



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44889 (13) C2
(51) B A01N63/04, C12N1/14, C12G1/18МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ ГРИБА NECTRIA PITYRODES MONTAGNE, ЯКИЙ ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ЯК БІОФУНГІЦИД (ВАРІАНТИ), БІОФУНГІЦИД, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ (ВАРІАНТИ), СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ ГРИБОВОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОСЛИН, СПОСІБ СКРИНІНГУ ФУНГІЦИДНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

(21) 96083413
(22) 27 01 1995
(24) 15 03 2002
(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р
(86) PCT/FI95/00042, 27 01 1995
(31) 940463
(32) 31 01 1994
(33) FI
(72) Тахвонен Рісто Тапіо, FI, Кескінен Мілья Тууліккі, FI, Лахденперя Марья-Лена, FI, Сейскари Пекка Тапани, FI, Тепері Еса Петрі, FI, Туомінен Улла Анта, FI
(73) KEMIRA АГРО ОЙ, FI
(56) EP 0106504, 29 09 84 92/18613 A1, 29 10 92
(57) 1 Штамм гриба Nectria pityrodes Montagne DSM 7522, використовуваний в якості біофунгіцида
2 Штамм гриба Nectria pityrodes Montagne DSM 8805, використовуваний в якості біофунгіцида
3 Штамм гриба Nectria pityrodes Montagne DSM 8806, використовуваний в якості біофунгіцида
4 Штамм гриба Nectria pityrodes Montagne DSM 8807, використовуваний в якості біофунгіцида
5 Штамм гриба Nectria pityrodes Montagne DSM 8808, використовуваний в якості біофунгіцида
6 Біофунгіцид, що містить мікроорганізм, **отличающийся** тим, що він містить грибовий штам, вибирається з групи, що включає грибові штамми Nectria pityrodes Montagne DSM 7522 або DSM 8805 або DSM 8806 або DSM 8807 або DSM 8808
7 Біофунгіцид по п. 6, **отличающийся** тим, що він додатково містить наповнювачі і/або добавки/ звичайні в цій області
8 Біофунгіцид по п. 7, **отличающийся** тим, що наповнювачі і добавки вибирають з групи, що включає двоокис кремнію, сухе молоко, карбоксиметилцеллюлозу, сахарозу, аскорбінову кислоту і крохмал
9 Спосіб отримання біофунгіцида по п. 7 або 8,

2

отличающийся тим, що включає вирощування грибового штаму по будь-якому з пп. 1-5 в прийнятній середовищі, відокремлення клітинної маси, додавання до неї наповнювачів і/або добавок, висушування і подрібнення цієї маси в порошок
10 Спосіб отримання біофунгіцида по п. 7 або 8, **отличающийся** тим, що включає вирощування грибового штаму по будь-якому з пп. 1-5 в прийнятній середовищі разом з двоокисом кремнію і додавання, при бажанні наповнювачів і/або добавок, висушування і подрібнення цієї маси в порошок
11 Спосіб подання грибової інфекції у рослин, що включає нанесення на рослину або його насіння або внесення в субстрат для росту рослини біофунгіцида, **отличающийся** тим, що використовують біофунгіцид по пп. 6-8
12 Спосіб скринінгу фунгіцидних мікроорганізмів в зразках мікробів, що включає наступні етапи
(а) випробування в піску, відповідно до якого насіння зернових культур висівають в шар піску, на насіння і субстрат пипеткою наносять міцелій і спори патогена, а потім спори випробуваного гриба в водній суспензії, після чого насіння покривають піском, через певний період часу перевіряють інтенсивність симптомів ураження ростків і відбраковують грибки, які не впливали на розвиток хвороби або самі виявилися патогенними, і (б) випробування обраних грибків в торфі, відповідно до якого насіння зернових культур закладають в суспензії спор патогена і сушать, а потім смачивають суспензією спор випробуваного гриба, сушать і висівають в оброблений паром торф, вирощують в певний визначений період часу, спостерігають за станом ростків і відбирають для наступних випробувань ізоляти, однозначно подавляють розвиток хвороби

Предметом настоящего изобретения являются

биологические методы борьбы с болезнями рас-

(13) C2
(11) 44889
(19) UA

тений и, в частности, новые микроорганизмы, относящиеся к роду *Nectria*, а также их применение для борьбы с грибковыми инфекциями у растений. Кроме того, данное изобретение относится к составам, включающим новые штаммы рода *Nectria* и используемым для указанной цели. Настоящим изобретением предусматривается метод скрининг-теста эффективных организмов в микробных штаммах, выделенных из почвы.

Известный уровень техники

Сельскохозяйственные культуры подвержены различным болезням, вызываемым грибами, бактериями и вирусами, и могут быть поражены рядом насекомых-вредителей. Для борьбы с такими болезнями разработаны методы культивации, химические и биологические методы. Эти методы направлены на предотвращение качественных и количественных потерь сельскохозяйственных культур вследствие болезней и поражения насекомыми-вредителями.

Как правило, термин "биологическая борьба с болезнями растений" означает уничтожение патогенов растений другими организмами, которые можно назвать биоконтролирующими агентами (БКА). Продукты, вырабатываемые биоконтролирующими агентами, часто называют биопестицидами. Механизмы биологической борьбы с болезнями растений могут быть весьма различны, и желаемый эффект часто достигается в результате совместного действия нескольких разных механизмов. Эффект подавления может быть вызван ингибирующими метаболитами, образуемыми биоконтролирующими агентами, которые иногда паразитируют на патогене или борются с ним за жизненное пространство и/или питательные вещества.

Потребность разработки биоконтролирующих агентов еще больше возросла в связи с тем, что многие традиционные химические контролирующие агенты оказались вредными для окружающей среды и людей. Недостатком химикатов является также то, что многие вредители быстро приобретают иммунитет к одному и даже нескольким контролирующим средствам. Выработка иммунитета к биопестицидам маловероятна, так как на основе их действия лежат механизмы разных типов. Химикаты обычно оказывают более быстрое и эффективное действие, чем биопестициды. С другой стороны, действие биопестицидов часто бывает более продолжительным, чем у химикатов, так как производимый ими эффект создается жизнеспособными и воспроизводимыми микроорганизмами.

Наиболее важную группу биопестицидов составляют бактериальные продукты, оказывающие целенаправленное действие на насекомых-вредителей. Наиболее распространенными являются биоинсектициды на основе бактерий *Bacillus thuringiensis*. В Финляндии производится биофунгицид на основе актиномицета *Streptomyces*, который эффективен против ряда грибковых болезней растений, источников которых являются почва и семена. Продукт, который предотвращает распространение корневой гнили (вызываемой грибом *Heterobasidion annosum*) в хвойных лесах, был получен из безвредного лесного пилостного гриба *Phlebia gigantea*.

Были всесторонне изучены бактерии рода *Pseudomonas*, в частности вида *Pseudomonas fluorescens*, и в настоящее время известно большое число штаммов *P. fluorescens*, обладающих фунгицидным действием. См., например, опубликованные заявки на патент WO 92/18613, FI 92 1722 и WO 90/01327, а также европейский патент № 228457.

В процессе поиска микроорганизмов, пригодных для биологической борьбы, обычно производится тестирование большого числа микробных штаммов с целью выявления их биоконтролирующей активности или других нужных свойств. В опубликованных патентах рассматриваются некоторые методы скрининг-теста.

В патенте США № 4647533 рассматривается трехэтапный метод скрининг-теста, в соответствии с которым бактерии сначала выделяют из почвы, содержащей множество спор болезнетворного гриба *Pythium*. На втором этапе выделенные бактерии подвергают скрининг-тесту в теплице путем проращивания семян зерновых культур в почве, содержащей большое количество спор *Pythium*, при этом тестируют каждый вид бактерий и проводят контрольный тест без этих бактерий. На основании теста отбирают бактерии, в присутствии которых растения достигают наибольшей высоты и имеют наиболее развитые листья. На третьем этапе отобранные бактерии еще раз проходят отбор в полевых условиях при проведении такого же испытания, что и в теплице. Кроме того, на третьем этапе отбирают те бактерии, в присутствии которых растения растут лучше всего.

В заявке на патент Финляндии № 92 1722 описывается следующий способ. Сначала в соответствующей среде выращивают мицелий штамма *Pythium*. Этот мицелий покрывают слоем стерильной почвы, в которую добавляют исследуемые микроорганизмы, после чего оценивают их воздействие на рост грибка *Pythium*. На втором этапе почвенный образец инокулируют штаммом *Pythium*, вызывающим ризоктинию. В почву высевают семена растения, восприимчивого к этой грибковой инфекции, и определяют влияние испытуемого организма на рост растений. Для последующих испытаний отбирают такие вещества, которые оказывают ингибирующее действие на грибок *Pythium* в обоих вышеуказанных испытаниях.

Краткое изложение существа изобретения

Предметом настоящего изобретения являются микроорганизмы рода *Nectria*, в частности *Nectria pityrodes* Montagne, которые оказались весьма эффективными для борьбы с грибами *Fusarium*.

Кроме того, данное изобретение относится к биофунгицидному составу на основе микробного штамма, который содержит в качестве активного ингредиента вышеуказанные грибковые штаммы, принадлежащие к роду *Nectria*, а также известные добавки или наполнители. Примерами таких препаратов являются составы, пригодные для протравливания семян, порошкообразные или гранулированные составы, вносимые в субстраты, необходимые для роста, или жидкие составы, предназначенные для обработки почвы.

Настоящим изобретением предусматривается

также новый и эффективный способ скрининг-теста грибковых штаммов, представляющий собой трехэтапное испытание, включающее тестирование в песке, торфе и полевой почве. На каждом этапе испытания грибковые штаммы, оказавшиеся неэффективными, исключают из последующих тестов. Грибковые штаммы, показавшие наилучшие результаты в теплице, затем испытывают в полевых условиях.

Краткое описание чертежей

Рис. 1. Эксперимент по выявлению реакции на дозу при использовании штамма J 76 летом 1992 г. Процент пораженных ростков при инокулировании семян грибом *F. culmorum*.

K = обработка не производилась,

B = протравливание составом "Байтан",

J 76-0 = суспензия спор J 76, $1,2 \times 10^7$ КОЕ/мл

J 76-1 = суспензия спор J 76, $1,2 \times 10^6$ КОЕ/мл

J 76-2 = суспензия спор J 76, $1,2 \times 10^5$ КОЕ/мл

J 76-3 = суспензия спор J 76, $1,4 \times 10^4$ КОЕ/мл

Рис. 2. Эксперимент по выявлению реакции на дозу при использовании штамма J 76 летом 1992 г. Процент пораженных ростков при использовании здоровых семян. Используемые аббревиатуры аналогичны рис. 1.

Рис. с 3а по 3д. Гистограммы, представляющие результаты воздействия грибковых изолятов, забракованных на разных этапах испытаний, проведенных в теплице, на состояние ростков в полевых условиях.

K = обработка не производилась,

B = протравливание составом "Байтан 1"

Подробное описание изобретения

Ниже дается детальное описание грибковых штаммов по настоящему изобретению. Приводятся данные об их выделении, подробно рассматриваются штаммы и указывается их эффективность в полевых условиях. Далее рассматриваются способы получения биофунгицидных составов из этих штаммов, характеристики составов и испытания эффективности этих составов. Помимо этого описывается метод скрининг-теста грибковых штаммов, выделенных из почвенных образцов.

Выделение микроорганизмов

Почвенные образцы, из которых выделяли грибковые штаммы по настоящему изобретению, отбирали в 1989, 1990 и 1991 гг. Их общее количество составляло 190. Почвенные образцы разных типов и из севооборотов различной ротации брали в разных частях Финляндии, главным образом с научно-исследовательских станций Сельскохозяйственного научно-исследовательского центра. Образцы брали из корневого слоя (с глубины 0 - 15 см). С каждого слоя брали несколько аналитических образцов, которые делили на части от 1 до 2 литров.

Выделение микроорганизмов производили по методу разбавления (выделение из почвы) или по методу культивирования на растениях (выделение из корней). Полученные результаты подробно описываются ниже в разделе "Методы".

Характеристика микроорганизмов

Грибковые штаммы, выделенные из почвенных образцов, испытывали с помощью метода скрининг-теста по настоящему изобретению, которые описываются ниже в разделе "Методы". Было

обнаружено пять штаммов, которые позволили получить очень хорошие результаты. Штаммы, названные, J 76, J 1431, J 1432, MOS1 и ROS 2, были отправлены на исследование в Центральное управление сельскохозяйственных культур, г. Барн, Нидерланды. В соответствии с Будапештским договором эти штаммы были внесены в банк данных DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH) под номерами DSM 7522 (15 марта 1993 г.), DSM 8805 (10 декабря 1993 г.), DSM 8806 (10 декабря 1993 г.), DSM 8807 (10 декабря 1993 г.) и DSM 8808 (10 декабря 1993 г.).

Эти микроорганизмы имеют следующие морфологические характеристики.

Морфология спороходий без краевых стерильных гифов. Периодические ответвления конидиофора при наличии нескольких ответвлений в каждом узле. Конечные ответвления содержат мутовки фиалид, образующиеся в стопчатом слое. Фиалиды имеют цилиндрическую форму длиной до 15 мкм с апикальными порами. Конидии в виде цепей или слизистых шариков эллипсоидной или каплеобразной формы с коротким хилусом, 7 - 8х4 мкм, гладко-стенные без отростков.

Характер развития колонии. Колония на агаре из овсяных хлопьев увеличилась в диаметре до 40 см в течение 7 дней при температуре 22°C, гиалин мицелия, спорообразующие участки покрыты зелеными, концентрическими кольцами спороходия. Запах отсутствует, колония обесцветилась, экссудат ограничен, светлый.

Структура конидиофора штамма J 76 аналогична структуре *Myrothecium verrucosum*, но отличается от этого вида образованием неграничного спороходия, наличием конидий в виде сухих цепей и без типичного веерообразного отростка.

Представители рода *Gliocladium* отличаются от новых штаммов тем, что для рода *Gliocladium* типично образование отдельных кистеобразных конидиофоров.

Таким образом, штаммы J 76, J 1431, J 1432, MOS 1 и ROS 2 были идентифицированы в качестве видов *Nectria pityrodes* Montagne.

Из этих штаммов можно получить устойчивые составы, которые легко наносятся на пораженные болезнью посевы. Состав можно получить в виде порошка. Культивирование микробов может быть начато с инокулята, который представляет собой содержащую споры пеллету (пепешку) картофельного агара с глюкозой, выдерживаемую при температуре -80°C. Микробы можно культивировать в жидкой среде или на твердой подложке. Питательная среда включает сахар, например сахарозу, и азот, а также небольшие количества других питательных веществ. Для культивирования микробов можно использовать неспецифические питательные среды, например кукурузный экстракт, или специфические питательные среды, например ГДС (глюкоза 4 г/л, дрожжевой экстракт 4 г/л, солодовый экстракт 10 г/л) или картофельно-декстрозный бульон. Показатель pH равен примерно 6,0 и регулируется вначале до стерилизации. Культивирование производится при встряхивании в течение одной-двух недель. Биомассу можно отделить от бульона путем фильтрования через фильтровальную бумагу или центрифугиро-

вания. Бели культивирование производят в жидкой среде, к биомассе примешивают наполнитель, например двуокись кремния, сухое молоко и/или карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ). Эту массу сушат при комнатной температуре и измельчают в порошок.

Методы

Выделение микробов

а) Метод разбавления (выделение из почвы)

10г почвы смешивали со 100мл 0,5% водного раствора агар (бактоагар). Из этой смеси отбирали три 10мл пробы и из каждой из них готовили два разведения (10^{-1} и 10^{-2}) в 0,5% водном растворе агара. Разбавленные пробы встряхивали (в водяной бане) в шейкере в течение 20 - 30 минут. 1мл разведения помещали с помощью пипетки на пустую чашку Петри и добавляли 20мл агара из бычьей желчи Литмана. Эти чашки инкубировали при комнатной температуре в течение 3 - 7 дней, после чего в чистые культуры на картофельном агаре с глюкозой вводили индивидуальные грибки.

б) Метод культивирования на растениях (выделение из корней)

15 горшков в виде матрицы с последовательным расположением (матрица с последовательно расположенными 50мл горшками Vefi-VP) заполняли почвой одного образца. В один горшок высевали четыре семени пшеницы, ячменя или примерно 15 семян репы, причем для каждого вида растений использовали пять горшков. Семена покрывали песком, поливали и инкубировали в камере для выращивания при температуре $+15^{\circ}\text{C}$ с 14-часовым световым периодом. После двух недель культивирования растения вытаскивали и промывали в проточной воде или очищали сухой щеткой. От корней отрезали маленькие кусочки и клали на плоские чашки. Используемые среды: агар из бычьей желчи Литмана (10г пептона, 10г декстрозы, 15г бычьей бактожелчи, 0,01г В-кристаллического фиолетового красителя, 0,03г стрептомицина, 20г агара и 1000мл воды), PCNB (15г пептона, 1г KH_2PO_4 , 0,5г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2г авикола, 3 части на миллион стрептомицина, 20г агара и 1000мл воды), картофельно-декстрозный агар со стрептомицином (39мг картофельного агара с декстрозой, 300 частей на миллион стрептомицина и 1000мл воды). Через несколько дней инкубирования выделяли отдельные грибки и инокулировали на плоские чашки картофельного агара с декстрозой. Штаммы хранили на пеллетах картофельного агара с декстрозой в ампулах (Nalgene 5000-0012, стерильный пиродифосфат 1,2мл) при температуре -80°C .

Проведение испытаний в теплице по методу скрининг-теста

Испытание в песке

Семена зерновой культуры высевали в спой песка. На эти семена и субстрат, необходимый для роста, с помощью пипетки наносили сначала мицелий и споры патогена в водной суспензии, а затем споры испытуемого грибка, после чего семена покрывали песком. Через две с половиной недели проверяли интенсивность проявления симптомов болезни. Из последующих испытаний исключали грибки, которые не влияли на интенсивность болезни, или сами оказались патоген-

ными

Испытание в торфе

Семена зерновой культуры замачивали в суспензии спор патогена и сушили. После этого семена смачивали в суспензии спор испытуемого грибка, сушили и высевали. В качестве субстрата, необходимого для роста, использовали пропаренный торф. Через две с половиной недели культивирования проверяли состояние ростков. Штаммы грибков, которые препятствовали возникновению болезней, отбирали для испытаний в полевой почве.

Испытания в полевой почве

Измельченную и увлажненную полевую почву помещали в горшки емкостью 1,5л и в каждый горшок высевали 36 семян зерновых культур. Перед посевом семена обрабатывали так же, как при испытании в торфе, причем использовали по 3 репликатных горшка для каждой обработки. Симптомы болезни у ростков проверяли через четыре недели культивирования.

Штаммы, показавшие хорошие результаты в этих испытаниях, отбирали для полевых испытаний, которые позволили окончательно определить биопрестицидную эффективность микробных isolates.

Патогенность грибковых штаммов

Экспериментальным путем проверяли возможные вредные воздействия грибкового штамма J 76. Полученные результаты показали, что этот грибок не оказывает патогенного действия на растения. Испытания проводились в отношении растений 33 видов.

Экспериментальная часть

Следующие эксперименты иллюстрируют возможности применения настоящего изобретения. В разделе (A) рассматривается использование суспензий спор *Nectria pityrodes* штаммов J 76, J 1431, J 1432, MOS 1 и ROS 2 по этому изобретению для борьбы с болезнями растений, вызываемыми главным образом видом *Fusarium spp*. В разделе (B) описывается способ получения и использования составов на основе этих штаммов. В разделе (C) рассматриваются эксперименты, с помощью которых исследовали действие, оказываемое грибковым штаммом J 76, и в разделе (D) приводится осуществление и оценка метода скрининг-теста по настоящему изобретению.

(A) Использование грибковых штаммов в виде суспензий спор

Эксперименты с суспензией спор штамма J 76

Летом 1992 г. на трах испытательных площадках проверяли воздействие суспензии спор штамма J 76. В этих испытаниях использовали семена двух разных зерновых культур, семена пшеницы, искусственно инокулированные *Fusarium culmorum*, и семена ячменя, зараженные *F. Nivale* естественным путем.

Результаты испытаний в отношении пшеницы приведены в таблице 1. Показатели урожайности искусственно инокулированной пшеницы даны в таблице 2.

Результаты проверки ростков ячменя представлены в таблице 3. Эта болезнь не оказала статистически значимого влияния на урожайность ячменя.

Таблица 1

Эксперименты, проведенные на трех испытательных участках летом 1992 г. в отношении искусственно инокулированной пшеницы. Появление всходов и развитие болезни у ростков

	Обработка	Ростки, количество/ метр рядка	Развитие болезни, процент сильно пораженных ростков
ХОКИОЙНЕН	Здоровые семена	50	5,2
	Необработанные семена	11	43
	Семена, протравленные составом "Байтан"	45	10
	J 76	47	7,2
МИЕТОЙНЕН	Здоровые семена	45	7,3
	Необработанные семена	10	42
	Семена, протравленные составом "Байтан"	39	3,8
	J 76	33	13
ПАЛКАНЕ	Здоровые семена	50	3,0
	Необработанные семена	15	57
	Семена, протравленные составом "Байтан"	51	24
	J 76	45	11

Таблица 2

Эксперименты, проведенные на трех испытательных площадках летом 1992 г. в отношении искусственно инокулированной пшеницы. Показатели урожайности (кг/га)

Обработка	Хокиойнен	Миетойнен	Палкане
Здоровые семена	3650	3190	5290
Необработанные семена	1830	1690	1950
Семена, протравленные составом "Байтан"	3270	3190	4940
J 76	3530	2950	4900

Таблица 3

Эксперименты, проведенные на трех испытательных площадках летом 1992 г. в отношении ячменя, зараженного естественным путем (*F. nivale*). Появление всходов и развитие болезни у ростков

	Обработка	Ростки, количество/ метр рядка	Развитие болезни, процент сильно пораженных ростков
ХОКИОЙНЕН	Необработанные семена	39	7,7
	Семена, протравленные составом "Байтан"	40	1,2
	J 76	40	0,9
	Необработанные семена	42	7,4
МИЕТОЙНЕН	Семена, протравленные составом "Байтан"	42	1,4
	J 76	43	2,8
	Необработанные семена	42	26
	Семена, протравленные составом "Байтан"	42	9,4
ПАЛКАНЕ	J 76	44	6,3

Испытание по выявлению реакции на дозу штамма J 76, проведенное летом 1992 г.

Поскольку штамм J 76 продемонстрировал действительно хорошие результаты во время опытов, проведенных в начале лета 1992 г., было исследовано воздействие этого штамма в зависимости от дозы на зерновую культуру, посеянную в начале лета. Использовали как здоровые семена пшеницы, так и семена, искусственно инокулиро-

ванные *Fusarium culmorum*.

Этот эксперимент проводили на небольших делянках площадью 2 м². Вести наблюдение за появлением всходов и проявлением симптомов болезни у ростков. Образцы ростков для проверки развития болезни брали через четыре равных периода времени. Образцы для каждой обработки брали с четырех делянок, посев на которых был произведен отдельно для каждого времени отбора

образцов. Количество ростков указано в таблице 4, а процентные значения пораженных ростков приведены в таблице 5 отдельно для пораженных

и здоровых семян. Данные, представленные в таблице 5, графически показаны на рисунках 1 и 2

Таблица 4

Эксперимент по выявлению реакции на дозу штамма J 76, проведенный летом 1992 г. Появление всходов

Обработка	Ростки, количество/метр, ряда
Семена, зараженные грибом	
Необработанные семена	18
Семена, протравленные составом "Байтан"	57
Суспензия спор J 76 ($1,2 \times 10^7$ КОЕ/мл)	74
Суспензия спор J 76 ($1,2 \times 10^6$ КОЕ/мл)	58
Суспензия спор J 76 ($1,2 \times 10^5$ КОЕ/мл)	51
Суспензия спор J 76 ($1,2 \times 10^4$ КОЕ/мл)	20
Здоровые семена	
Необработанные семена	71
Семена, протравленные составом "Байтан"	66
Суспензия спор J 76 ($1,2 \times 10^7$ КОЕ/мл)	80

Таблица 5

Эксперимент по выявлению реакции на дозу штамма J 76, проведенный летом 1992 г. Процент пораженных ростков для семян, инокулированных грибом *F. culmorum*, и здоровых семян. Сокращения аналогичны рис. 2

Обработка	Количество дней после появления всходов			
	10	17	30	44
Семена, зараженные грибом <i>Fusarium</i>				
К	75,4	82,8	79,5	85,1
В	15,9	60,9	65,3	78,2
J 76-0	10,1	50,0	66,8	70,3
J 76-1	23,1	51,8	55,5	62,9
J 76-2	36,4	64,7	76,0	78,0
J 76-3	68,6	72,8	77,1	76,2
Здоровые семена				
К	54,7	71,8	67,7	85,1
В	8,4	50,4	58,3	73,6
J 76-0	14,3	48,0	69,9	73,8

Полевые опыты с использованием суспензии спор J 76, проведенные летом 1993 г.

Эти опыты были проведены на научно-исследовательских станциях Хокиойнен, Метиойнен и Палкане. В опытах использовали образцы семян шести типов:

- пшеница "Luja", зараженная грибом *F. culmorum* естественным путем,
- пшеница "Luja", искусственно инокулированная грибом *F. culmorum*
- пшеница "Luja", незараженная,
- пшеница "Laari" незараженная,
- ячмень "Kustaa", зараженный разными грибами *Fusarium* и грибом *Virgaria sorokiniana* естественным путем,
- овес "Yty", зараженный грибом *F. avenaceum* естественным путем.

Здоровые семена были посеяны только в Хокиойнене, в отношении других четырех образцов

семян опыты проводились в каждом из трех испытательных районов. Для проведения опытов делянки площадью 10 м^2 засеивали шестью дублированными образцами, предназначенными для каждой обработки.

Все образцы семян подвергали аналогичной обработке. К = необработанные контрольные семена,

В = химически обработанные семена, протравленные составом "Байтан 1",

J 76S = суспензия спор J 76 из культуры на плоских чашках ($8,4 \times 10^9$ КОЕ/кг семян).

В таблице 6 приведены значения интенсивности поражения болезнью отдельно для каждой обработки и образцов семян. Показатели урожайности суммированы в таблице 7.

Таблица 6

Полевые опыты с использованием суспензии спор J 76, выполненные в 1993 г. Процент сильно пораженных ростков

	Ячмень	Овес	Пшеница зараженная естественным путем	Пшеница инокулированная искусственно	Здоровая пшеница "Luja"	Здоровая пшеница "Laan"
ХОКИОЙНЕН						
K	6,0	10,1	7,4	34,2	20,6	5,7
B	0,9	2,0	2,1	1,0	1,4	0,7
J 76S	0,9	1,4	0,7	1,0	3,3	5,7
МИЕТОЙНЕН						
K	12,8	3,5	20,4	72,0		
B	1,3	0,6	5,7	6,6		
J 76S	5,4	0	7,1	7,3		
ПАЛКАНЕ						
K	9,6	7,4	10,9	26,9		
B	2,5	3,3	2,1	0,8		
J 76S	2,4	3,6	2,3	0		

Таблица 7

Урожайность, достигнутая во время полевых опытов, проведенных в 1993 г. с использованием суспензии спор J 76 (кг/га)

	Ячмень	Овес	Пшеница, зараженная естественным путем	Пшеница, инокулированная искусственно	Здоровая пшеница "Luja"	Здоровая пшеница "Laan"
ХОКИОЙНЕН						
K	7460	6850	6090	2950	6100	6360
B	7500	6790	5870	5690	5940	6060
J 76S	7840	6850	6050	6040	6150	6570
МИЕТОЙНЕН						
K	5900	5780	4920	3890		
B	6070	5200	4910	4990		
J 76S	6120	5440	4670	4810		
ПАЛКАНЕ						
K	4670	5560	3630	2950		
B	4550	5200	4190	4000		
J 76S	4710	5430	3710	3650		

Испытание штамма J 76 в отношении воздействия на твердую головку пшеницы и гниль корневой шейки ячменя

Летом 1993 г. штамм J 76 был включен в полевые опыты, в ходе которых десять химических фунгицидов, используемых для протравливания семян зерновых культур, испытывали в отношении

воздействия на твердую головку пшеницы (вызываемую грибом *Tilletia caries*). Штамм J 76 применяли в виде суспензии конидий, а химикаты - в соответствии с инструкциями по использованию. Опыты проводили на делянках площадью 0,1 м² при пятикратном дублировании (таблица 8)

Таблица 8

Влияние протравливания на возникновение твердой головки пшеницы

Обработка	Эффективность уничтожения (%) (= сокращение количества пораженных колосов)
Тайссато S, жидкий состав	78
Байтан WS	100
Берет 050	100
Фунгазил С	100
Паноктин 35	100
Раксил 1, порошкообразный состав	100
Раксил 1, жидкий состав	100

Прелюд LS	100
Витавакс 200	100
J 76	85

В составе "Байтан" активным ингредиентом был триадименол. Состав "Байтан 1" представлял собой смесь, которая включала триадименол и имазалил. Состав "Тайссато S" содержал карбоксин и имазалил. Активным ингредиентом в составе "Паноктин" являлся квазатин.

Во время полевых опытов по испытанию химических в отношении уничтожения гнили корневой шейки ячменя (вызываемой *Viridaria sorokiniana*)

также производили обработку семян спорами J 76. Опыты проводили на делянках площадью 10 м² с четырехкратным дублированием. Не было обнаружено никаких различий в появлении всходов при различных обработках. Штамм J 76 позволил в значительной степени устранить симптомы болезни (таблица 9), хотя этот патоген сильно отличается от грибов, *Fusarium*, для борьбы с которыми он был выбран.

Таблица 9

Влияние протравливания на возникновение гнили корневой шейки ячменя

Обработка	Эффективность уничтожения (%) (сокращение количества пораженных ростков)
Прелюд LS	85
Дивиденд 37,5 (400мл)	84
Дивиденд 37,5 (200мл)	81
Байтан 1	81
Берет специальный (400мл)	74
Раксил 1, порошкообразный состав	70
Тайссато S, жидкий состав	66
Паноктин плюс	66
Фунгазил С	66
Берет специальный (200мл)	65
Раксил 1, жидкий состав	64
Берет FS 050	49
RNL 210	39
J 76	69

(В) Препараты, полученные из грибковых штаммов, эффективность их применения в полевых опытах

Порошкообразные составы из грибкового штамма J 76 были получены следующим образом. Состав 1

Культивирование производили в колбе Эрленмейера емкостью 1л, в которую помещали 0,5л питательной среды, содержащей 4г/л сахарозы, 4г/л дрожжевого экстракта и 10г/л солодового экстракта. Показатель pH доводили до 6,0 перед стерилизацией в автоклаве. В качестве инокулята использовали пеллету агара со спорами, которую хранили при температуре -80°C (картофельно-декстрозный агар). Скорость вращения шейкера равнялась 150 оборотам в минуту, культуру выращивали при комнатной температуре (22°C) и период культивирования составлял от 7 до 12 дней. Клетки отделяли фильтрованием через фильтровальную бумагу С биомассой (клеточной) смешивали SiO₂, сухое молоко и карбоксиметилцеллюлозу в следующих количествах:

биомасса	20%
диоксид кремния	55%
сухое молоко	15%
карбоксиметилцеллюлоза (7% водный раствор)	10%

Эту смесь в течение 2 дней сушили на откры-

тых чашках Петри при комнатной температуре в стерильной атмосфере. Толщина слоя составляла 1 - 2см. Высушенную смесь измельчали в порошок. Жизнеспособность препарата равнялась 10 КОЕ/г (КОЕ = колониеобразующая единица).

КОЕ (колониеобразующая единица) - это единица, которая используется для определения жизнеспособности микробов.

Разбавленную суспензию микробов помещали на плоские чашки агара и через несколько дней подсчитывали колонии. Если известна степень разведения, можно высчитать количество колоний или количество микробных клеток в первоначальном образце.

Состав 2

Клетки культивировали так же, как при получении состава 1, после чего с биомассой смешивали SiO₂, сухое молоко, карбоксиметилцеллюлозу и аскорбиновую кислоту в следующих количествах:

биомасса	60%
SiO ₂	20%
сухое молоко	14%
карбоксиметилцеллюлоза (7%)	3%
аскорбиновая кислота	3%

Эту смесь сушили так же, как при получении состава 1, и измельчали в порошок. Жизнеспособность этого препарата составила 10⁷ КОЕ/г.

Состав 3

Клетки культивировали так же, как при получении состава 1, после чего с клеточной биомассой смешивали сахарозу и крахмал в следующих количествах

биомасса	20%
сахароза	25%
крахмал	55%

Эту смесь сушили так же, как при получении состава 1, и измельчали в порошок. Жизнеспособность этого препарата составила 10^7 КОЕ/г

Состав 4

Штамм J 76 культивировали в твердой питательной среде с наполнителем из SiO_2 . В качестве питательного бульона использовали 8% солодовый экстракт (Мальтакс MP10, Lahden Polttimo). 120г питательного бульона смешивали в химическом стакане с 50г порошкообразного силикагеля и на 20 минут помещали в автоклав при температуре 120°C . Охлажденную среду инокулировали 10г суспензии спор J 76, которую получали путем соскабливания спор с чашки картофельного агара с глюкозой в стерильную воду. Эту среду инкубировали в течение 20 дней при температуре 16°C , после чего ее 2 дня сушили при комнатной температуре. Жизнеспособность сухого препарата составила 10^7 КОЕ/г.

Остальные штаммы по настоящему изобретению можно получить аналогичным образом.

Эффективность применения порошкообразных составов в полевых опытах

Рассматриваемые ниже опыты проводились Институтом защиты растений в Сельскохозяйственном научно-исследовательском центре Финляндии летом 1993 г. при использовании порошкообразного состава штамма J 76. Эти опыты проводились в Сельскохозяйственном научно-

исследовательском центре в Хокиойнене, Миетойнене и Палкане. При проведении этих опытов использовали образцы семян шести видов

- пшеница "Luja", зараженная грибом *F. culmorum* естественным путем,
- пшеница "Luja", искусственно инокулированная грибом *F. culmorum*
- пшеница "Luja", незараженная,
- пшеница "Laari" незараженная,
- ячмень "Kustaa", зараженный разными грибами *Fusarium* и грибом *Biopolaris sorokiniana* естественным путем,
- овес "Yty", зараженный грибом *F. avenaceum* естественным путем

Образцы здоровой пшеницы сеяли только в Хокиойнене, а опыты с четырьмя другими образцами семян проводили на всех трех испытательных участках. В ходе опытов засеивали делянки площадью 10 м^2 с шестикратным дублированием для каждой обработки.

Все образцы семян подвергали одинаковой обработке. К = необработанные контрольные семена,

В = химически обработанные контрольные семена, протравленные составом "Байтан 1",

J 76PK = порошкообразный состав J 76, используемый в виде сухой протравки ($8,4 \times 10^8$ КОЕ/кг = наибольшее количество, поглощаемое семенами),

J 76PN = порошкообразный состав J 76, используемый в виде жидкой протравки ($8,4 \times 10^8$ КОЕ/кг)

В таблице 10 приведены величины интенсивности поражения болезнью отдельно для каждой обработки и образцов семян. Показатели урожайности суммированы в таблице 11.

Таблица 10

Полевые опыты с использованием порошкообразного состава J 76, выполненные в 1993 г. Процентные значения сильно пораженных ростков

	Ячмень	Овес	Пшеница зараженная естественным путем	Пшеница инокулированная искусственно	Здоровая пшеница "Luja"	Здоровая пшеница "Laari"
ХОКИОЙНЕН						
К	6,0	10,1	7,4	34,2	20,6	5,7
В	0,9	2,0	2,1	1,0	1,4	0,7
J 76PK	2,2	1,5	2,7	7,0	6,2	2,8
J 76PN	1,2	1,9	3,9	1,3	5,7	4,6
МИЕТОЙНЕН						
К	12,8	3,5	20,4	72,0		
В	1,3	0,6	5,7	6,6		
J 76PK	10,1	0	17,2	42,5		
J 76PN	9,1	0,3	13,7	14,3		
ПАЛКАНЕ						
К	9,6	7,4	10,9	26,9		
В	2,5	3,3	2,1	0,6		
J 76PK	5,3	2,6	4,8	6,1		
J 76PN	3,9	3,8	3,9	2,7		

Таблица 11

Показатели урожайности, достигнутые во время полевых опытов, проведенных в 1993 г с использованием порошкообразного состава J 76 (кг/га)

	Ячмень	Овес	Пшеница, зараженная естественным путем	Пшеница, инокулированная искусственно	Здоровая пшеница "Luja"	Здоровая пшеница "Laan"
ХОКИОЙНЕН						
K	7460	6650	6060	2950	6100	6360
B	7500	6790	5870	5690	5940	6060
J 76PK	7610	6940	6060	5140	6400	6320
J 76PN	7610	6970	6040	6020	6000	6400
МИЕТОЙНЕН						
K	5900	5780	4920	3890		
B	6070	5200	4910	4990		
J 76PK	6000	5870	4770	4620		
J 76PN	6110	5760	4790	4950		
ПАЛКАНЕ						
K	4670	5560	3630	2950		
B	4550	5200	4190	4000		
J 76PK	4730	5560	3600	3390		
J 76PN	4870	5470	3660	3760		

Кроме того, в 1993 г проводили испытания по эффективности воздействия составов, полученных из штамма J 76, на разные грибки. Результа-

ты этих экспериментов приведены в таблицах с 12 по 18

Таблица 12

Эффективность подавления штаммом J 76 грибов *Gaeumannomyces* на инокулированной пшенице Polkka, произрастающей в песчаной почве. Вегетационное испытание с прикрытием

Обработка	Появление всходов %	Процент полностью здоровых ростков	Индекс поражения (0 - 3)	Сырой вес	
				г/репликацию	г/росток
Пораженные болезнью семена (не обработанные штаммом J 76)	78,7	65,3	0,76	5,8	0,28
Протравливание сухим составом J 76 (состав 4), 8г/кг	81,3	76,0	0,55	10,1	0,46
Протравливание жидким составом J 76, 10 ⁶ КОЕ /мл	90,7	81,3	0,31	10,4	0,43

Индекс поражения

- 0 здоровые семена
- 1 незначительное поражение
- 2 сильное поражение
- 3 отсутствие всходов

Таблица 13

Эффективность воздействия препаратов J 76 на грибок *Fusarium culmorum*, поражающий пшеницу Polkka. Вегетационные испытания при использовании торфа в качестве субстрата. KF = выращивание в твердой фазе (состав 4), R = культивирование в жидкой фазе в шейкере (состав 1), M = микробы из культуры на агаре

Обработка	Процент появления всходов	Процент полностью здоровых растений	Индекс поражения (0 - 3)	Сырой вес, г/репликац
Здоровые семена	91	84	0,37	16,2
Пораженные болезнью семена	30	5	2,54	4,5
Протравливание жидким составом J 76 KF 40/931, 10 ⁶ КОЕ/мл	72	44	1,17	14,0

Продолжение таблицы 13

Протравливание жидким составом – J 76 R 10/2 C, 10 ⁶ КОЕ/мл	71	49	1,21	13,0
J 76 M, 10 ⁶ КОЕ/мл	76	58	0,99	14,8

Индекс поражения

0	здоровые растения
1	незначительное поражение
2	сильное поражение
3	отсутствие всходов

Таблица 14

Эффективность воздействия препаратов J 76 на грибок *Pythium*, поражающий огурцы. Результаты даны в виде средних значений для трех вегетационных испытаний (рН 6,2, рН 6,9 и рН 7,4)

Обработка	Процент жизнеспособных проростков	Индекс поражения (0 - 2)	Сырой вес г/репликацию
Здоровые семена	98	0,04	12,1
Пораженные болезнью семена	47	0,63	5,4
Протравливание жидким составом J 76, 10 ⁶ КОЕ/мл	58	0,52	6,9

Индекс поражения

0	здоровые растения
1	погибшие растения
2	отсутствие всходов

Таблица 15

Эффективность защиты грибковым штаммом J 76 цветной капусты, произрастающей в песчаной почве, зараженной грибом *Rhizoctonia solani*. Вегетационное испытание в теплице

Обработка г	Процент появления всходов	Процент полностью здоровых растений	Сырой вес	
			г/репликацию	г/росток
Необработанные семена	92,7	52,0	21,7	0,79
Протравливание жидким составом J 76 в количестве 10 ⁷ КОЕ/мл	94,7	72,0	24,1	0,84

Таблица 16

Эффективность защиты грибковым штаммом J 76 ячменя "Kustaa", произрастающего в песчаной почве, инокулированной грибом *Fusarium nivale*. Вегетационное испытание на открытом воздухе, с прикрытием

Обработка	Процент появления всходов	Процент полностью здоровых растений	Индекс поражения (0 - 3)	Сырой вес, г/репликацию
Здоровые семена	93,3	37,3	0,91	8,9
Пораженные болезнью семена	73,3	29,3	1,43	7,8
Протравливание жидким составом J 76 KF, 10 ⁶ КОЕ/мл	80,0	52,0	0,91	9,7
Протравливание жидким составом J 76, 10 ⁶ КОЕ/мл	81,3	52,0	0,93	10,3

Индекс поражения

0	здоровые растения
1	незначительное поражение
2	сильное поражение
3	отсутствие всходов

Таблица 17

Эффективность воздействия грибкового штамма J 76 на грибок *Alternaria brassicicola*, поражающий цветную капусту. Результаты даны в виде средних значений для экспериментов, выполненных при трех разных температурах (15°C, 20°C и 25°C)

Обработка	Процент появления всходов	Индекс поражения (0 - 3)	Сырой вес г/репликации
Здоровые семена	96	0,17	33,2
Пораженные болезнью семена	50	2,01	21,8
Протравленные жидким составом J 76, 10 ⁶ КОЕ/мл	96	0,22	35,4

Индекс поражения

- 0 здоровые растения
- 1 незначительное поражение
- 2 сильное поражение
- 3 погибшие растения или отсутствие всходов

Результаты экспериментов по выявлению эффективности воздействия пяти штаммов *Nectria pityrodes* по настоящему изобретению (J 76, J 1431, MOS 1 и ROS 2) на грибок *Fusarium culmorum*, поражающий пшеницу, приведены в

таблице 18. Результаты даны в виде средних значений, полученных в двух экспериментах, в одном из которых в качестве субстрата использовали торф, а в другом - полевую почву

Таблица 18

Эффективность воздействия пяти штаммов *Nectria pityrodes* (J 76, J 1431, J 1432, MOS 1 и ROS 2) на грибок *Fusarium culmorum*, поражающий пшеницу. Результаты даны в виде средних значений для двух вегетационных испытаний (торф и полевая почва)

Обработка	Процент полностью здоровых растений	Индекс поражения (0 - 3)	Сырой вес, г/репликацию
Пораженные болезнью семена	23	2,06	3,0
Протравливание жидким составом J 76, 10 ⁴ КОЕ/мл	73	0,66	8,0
Протравливание жидким составом J 1431, 10 ⁴ КОЕ/мл	80	0,51	8,5
Протравливание жидким составом J 1432, 10 ⁴ КОЕ/мл	72	0,78	8,0
Протравливание жидким составом MOS 1, 10 ⁷ КОЕ/мл	76	0,66	8,8
Протравливание жидким составом ROS 2, 10 ⁷ КОЕ/мл	76	0,66	8,3

Индекс поражения

- 0 здоровые растения
- 1 незначительное поражение
- 2 сильное поражение
- 3 отсутствие всходов

(С) Характер воздействия штамма J 76

Предварительные исследования характера воздействия штамма, J 76 в качестве антагониста других грибов производили с помощью микроскопа и лабораторных испытаний

Наблюдения под микроскопом позволили установить, что гифы J 76 взаимодействуют с грибом *F. culmorum* и первые отчетливо воспринимаемые реакции происходят очень быстро. В местах соприкосновения мицелия клетки гифов грибка *Fusarium* начинают разлагаться примерно через час после взаимодействия. Сначала клеточные стенки теряют свою форму, затем исчезает содержимое клеток, и, наконец, полностью разлагаются клеточные стенки. Процесс разложения

гифов грибка *Fusarium* медленно распространяется. При выращивании смеси J 76 и *F. culmorum* в течение нескольких дней гифы грибка *Fusarium* полностью пропадают. Под действием штамма J 76 разлагаются также споры этого грибка (как конидии, так и хламидоспоры), но медленнее, чем гифы. Обычно гифы штамма J 76 свободно обволакивают споры грибка *Fusarium* до их разложения. Проникновение штамма J 76 в гифы грибка *Fusarium* не наблюдалось.

На основании наблюдений под микроскопом был сделан вывод о том, что штамм J 76 с орее всего выделяет в окружающую среду биологически активные вещества. По своей природе они могут быть подобны ферментам или антибиотикам. Действие штамма J 76 может быть связано с выработкой именно таких веществ, так как не было обнаружено признаков его паразитирования на других грибах, и вследствие медленного роста он не может эффективно бороться за питательные

вещества. При выполнении испытаний на целлофане были также высказаны предположения о выделении этим грибом метаболитов, действующих на рост других грибов.

При выращивании штамма J 76 и *F. culmorum* в непосредственной близости друг от друга на очень тонком субстрате формируется зона ингибирования, в которой прекращается рост грибка *Fusarium*. На субстрате нормальной толщины такой эффект обнаружен не был. Это, вероятно, связано с диффузией в субстрат выделяемых веществ в небольших концентрациях. Кроме того, было установлено, что летучие вещества, выделяемые штаммом J 76, также замедляют рост грибка *F. culmorum*.

Испытание на целлофане. На субстрат, необходимый для роста, помещали целлофановую пленку, на которой культивировали штамм J 76. После культивирования в течение 10 дней пленку вместе со штаммом J 76 удаляли. Вещества, выделенные штаммом J 76 и прошедшие через пленку, оставались в субстрате. В качестве контрольных образцов использовали чашки, в которые помещали целлофановую пленку без штамма J 76. Результаты испытания на целлофане приведены в таблице 19.

Таблица 19

Влияние метаболитов, выделяемых грибом J 76 на рост грибка *F. culmorum* при испытании на целлофане, скорость роста дана в мм/день

J 76	2,5
Контрольный образец	6,2

(D) Выполнение метода скрининг-теста и оценка полученных результатов

Испытания в песке

Субстрат для посева

В качестве субстрата для посева использовали песок с размером зерен 0,2 - 0,7 мм Kauniston Sora Oy, Loimaa). Песок увлажняли путем смешивания 4 частей песка с 1 частью воды. Из матрицы последовательно расположенных горшков (VefiVP 96), вырезали пластину размером 5x7 горшков (емкостью 50мл), которую помещали в пластиковый ящик. Горшки наполняли увлажненным песком так, чтобы он не доходил до верхнего края на 1 - 1,5 см. В каждый горшок высевали по три зерна яровой пшеницы "Luja".

Обработка

Заражение грибом *Fusarium culmorum*. Грибок *F. culmorum* выращивали на чашках картофельного агара с декстрозой при комнатной температуре в течение 1 месяца (до полного спорообразования). Мицелий со спорами отделяли от чашки и смешивали с дистиллированной водой при помощи гомогенизатора "Ультратурракс". Количество спор доводили до 10^6 спор/мл. Этот раствор замораживали в виде 30мл порций в мешках "Мини-грип" до -20°C. Для проведения испытаний замороженные растворы оттаивали и вновь смешивали. Этот раствор использовали как есть (основной раствор) и в виде разбавления до 10^2 . Патогенность штаммов

Fusarium сохраняли путем последовательного заражения им растений (семена пшеницы инокулировали суспензией грибка *Fusarium*, после чего патоген вновь выделяли из пораженных ростков).

Суспензия антагониста. Пеллету картофельного агара с декстрозой, содержащую антагонист, брали из морозильной камеры, делили на три части и помещали на три чашки картофельного агара с декстрозой. Чашки инокулировали при комнатной температуре (в темноте) в течение трех недель. Основной раствор суспензии антагониста готовили путем соскабливания содержимого из двух чашек с антагонистом в 50мл дистиллированной воды. Полученную смесь перемешивали с помощью гомогенизатора "Ультратурракс". Из основного раствора готовили два раствора - разведения до 10^1 и 10^3 .

Обработка семян. На посеянные в горшки семена с помощью пипетки наносили сначала 1мл суспензии *F. culmorum*, а затем 1мл суспензии антагониста. 15 семян в пяти 50мл горшках обрабатывали всеми шестью комбинациями суспензий с разной плотностью спор (два разведения суспензии *F. culmorum* x три разведения суспензии антагониста).

Контрольная обработка. Для тестирования одного грибка использовали пять горшков, в которые дополнительно высевали 15 семян и обрабатывали только основным раствором испытуемого грибка.

В испытаниях на песке одновременно тестировали от 15 до 30 грибковых штаммов. В день начала испытаний также производили посев в горшки, которые служили для проверки состояния семян и патогенности инокулята *F. culmorum*. Контрольные семена, посеянные в отдельную матрицу горшков, подвергали трем обработкам, которые включали, без инокуляции (только вода), инокуляцию основным раствором *F. culmorum* и инокуляцию разбавленным основным раствором *F. culmorum* (10^{-2}). Каждую из этих трех обработок производили в отношении 30 семян, посеянных в 10 горшков.

Условия роста

После нанесения с помощью пипетки грибковых суспензий семена покрывали увлажненным песком. Ящики с горшками заворачивали в прозрачный пластик и переносили в камеру для выращивания (температура 10° - 15°C, 14-часовой световой период).

Наблюдения

После выращивания проростков в течение 16 - 18 дней их тщательно промывали в проточной водопроводной воде и исследовали симптомы болезни. Ростки, у которых корневые или coleoptильные клетки побурели, и непроросшие семена, оставшиеся твердыми, считались здоровыми. Ростки с отчетливыми симптомами болезни и непроросшие семена, которые стали мягкими, были признаны больными.

Первыми исследовали растения, подвергавшиеся контрольной обработке. Если из семян, обработанных водой, развились только здоровые растения, и у семян, обработанных патогеном, наблюдались четко выраженные симптомы болезни, результаты испытания считались действи-

тельными и производилась проверка растений, обработанных грибковыми штаммами

При испытании в песке оценку, присваиваемую каждому выделенному грибковому штамму, определяли, исходя из количества обработанных им растений, которые оказались больными. Если всхожесть растений, обработанных испытуемым грибом, была значительно меньше, чем у контрольных здоровых растений, или были обнаружены симптомы другой болезни, этот грибок считался непригодным для дальнейших исследований. Если поражения отсутствовали, каждую из шести комбинаций плотности спор патогена и спор испытуемого грибка оценивали отдельно по следующей шкале

- 0 = все 15 растений здоровы
- 1 = не более 2 пораженных растений
- 2 = 3 - 5 пораженных растений
- 3 = 6 - 8 пораженных растений
- 4 = 10 - 13 пораженных растений
- 5 = не более одного здорового растения

На основании шести вышеуказанных оценок выбирали грибковые штаммы, которые использовали на следующем этапе испытаний, т.е. в испытаниях в торфе. Для последующих испытаний были отобраны такие штаммы, которые не менее трех раз получали оценки 0 и 1. Если грибок не получил ни одной оценки 0, его отбирали для последующих исследований, если он получал не менее четырех раз оценку 1.

Испытания в торфе

Субстрат для выращивания

В качестве субстрата для выращивания использовали пропаренный, удобренный и известкованный торф. До осени 1992 г. применяли непросеянный неочищенный торф из Торронсуо, а затем просеянный неочищенный торф из Эруахоки (Внесение удобрений 800г доломитовой извести и 100г удобрения Y-lannos/100л торфа (Y-lannos = в торговой марка, означающая финское универсальное удобрение). Увлажненный торф помещали в пластиковые ящики (28,5x49,5x9,4см, ящик "Mammut" компании Weibulls Robusta, Muovihtyma Oy) в виде слоя толщиной 5см. На дно ящика клали пластиковую пленку.

Обработка

T = Здоровые, неинокулированные семена яровой пшеницы "Luja"

Полив производили дистиллированной водой

F = Семена, инокулированные грибом *F. culmorum*. Семена вымачивали в основном растворе *F. culmorum* (раствор использовали в избыточном количестве), содержащем примерно 10^6 спор/мл (культивирование грибка *Fusarium* сравни с испытанием в песке). После обработки семена рассыпали на бумаге и оставляли для высушивания на ночь.

F0 = Инокулирование грибом *F. culmorum* производили так же, как в случае обработки F. Когда семена высыхали, их смачивали основным раствором антагониста. Основной раствор получали путем соскабливания мицелия и спор из одной чашки антагониста в 25мл дистиллированной воды. Обработку производили посредством встряхивания семян и раствора антагониста в маленькой пластиковой склянке. После обработки семена

сушили на бумаге

F2 = Инокулирование грибом *F. culmorum* производили так же, как в случае обработки F. Обработку антагонистом выполняли так же, как в случае обработки F0, с использованием основного раствора антагониста, разбавленного до 10^2 .

В торфе делали 10 рядков, в каждый из которых высевали по 30 семян. Посев производили в следующей последовательности: защитный ряд, F, F0, F2, T, F, F0, F2, T, защитный ряд. После посева семена покрывали торфом, который увлажняли.

Условия роста

Посеянные семена выращивали в теплице при температуре около 15°C. В темное время года при помощи лампы с несколькими нитями накаливания создавали дополнительное освещение в течение 12 часов/день. При необходимости посеянные семена смачивали водой. Период культивирования составлял 18 дней.

Сортировка

Ростки промывали и определяли у них симптомы болезни аналогично тому, как это делали после испытания в песке. На основании результатов наблюдений, полученных после обработок T и F, принимали решение о достоверности испытания. У здоровых контрольных растений (T) не допускалось наличие более 12 пораженных растений (из 60 посеянных семян), а в контрольной группе (F), зараженной патогеном, должно было быть не менее 52 пораженных растений (из 60 семян). Испытуемый грибковый штамм считался приемлемым для следующего этапа испытаний (опыты в полевой почве), если из семян (60 семян), обработанных раствором, имеющим одну из двух концентраций, развивалось не более 19 пораженных растений.

Испытания в полевой почве

Субстрат для посева

Используемую почву (песчаная глина) брали с опытного поля в Хокиойнене. Почву измельчали руками или (зимой 1992-1993 гг.) просеивали через грохот с отверстиями размером 1x1см. Пластиковые горшки емкостью 1,5л (диаметром 14см) заполняли почвой так, чтобы верхний край оставался пустым на высоту 3 - 4см. На дно горшка клали фильтровальную бумагу.

Обработка

1 Здоровые семена. Смоченные только дистиллированной водой.

2 Контрольная группа, обработанная грибом *Fusarium*. Семена смачивали инокулянтom *Fusarium* (препарат, используемый в испытаниях в песке), содержащим 10^6 спор/мл, этот раствор использовали в избыточном количестве.

3 Инокулирование, произведенное так же, как в контрольной группе, обработанной грибом *Fusarium*. После высыхания семян их обрабатывали суспензией антагониста, которую получали путем смешивания мицелия и спор из одной чашки с 25мл дистиллированной воды. Обработку производили в пластиковой склянке, куда помещали 130 семян (120 - 150 семян) и 1мл (или 1,5мл) суспензии антагониста.

4 Контрольная группа, обработанная фунгицидом. Инокулирование производили так же, как в

контрольной группе, обработанной *Fusarium*. После высушивания семена обрабатывали 2г протравливающего порошка "Байтан 1" на один кг семян. Кроме того, производили ранее применявшиеся обработки составами "Серезан" и "Тайссато S".

В горшки высевали по 36 обработанных семян, по три дубликата на каждую обработку. Посеянные семена покрывали полевой почвой. Условия роста были такими же, как при испытании в торфе. Период культивирования составлял четыре недели.

Проверка и сортировка

Ростки промывали и оценивали у них симптомы болезни.

0 = полностью здоровые растения,

1 = незначительное поражение грибом *Fusarium*,

2 = от среднего до сильного поражения болезнью,

3 = ростки полностью побурели - гибель растений.

Эффективность испытаний в теплице

Летом 1993 г. был проведен один широкомаштабный полевой опыт по проверке метода скрининг-теста по настоящему изобретению. В ходе этого испытания проверяли, правильно ли были выбраны для дальнейшего тестирования грибковые штаммы, выделенные во время серии опытов, проведенных между октябрем 1991 г. и февралем 1993 г. Для обработки семян произвольно выбирали 60 штаммов из тех, которые были отвергнуты при испытаниях в песке, но не оказали патогенного воздействия на пшеницу. Из штаммов, забракованных во время испытаний в торфе, отобрали 92 штамма. Были отобраны все 58 грибов, использовавшихся во время испытаний в почве. 43 гриба были забракованы во время этого испытания и 15 были отобраны для полевых опытов.

Помимо вышеуказанных 210 обработок испытание включало 6 контрольных обработок необработанных семян (К), протравливание составом "Байтан 1" (В) и четыре грибковых штамма, исследованных в предыдущих испытаниях, в том числе J 76.

В этом испытании использовали пшеницу "Luja", зараженную грибом *F. culmorum* естественным путем. Наблюдения велись за рядом длиной 1,4м, в котором было посеяно 5,5г семян. Для выполнения всех 216 обработок было посеяно шесть дублирующих рядов. Рендомизация достигалась с помощью кубической решетки экспериментальной конструкции. Таким образом, уменьшали ошибочные вариации, связанные с почвенными факторами. Через пять недель после посева ростки выкапывали из почвы, подсчитывали и исследовали симптомы болезни.

Результаты испытания иллюстрируют четыре гистограммы, приведенные на рис. с 3а по 3д. Между изолятами, забракованными во время испытания в торфе, и непатогенными изолятами, забракованными во время испытания в песке, не было обнаружено никаких различий. Испытание в торфе дало очень хорошие результаты. Штаммы, отобранные после него для последующих испытаний, были в среднем гораздо лучше, чем отвергнутые в ходе испытания грибки.

Во время испытаний в песке и торфе неправильно было забраковано всего несколько грибов. С другой стороны, при испытании в почве было отвергнуто достаточно большое количество очень хороших изолятов, но из тех изолятов, которые были отобраны для полевых опытов, лишь два из 15 показали отрицательные результаты в естественных условиях.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что испытания в песке и торфе позволяют надежно отобрать лучшие антагонисты для дальнейших исследований, а вот во время испытаний в полевой почве могут быть забракованы даже хорошие антагонисты.

Отборочные испытания грибкового штамма J 1431

Из грибковых штаммов по настоящему изобретению штамм J 1431 исследовали во всех трех отборочных испытаниях, выполненных в теплице.

При испытании в песке штамм J 1431 получил оценки 0, 0, 1, 1, 1 и 2 и был отобран для последующих испытаний.

При испытании в торфе с использованием штамма J 1431 были получены следующие результаты:

T	3 пораженных растения
F	36 пораженных растений
F0	3 пораженных растения
F2	7 пораженных растений

Во время испытаний в полевой почве с использованием штамма J 1431 при выполнении разных обработок были получены следующие процентные значения пораженных ростков:

здоровые растения	66%
контрольная группа, обработанная грибом <i>Fusarium</i>	87%
протравливание составом "Байтан 1"	31%
J 1431	19%

На основании отборочных испытаний, проведенных летом 1993 г., штамм J 1431 был отобран для полевых опытов вместе с 61 другим грибковым штаммом. В этом испытании использовали яровую пшеницу "Luja", искусственно инокулированную суспензией спор гриба *F. culmorum*. Семена высевали на однорядных деланках (1,4м) при шестикратном дублировании этого опыта. Через 34 дня после посева ростки выкапывали из почвы, промывали и определяли симптомы болезни. При разных обработках было получено указанное ниже количество здоровых ростков на метр ряда.

контрольная группа, обработанная грибом <i>Fusarium</i>	5,9
протравливание составом "Байтан 1"	56
J 76	61
J 1431	65
другие испытанные штаммы	30 - 38

Отборочные испытания грибкового штамма J 1432

Штамм J 1432 исследовали во всех трех отборочных испытаниях, выполненных в теплице.

При испытании в песке J 1432 получали оценки 0, 0, 0, 1, 1 и 2 и был отобран для последующих испытаний.

При испытании в торфе с использованием

штамма J 1432 были получены следующие результаты

T	10 пораженных растений
F	60 пораженных растений
F0	10 пораженных растений
F2	37 пораженных растений

Во время испытания в полевой почве с использованием штамма J 1432 при разных обработках были получены следующие процентные значения пораженных ростков

здоровые растения	56%
контрольная группа, обработанная грибом <i>Fusarium</i>	98%

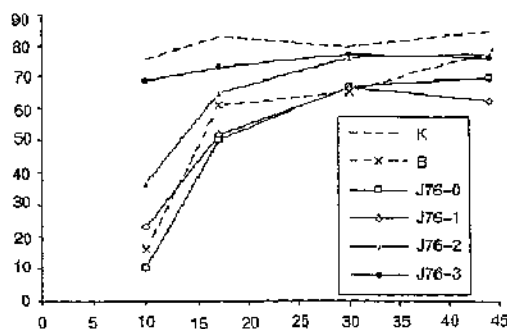
протравливание составом "Байтан 1" 16%
J 1432 38%

На основании результатов испытания в полевой почве штамм J 1432 был изъят из полевых опытов

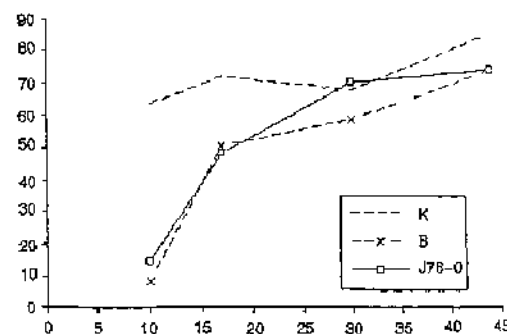
Микроорганизмы, внесенные в банк данных

На основании Будапештского договора следующие микроорганизмы были внесены в банк данных по адресу DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Брауншвейг, Германия

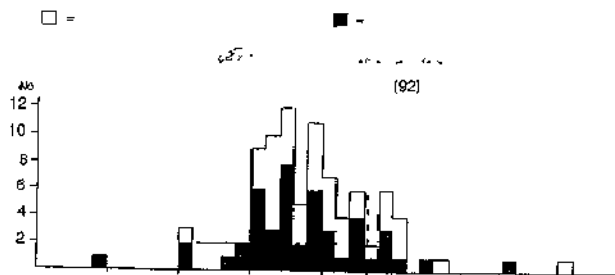
Микроорганизм	Номер в банке данных	Дата регистрации в банке данных
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J 76	DSM 7522	15 марта 1993 г
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J 1431	DSM 8805	10 декабря 1993 г
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne J 1432	DSM 8806	10 декабря 1993 г
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne MOS 1	DSM 8807	10 декабря 1993 г
<i>Nectria pityrodes</i> Montagne ROS 2	DSM 8808	10 декабря 1993 г



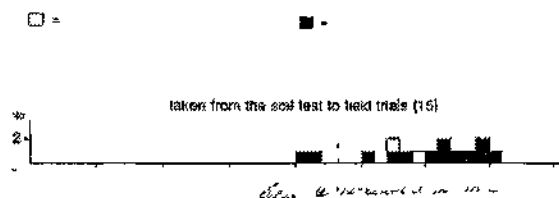
Фиг. 1



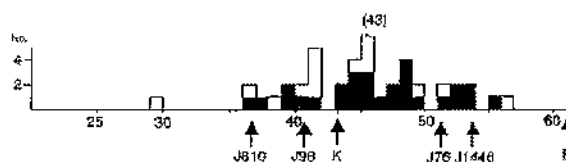
Фиг. 2



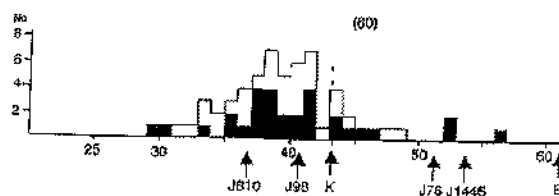
Фиг. 3с



Фиг. 3а



Фиг. 3b



Фиг. 3d

