



Маслиенко Л.В. - заведующая лабораторией биометода ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК, доктор биологических наук, заслуженный деятель науки Кубани, лауреат премии администрации Краснодарского края, лауреат национальной экологической премии «ЭкоМир», занимается разработкой биотехнологий получения и применения современных конкурентоспособных микробиологических препаратов для сельского хозяйства с 1981 года.

«Разработка биотехнологий производства и применения современных конкурентоспособных микробиологических препаратов для защиты растений от болезней»

Сельское хозяйство многих стран, а в последние годы и России, нацелено на более интенсивное использование элементов органического земледелия. Речь идёт о том, чтобы в самые ближайшие годы перейти на новые технологии выращивания сельскохозяйственных культур, не только более продуктивные и экономичные, но и безопасные для здоровья и окружающей среды. Поэтому разработка биотехнологий получения и применения современных конкурентоспособных микробиологических препаратов для сельского хозяйства становится первоочередной задачей социально-экономического развития государств.

Достоинствами микробиологических средств защиты растений являются:

- полифункциональность - обладают одновременно защитным (фунгицидным, бактерицидным, инсектицидным) механизмом действия, а также ростостимулирующей и целлюлозоразрушающей активностью;

- высокая экологичность - действующие агенты биопрепаратов – компоненты природных биоценозов, что объясняет их безопасность для окружающей среды;

- возможность решения проблемы резистентности популяций фитопатогенов к пестицидам.

Одним из немногих в нашей стране разработчиков микробиологических препаратов для защиты растений является лаборатория биометода ВНИИМК.

Основным направлением исследований лаборатории является разработка технологии производства разных препаративных форм микробиопрепаратов и технологии их применения для защиты семян, вегетирующих растений и почвы от комплекса патогенов масличных и других сельскохозяйственных культур.

В основе, разработанной в лаборатории биометода ВНИИМК концепции целенаправленного создания микробиопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от болезней, лежит поиск штаммов антагонистов, прежде всего безопасных для человека, нефитотоксичных, проявляющих высокую активность в широко варьируемых условиях против комплекса возбудителей болезней, обладающих полифункциональным типом действия.

Этапы включают:

- изыскание штаммов антагонистов в природе;
- ступенчатый скрининг штаммов в лабораторных и полевых условиях;
- селекционное улучшение перспективных штаммов, безопасных для человека и нефитотоксичных для растений;
- разработку препаративных форм, регламентов производства и хранения;
- обоснование стратегии применения микробиопрепаратов.

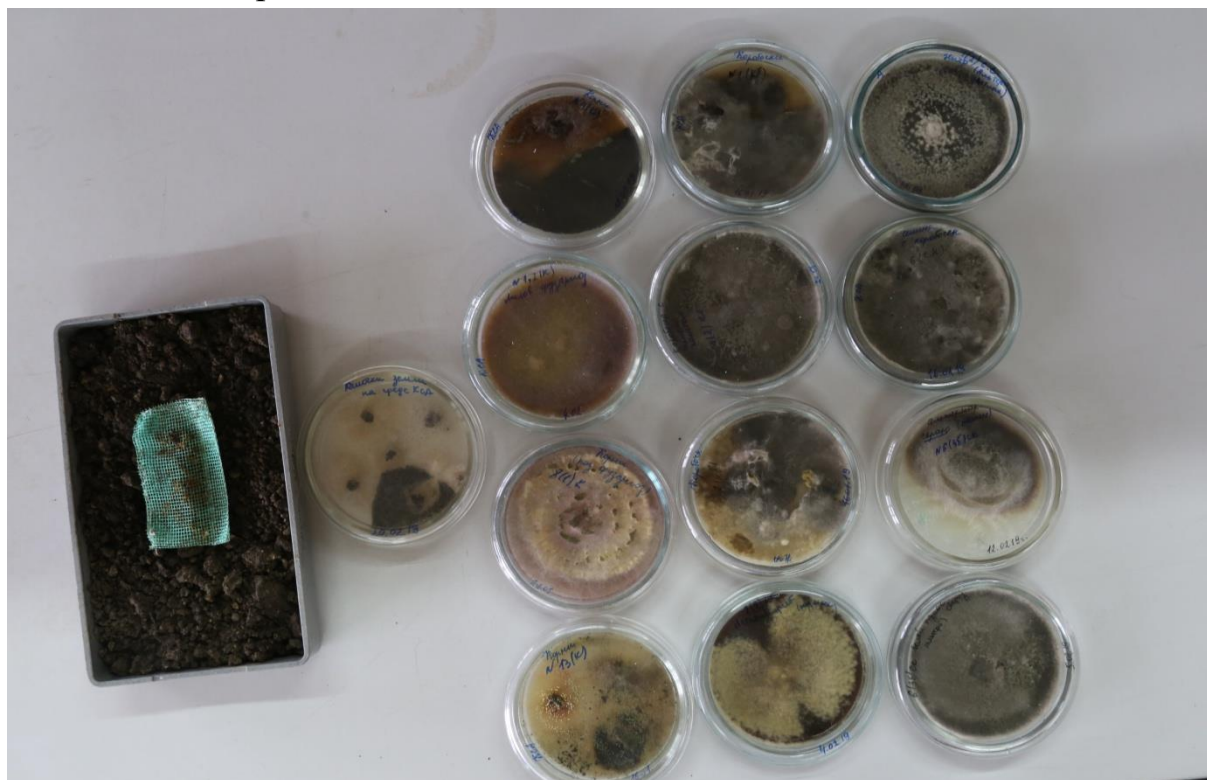
1. Для выделения штаммов, проявляющих антагонизм в отношении патогенных грибов, используются образцы почв, находящиеся в сельскохозяйственном использовании, а также ризосфера, корни, семенная оболочка больных и здоровых семян, листья и растительные остатки растений, пораженных болезнями, с использованием нескольких известных методов (рис. 1):

а - ловушек (помещением выращенных на твёрдой питательной среде возбудителей болезней в матрасиках из сетки в почву);

в - прямой инокуляцией комочками почвы;

с - прямой инокуляцией растительных остатков;

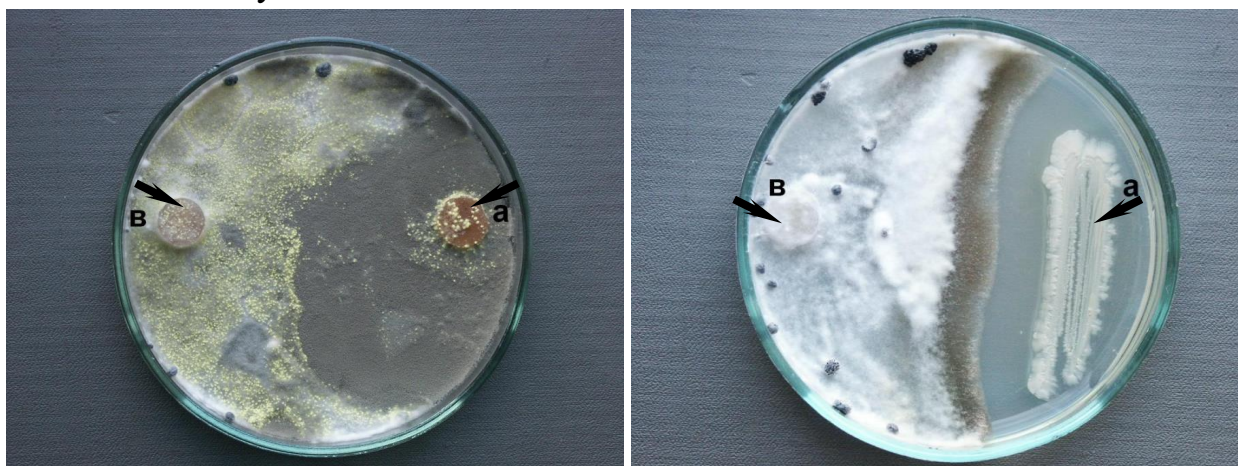
д - почвенного разведения.



а в с с д

Рисунок 1 – Методы выделения штаммов-продуцентов микробиопрепаратов (Фото Юдина С. А.)

2. Первичную оценку антагонистической активности *in vitro* к наиболее распространенным и вредоносным возбудителям болезней сельскохозяйственных культур осуществляют методом двойных или встречных культур (рис. 2), который позволяет определять тип антагонистической активности и оценить взаимоотношения выделенных штаммов с возбудителями болезней.



1

2

Рисунок 2 – Антагонистическая активность штаммов-продуцентов микробиопрепаратов к возбудителю белой гнили *Sclerotinia sclerotiorum* (ориг.):

1. РК-1-3 *Penicillium vermiculatum* (гиперпаразитизм);

2. Б - 5 *Bacillus licheniformis* (антибиогенез);

а - антагонист, в – патоген

3. Возможное патогенное или токсичное действие на культуру определяют методом обработки семян антагонистами с дальнейшим проращиванием в рулонах (рис 3) и методом «стаканчиков», когда проростки с подрезанной корневой системой помещают в суспензию спор антагониста (рис. 4). В рулонах также определяется ростостимулирующее влияние перспективных штаммов на проростки защищаемой культуры. Параметрами служат длина и масса корня и ростка (рис. 4).

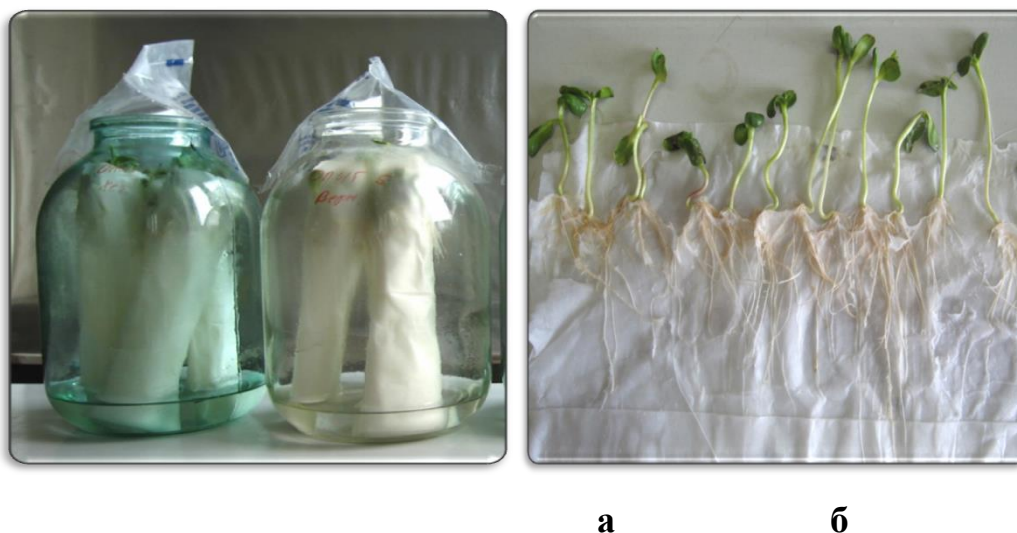


Рисунок 3 – Патогенное действие штамма-продуцента Хк-1-4 *Chaetomium olivaceum* на проростки сои в рулонах (ориг.)

а - контроль, семена сои без обработки

б – вариант, семена сои, обработанные лабораторным образцом микробиопрепарата на основе штамма-продуцента Хк-1-4 *Chaetomium olivaceum*.



а

б

с

Рисунок 4 – Патогенное действие штамма-продуцента Хк-1-4 *Chaetomium olivaceum* на проростки сои методом «стаканчиков» (ориг.):

а - контроль, проростки без подрезания корневой системы, помещённые в стерильную воду;

б – контроль, проростки с подрезанной корневой системой, помещённые в стерильную воду;

с - вариант, проростки с подрезанной корневой системой, помещённые в суспензию спор антагониста.

4. Следующим этапом скрининга (вторичный скрининг) является определение биологической эффективности отобранных штаммов на фоне искусственного заражения патогенами в лабораторных условиях различными методами:

- агаровых блоков (защитный эффект с возбудителем белой гнили) (рис. 5);

- перфорированных чашек Петри (колонизирующая активность с возбудителем фузариоза) (рис. 6).



а

б

Рисунок 5 – Биологическая эффективность обработки семян подсолнечника сорта Р-453 лабораторным образцом микробиопрепарата Вермикулена на фоне искусственного заражения возбудителем белой гнили (ориг.):

а – вариант (семена, обработанные СП Вермикулена + инфекция)

б - контроль (семена без обработки микробиопрепаратом +инфекция)



а

б

с

Рисунок 6 – Колонизирующая активность штамма бактерии-антагониста Sgrc-1 *Pseudomonas sp.* корней проростков подсолнечника сорта Р-453 на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза *Fusarium sporotrichiella var. poae* (ориг.):

а – контроль (здоровые, неинфицированные проростки);

б – контроль (инфицированные проростки);

с – вариант (инфицированные проростки, полученные из семян, обработанных лабораторным образцом бактериального штамма Sgrc-1).

5. С целью определения возможности применения микробиопрепаратов в интегрированной защите растений от вредителей

и болезней нами модифицирована методика диффузии в агар (Маслиенко, 1999), которая позволяет определять совместимость штаммов-продуцентов с перспективными пестицидами (рис.7), а также штаммов между собой (рис. 8).

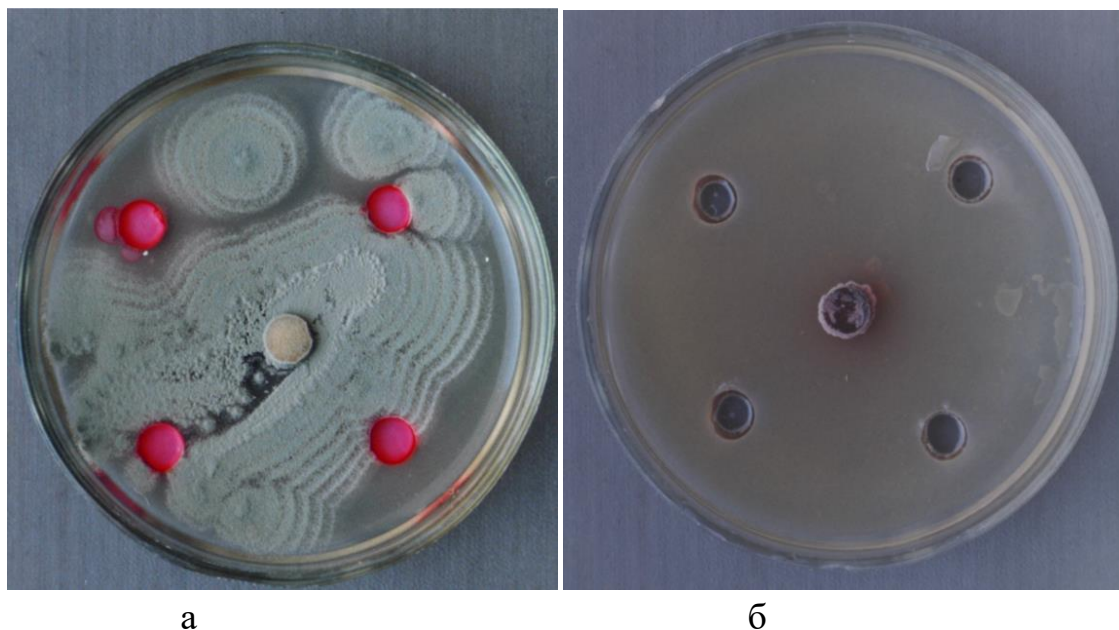


Рисунок 7 – Совместимость штамма продуцента микробиопрепарата Веррукозина с пестицидами (ориг.):

- а – штамм продуцент совместим с пестицидом,
- в – штамм продуцент не совместим с пестицидом.



Рисунок 8 – Совместимость штаммов-продуцентов микробиопрепаратов Триходерма (а) и Метаризиум (в) между собой (ориг.).

Штамм *Trichoderma sp.* подавляет штамм *Metarhizium sp.*

В результате многолетних исследований в лаборатории:

- создана уникальная коллекция перспективных штаммов-продуцентов микробиопрепаратов, включающая штаммы грибов и бактерий антагонистов основных заболеваний масличных и других сельскохозяйственных культур подавляющих рост нескольких возбудителей болезней, не патогенных к с/х культурам, а напротив, обладающих ростостимулирующей активностью;

- разработаны новые, экологичные, эффективные микробиопрепараты полифункционального типа действия - **Вермикулен, Хетомин, Бациллин, Веррукозин и Фуникулозум.**

Штамм продуцент Вермикулена ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* обладает высокой конкурентоспособностью, быстро занимает пространство питательной среды, не давая возможности расти патогену, подавляет всех основных возбудителей болезней подсолнечника. Гриб является разрушителем гиф возбудителя белой гнили и выделяет ряд антибиотиков – таларон, вермикулин, вермистатин, вермициллин которые обладают противогрибным эффектом. Таким образом, штамм продуцент Вермикулена обладает полифункциональным типом действия – конкуренцией, гиперпаразитизмом (рис. 9) и антибиозом.

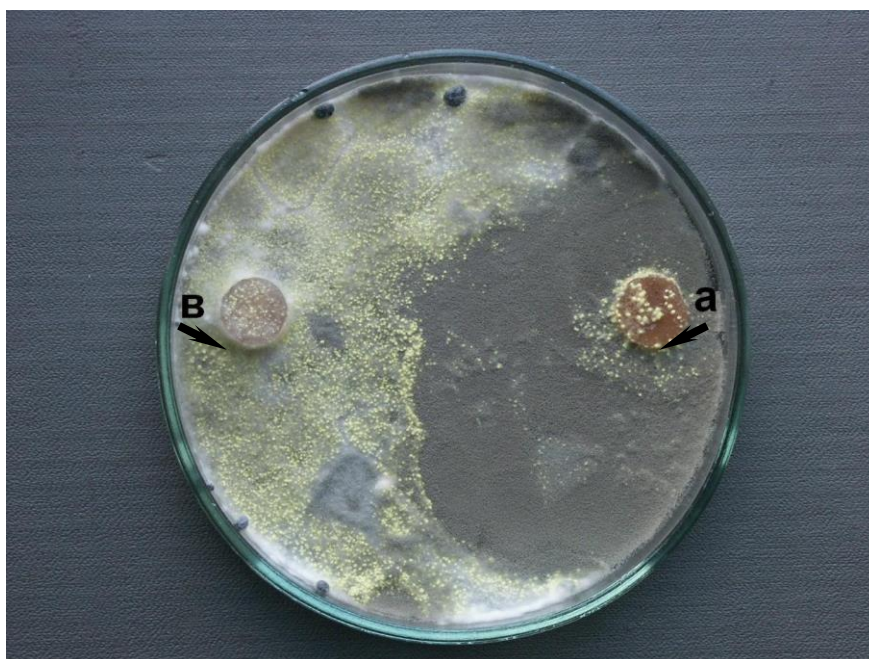


Рисунок 9 – Гиперпаразитическая активность штамма ВИЗР-24 *Penicillium vermiculatum* к возбудителю белой гнили *Sclerotinia sclerotiorum* (ориг.);

а - антагонист, в – патоген.

Микробиопрепарат Вермикулен по эффективности против белой гнили, фомопсиса и фузариоза не уступает химическим фунгицидам. Кроме

многолетнего применения на тысячах гектарах в Краснодарском крае он прошёл широкие испытания в Ростовской, Тамбовской, Волгоградской, Воронежской, Белгородской областях и Ставропольском крае. Сейчас завершается перерегистрация препарата с расширением спектра действия против комплекса патогенов ещё на пяти культурах (яблоне, сливе, землянике, картофеле и малине).

Штамм продуцент Хетомина ХК-1-4 *Chaetomium olivaceum* Cook at *Ellis*, обладает антагонистической активностью ко всем основным патогенам подсолнечника, образует антибиотическую зону 1,0 - 3,0 мм. Штамм обладает высокой целлюлозоразрушающей активностью, подавляет жизнеспособность склероциев белой гнили на 100 % (рис. 10) и образование перитециев фомопсиса. Штамм-продуцент выделяет антибиотические вещества – хетомин, стеригматоциетин, хаэтоцин и является сильнейшим ростостимулятором для культуры сои.

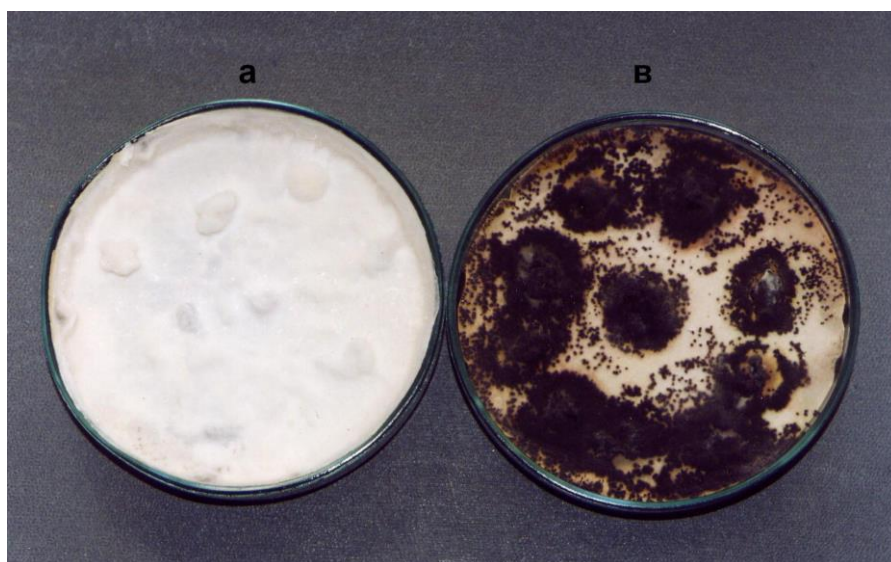


Рис. 10 – Подавление жизнеспособности склероциев белой гнили

Sclerotinia sclerotiorum штаммом ХК-1-4 *Chaetomium olivaceum* (ориг.);

а - контроль, в - вариант

Штамм продуцент Бациллина Б-12 *Bacillus licheniformis*, образует зоны подавления роста всех патогенов подсолнечника (рис. 11), подавляет жизнеспособность склероциев белой гнили на 100% и обладает сильной ростостимуляцией для всех масличных культур, но особенно для подсолнечника и рапса.

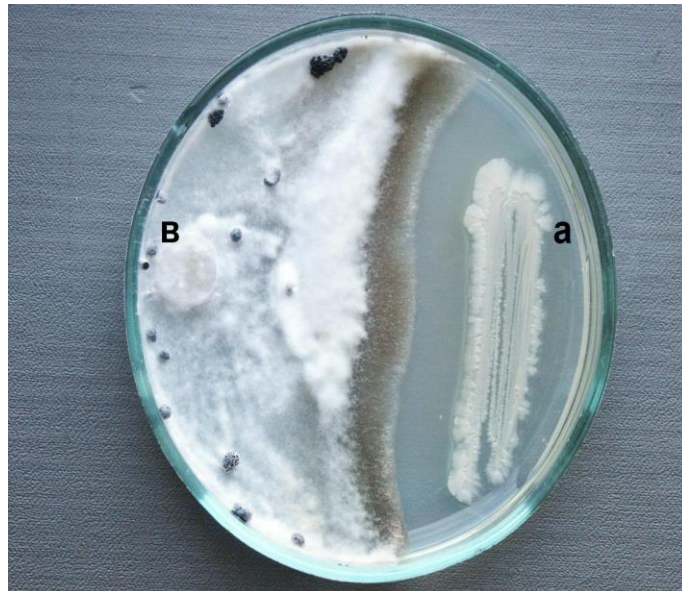
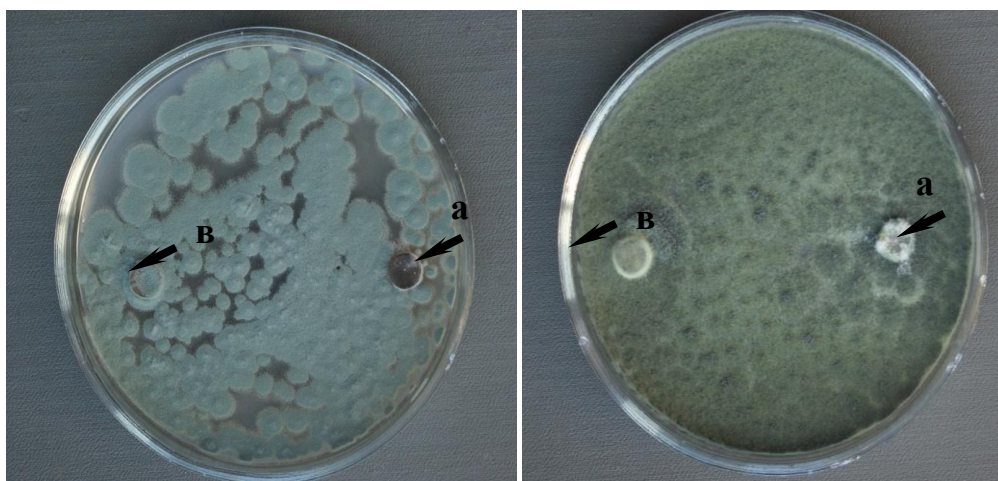


Рисунок 11 – Антибиотическая активность штамма *В - 12 Bacillus licheniformis* к возбудителю белой гнили *Sclerotinia sclerotiorum* (ориг.);
а - антагонист, в – патоген.

Бациллин один из немногих препаратов, наравне с Хетомином, показывает высокую эффективность против ложной мучнистой росы 75,0–90,0 %, при эффективности Апрона – 100 %.

Штаммы-продуценты микробиопрепаратов **Веррукозин** и **Фуникулозум** (**PV-3 *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*** и **PF-1 *Penicillium funiculosum***) также подавляют весь комплекс патогенов подсолнечника, но изначально разрабатывались для защиты от фомопсиса (рис. 12).



1

2

Рисунок 12 – Антагонистическая активность штаммов PV-3 *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (1) и PF-1 *Penicillium funiculosum* (2) к возбудителю фомопсиса *Phomopsis helianthi* (ориг.)

а – антагонист, в – патоген.

Механизм антагонистического действия этих препаратов составляет конкуренция, гиперпаразитизм и антибиоз. Установлена значительная ростостимулирующая активность штаммов-продуцентов микробиопрепаратов для культуры подсолнечника. Это выразилось в увеличении длины корня и, что особенно важно, в увеличении массы корня из-за большого количества боковых корешков.

Разработана последовательность технологических процессов при различных способах производства микробиопрепаратов. Разработаны лабораторный, технологический регламент и технические условия для малотоннажного производства различных препаративных форм (жидких культур, паст и порошков).

Основные усилия разработчиков технологий производства микробиопрепаратов направлены на увеличение сроков хранения препаративных форм, без снижения титра штаммов-продуцентов при достаточно высокой температуре. В настоящий момент многие производители микробиопрепаратов имеют линейку препаративных форм: жидкие культуры, суспензионные концентраты и смачивающиеся порошки. В последние годы отмечена тенденция производства микробиопрепаратов в

препаративной форме «смачивающийся порошок». Современный биопрепарат должен храниться не менее 2-х лет при $+4^{\circ}\text{C}$, около одного года при $20-25^{\circ}\text{C}$, три месяца при 30°C , несколько суток при $40-50^{\circ}\text{C}$. Существующие технологии глубинного культивирования штаммов-продуцентов, позволяют получить препаративные формы, имеющие короткие сроки хранения, особенно на основе мицелиальных микроорганизмов, что не позволяет производить их в период межсезонья и продавать на большие расстояния. Производимые на сегодняшний день порошки микробиопрепаратов, в основном, на основе бактериальных штаммов-продуцентов, полученные при высушивании на распылительной или лиофильной сушилке, имеют высокую норму расхода и соответственно, высокую стоимость. Поэтому большинство сельхозпроизводителей вынуждены приобретать менее дорогую препаративную форму жидкую культуру или суспензионные концентраты. Несмотря на короткие сроки хранения (особенно жидких на основе грибных штаммов-продуцентов) эти препаративные формы можно применять на «короткий рукав» - небольшие расстояния от места производства. Но при этом есть риск потери качества препарата, если его нельзя вовремя применить из-за неблагоприятных погодных условий. Лучше сохраняются бактериальные препараты, как жидкие, так и суспензионные концентраты, поэтому сельхозпроизводители чаще приобретают биопрепараты на основе бактериальных штаммов-продуцентов.

В последние годы в лаборатории биометода ведутся исследования по разработке препаративной формы «смачивающийся порошок» по технологии поверхностного выращивания штаммов на жидких питательных средах. Особенно эта технология перспективна для грибных штаммов-продуцентов и бактериальных, на основе псевдомонад, которая позволяет увеличить срок хранения препаратов без снижения титра при относительно высокой температуре 25°C до года. Технология позволяет получать минимальную норму расхода СП (от 50 до 200 грамм на т или гектар).

Разработана технология применения микробиопрепаратов, для защиты семян, вегетирующих растений масличных культур и почвы.

В современных системах земледелия, направленных на экологичные технологии, с целью защиты семян, всходов и вегетирующих растений на ранних этапах развития от возбудителей болезней рекомендуется инкрустация семян биологически-активными композициями. В лаборатории разработаны композиционные составы, включающие комплекс биопрепаратов, для защиты семян, всходов и вегетирующих растений на ранних этапах развития подсолнечника от основных болезней, а также химический или биологический инсектицид для защиты от проволочников и прилипатель. Инкрустация семян подсолнечника композицией на основе микробиопрепаратов повышает всхожесть на 9,0 - 18,0 %, оказывает ростостимулирующее влияние на всходы, увеличивая длину и массу корня, способствует увеличению количества полезной микрофлоры в почве на 27,8 - 75,5 % по сравнению с естественным фоном и, как следствие, восстановлению почвенного равновесия. Инкрустация композицией обеспечивает биологическую эффективность против возбудителей: белой гнили – на 50,0 - 100 %; фомопсиса – на 21,9 - 90,0 %; фузариоза – на 14,0 - 78,0 %, что гарантирует сохранение урожая подсолнечника от 0,2 до 0,7 т/га. Обработка микробиопрепаратом Хетомином растительных остатков подсолнечника и рапса осенью, перед заделкой в почву, обеспечивает устойчивое снижение инфекционного запаса белой гнили в почве на 81,8-100 % и фомопсиса – на 48,6-100 %.

Разработанные микробиопрепараты успешно проходят испытания на плодово-ягодных и овощных культурах. Биологическая эффективность опытных образцов микробиопрепаратов составила: на яблоне против возбудителя парши 52,0–96,7 %, мучнистой росы – 74,2–93,8 %; на землянике против пятнистостей – 73,0–91,1 %, антракноза – 80,2–90,1 %, серой гнили – 71,6–77,2 %; на сливе против класпероспориоза – 86,7–93,5 %; на винограде против оидиума – 58,0–98,4 %; на малине против пурпуровой пятнистости

39,5–46,2 %; на картофеле против парши – 41,2–55,9 %, против ризоктониоза отмечено снижение поражения клубней нового урожая с образованием склероциев.