**Биологическая эффективность
лабораторных образцов
микробиопрепаратов
на основе перспективных
штаммов антагонистов против
возбудителя фузариоза
льна масличного на фоне
искусственного заражения *in vitro***

Л.В. Маслиенко¹,

доктор биологических наук

А.Х. Воронкова¹,

младший научный сотрудник

Л.А. Даценко^{1,2},

лаборант-исследователь, магистрант КУБГУ

Е.А. Ефимцева^{1,2},

лаборант-исследователь, магистрант КУБГУ

¹ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

350038, Россия, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

Тел.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Для цитирования: Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е.А. Биологическая эффективность лабораторных образцов микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов антагонистов против возбудителя фузариоза льна масличного на фоне искусственного заражения *in vitro* // Масличные культуры. – 2019. – Вып. 3 (179). – С. 128–132.

Ключевые слова: лен масличный, фузариоз, искусственное заражение, *in vitro*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*.

Представлены результаты вторичного скрининга 43 перспективных штаммов антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wn.) Bilai *in vitro*. Выделено 20 перспективных штаммов-продуцентов микробиопрепаратов, показавших биологическую эффективность, превышающую 70,0 %. При этом максимальная эффективность установлена у трех грибных штаммов: И-3 *Basidiomycetes* (94,1 %),

Pv-3 *Penicillium verrucosum* и Т-1 *Trichoderma* sp. (88,2 %); четырех штаммов бактерий рода *Bacillus*: Б-2 *B. circulans* (94,1 %), Б-4 *B. circulans* (88,2 %), 5-3 *Bacillus* sp. и Б (2-1) *B. licheniformis* (82,4 %) и двух штаммов бактерий рода *Pseudomonas*: Sgc-1 и 16-2 *Pseudomonas* sp. (70,6 %).

UDC 633.854.54:632.937

Biological efficiency of laboratory samples of microbiopreparations basing on the promising strains-antagonists of fusariose pathogen affecting oil flax at artificial inoculation *in vitro*.

L.V. Maslienko¹, doctor of biology

A.Kh. Voronkova¹, junior researcher

L.A. Datsenko^{1,2}, laboratory assistant, master's degree student

E.A. Efimtseva^{1,2}, laboratory assistant, master's degree student

¹V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil Crops

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

Tel.: (861) 275-85-19

E-mail: biometod@yandex.ru

²Kuban State University

Key words: oil flax, fusariose, artificial inoculation, *in vitro*, *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*.

We presented the results of the secondary screening of 43 promising strains-antagonists from the collection of the laboratory of biological methods of V.S. Pustovoi All-Russian Research Institute of Oil to a pathogen *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wn.) Bilai *in vitro* affecting oil flax. We selected 20 promising strains-producers of microbiopreparations that had biological efficiency exceeding 70.0%. maximal efficiency was stated for three fungal strains: I-3 *Basidiomycetes* (94.1%), Pv-3 *Penicillium verrucosum* and T-1 *Trichoderma* sp. (88.2 %); four bacterial strains of *Bacillus* genus: B-2 *B. circulans* (94.1%), B-4 *B. circulans* (88.2%), 5-3 *Bacillus* sp. и B (2-1) *B. licheniformis* (82.4%), and for two strains of *Pseudomonas* bacteria: Sgc-1 and 16-2 *Pseudomonas* sp. (70.6%).

Введение. В лаборатории биометода ВНИИМК проводятся многолетние исследования по разработке биологических мер борьбы с болезнями масличных культур. В последние годы начаты исследования по разработке микробиологических методов снижения вредоносности наиболее распространенной болезни льна масличного – фузариоза.

В основе разработанной нами концепции целенаправленного создания микробиопрепаратов для защиты сельскохозяй-

ственных культур от болезней лежит ступенчатый скрининг выделенных штаммов-антагонистов фитопатогенов, который включает первичную оценку антагонистической активности *in vitro* к наиболее распространенным и вредоносным возбудителям болезней методом двойных или встречных культур. Затем лабораторные образцы микробиопрепаратов, изготовленные на основе выделенных в первичном скрининге перспективных штаммов, оценивают на фоне искусственного заражения патогенами в лабораторных условиях во влажной камере и в почве [1; 2]. Так как применяемый нами метод агаровых блоков [3] для искусственного заражения возбудителями болезней подсолнечника и сои не подходит для культуры льна в связи с малыми размерами семян, мы модифицировали методы, разработанные для заражения фузариозом семян рапса и горчицы [4; 5].

В результате первичного скрининга к патогенным возбудителям фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *Fusarium poae* из 60 коллекционных штаммов антагонистов выделены 43 перспективных штамма, проявивших антагонистическую активность к обоим патогенам. Из них 15 перспективных штаммов грибов: Т-1, Т-2, Т-3, Т-4 *Trichoderma* sp., Тк-1 *T. koningii*, SM-1 *Sordaria* sp., Pv-3 *Penicillium verrucosum*, Pr-1 *P. rugulosum*, Pk-1 *Penicillium vermiculatum*, A-1 и И-3 *Basidiomycetes*, An-1 *Aspergillus niger*, Av-1 *Aspergillus versicolor*, Хк-1 *Chaetomium olivaceum* и Хк-3 *Chaetomium globosum*; 20 штаммов бактерий рода *Bacillus*: Fa 4-1, D 7-1, 5Б-1, К 1-2 *Bacillus subtilis*, 3-2, 3-3, 5-3, 11-2, 11-3, D 1-1, D 7-3, Fa 4-2, Fz 9, 01 корф *Bacillus* sp., Б-2, Б-4 *B. circulans*, Р-9 *B. polymyxa*, Б-12, Б-5, Б (2-1) *B. licheniformis* и восемь штаммов бактерий из рода *Pseudomonas*: Oif 2-1, 16-2, Sgc-1, 14-4, 12-2, 15-1 *Pseudomonas* sp., Sgrc-1 *P. fluorescens* и 14-3 *P. chlororaphis* [6].

Настоящая работа посвящена первому этапу вторичного скрининга выделенных перспективных штаммов-антагонистов к наиболее распространенному возбудителю фузариоза льна масличного *Fusarium*

oxysporum Schlecht. emend. Shyd. et Hans. var. *orthoceras* (App. et Wn.) Bilai.

Материалы и методы. На основе выделенных в первичном скрининге перспективных штаммов антагонистов изготавливали лабораторные образцы микробиопрепаратов в препаративной форме «жидкая культура» (ЖК) при глубинном культивировании штаммов на качалке, со скоростью вращения 200 об./мин., в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, при объемах среды 150 мл. Грибы выращивали в течение 4-х суток на среде Рудакова [7], бактерии – в течение 2-х суток, из рода *Bacillus* – на среде Тайлона-3 [8], а из рода *Pseudomonas* – на среде Кинга В [9]. Титр определяли методом серийных разведений [10].

Семена льна масличного сорта ВНИИМК 620 обрабатывали лабораторными образцами микробиопрепаратов вручную, в круглодонных колбах, с нормами расхода препарата 3,0 л/т, рабочей жидкости – 6,0 л/т и хранили в течение 3-х суток.

Патогенный изолят возбудителя фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* предварительно выращивали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) [8] в течение 15 суток при температуре 25 °С. Затем обработанные семена льна, по 20 шт. раскладывали на увлажненную стерильной водой фильтровальную бумагу, высланную на поверхность 15-дневных колоний патогена, при этом верхнюю крышку чашки Петри выстилали стерильной фильтровальной бумагой, смоченной стерильной водой. Через 10 суток проводили учет поражения проростков льна возбудителем фузариоза. Повторность 3-кратная. Контроль – чистые необработанные семена с заражением патогеном. Биологическую эффективность препаратов определяли по формуле [11]:

$$C = \frac{100 \cdot (a - b)}{a},$$

где С – биологическая эффективность, %;

а – количество больных растений в контроле;

б – количество больных растений в варианте.

Результаты и обсуждение. В результате оценки лабораторных образцов микробиопрепаратов в препаративной форме ЖК на основе 43 штаммов антагонистов, выделенных в первичном скрининге, на фоне искусственного заражения льна масляного возбудителем фузариоза *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* в лабораторных условиях *in vitro* (в контроле поражение составило 85,9 %) выделено 20 перспективных штаммов-продуцентов, показавших биологическую эффективность, превышающую 70,0 % (табл. 1, 2, 3).

Таблица 1

Эффективность обработки семян льна масляного лабораторными образцами микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов грибов антагонистов на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* *in vitro*, через 10 суток

ЦЭБ, ВНИИМК, 2019 г.

№ п/п	Вариант	Титр, КОЕ/мл	Биологическая эффективность, %
1	Контроль	-	85,9*
2	T-1 <i>Trichoderma</i> sp.	$2,8 \times 10^9$	88,2
3	T-2 <i>Trichoderma</i> sp.	$3,0 \times 10^9$	76,5
4	T-4 <i>Trichoderma</i> sp.	$3,5 \times 10^9$	76,5
5	T-3 <i>Trichoderma</i> sp.	$3,8 \times 10^9$	64,7
6	Tk-1 <i>Trichoderma koningii</i>	$2,9 \times 10^9$	58,8
7	Pv-3 <i>Penicillium verrucosum</i>	$8,5 \times 10^9$	88,2
8	Pr-1 <i>Penicillium rugulosum</i>	$6,8 \times 10^9$	52,9
9	Pk-1 <i>Penicillium vermiculatum</i>	$8,5 \times 10^9$	41,2
10	И-3 <i>Basidiomycetes</i>	$2,5 \times 10^7$	94,1
11	A-1 <i>Basidiomycetes</i>	$2,8 \times 10^7$	64,7
12	Xk-1 <i>Chaetomium olivaceum</i>	$6,5 \times 10^7$	64,7
13	Xk-3 <i>Chaetomium globosum</i>	$8,8 \times 10^7$	76,5
14	SM-1 <i>Sordaria</i> sp.	$7,8 \times 10^7$	23,5
15	An-1 <i>Aspergillus niger</i>	$4,5 \times 10^{10}$	76,5
16	Av-1 <i>Aspergillus versicolor</i>	$1,5 \times 10^{10}$	0

Примечание: * – поражено возбудителем фузариоза в контроле без обработки, %

Из 15 перспективных грибов антагонистов высокую эффективность против возбудителя фузариоза показали семь штаммов: T-1 *Trichoderma* sp., T-2 *Trichoderma* sp., T-4 *Trichoderma* sp., Pv-3 *Penicillium verrucosum*, И-3 *Basidiomycetes*, Хк-3 *Chaetomium globosum*, An-1 *Aspergillus niger*. При этом максимальная эффективность установлена у трех штаммов: И-3 *Basidiomycetes* (94,1 %), Pv-3 *Penicillium verrucosum* и T-1 *Trichoderma* sp. (88,2 %) (рис. 1).

Из 20 перспективных штаммов бактерий рода *Bacillus* выделены 11, эффективность которых на фоне искусственного заражения

ния возбудителем фузариоза превысила 70,0 %: 01 корф, D 1-1, Fa 4-1, Fa 4-2, 5-3, D 7-3, 3-3 и 11,3 *Bacillus* sp., Б (2-1) *B. licheniformis*, Б-2 и Б-4 *B. circulans* (табл. 2).

Рисунок 1 – Влияние обработки семян льна масляного лабораторным образцом микробиопрепарата на основе перспективного штамма И-3 *Basidiomycetes* на развитие возбудителя фузариоза льна масляного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* *in vitro* (а – вариант; б – контроль без обработки) через 10 суток, 2019 г. (ориг.)

Таблица 2

Эффективность обработки семян льна масляного лабораторными образцами микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов-антагонистов из рода *Bacillus* на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* *in vitro*, через 10 суток

ЦЭБ, ВНИИМК, 2019 г.

№ п/п	Вариант	Титр, КОЕ/мл	Биологическая эффективность, %
1	Контроль	-	85,9*
2	01 корф <i>Bacillus</i> sp.	$2,4 \times 10^{10}$	76,5
3	3-2 <i>Bacillus</i> sp.	$1,8 \times 10^{10}$	52,9
4	D 1-1 <i>Bacillus</i> sp.	$1,6 \times 10^{10}$	70,6
5	Fa 4-2 <i>Bacillus</i> sp.	$2,1 \times 10^{10}$	76,5
6	5-3 <i>Bacillus</i> sp.	$3,1 \times 10^{10}$	82,4
7	11-2 <i>Bacillus</i> sp.	$2,0 \times 10^{10}$	64,7
8	11-3 <i>Bacillus</i> sp.	$3,6 \times 10^{10}$	70,6
9	D 7-3 <i>Bacillus</i> sp.	$3,4 \times 10^{10}$	82,4
10	Fz 9 <i>Bacillus</i> sp.	$3,6 \times 10^{10}$	29,4
11	3-3 <i>Bacillus</i> sp.	$3,4 \times 10^{10}$	76,5
12	Fa 4-1 <i>B. subtilis</i>	$2,4 \times 10^{10}$	70,6
13	K 1-2 <i>B. subtilis</i>	$2,8 \times 10^{10}$	41,2
14	D 7-1 <i>B. subtilis</i>	$2,4 \times 10^{10}$	47,1
15	5Б-1 <i>B. subtilis</i>	$2,6 \times 10^{10}$	35,3
16	Б-2 <i>B. circulans</i>	$8,5 \times 10^8$	94,1
17	Б-4 <i>B. circulans</i>	$6,2 \times 10^8$	88,2
18	Б-5 <i>B. licheniformis</i>	$3,6 \times 10^{10}$	0
19	Б-12 <i>B. licheniformis</i>	$4,8 \times 10^{10}$	58,8
20	Б (2-1) <i>B. licheniformis</i>	$3,9 \times 10^{10}$	82,4
21	P-9 <i>B. polymyxa</i>	$7,6 \times 10^{10}$	41,2

Примечание: * – поражено возбудителем фузариоза в контроле без обработки

Максимальная эффективность установлена у штаммов Б-2 *B. circulans* (94,1 %), Б-4 *B. circulans* (88,2 %), а также 5-3 *Bacillus* sp. и Б (2-1) *B. licheniformis* (82,4 %) (рис. 2).

Рисунок 2 – Влияние обработки семян льна масличного лабораторным образцом микробиопрепарата на основе перспективного штамма Б-2 *Bacillus circulans* на развитие возбудителя фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* in vitro (а – вариант; б – контроль без обработки), через 10 суток, 2019 г. (ориг.)

Из восьми перспективных штаммов бактерий псевдомонад выделены два штамма: Sgc-1 и 16-2 *Pseudomonas* sp., эффективность которых на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза составила 70,6 % (табл. 3, рис. 3).

Таблица 3

Эффективность обработки семян льна масличного лабораторными образцами микробиопрепаратов на основе перспективных штаммов-антагонистов на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* in vitro, через 10 суток

ЦЭБ, ВНИИМК, 2019 г.

№ п/п	Вариант	Титр, КОЕ/мл	Биологическая эффективность, %
1	Контроль	-	85,9*
2	Sgc-1 <i>Pseudomonas</i> sp.	$2,5 \times 10^{11}$	70,6
3	12-2 <i>Pseudomonas</i> sp.	$1,8 \times 10^{11}$	64,7
4	15-1 <i>Pseudomonas</i> sp.	$1,5 \times 10^{11}$	64,7
5	Sgrc-1 <i>P. fluorescens</i>	$3,5 \times 10^{11}$	52,9
6	14-3 <i>P. chlororaphis</i>	$3,8 \times 10^{11}$	23,5
7	14-4 <i>Pseudomonas</i> sp.	$2,5 \times 10^{11}$	52,9
8	16-2 <i>Pseudomonas</i> sp.	$1,8 \times 10^{11}$	70,6
9	Oif 2-1 <i>Pseudomonas</i> sp.	$2,5 \times 10^{11}$	47,1

Примечание: * – поражено возбудителем фузариоза в контроле без обработки

Рисунок 3 – Влияние обработки семян льна масличного лабораторным образцом микробиопрепарата на основе перспективного штамма Sgc-1 *Pseudomonas* sp. на развитие возбудителя фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* in vitro (а – вариант; б – контроль без обработки), через 10 суток, 2019 г. (ориг.)

Выводы. В результате вторичного скрининга 43 перспективных штаммов антагонистов к возбудителю фузариоза льна масличного *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* in vitro выделено 20 перспективных штаммов-продуцентов, показавших биологическую эффективность, превышающую 70,0 %.

Из 15 перспективных грибных штаммов максимальная эффективность установлена у трех: И-3 *Basidiomycetes* (94,1 %), Рv-3 *Penicillium verrucosum* и Т-1 *Trichoderma* sp. (88,2 %).

Из 20 перспективных штаммов бактерий рода *Bacillus* максимальная эффективность установлена у четырех: Б-2 *B. circulans* (94,1 %), Б-4 *B. circulans* (88,2 %), а также 5-3 *Bacillus* sp. и Б (2-1) *B. licheniformis* (82,4 %).

Из восьми перспективных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* выделены два – Sgc-1 и 16-2 *Pseudomonas* sp., эффективность которых на фоне искусственного заражения возбудителем фузариоза составила 70,6 %.

Все выделенные перспективные штаммы антагонистов будут включены в следующий этап скрининга на фоне искусственного заражения льна масличного возбудителем фузариоза в почве.

Список литературы

1. Маслиенко Л.В. Лаборатория биологических средств защиты растений (вчера, сегодня, завтра) // История научных исследований во ВНИИМК за 90 лет. – Краснодар, 2003. – С. 273–281.

2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изд-во «Наука», 2004. – 525 с.

3. Зайчук В.Ф. Об устойчивости подсолнечника к гнилям // Масличные культуры. – 1983. – № 1. – С. 16–17.

4. Зайчук В.Ф., Коновалов Н.Г., Калюжная Г.А., Полянская О.Ф. Метод оценки устойчивости рапса и горчицы к фузариозу // Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 1990. – Вып. 4 (111). – С. 49–52.

5. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е. А. Сравнение двух методов искусственного заражения семян льна масличного возбудителями фузариоза *in vitro* // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2019. – Вып. 3 (179). – С. 100–105.

6. Маслиенко Л.В., Воронкова А.Х., Даценко Л.А., Ефимцева Е. А. Первичный скрининг штаммов-антагонистов из коллекции лаборатории биометода ВНИИМК к возбудителю фузариоза льна масличного // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2019. – Вып. 3 (179). – С. 92–99.

7. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М.: Наука, 1981. – 160 с.

8. Егоров Н.С. Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1956. – 78 с.

9. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescing // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – Vol. 44. – P. 301–307.

10. Нетрусов Ф.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

11. Груздев Г.С. Практикум по химической защите. – М.: Колос, 1983. – 230 с.

issledovaniy vo VNIIMKe za 90 let. – Krasnodar, 2003. – S. 273–281.

2. Egorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikakh. – M.: Izd-vo «Nauka», 2004. – 525 s.

3. Zaychuk V.F. Ob ustoychivosti podsolnechnika k gnilyam // Maslichnye kul'tury. – 1983. – № 1. – S. 16–17.

4. Zaychuk V.F., Kononov N.G., Kalyuzhnaya G.A., Polyanskaya O.F. Metod otsenki ustoychivosti rapsa i gorchitsy k fuzariozu // Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 1990. – Vyp. 4 (111). – S. 49–52.

5. Maslienko L.V., Voronkova A.Kh., Datsenko L.A., Efimtseva E. A. Sravnenie dvukh metodov iskusstvennogo zarazheniya semyan l'na maslichnogo vzbuditelyami fuzarioza in vitro // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2019. – Vyp. 3 (179). – S. 100–105.

6. Maslienko L.V., Voronkova A.Kh., Datsenko L.A., Efimtseva E. A. Pervichnyy skринing shtammov-antagonistov iz kollektzii laboratorii biometoda VNIIMK k vzbuditelyu fuzarioza l'na maslichnogo // Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekhn. byul. VNIIMK. – 2019. – Vyp. 3 (179). – S. 92–99.

7. Rudakov O.L. Mikofil'nye griby, ikh biologiya i prakticheskoe znachenie. – M.: Nauka, 1981. – 160 s.

8. Egorov N.S. Vydelenie mikrobov-antagonistov i biologicheskie metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1956. – 78 s.

9. King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescing // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – Vol. 44. – P. 301–307.

10. Netrusov F.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Praktikum po mikrobiologii. – M.: Izdatel'skiy tsentr «Akademiya», 2005. – 608 s.

11. Gruzdev G.S. Praktikum po khimicheskoy zashchite. – M.: Kolos, 1983. – 230 s.

Получено: 14.11.2019 Принято: 14.11.2019

Received: 14.11.2019 Accepted: 14.11.2019

References

1. Maslienko L.V. Laboratoriya biologicheskikh sredstv zashchity rasteniy (vchera, segodnya, zavtra) // Istoriya nauchnykh