153. Roskopf, E. N. Influence of epidemiological factors on the bioherbicidal efficacy of *Phomopsis amaranthicola* on *Amaranthus* spp. / E. N. Roskopf, C. B. Yandoc, R. Charudattan, J. T. DeValerio // Plant Dis. – 2005. – Vol. 89, No. 12. – P. 1295-1300.

154. Quimby, P. C., Jr. Enhancing biological control through superior formulations: a worthy goal but still a work in progress / P. C. Quimby Jr., G. Mercadier, W. Meikle e.a. // Enhancing biocontrol agents and handling risks / – Amsterdam: IOS Press, 2001. – Vol. 339. – P. 86-95.

155. Reid, D. A. New or interesting British plant diseases / D. A. Reid // Transactions of the British Mycological Society – 1969. – Vol. 52, №. 1. – P. 19-38.

156. Sanjai, S. Mycoherbicidal potential of *Alternaria alternata* ITCC4896 for the control of *Parthenium hysterophorus* / Saxena Sanjai, Kumar Mikeshe // Journal of plant protection research. – 2007 – Vol. 47, № 2 – P.213.

157. Sawada X. *Helminthosporium papaveris* Sawada./ X. Sawada – Trans. Formosan Nat. Hist. Soc. – 1917. – № 32. – P. 129.

158. Schmitt, C. G. Pathogens of selected members of the *Papaveraceae* : An annotated bibliography / C. G. Schmitt, B. Lipscomb. – Agric. Res. Serv. : U. S. Dep. of Agric., Beltsville, MD, 1975. – 186 p.

159. Scott, J. B. Phylogenetic analysis of the down mildew pathogen of oilseed

- poppy in Tasmania, and its detection by PCR [Text] / J. B. Scott, F. S. Hay, C. R. Wilson // Mycological Research. – 2004. – V. 108, № 2. – P. 198-205.
160. Sehgal, S. P. Capsule rot of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) / S. P. Sehgal, I. J. Gupta, J. M. Agrawat // Rajasthan J. Agric. Sci. – 1971. – № 2. – P. 61-62.
161. Smith, D. A. Interactions between chemical herbicides and the candidate bioherbicide *Microsphaeropsis amaranthi* / D. A. Smith, S. G. Hallett // Weed Science. – 2006. – Vol. 54, № 3. – P. 532-537.
162. Tanaka, T. New Japanese fungi. Notes Translations+IX / T. Tanaka // Mycologia. – 1920 – Vol. 12, № 1. – P. 329-333.
163. TeBeest, D. O. The status of biological control of weeds with fungal pathogens / D. O. TeBeest, X. B. Yang, C. R. Cisar // Ann. Rev. Phytopathol. – 1992. – Vol. 30. – P. 637-657.
164. TeBeest, D. O. Biological control of weeds with plant pathogens and microbial pesticides / D. O. TeBeest // Advances in Agronomy; / San Diego: Academic Press, 1996. – Vol. 56 – P. 115-137.
165. Thomashow, L. S. Current concept in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites / L. S. Thomashow, D. M. Weller // Plant-Microbe Interaction. NY. : Chapman and Hall, 1995. – Vol. 1. – P. 187-235.
166. Thomson, R. H. Naturally occurring Quinones / R. H. Thomson. – London; NY.: Acad. Press, 1971. – 734 p.
167. Thrane, U. The exo-metabolome of *Fusarium* species / U. Thrane // XV Congress of European Mycologists : abstracts : St. Petersburg, Russia. September 16–21. – St. Petersburg : Treeart LLC , 2007. – P. 283.
168. Turner, S. K. Resistans of canada thisle (*Cirsium arvense*) ecotipes to a rust pathogen (*Puccinia obtengens*) / S. K. Turner, P. K. Fay, E. L. Sharp, D. C. Sands // Weed Sci. – 1981. – V. 29, № 6. – P. 623-624.

169. Winder, R. S. Evaluation of *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* spp. as potential biological control agents for marsh reed grass (*Calamagrostis canadensis*) / R. S. Winder // Can. J. Plant Pathol. – 1999. – Vol. 21, № 1. – P. 8-15.
170. Winder, R. S. Microencapsulation: a strategy for formulation of inoculum / R. S. Winder, J. J. Wheeler, N. Conder, I. S. Otvos, R. Nevill, L. Duan // Biocontrol Sci. Technol. – 2003. – Vol. 13, № 2. – P. 155-169.
171. Womack, J. G. A vegetable oil-based invert emulsion for mycoherbicide delivery / J. G. Womack, G. M. Eccleston, M. N. Burge // Biological control. – 1996. – Vol. 6, № 1. – P. 23-28.
172. Wraight, S.P. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents / S.P. Wraight, M.A. Jackson, S.L. de Kock // Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential. – NY: CAB International, 2001. – P. 253-287.
173. Zidack, N. K. Formulation and application of plant pathogens for biological weed control / N. K. Zidack, P. C. Quimby // Biopesticides: Use and Delivery Methods in Biotechnology, Vol. 5. – Totowa : Humana Press, 1999. – P. 371-381.
174. Доклад о международной стратегии по контролю над наркотиками за 2007 год [Электронный ресурс]. – Россия, 2008 – 112 с.
URL: <http://russian.moscow.usembassy.gov/incsr2008.html>
175. Доклад Международного комитета по контролю над наркотиками за 2009 год [Электронный ресурс] / Организация Объединенных Наций. – Нью-Йорк, 2011. – 178 с.
URL: <http://www.un.org/ru/development/surveys/docs/incb2010.pdf>
176. Annual Report USDA 2005 (4th August, 2005) [Internet Resource];
URL: http://www.pw.usda.gov/wrrcpagedoc/UNITS/U5325_43_00.htm.
177. Biological Control of Weeds, Inc. [Internet Resource];
URL: <http://www.bio-control.com/siteindex.php>

ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ
Директор ГНУ ВИЗР
академик РАСХН

В.А.Павлюшин
23 июля 2009 г.

Акт

испытаний эффективности опытной партии биопрепарата на основе
перспективного штамма *Dendriphion penicillatum* 1.39-8
в полевых условиях в посевах мака с помощью СЛА
(Тосненская опытная станция защиты растений ГНУ ВИЗР,
Ленинградская область, 2009 г.)

В 2009 году в период с 16 июня по 8 июля на опытном поле Тосненской опытной станции защиты растений ГНУ ВИЗР были проведены испытания эффективности опытных партий биопрепарата на основе перспективного штамма *D. penicillatum* 1.39-8 на культуре мака.

Субстратную (зерновую) гранулированную препаративную форму биогербицида получали базе биотехнологического производства ЗАО «Агробиотехнология» методом глубинно-поверхностного культивирования. Для получения культуральной жидкости на первой стадии технологического процесса проводили глубинную ферментацию штамма-продуцента на оптимизированной соево-глюкозной питательной среде (СГС-2) в ферментере в течение 2-х суток. Для подавления роста бактерий применяли следующие антибиотики в концентрации 50 мкг/мл: полимиксин, пенициллин, стрептомицин.

Вторая стадия поверхностного культивирования была проведена на инокулированном зерне в установке для твердофазного культивирования микроорганизмов. Дорастивание микромицета осуществляли в стерилизованной термостатированной камере при температуре 23–25° С в течение 6 суток, а затем высушивали при 37–40° С в течение 2-х суток.

Титр готовой препаративной формы составлял $1,2 \times 10^4$ КОЕ/г по данным учета в камере Горяева.

Субстратную гранулированную препаративную форму биогербицида на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 получали в лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР методом полупромышленного малообъемного твердофазного культивирования.

Глубинное культивирование штамма-продуцента на оптимизированной соево-глюкозной питательной среде (СГС-2) в колбах объемом 750 мл на качалке при $25 \pm 2^\circ$ С в течение 5-ти суток. Вторая стадия твердофазного культивирования проводилась на отходах промышленного культивирования съедобных грибов (опилки смешанные; отруби пшеничные 7% по влажному весу субстрата, первично

конвертированные макромицетом; грибной белок – мицелий съедобного макромицета в толще субстрата). Затем в условиях стерильного ламинарного бокса проводили инокулирование пластиковых мешков объемом 3 л со стерильными отходами промышленного культивирования съедобного гриба шии-таке (*Lentinus edodes*). Культивирование микромицета осуществляли в стерилизованной термостатированной камере при 23–25° С в течение 10 суток, ежедневно встряхивая.

Титр готовой препаративной формы составлял $0,4 \times 10^5$ КОЕ/г по данным учета в камере Горяева.

Для получения рабочей суспензии, производили замачивание 1 000 г гранул субстратной формы в 1 000 мл стерильной воды при постоянном встряхивании для получения суспензии. Затем гомогенизировали с помощью блендера Vitek, фильтровали через 2 слоя марли, концентрировали и определяли титр инфекционных единиц (КОЕ/мл) в камере Горяева, рассчитывая его на 1 мл суспензии по следующей формуле: $N = a \times 250 \times 10^3$, где: а – среднее количество грибных колониеобразующих единиц в одном большом квадрате камеры Горяева (среднее из 5 больших квадратов камеры); 250×10^3 – коэффициент пересчета, зависящий от объема большого квадрата; N – титр грибных колониеобразующих единиц, клеток/мл. Стабилизированные суспензионные концентраты, полученные из гранулированных субстратных препаративных форм смешивали для приведения титра рабочей жидкости к значению $1,5 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Биологическая эффективность лабораторных образцов биопрепарата на основе штамма гриба *D. penicillatum* 1.39-8 против растений мака была оценена в полевых условиях на Тосненской опытной станции ГНУ ВИЗР (Ленинградская обл.). Для проведения испытаний использовали жидкую и гранулированные зерновую и субстратную препаративные формы, наработанные в лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР и полученные из ЗАО «Агробιοтехнология». Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 применялся однократно, титр рабочей суспензии составлял $0,5 \times 10^4$ КОЕ/мл по данным учета в камере Горяева.

Было проведено сплошное опрыскивание посева целевых растений в наиболее уязвимую к воздействию фазу развития мака – 1–2-го настоящих листа с помощью мотодельтоплана FO-2 АГРО. Площадь поля составляла 1 га (4 опытных деланки по 0,25 га).

Варианты опыта:

14. Контроль;
15. Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 однократно (гранулированная (зерновая и субстратная) форма использовалась в виде смывов – суспензия КОЕ) для опрыскивания проростков мака в фазе 1–2-х настоящих листьев (норма расхода 50 л/га).

Схема опыта

- Контроль (без обработки).
- Биопрепарат на основе *D. penicillatum* 1.39-8 – однократно.

Анализ данных маршрутных обследований и обработки растений, собранных на учетных площадях, показал, что в контрольных вариантах опыта растения мака нормально росли и развивались. В течение всего учетного периода они имели интенсивно-зеленую окраску, признаков болезней и ингибирования роста и развития не отмечено. В конце проведения опыта наблюдали бутонизацию. В опытном варианте на всех учетных площадях выявлено, что уже через 7 суток после опрыскивания биопрепаратом растения начали отставать в росте и развитии по сравнению с растениями в контроле, хотя не было зарегистрировано их полной гибели. Выявлен яркий фитотоксический эффект штамма-продуцента, мицелий которого содержит комплекс биологически активных соединений.

Биологическая эффективность обработки оценивали по потерям в биометрических показателях растений мака, определяющих их производственную ценность и товарно-потребительские качества. Средние потери в росте за 3 проведенных учета растений мака с 90 учетных площадей составили 5,7 %, в биомассе – 42,4 %, в общей ассимиляционной поверхности листьев – 47,2 % по сравнению с контролем. В опытном варианте бутонизации и цветения мака не наблюдали.

Сильное угнетение растений достигло максимума на 7-е сутки после обработки и составило 16,1 %. Потери по всем биометрическим показателям роста и развития растений мака (высота, общая ассимиляционная поверхность листьев) продолжали возрастать до 21-х суток опыта. Это позволяет предположить пролонгированное воздействие биопрепарата на основе *D. penicillatum* 1.39-8 на растения, особенно при их переходе в репродуктивную стадию. Потери в биомассе, длине корня и количестве листовых ярусов выявили максимум на 10–12-е сутки после обработки. На 14-е сутки после применения биопрепарата наблюдали существенное снижение потерь в количестве листовых ярусов и менее значительное в биомассе растений мака. На сильно угнетенных растениях наблюдали развитие сапротрофной микробиоты с доминирующими видами *Alternaria brassicicola* и *A. alternata*. В дальнейшем растения мака не отрастали. Распространенность поражения угнетенных растений мака комплексом сапротрофов концу периода наблюдений составила более 73 %.

Таким образом, подтвержден фитотоксический эффект биопрепарата на основе перспективного штамма-продуцента *D. penicillatum* 1.39-8, заключающийся в значительном угнетении роста и развития целевых растений мака, и поражении их сапротрофной почвообитающей микробиотой, а также нарастании распространенности этого поражения.

Испытания показали, что применение биопрепарата на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 методом авиационного опрыскивания эффективно для уничтожения незаконных посевов и дикорастущего мака при норме расхода рабочей жидкости 50 л/га (УМО опрыскивание). Биологическое действие препарата выражается в снижении общего продуктивного состояния растений мака: в ростингибирующем действии на растения (снижении биомассы, высоты растений и количества листьев и т.п.), не доводя их до бутонизации, в угнетении вплоть до гибели в 16 % случаев.

Так, к 21-м суткам после опрыскивания количество выпадов растений составило 16,1 %, снижение биомассы – 42,4 %, снижение ассимиляционной поверхности листьев – 47,2 %. Высота обработанных растений в 2 раза, длина корня – в 1,5 раза, количество листьев – 1,1 раза, биомассы – в 7,5 раза, общая ассимиляционная поверхность листьев – в 8,2 раза были меньше контрольных.

Акт подписали:

Ведущий научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений, д.б.н.
Новикова И.И.

Зам.директора по научной работе, к.т.н.
Лысов А.К.

Старший научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений, к.б.н.
Титова Ю.А.

Научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений
Краснобаева И.Л.

УТВЕРЖДАЮ
Директор ГНУ ВИЗР
академик РАСХН

В.А.Павлюшин
24 сентября 2009 г.

Акт
испытаний эффективности опытной партии биопрепарата на основе
перспективного штамма *Dendriphion penicillatum* 1.39-8
в полевых условиях в посевах мака
(опытное поле ГНУ ВИЗР, 2009 г.)

В 2009 году в период с 15 июля по 3 сентября на опытном поле ВИЗР были проведены испытания эффективности опытных партий биопрепарата на основе перспективного штамма *D. penicillatum* 1.39-8 на культуре мака.

Субстратную гранулированную препаративную форму биогербицида получали базе лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР методом полупромышленного малообъемного твердофазного культивирования.

Вторая стадия твердофазного культивирования проводилась на отходах промышленного культивирования съедобных грибов следующего состава: опилки смешанные; отруби пшеничные 7 % по влажному весу субстрата, первично конвертированные макромицетом; грибной белок (мицелий съедобного макромицета в толще субстрата).

Титр готовой препаративной формы составлял $1,1 \times 10^4$ КОЕ/г по данным учета в камере Горяева.

Субстратную (зерновую) гранулированную препаративную форму биогербицида получали базе биотехнологического производства ЗАО «Агробиотехнология» методом глубинно-поверхностного культивирования.

Для получения культуральной жидкости на первой стадии технологического процесса использовали среду оптимизированного состава (ранее разработанную модифицированную соево-глюкозную среду с солями – СГС-2). Для подавления роста бактерий применяли следующие антибиотики в концентрации 50 мкг/мл: полимиксин, пенициллин, стрептомицин.

Вторая стадия поверхностного культивирования была проведена на инокулированном зерне в установке для твердофазного культивирования микроорганизмов.

Титр готовой препаративной формы составлял $1,2 \times 10^4$ КОЕ/г по данным учета в камере Горяева.

Стабилизированный суспензионный концентрат, полученный из гранулированной зерновой формы разбавляли водой для приведения титра рабочей жидкости к значению 3×10^6 КОЕ/мл.

Жидкую препаративную форму биогербицида в виде суспензии КОЕ получали базе лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР методом полупромышленного малообъемного погруженного культивирования.

Титр готовой препаративной формы составлял $2,8 \times 10^6$ КОЕ/мл по данным учета в камере Горяева.

Биологическая эффективность биопрепарата на основе штамма гриба *D. penicillatum* 1.39-8 против растений мака была оценена в полевых условиях на опытном поле ГНУ ВИЗР. Для проведения испытаний использовали жидкую и гранулированные зерновую и субстратную препаративные формы, наработанные в лаборатории микробиологической защиты растений ГНУ ВИЗР и полученные из ЗАО «Агробiotехнология». Биопрепарат применялся трехкратно:

- гранулированная субстратная форма с титром $1,1 \times 10^4$ КОЕ/г внесена за 30 суток до посева мака вкапыванием в почву с нормой расхода 2 кг/10 кв.м для обеспечения вышеуказанного титра;
- гранулированная зерновая форма использовалась в виде смывов – суспензия КОЕ с титром $3,1 \times 10^6$ КОЕ/мл – для опрыскивания проростков мака в фазе семядольных листьев;
- жидкая препаративная форма в виде суспензии КОЕ с титром $2,8 \times 10^6$ КОЕ/мл для опрыскивания проростков мака в фазе 1–2-х настоящих листьев.

Норма расхода биопрепарата 10 кг/га, рабочей жидкости – 1000 л/га.

Опрыскивание растворами гербицидов Ларен, СП и Зонтран, ККР различных концентраций проводилось 15.07.09 г. в фазе 5–6-и настоящих листьев после трехкратного применения биопрепарата на основе *D. penicillatum* 1.39-8.

Варианты опыта:

- Контроль (без обработки);
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 (гранулированная субстратная форма за 30 суток до посева мака с нормой расхода 2 кг/10 кв.м, гранулированная зерновая форма использовалась в виде смывов – суспензия КОЕ – для опрыскивания проростков мака в фазе семядолей, норма расхода биопрепарата 10 г/м²; жидкая препаративная форма в виде суспензии для опрыскивания проростков мака в фазе 1–2-х настоящих листьев норма расхода 100 мл/м²);
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (1,25 г/га – $\frac{1}{8}$ нормы) последовательно;
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (2,5 г/га – $\frac{1}{4}$ нормы) последовательно;
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Ларен, СП (5 г/га – $\frac{1}{2}$ нормы) последовательно;
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,2125 л/га – $\frac{1}{8}$ нормы) последовательно;
- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,425 л/га – $\frac{1}{4}$ нормы) последовательно;

- Биопрепарат на основе штамма *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно + Зонтран, ККР (0,85 л/га – $\frac{1}{2}$ нормы) последовательно;
- Гербицид Ларен, СП (1,25 г/га – $\frac{1}{8}$ нормы) однократно;
- Гербицид Ларен, СП (2,5 г/га – $\frac{1}{4}$ нормы) однократно;
- Гербицид Ларен, СП (5 г/га – $\frac{1}{2}$ нормы) однократно;
- Гербицид Ларен, СП (10 г/га – полная норма) однократно;
- Гербицид Зонтран, ККР (0,2125 л/га – $\frac{1}{8}$ нормы) однократно;
- Гербицид Зонтран, ККР (0,425 л/га – $\frac{1}{4}$ нормы) однократно;
- Гербицид Зонтран, ККР (0,85 л/га – $\frac{1}{2}$ нормы) однократно;
- Гербицид Зонтран, ККР (1,7 л/га – полная норма однократно).

Схема опыта

- Контроль (без обработки)
- Биопрепарат на основе *D. penicillatum* 1.39-8 трехкратно
- Биопрепарат трехкратно + Ларен, СП – $\frac{1}{8}$ нормы последовательно
- Биопрепарат трехкратно + Ларен, СП – $\frac{1}{4}$ нормы последовательно
- Биопрепарат трехкратно + Ларен, СП – $\frac{1}{2}$ нормы последовательно
- Биопрепарат трехкратно + Зонтран, ККР – $\frac{1}{8}$ нормы
- Биопрепарат трехкратно + Зонтран, ККР – $\frac{1}{4}$ нормы последовательно
- Биопрепарат трехкратно + Зонтран, ККР – $\frac{1}{2}$ нормы последовательно
- Гербицид Ларен, СП – $\frac{1}{8}$ нормы однократно
- Гербицид Ларен, СП – $\frac{1}{4}$ нормы однократно
- Гербицид Ларен, СП – $\frac{1}{2}$ нормы однократно
- Гербицид Ларен, СП – полная норма – 10 г/га однократно
- Гербицид Зонтран, ККР – $\frac{1}{8}$ нормы однократно
- Гербицид Зонтран, ККР – $\frac{1}{4}$ нормы однократно
- Гербицид Зонтран, ККР – $\frac{1}{2}$ нормы однократно
- Гербицид Зонтран, ККР – полная норма -1,7 л/га однократно

Сильное угнетение и гибель растений отмечены во всех вариантах опыта. Гибель растений после трехкратной обработки биопрепаратом колебалась от 13,8 % без гербицидов до 40 % с последующим использованием Ларена, СП при $\frac{1}{2}$ норме расхода. Зонтран, ККР при полной норме расхода также вызывал 100 %-ю гибель растений мака. Тем не менее, практически во всех вариантах опыта отмечено сильное распространение токсического поражения растений: от 79,1 % в случае использования биопрепарата без гербицидов, до 100 % в вариантах последующего применения гербицидов в пониженных концентрациях. Индекс развития токсического поражения при использовании трехкратной обработки биопрепаратом составил 5,0 %, в вариантах опыта с последующим применением Ларена, СП колебался от 7,6 % до 8,6 %, а Зонтрана, ККР – от 4,4 до 5,5 %. Максимальной величины этот показатель достигал в вариантах с использованием гербицидов – Ларен, СП ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ и полная норма расхода) и Зонтран (полная норма расхода).

Таким образом, проведенные исследования показали высокую эффективность последовательного применения трехкратной обработки биопрепаратом на основе

штамма *D. penicillatum* 1.39-8 1.39-8 при норме расхода препарата – 10 кг/га, рабочего раствора – 1 000 л/га и гербицида Ларен, СП с интервалом 7–10 суток при нормах расхода $\frac{1}{8}$ и $\frac{1}{4}$ от рекомендованной. Потери роста составляли 82,4–90,7 %, биомассы – 78,7–84,4 %, ассимиляционной поверхности листьев – 68,7–100 %. В этих случаях эффективность обработки практически соответствовала эффективности применения Ларена, СП и Зонтрана, ККР при полной норме расхода.

Акт подписали:

Ведущий научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений, д.б.н.
Новикова И.И.

Ведущий научный сотрудник
Центра биологической регламентации
пестицидов, к.с.-х. н.
Маханькова Т.А.

Старший научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений, к.б.н.
Титова Ю.А.

Ведущий научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений, к.б.н.
Бойкова И.И.

Научный сотрудник
лаб. микробиологической
защиты растений
Краснобаева И.Л.