

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра Общего земледелия, Защиты растений и селекции

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МАГИСТРА**

«ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
АГЕНТОВ В КОНТРОЛЕ КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ»

Исполнитель – магистр заочного отделения
агрономического факультета

ЗАЙНУЛЛИНА ЛЕЙЛЯ НАИЛЕВНА

Руководитель: профессор, д.с.-х.н.

Сафин Р.И.

Допущена к защите: зав. кафедрой,
профессор, д.с.-х.н.

Сафин Р.И.

Казань – 2018 г

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
II. УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.	13
2.1. Методика выделения и определения активности эндофитов	13
2.2. Методика исследований активности против корневых гнилей...	15
III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	16
3.1. Результаты выделения и определения активности эндофитов....	16
3.2. Оценка активности против корневых гнилей.....	21
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ.	24
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Для Российской Федерации, в условиях существующих геополитических рисков, развитие национального АПК становится важнейшей проблемой и национальной безопасностью. Кроме того, аграрный сектор экономики страны начинает играть ведущую роль с точки зрения экспорта, растет его инвестиционная привлекательность и конкурентоспособность на мировом рынке. Вместе с тем, существующая ситуация в отечественном сельском хозяйстве диктует необходимость в значительной модернизации подходов к производству. Возникает острая необходимость в ускоренном внедрении перспективных агротехнологий, в создании новых генотипов растений и животных, в разработке средств управления культурными растениями и т.д. В решение данной проблемы особое место должны занять подходы, базирующиеся на максимально полном учете особенностей живых организмов, характере их взаимодействия на различном уровне организации агросистем, т.е. подходы в рамках концепции «биома». К числу наиболее важных из них, с полным правом, можно отнести методы биотехнологии, применяемые для биологической защиты растений (Захаренко, 2015).

Произошли изменения в популяциях фитопатогенов, изменился их расовый состав, усилилась вредоносность и скорость развития резистентности к пестицидам (Монастырский, 2006; Дружин, 2010; Левитин, 2015, 2016). Все эти изменения диктуют необходимость в разработке новых подходов к контролю как абиотических, так и биотических стрессов растений. В решении данной задачи особую роль должны сыграть новые биопрепараты, на базе которых необходимо разрабатывать комплексные системы защиты культурных растений от стрессов, адаптированные для берегающих агротехнологий растениеводства.

В связи с этим, поиск перспективных агентов для биологической защиты яровой пшеницы от патогенов имеет большую теоретическую и прикладную значимость.

Цель исследований – изучение потенциальных микроорганизмов эндофитов различных растений в качестве возможных источников биоагентов для врой пшеницы.

Задачи исследований:

– изучить активность различных эндофитных микроорганизмов в качестве потенциальных источников для биофунгицидов против корневых гнилей яровой пшеницы;

– дать лабораторную оценку активности микроорганизмов против корневых гнилей яровой пшеницы.

Научная новизна. Впервые в зоне проведения исследований рассмотрены возможности использования эндофитных микроорганизмов как потенциальных биологических агентов биофунгицидов.

Положения, выносимые на защиту:

1. результаты оценки активности микроорганизмов в отношении грибов вызывающих корневые гнили;

2. возможные штаммы для разработки биопрепаратов.

Практическая значимость. Разработанные приемы позволяют проводить оценку и отбора перспективных биоагентов для создания биопестицидов для яровой пшеницы.

Объем работы. ВКР изложена на 30 страницах компьютерного текста, состоит из введения, трех глав, выводов и предложений производству, включает 5 таблиц, 5 рисунка, 1 приложение. Список литературы состоит из 42 наименований, в том числе 21 иностранных авторов.

Основная часть посевных площадей сельскохозяйственных угодий Республики Татарстан отводится под зерновые культуры, прежде всего яровую пшеницу. Одной из причин недостаточной урожайности зерновых культур остаются большие потери от вредных организмов, в том числе и от болезней. В РТ потери урожая от болезней на зерновых культурах достигают в среднем 12,1 % (Сафин, Хадеев, 2013). Наряду с отрицательным действием на урожайность, фитопатогенные организмы могут оказывать негативное воздействие и на качественные характеристики продукции, в том числе и приводить к накоплению в ней токсичных для человека соединений (Монастырский, 2006; Гагкаева и др., 2011). Ситуация с инфекционными болезнями растений имеет тенденцию к ухудшению, что во многом связано с глобальными климатическими изменениями (Левитин, 2012). Ю.Т. Дьяков (2015) выделяет несколько наиболее важных последствий отмечаемых изменений климата на развитие инфекционных болезней: а) продвижение болезней в северном направлении, где они раньше отсутствовали или не имели существенного значения; б) усиление вредоносности как за счет улучшения сохранности первичной инфекции, так и за счет роста агрессивности патогенов при снижении иммунитета растений.

Одним из наиболее актуальных вопросов развития систем защиты растений яровой пшеницы от болезней остается развитие биологического метода защиты.

В Республике Татарстан производится около 20 наименований биосредств различного назначения – биофунгициды, биоинсектициды, микробиудобрения, регуляторы роста, отравленная приманка и силосная закваска (см. рис.1). Больше применяется биофунгицидов на основе живых бактерий *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*.

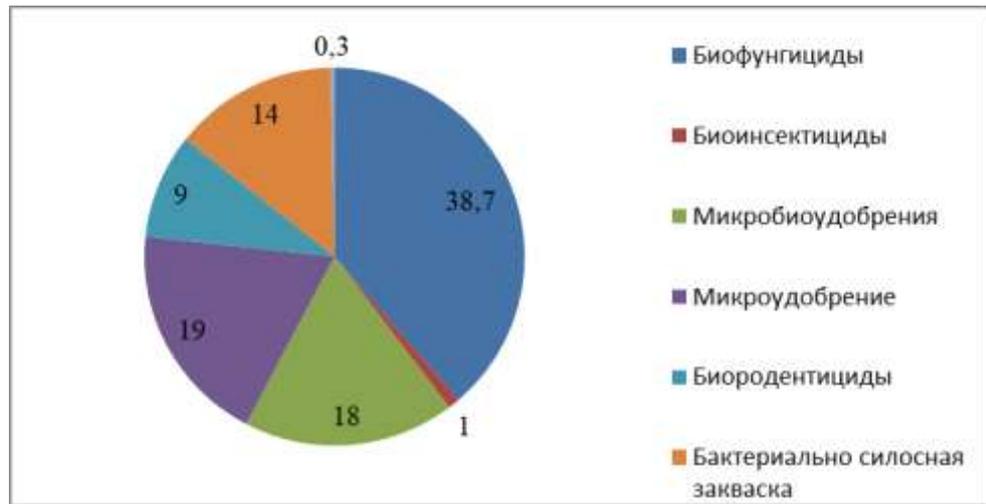


Рис. 1. Структура производства биологических средств защиты растений в РТ, %

Расширение применения биологического метода защиты растений в первую очередь продиктовано задачами биологизации производства.

Ежегодно в РТ высевается около 400 тыс. тонн семян, протравливается биофунгицидами (от 5-10 %, от общего объема) (рис.2).



Рис.2. – Предпосевная обработка семян зерновых культур биологическими и химическими средствами защиты растений по годам, тыс. ТОНН.

По вегетации биопрепараты применяются для снятия стресса у растений и для профилактики болезней.

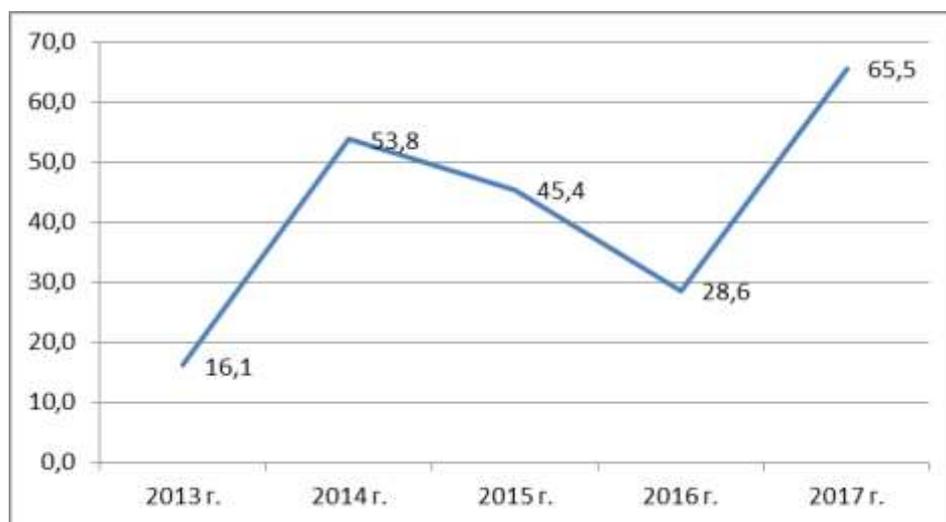


Рис.3. Площади обработки зерновых культур биопрепаратами по вегетации в Республике Татарстан, тыс. га

Вместе с тем, эффективность использования биологического метода защиты растений определяется активностью биологических агентов, к числу которых относятся различные микроорганизмы. Такие микроорганизмы получили название микроорганизмов биостимуляторов (biostimulant microorganisms) и включают в себя различные группы Plant growth promoting microorganisms (PGPMs), в том числе Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Biocontrol microorganisms (BCMs – например *Trichoderma*, бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Gopalakrishnan et al., 2015; VanOostenetal., 2017).

В биологической защите растений от болезней используются различные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности. Согласно А. Singh et al. (2014) можно выделить три основных вида активности микроорганизмов для такой защиты:

а) биологическая и экологическая активность – обычно проявляющаяся в подавление развития других видов;

б) физическое воздействие – при этом микроорганизмы создают физические барьеры или занимают пространство, что препятствует развитию других организмов, в том числе и патогенных;

с) химическое или биохимическое воздействие – при этом агент выделяет различные продукты метаболизма, которые оказывают влияние как на само растение, так и на генетические и функциональные свойства вредного организма.

Наиболее общие механизмы влияния биологических агентов на культурные растения включают в себя – конкуренцию, антибиотики, паразитизм, индуцированную устойчивость и стимуляцию роста растений, а также с узкоспециализированный механизм – гиперпаразитизм вирусов и блокирование активности ферментов патогенов (Xu et al., 2011), которые часто действуют сообща (Szczech, Shoda, 2004) и во всех частях растений – в филлосфере, ризосфере, спермосфере и на остатках (Whipps, McQuilken, 2009).

Конкуренция за жизненное пространство и питательные ресурсы

Как биологические агенты, так и патогены конкурируют друг с другом за питательные вещества и жизненное пространство, необходимые для выживания. Этот процесс конкуренции между возбудителем и агентом биологического контроля, при котором патогены исключаются из сообщества микроорганизмов из-за истощения пищевой базы или физической невозможности развития на данном месте (участке) (Бухарин и др., 2007)

Наиболее изученным механизмом такого действия является образование сидерофоров (низкомолекулярные гидроксаматы, α -гидроксикарбоксилаты, катехолы и пиовердины), связывающих ионы железа и других металлов в недоступные для патогенов хелаты (Артамонова и др., 2014). У специфических агентов имеется мембранные рецепторы которые распознают и связывают Сидерофор-*Fe*-комплекс. Однако, положительный эффект имеет свои ограничения, в частности при использовании в условиях кислых почв и высоких концентраций железа (Феоктистова и др., 2016).

На основе данного механизма контроля в качестве биоагентов современных биофунгицидов активно используются ризосферные микроорганизмы, в частности различные штаммы бактерии рода *Pseudomonas* – *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae*, *P. aureofaciens*, *P. cepacia* и т.д. (Акимова и др., 2009). Высокая эффективность их использования показана в отношении контроля наиболее хозяйственно важных патогенных микромицетов – *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, а также оомицетов – *Phytophthora*, *Peronospora* и т.д. (Марченко, 2017). На основе таких штаммов были разработаны широко распространенные в РФ биофунгициды (Штерншис, 2012).

Выделение антибиотиков

Производство антибиотиков и ингибирующих метаболитов микроорганизмами хорошо изучен как механизм их действия на фитопатогенные объекты. Микроорганизмы обычно продуцируют такие метаболиты в ходе своего роста и развития, используя их для повышения конкурентоспособности за ресурсы. В настоящее время описаны такие антибиотики, как амфизин, 2,4-диацетилфторглюцинол, оомицин А, феназин, пиолеторин, пирролнитрин, тензин, типонол и циклические липополисахариды производимые *Pseudomonas* spp.; грамицидин S, олигомицин А, канозамин, итурин, цвиттермицин А и ксантобакцин продуцируемые *Bacillus*, *Streptomyces* и *Stenotrophomonas* spp. (Danaei et al., 2014); глиотоксин и пептаиболы, продуцируемые *Trichoderma* spp. (Wiest и et al., 2002) Достаточно подробно описаны гены и сигнальные системы (GacA/GacS or GrrA/Grrs, RpoD, RpoN, RpoS, prsA и др.), отвечающие за выделение антибиотиков у биологических агентов биопрепаратов, а также системы их авторегуляции, что позволяет вести целенаправленную селекционную работу по отбору эффективных штаммов продуцентов. Кроме антибиотиков, интерес представляют продуцируемые некоторыми (*Muscador albus*, *M. roseus*) биологическими агентами антипатогенные летучие соединения, в том числе спирты, сложные эфиры, кетоны,

кислоты и липиды, показывающие высокую фузигантную активность (Stinson et al., 2003).

Скрининг на антибиотики и их активность – один из обязательных элементов при создании новых биофунгицидов (Gopalakrishnan et al., 2014).

Паразитизм и выделение экстрацеллюлярных (внеклеточных) литических ферментов

Паразитизм и связанное с ним производство внеклеточных литических ферментов имеет существенное распространение как способ действия в био-контроле патогенов. У ряда бактерий это может варьироваться от простого прикрепления бактериальных клеток к гифам патогенных микромицетов с минимальной деградацией мицелия, до полного лизиса и разрушения клеточных стенок гриба (Bolwerk et al., 2003). К внеклеточным литическим ферментам бактерий относятся – различные хитиназы, протеазы, глюконазы (Palumbo et al., 2005).

Для грибов биологических агентов процесс паразитизма включает в себя ряд фаз, при котором происходит гифа-гифальные взаимодействия, хорошо изучены для наиболее известного рода микромицетов – *Trichoderma* spp. Данный процесс включает – обнаружение, направленный рост, контакт и соединение с мицелием патогена (иногда связанные с производством аппрессориев), скручивание или выравнивание гиф микопаразита вокруг хозяина, проникновение в клетки патогена с последующей их деградацией (Алимова, 2006).

Индукцированная устойчивость (искусственный иммунитет растений)

В многочисленных исследованиях было показано, что многие биологические агенты (бактерии, грибы, вирусы и т.д.) обладают способностью индуцировать системную и локальную устойчивость растений к патогенам. Такой эффект описан для бактерий *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Lysobacter*

enzymogenes, а также для грибов *Trichoderma* spp., микоризных грибов, дикариотичных изолятов *Rhizoctonia* и грибоподобных организмов (Whipps, McQuilken, 2009).

Механизмы индукции резистентности к стрессам под влиянием ВСАs связаны как с системно индуцированной (СИУ), так и системно приобретенной (СПУ) устойчивостью. Так, салициловая кислота (SA), является одним из основных механизмов в СПУ растений под влиянием *Trichoderma harzianum*. Элиситерами в запуске реакций устойчивости к стрессам под влиянием биологических агентов у бактерий выступают – липосахариды, сидерофоры, жгутики или флагеллин, летучие соединения, салицилаты, циклический белок сириngoлин, антибиотики (Meziane et al., 2005).

Использование микроорганизмов для повышения устойчивости растений к биотическим стрессам (искусственный или приобретенный иммунитет) одна из наиболее перспективных направлений в интегрированной защите растений (Wu et al., 2017).

Формирование семян пшеницы происходит при тесном взаимодействии генотипа и условий окружающей среды, что, с учетом вариабельности и изменчивости основных агроэкологических параметров, может оказывать пролонгированное влияние на реализацию потенциальных характеристик конкретного сорта. Такие свойства семян как – геометрические размеры, форма и масса, их лабораторная всхожесть и сила роста, зараженность основными фитопатогенами, а также оценка потенциальной засухоустойчивости (на растворах сахарозы с разной концентрацией) стали неотъемлемой частью оценки генотипов в селекционных программах пшеницы, что связано с высокой значимостью данных параметров для практической деятельности (Diekmann, 1996). В последнее время все большее внимание исследователей привлекает микробиом растений, представляющий собой сложный эндосимбиотический комплекс архей, бактерий и микромицетов, которые живут как на всех частях растениях (Hardoim et al., 2015). При изучении с помощью qPCR ДНК спектра микробиома, было установлена их значительная роль в жизни

растения, в том числе и в защите от фитопатогенов (Links et al., 2014). Количественное изучение особенностей микробиома семян у разных сортов пшеницы находится на начальной стадии и требует дополнительных исследований. Эндوفитные микроорганизмы, которые находятся в тканях растений, в том числе и семян, являются относительно малоизученными и потенциальными источниками биоагентов для использования в сельском хозяйстве (Hallmann et al., 1997; Haggag, 2010).

В РФ и в мире накоплен значительный опыт по применению биопрепаратов для защиты от болезней на зерновых культурах. Так, на яровой пшенице в исследованиях В.В. Немченко, М.Ю. Цыпышева (2014) двукратная обработка Фитоспорином–М привела к повышению урожайности яровой пшеницы сорта Омская -36 на 3,1 ц/га. Применение на яровой пшенице препарата Экстрасол в Ивановской области увеличило урожайность на 1,3 ц/га на фоне без применения удобрений, а совместно с удобрениями прирост составил 3,8 ц/га (Привезенцев, Тарасов, 2016). Использование данного препарата в условиях Казахстана положительно повлияло на рост и развития растений (Амангельды и др., 2017). Значительный интерес представляют результаты исследований М.Ю. Цыпышевой (2014) о высокой эффективности баковых смесей фунгицидов с Фитоспорином-М. Использование биопрепаратов Экстрасол, Флавобактерин и Ризоагрин в Ульяновской области повышало урожайность яровой пшеницы на 3,3-4,9 ц/га, что эквивалентно внесению $N_{30}P_{30}K_{30}$ (Никитин, Захаров, 2016).

В связи с этим, поиск новых биоагентов для создания перспективных биопрепаратов имеет важнейшее научное и практическое значение.

II. УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Методика выделения и определения активности эндофитов

Выделение и оценка активности эндофитов из различных частей яровой пшеницы.

Для выделения использовались семена из коллекции кафедры Общего земледелия, защиты растений и селекции ФГБОУ ВО «Казанский ГАУ». Исследования проводились на следующих сортах яровой пшеницы:

1. Яровая пшеница – сорт Садокат (Республика Таджикистан);
2. Яровая пшеница – сорт Карагандинская 31 (Республика Казахстан);
3. Яровая пшеница – сорт Йолдыз (Республика Татарстан).

Выделение эндофитов проводилось в трех сериях опытов: а) из стерильных семян; б) при посеве нестерильных семян в стерильный песок (песчаная культура), с выделением эндофитов из корней; в) при посеве нестерильных семян в нестерильную почву (темно-серая лесная, среднесуглинистая), с выделением эндофитов из корней.

Растения выращивались в вегетационных сосудах, в фитотроне при продолжительности светового дня 14 часов в течение 14 дней при температуре +25° С.

Методика выделения эндофитных бактерий из семян

Выделение проводили по методике M. Simons et al., (1996). В каждом варианте отбиралось по 100 семян, которые помещались в стерильную колбу, в течение 5 минут проводили стерилизацию 50 мл 70% этанолом. Последующую стерилизацию проводили 4% гипохлоритом натрия (NaClO) с 0,5 мл додецил сульфата натрия (ДСН) и 38 мл дистиллированной воды. Стерилизация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре. Семена промывались не менее 6 раз 100 мл стерильной дистиллированной водой комнатной температуры до исчезновения запаха. Стерильным и остывшим шпателем разложить семена на поверхности чашек Петри со средой Кинг

Б. Для проверки качества стерилизации помещали 10 стерильных семян на чашку Петри со средой LB и инкубировать при 28°C. Если через 4 дня около семян не появлялись колонии микроорганизмов, семена считали стерильными.

Методика выделения эндофитных бактерий из корней

Корни с почвой или песком аккуратно помещали в колбу со 100 мл стерильной воды и взбалтывают в течение 2 мин (Широких и др., 2007). Стерильным пинцетом корни извлекали из колбы и переносили в другую емкость, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды. Процедуру повторяли, последовательно промывая корни до исчезновения следов почвы и песка. Последующую стерилизацию проводили 4% гипохлоритом натрия (NaClO) с 0,5 мл додецил сульфата натрия (ДСН) и 38 мл дистиллированной воды. Стерилизация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре. Корни промывались не менее 6 раз 100 мл стерильной дистиллированной водой комнатной температуры до исчезновения запаха. Стерильные корни измельчались в стерильной ступке до гомогенной массы и одинаковую массу по всем вариантам помещали на поверхности чашек Петри со средой Кинг Б.

Для культивирования эндофитов использовали среду Кинга Б (King et al., 1954), которая состояла из триптона и глицерина 10 г/л. Для приготовления агаризованной среды добавляли агар в концентрации 18 г/л. Среду стерилизовали 40 минут при 110°C. После охлаждения среды до 50 – 60 °C добавляли 10 мл стерильного раствора сульфата магния 150 г/л и фосфата калия двузамещенного в концентрации 150г/л и нистатин для контроля роста грибов. Культивирование проводили в термостате при температуре 28 С в течение 4 дней. Полученные колонии пересеивали и определяли антагонистическую активность в отношении фитопатогенного микромицета *Fusarium oxysporum* (штамм представлен из коллекции КФУ), вызывающего корневые гнили у яровой пшеницы. Фитопатоген выращивали на агаре Чапека.

Опыты проводили в двух параллельных сериях.

2.2. Методика исследований активности против корневых гнилей

Семена обрабатывали экспериментальными штаммами, а затем закладывали в рулоны согласно «ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями».

Определение зараженности патогенами проводили по общепринятым в фитопатологии определителям (Хохряков и др., 2003).

Учет корневых гнилей осуществляли по шкале ВИЗР (0 - отсутствие внешних признаков поражения корней; 1- слегка обесцвеченные бурые пятна, занимающие до 25% поверхности корня; 2- буро-коричневые сливающиеся пятна, занимающие до 50% поверхности корней; 3- гниль занимает большую часть корня, растения низкорослые и угнетены; 4- сплошное поражение, ткани разрушаются, корни отмирают, растения погибшие).

Расчет распространенности и интенсивности развития болезней проводили с применением известных в фитопатологии формул (Чумаков, Захарова, 1990).

Для оценки зараженности в вегетационных сосудах использовали пластиковые сосуды емкостью 0,5 л. В которые помещалась нестерильная почва после ячменя (высокий инфекционный потенциал). В сосуды помещались обработанные семена, почва увлажнялась. Сосуды устанавливали в фитотрон при прорастания, на 14 день проводился учет развития корневых гнилей. Оценка эффективности обработки проводили по формуле Аббота.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты выделения и определения активности эндофитов

Результаты оценки количества эндофитных бактерий, выделенных из семян и корневой системы различных сельскохозяйственных культур, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Общее число эндофитов и количество активных штаммов (в отношении возбудителя корневых гнилей *Fusarium oxysporum*) выделенных из семян и корневой системы растений, шт., 2017 г

Источник	Общее число колоний эндофитов, шт.	Активные изоляты, шт.
Яровая пшеница (Садокат)	636	29
Яровая пшеница (Карагандинская 31)	737	4
Яровая пшеница (Йолдыз)	3	0
Всего:	2131	40

При сравнении сортов яровой пшеницы из различных регионов СНГ было установлено, что наибольшее количество было у сорта Карагандинская 31, несколько меньше – у сорта Садокат, а минимальное количество у местного сорта Йолдыз.

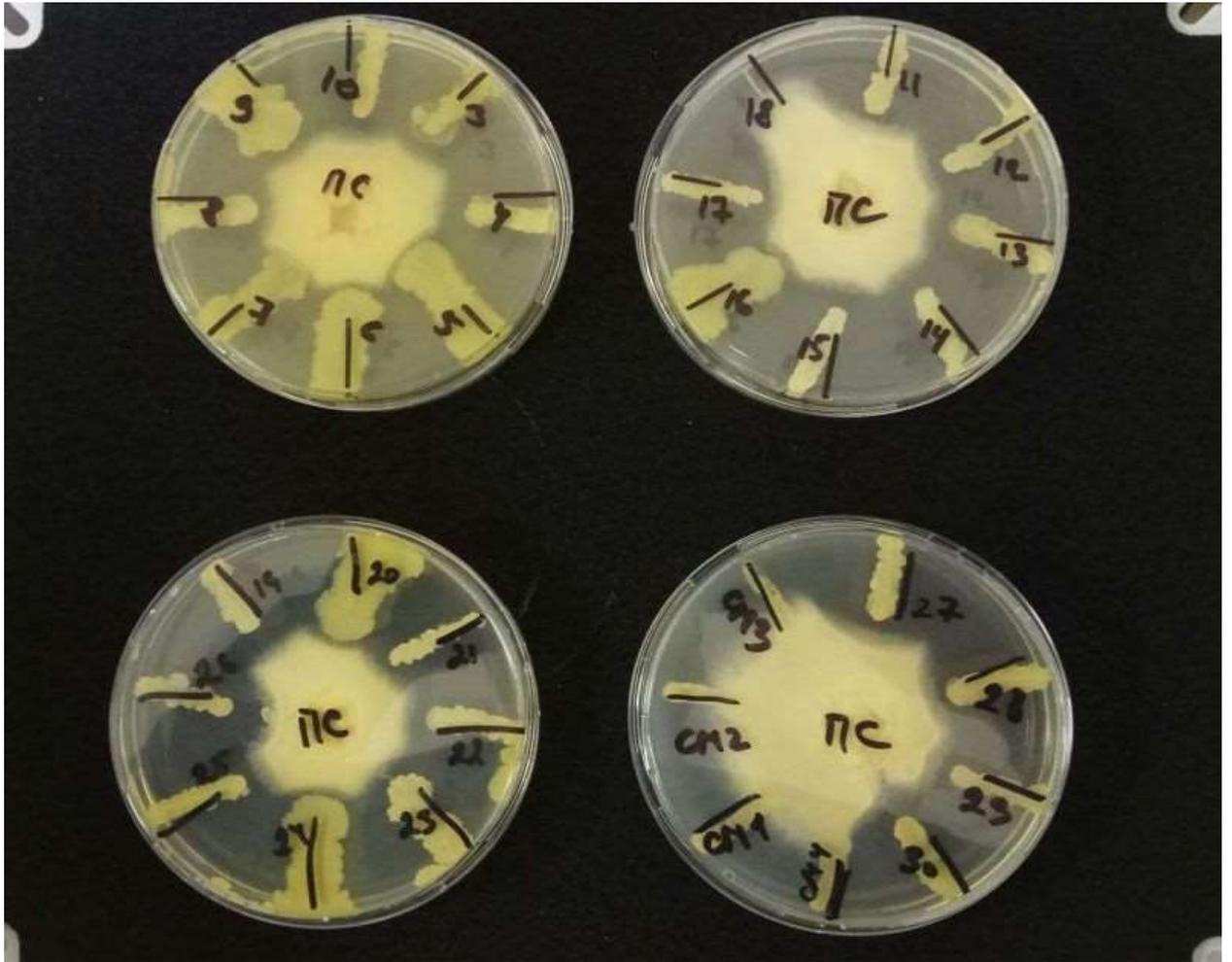
Лишь 1,8% изолятов были активны в отношении гриба рода Фузариум, причем наибольшее число выделялось из семян и корней яровой пшеницы сорта Садокат из Таджикистана.

Результаты оценки антагонистической активности представлены в таблице 2 и фото 1.

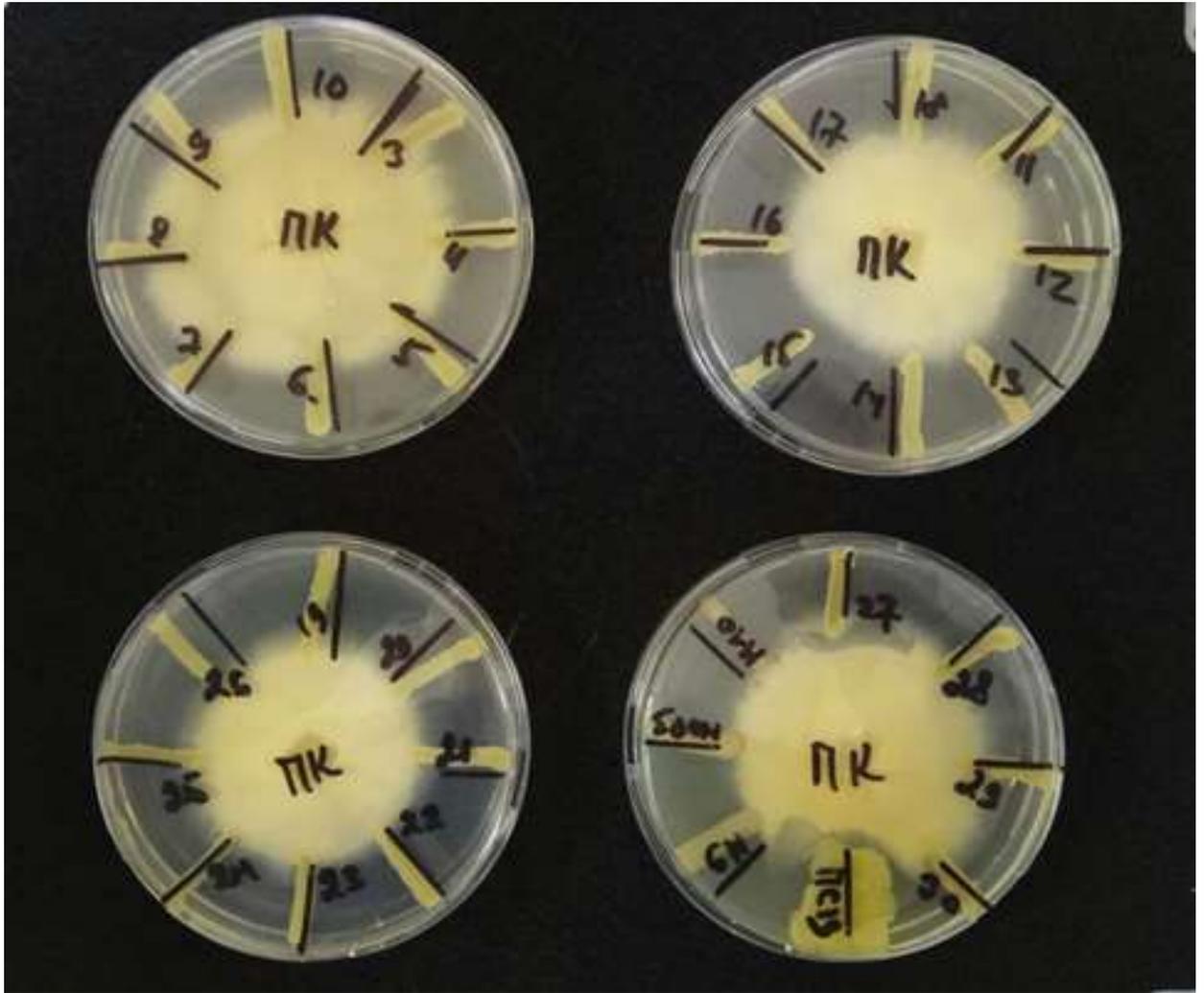
Таблица 2 – Зона подавления роста колонии *Fusarium oxysporum* на агаре Чапека, мм, 2017 г

Источник	Код изолята в коллекции КГАУ	Зона подавления роста, мм
Яровая пшеница (Садокат)	КГАУ-2017-332, КГАУ-2017-333, КГАУ-2017-335, КГАУ-2017-336, КГАУ-2017-337, КГАУ-2017-340, КГАУ-2017-343, КГАУ-2017-344,0 КГАУ-2017-346, КГАУ-2017-352, КГАУ-2017-355, КГАУ-2017-356, КГАУ-2017-357, КГАУ-2017-358, КГАУ-2017-359	2,0
	КГАУ-2017-334, КГАУ-2017-338, КГАУ-2017-360	4,0
	КГАУ-2017-361	6,0
Яровая пшеница (Карагандинская 31)	КГАУ-2017-313, КГАУ-2017-314, КГАУ-2017-315, КГАУ-2017-317	1,0
Средние значения		1,85

Наиболее перспективными штаммами для дальнейшей работы были – КГАУ-2017-361, а также КГАУ-2017-334, КГАУ-2017-338, КГАУ-2017-360, которые и были заложены в холодильник для длительного хранения.



Активность изолятов из яровой пшеницы Садокат (Таджикистан)



Активность изолятов из яровой пшеницы Карагандинская 31(Казахстан)

Таким образом, наиболее активными штаммами в отношении фузариозной корневой гнили яровой пшеницы были KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334. В КФУ на базе штаммов KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334 были произведены препараты для проведения испытания на яровой пшеницы в отношении корневых гнилей.

Видовую идентификацию штаммов KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334, выделенных из семян пшеницы сорта Содакат (Республика Таджикистан), проводили в КФУ в Институте фундаментальной медицины и биологии на основе сравнения последовательностей фрагмента гена 16S рРНК с таковыми в базе данных GenBank. Для амплификации фрагментов использовали универсальные праймеры 27fm (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3) и R1522 (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3) (Weisburget al., 1991) и хромосомальную ДНК, выделенную из штаммов PS16 и PS17. Амплификацию проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1хбуфер для Encyclo полимеразы, 2 mM/мкл всех четырех дидезокси нуклеотидтрифосфатов, праймеры 27fm и 1522R, каждый в концентрации 1пМ/мкл, 10 нг тотальной ДНК штаммов KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334 и Encyclo полимеразы 2 ед. Температурный режим реакции был следующим: за первичной денатурацией при 95°C в течение 2 мин следовали 35 циклов в режиме 95°C в течение 15 с, отжиг праймеров при 45°C в течение 20 с, элонгация при 72°C в течение 40 с. В завершении ПЦР смесь выдерживали при 72°C в течение 5 мин для достройки фрагментов. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после чего фрагмент размером 1500 п.о. элюировали из агарозного геля с помощью набора CleanUp Mini (ООО «Евроген», г. Москва, РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Нуклеотидную последовательность фрагментов определяли в компании ООО «Евроген» (г. Москва, РФ) с использованием праймеров 27fm и R1522. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программного пакета Clont Manager 9 (Science and Education Software, США). Нуклеотидные последовательности сравнивали с помощью системы BLAST.

В результате сравнения нуклеотидных фрагментов генов 16S рРНК было показано, что штаммы KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334 наиболее близки к штаммам вида *Bacillus mojavensis*.

Среди представителей вида *Bacillus mojavensis* обнаружены эндофитные штаммы выделяющие антимикробные вещества (Jasim et al. 2016).

Таблица 3 – Сравнение полученных штаммов с референтной базой

Штамм	Референтный штамм в GenBank	Accession number	% сходства
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-361	QAN5	KF419124	99
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-334	Cu4	KY131800	98

3.2. Оценка активности против корневых гнилей

Результаты оценки активности обработки семян в опытах с рулонами представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние обработки семян яровой пшеницы сорта Йолдыз на показатели развития растений (опыт в рулонах), 2018 г

Вариант	Количество первичных корешков	Длина корешков, мм	Длина coleoptilya, мм	Длина ростка, мм	Лабораторная всхожесть, %
Контроль (чистая вода)	3	64,6	28,2	59,6	80
Ризоплан (стандарт)	4,7	72,0	49,0	62,4	90
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-361	5,0	65,4	31,8	88	94
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-334	4	86	51,6	102	82

Результаты оценки показали, что обработка биоагентами привела к росту лабораторной всхожести и всех биометрических показателей.

По значениям лабораторной всхожести, числу первичных корешков преимущество имел штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361, тогда как штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-334 отличался способностью стимулировать развитие ростков.

В целом, по своему потенциальному влиянию полученные штаммы эндофитов не отличались от стандартного биопрепарата Ризоплан.

Таблица 5 – Влияние обработки семян на их зараженность патогенами яровой пшеницы сорта Йолдыз (опыт в рулонах), 2018 г

Вариант	Фузариозная инфекция, %	Гельминтоспориозная инфекция, %	Альтернариозная инфекция, %
Контроль (чистая вода)	1	10	14
Ризоплан (стандарт)	0	2	6
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-361	0	0	2
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-334	0	2	2

Результаты фитоэкспертизы семян показали, что все изучаемые биоагенты полностью снизили развитие фузариозной инфекции в сравнении с контрольным вариантом.

В отношении гельминтоспориозной инфекции выделялся штамм KGAU-2017-361, для Ризоплана и штамма KGAU-2017-334 результаты были одинаковыми.

Применение обоих полученных штаммов приводило к значительному снижению (в 7 раз) зараженности семян альтернариозной инфекцией и по своему воздействию они превосходили стандартный биопрепарат Ризоплан.

Данные по определению влияния обработки на зараженность растений корневыми гнилями в вегетационных сосудах приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Зараженность корневыми гнилями и эффективность их контроля при обработке семян яровой пшеницы сорта Йолдыз, 2018 г

Вариант	Показатель учета		Биологическая эффективность	
	P*	R*	P	R
Контроль (чистая вода)	75,0	2,8		
Ризоплан (стандарт)	24,0	0,95	68,0	66,1
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-361	5,0	0,1	93,3	96,4
<i>Bacillus mojavensis</i> KGAU-2017-334	22,1	1,0	70,5	64,3

Примечание: P- распространенность болезни, %; R – развитие болезни, %.

Проведенные исследования показали, что штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361 отличается наибольшей активностью в подавлении корневых гнилей в период всходов яровой пшеницы. В тоже время штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-334 по своей эффективности находится на уровне стандартного препарата Ризоплан.

Таким образом, можно констатировать, что штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361 является перспективным биологическим агентом для создания биофунгицидов для яровой пшеницы.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие предварительные выводы:

1. При выделении из семян, корней из стерильного песка и корней из почвы отмечались резкие сортовые различия, но максимальное количество активных штаммов были для сорта яровой пшеницы Садокат;

2. В результате сравнения нуклеотидных фрагментов генов 16S рРНК было показано, что штаммы KGAU-2017-361 и KGAU-2017-334 наиболее близки к штаммам вида *Bacillus mojavensis*.

3. По значениям лабораторной всхожести, числу первичных корешков преимущество имел штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361, тогда как штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-334 отличался способностью стимулировать развитие ростков.

4. Все изучаемые биоагенты полностью снизили развитие фузариозной инфекции в сравнении с контрольным вариантом. В отношении гельминтоспориозной инфекции выделялся штамм KGAU-2017-361. Применение обоих полученных штаммов приводило к значительному снижению (в 7 раз) зараженности семян альтернариозной инфекцией и по своему воздействию они превосходили стандартный биопрепарат Ризоплан.

5. Штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361 отличается наибольшей активностью в подавлении корневых гнилей в период всходов яровой пшеницы. В тоже время штамм *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-334 по своей эффективности находится на уровне стандартного препарата Ризоплан.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

Использовать *Bacillus mojavensis* KGAU-2017-361 для дальнейших работ по получению биофунгицидов для яровой пшеницы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимova, Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К.Алимova. – Казань: Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина, 2006. – 209 с.
2. Амангельды, Н. Применение Экстрасола против болезни корневой гнили на яровой пшенице /Амангельды Н., Кочоров А.С., Агибаев А.Ж. //Аграрная наука - сельскому хозяйству. – Алтайский государственный аграрный университет. – 2017. – С. 48-50.
3. Артамонова М. Н. Роль бактериальных симбионтов в растительно-микробных ассоциациях/ М. Н. Артамонова, Н. И. Потатуркина-Нестерова, О. Е. Беззубенкова//Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19. – №1. – С.81-84.
4. Бухарин, О. В Ассоциативный симбиоз/ О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. В. Немцева, С. В. Черкасов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
5. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур/ Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В.//Приложение к журналу Защита и карантин растений. – 2011. – №5. – 52 с.
6. Дружин, А.Е.Влияние изменений климата на структуру популяций патогенов яровой пшеницы в Поволжье/ А.Е.Дружин//Аграрный вестник Юго-Востока. – 2010. – № 1 (4). – С.31-35.
7. Дьяков, Ю.Т. Инвазии фитопатогенных грибов/Ю.Т. Дьяков//Материалы VII Всероссийской микологической школы-конференции с международным участием «Биотические связи грибов: мосты между царствами». Сборник докладов и тезисов. – М.: ЗБС МГУ, 2015. – С.39-49.
8. Захаренко, В.А. Биотехнологии и защита растений//Защита и карантин растений. – 2015. – №11. – С.3-8.
9. Левитин, М.М. Микроорганизмы в условиях глобального изменения климата/М.М. Левитин //Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Том 50. – № 5. – С. 641-647.

10. Левитин, М.М. Распространение болезней растений в условиях глобального изменения климата/М.М. Левитин //Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков. – 2016. – №3. – С.97-101.
11. Левитин, М.М. Защита растений от болезней при глобальном потеплении/Левитин М.М.//Защита и карантин растений. – 2012. – №8. – С.16-17.
12. Марченко, А. Б. Фузариозное увядание астры однолетней и ограничение его распространения / А. Б. Марченко // Защита и карантин растений. – 2017. – № 9. – С. 50-51.
13. Монастырский, О. А. Чем грозит глобальное потепление // Защита и карантин растений. – 2006. - № 2. – С. 18-20.
14. Монастырский, О.А. Токсинообразующие грибы и микотоксины/ О.А. Монастырский//Защита и карантин растений. – 2006. – №11. – С.18-20.
15. Немченко, В.В. Влияние биопрепаратов и регуляторов роста на структуру урожая и продуктивность яровой пшеницы/ В.В. Немченко, М.Ю. Цыпышева //Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – № 8 (118). – С. 5-8.
16. Никитин, С. Н. Эффективность применения биопрепаратов на яровой пшенице/ С. Н. Никитин, С. А. Захаров // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal) .NAUKI ROLNICZE. – 2016. – № 7. – P.165-168.
17. Привезенцев, С.Р. Влияние биопрепаратов Экстрасол и Бисолбифит на продуктивность пшеницы яровой в условиях Верхневолжского региона/ С.Р. Привезенцев, А.Л. Тарасов // Системы интенсификации земледелия как основа инновационной модернизации аграрного производства. – Суздаль, 2016. – С. 267-269.
18. Сафин, Р.И. Управление вредными биологическими объектами /Р.И. сафин, Т.Г. Хадеев//Система земледелия Республики Татарстан. Инновации на базе традиций. Ч.1. Общие аспекты системы земледелия. Под ред. И.Х.Габдрахманова. – Казань: Центр инновационных технологий, 2013. – С.109-130.

19. Феоктистова, Н.В. Ризосферные бактерии //Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки/ Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова. – 2016. – Т. 158, кн. 2. – С. 207–224.
20. Цыпышева, М.Ю. Эффективность применения биопрепаратов и листовых фунгицидов на яровой пшенице/ М.Ю. Цыпышева// Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 4. – С. 51-53.
21. Штерншис, М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2012. – № 2 (18). – С. 92–100.
22. Bolwerk, A. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*/ A. Bolwerk, A.L. Lagopodi, A.H.M. Wijfjes, G.E.M. Lamers, T.F.C. Chin-A-Woeng, B.J.J. Lugtenberg, G.V. Bloemberg //Molecular Plant–Microbe Interactions. – 2003. – Vol. 16. – P. 983–993.
23. Danaei, M. Biological control of plant fungal diseases using volatile substances of *Streptomyces griseus*/ M. Danaei, A. Baghizadeh, S. Pourseyedi, J. Amini and M. M. Yaghoobi//European Journal of Experimental Biology. – 2014. – Vol. 4(1). – 334-339.
24. Diekmann M. (1996) Diseases in seed production. Eds. Seed Science and Technology. Proc. Train-the-Trainers Workshop Sponsored by Med-campus Programme (EEC), 24Apr.-9 May 1993, Amman. Aleppo, Syria, ICARDA.– P.170-175.
25. Gopalakrishnan, S. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities/ S. Gopalakrishnan, A. Sathya, R. Vijayabharathi, R.K. Varshney, C.L.L. Gowda, L. Krishnamurthy//Biotech. – 2015.–Vol. 5(4). – 355–77.
26. Haggag W. M. (2010) Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. Life Science Journal. 7(2):57-62.
27. Hallmann, J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F. and Kloepper J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol. 43:895– 914.

28. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., et al. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79:293–320.
29. Kang H.W., Cho Y.G., Yoon U.H. and Eun M.Y. (1998). A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 1-9.
30. Links M.G., Demeke T., Gräfenhan T., Hill J. E., Hemmingsen S. M. and Dumonceaux T. J. (2014). Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared piphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds. *New Phytol.* 202(2): 542–553.
31. Meziane, H. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants/ Meziane H, van der Sluis I, van Loon LC, Höfte M, Bakker PAHM // *Molecular Plant Pathology*. – 2005. – Vol. 6. – P.177–185.
32. Palumbo J.D. Mutagenesis of β -1,3-glucanase genes in *Lysobacter* enzymogenes strain C3 results in reduced biological control activity toward *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet/ J.D. Palumbo, G.Y. Yuen, C.C. Jochum, K. Tatum, D.Y. Kobayashi // *Phytopathology*. – 2005. – Vol. 95. – P.701–707.
33. Simons M., van der Bij A.J., Brand J., de Weger L.A., Wijffelman C.A., and Lugtenberg B.J.J. (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 600-607.
34. Singh, A. Use of Microbes: A Sustainable Approach in Management of Horticultural Crops/A. Singh, R. Hembrom, A. K. Pal//*Microbes and Environmental Management*. –2014. – P.45-47.
35. Stinson, A.M. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and verticillium wilt of egg-

plant/Stinson A.M., Zidack N.K., Strobel G.A., Jacobsen B.J. //Plant Disease. – 2003. – Vol. 87. – P.1349–1354.

36. Szczech, M. Biocontrol of Rhizoctonia damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*/ M. Szczech, M. Shoda// J. Phytopathol. – 2004.– Vol. 152. – P.549-556.

37. Validov S., Kamilova F., Qi S., Stephan S., Wang J.J., Makarova N., Lugtenberg B. (2007) Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *radices-lycopersici* in stonewool substrate. J. Appl. Microbiol. 102:461–471.

38. Van Oosten, M. J. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants/Michael James Van Oosten, Olimpia Pepe, Stefania De Pascale, Silvia Silletti and Albino Maggio //Chem. Biol. Technol. Agric. – 2017. – Vol.4:5. – 12 p. /DOI 10.1186/s40538-017-0089-5

39. Whipps, J. M. Biological control agents in plant disease control/ J. M. Whipps, M. McQuilken //Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches. – Blackwell Publishing Ltd ,2009. – P.27-61.

40. Wiest, A. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase/ A. Wiest, D. Grzegorski, B.W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D.J. Ebbole, B. Bodo, C. Kenerley //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 70. – Vol. 70. 277. – 20862–20868.

41. Wu, L . Induction of systemic disease resistance in *Nicotiana benthamiana* by the cyclodipeptides cyclo (l- Pro- l- Pro) and cyclo (d- Pro- d- Pro)/ Wu, L., Wu, H., Chen, L., Zhang, H. & Gao, X. // Mol. Plant Pathol. – 2017. – Vol.18. – 67–74.

42. Xu, X.-M. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice/ Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., and Jeger, M. J.// Phytopathology. – 2011. – Vol. 101. – P. 1024-1031.



Bacillus mojavensis