

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ НИЗАМИ
ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
5140400-Биология и охрана жизнедеятельности человека
Кафедра «БОТАНИКИ, ЭКОЛОГИИ И КЛЕТОНОЙ БИОЛОГИИ»

Допустить к защите
Декан факультета д.б.н., профессор
_____ П.М.Мирхамидова
«___» _____ 2013г.

Выпускная квалификационная работа
ПОДЪЯЧЕВА ДМИТРИЯ ВЛАДИМИРОВИЧА

На тему:

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БОРЬБЫ С ФУЗАРИОЗНЫМ
УВЯДАНИЕМ РАСТЕНИЙ ТОМАТА**

Научный руководитель к.б.н., доц.
_____ Турсунбаева Г.С.
Научный консультант
к.б.н. проф.
_____ Давранов К.Д.
«___» _____ 2013г

Рекомендую к защите
Заведующая кафедрой
Ботаники, экологии и клеточной биологии
_____ к.б.н., доц. Турсунбаева Г.С
«___» _____ 2013г

Ташкент 2013

Содержание

Глава I	
1.1 Введение.....	3
1.2 Актуальность темы.....	5
1.3 Задачи темы.....	10
1.4 Цели исследования.....	10
Глава II	
Обзор литературы.....	11
Глава III	
3.1 Общая характеристика фузариозного увядания растений томата.....	19
3.2 Антагонизм и использование антагонизма для борьбы с фузариозным увяданием	24
3.4 Сенная палочка- <i>Bacillus subtilis</i>	36
3.5 Триходерма - <i>Trichoderma</i>	40
Глава IV Материалы и методы исследований	51
4.1 Выделение чистой культуры <i>Fusarium</i>	51
4.2 Выделение чистой культуры <i>Bacillus subtilis</i>	53
4.3 Выделение чистой культуры <i>Trichoderma</i>	53
4.3 Выявить антагонистическое действие бактерий <i>Bacillus subtilis</i> на <i>Fusarium</i> чашечным методом.....	53
4.4 Выявление антагонистического действия <i>Trichoderma</i> на <i>Fusarium</i> чашечным методом	54
4.5 Выявление действия культуральной жидкости <i>Bacillus subtilis</i> на всхожесть семян томата в зараженной <i>Fusarium</i> почве.....	54
4.6 Результаты исследований.....	55
Выводы	58
Список использованной литературы.....	61

Очень важным сектором экономики Узбекистана является сельское хозяйство. Данная отрасль обеспечивает заселение необходимыми продуктами питания, а различные отрасли промышленности - сырьем. Сельскому хозяйству, как крупной механизированной отрасли, отводится приоритетная роль в экономике республики. Сельское хозяйство занимает ведущее место по числу и удельному весу занятых в отраслях народного хозяйства. 60% населения Узбекистана проживает в сельской местности, и здесь трудится значительная часть занятого населения. Большая часть посевных площадей, а под техническими культурами практически все, – это орошаемые земли, которые обслуживаются мощной государственной ирригационной системой. На сегодняшний день площадь посева сельхозкультур на всех категориях земель составляет более 4 млн. га, причем поливные земли занимают 87% от общей площади посева. Президент республики Узбекистан Ислам Каримов 25 марта подписал постановление о присоединении к соглашению о создании Международного фонда сельскохозяйственного развития (IFAD) от 13 июня 1976 года. Фонд специализируется на предоставлении финансовых ресурсов развивающимся странам на льготных условиях в целях развития сельского хозяйства, направленного на расширение производства продовольствия. В частности, фонд предоставляет беспроцентные льготные займы сроком до 50 лет, включая 10-летний льготный период, и оплатой услуг в размере 1%.

Не смотря на достигнутые успехи по их производству, нельзя останавливаться на достигнутом, как предусмотрено задачами, определенными в произведении Президента Республики Узбекистан И.А. Каримова – «прежде всего наращивание производства продовольствия, на которое всегда имеется устойчивый спрос» («Мировой финансово-экономический кризис, пути и меры по его преодолению в условиях Узбекистана », г.Ташкент, издательство «Узбекистан», 2009г.). Важным звеном в технологии возделывания этих культур является защита их от болезней, так как в условиях орошаемого земледелия часто создаются благоприятные условия для развития опасных заболеваний, значительно снижающих урожайность культур.

В настоящее время, в связи с возрастающей опасностью отрицательного воздействия применяемых химических средств защиты растений на здоровье человека и окружающую среду, внимание ученых направлено на поиск биологических средств борьбы с фитопатогенами. Оценка последних

результатов по использованию биологических агентов для борьбы с фитопатогенами показывает, что биометод имеет большое будущее в сельском хозяйстве.

Основным препятствием к созданию экологически чистых биопрепаратов является недостаток знаний о биологии микробов-антагонистов и природы их взаимоотношений с фитопатогенными микроорганизмами. Поэтому, проведение исследований в данном направлении является актуальной научной задачей для решения практических проблем защиты растений от фитопатогенов. Специфические условия защищенного грунта - практически бессменная культура растений без замены грунтов, высокая температура и влажность воздуха - приводят к накоплению и массовому развитию большого числа возбудителей болезней и вредителей, которые нередко являются одним из лимитирующих факторов увеличения урожайности, улучшения его качества, повышения производительности труда и снижения себестоимости продукции. Поэтому защита растений в защищенном грунте имеет первостепенное значение.

1.2 Актуальность темы

Современные представления о биологических средствах защиты растений основаны на использовании реально существующих в природе энтомопатогенных микроорганизмов (вызывающих болезни и гибель насекомых), микроорганизмов-антагонистов фитопатогенов, энтомофагов – паразитов вредных насекомых.

Важно понимать, что биологические средства предназначены не для полного истребления популяции вредного вида, а лишь для снижения ее плотности с целью сокращения наносимого вреда до приемлемого уровня.

Попытки использования одних организмов для борьбы с другими предпринимались с давних времен. Так, для уничтожения вредных насекомых на цитрусовых растениях использовали муравьев, для борьбы с красной саранчой на о. Маврикий – птицу майну, завезенную из Индии. В разных странах неоднократно пытались распространять хищных жуков.

Первые научные эксперименты по использованию биологических методов борьбы были предприняты в конце семидесятых – начале восьмидесятых годов XIX столетия. Мечников открыл возбудителей грибных и бактериальных болезней хлебного жука, провел ряд опытов по использованию возбудителей зеленой мускардины и обосновал перспективы практического использования патогенных микроорганизмов.

Сегодня биологический метод рассматривается, как составная часть интегрированной системы защиты и применяется в комплексе с другими мерами борьбы с вредными организмами. В основу биологических препаратов положены полезные для защиты растений микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые вызывают заболевания и гибель вредителей растений. Уже разработаны биологические препараты, полученные на основе различных высокоактивных штаммов бактерий и грибов, которые без вреда для окружающей среды могут контролировать численность вредных организмов, позволяют получать продукцию высокого качества.

В Российском Институте защиты растений НААН созданы малотоннажные технологии производства биопрепаратов (в лабораториях) вертициллин, боверин, гаупсин, триходермин. Производство биопрепаратов (лепидоцид-БТУ, битоксибациллин-БТУ, липосам, фитоцид, азотофит, биокомплексы-БТУ для зерновых, технических, овощных, ягодных культур) налажено на

ЧП БТУ-Центр “Биотехнология Украины”, г. Ладыжин; ООО “Центр Биотехника”, а также в специализированных лабораториях тепличных комбинатов, в районных и областных биолaborаториях.

В США, Японии и в европейском регионе сформировались крупные фирмы “биометода”: Valent Bioscience, Certis, Koppert Biological Systems, Biobest и множество меньших компаний. Их совместными усилиями производится около 90 агентов биологической защиты на сумму более 100 млн долларов в год. В России самым крупным производителем является Бердский завод биопрепаратов в Новосибирской области.

В нашей республике так же имеется ряд работ по данной тематике (Маннанов Р.Н. 2010 ТГАУ), однако в условиях климата Узбекистана возникают специфические отличия штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и местных сортов томата, по данной причине необходимо провести ряд экспериментов для того что бы удостоверится на практике в действии данных препаратов в условиях климата Республики Узбекистан

По функциональному назначению биологические средства защиты разделяют на две группы:

- а) микробиологические препараты на основе бактерий, грибов, вирусов, предназначенные для борьбы с вредителями (биоинсектициды) и болезнями (биофунгициды) растений;
- б) энтомофаги и акарифаги – насекомые и клещи, паразитирующие на фитофагах и используемые для ограничения численности последних.

По механизму действия на вредные организмы их разделяют на препараты кишечного, контактного и комбинированного действия. В настоящее время известно большое количество полезных для биометода видов организмов, однако на практике используется немногим более 30, включая микроорганизмы и энтомофаги.

В микробиологических препаратах в качестве действующего начала содержатся покоящиеся стадии развития бактерий, грибов, вирусов (споры, гранулы, бластоспоры, полиэдры) или продукты их жизнедеятельности (токсины), а также вещества, выполняющие роль прилипателей, эмульгаторов, смачивателей.

Все микробиологические препараты обладают такими положительными свойствами:

- 1) высокая эффективность в отношении целевых вредителей;
- 2) безвредность для человека, теплокровных животных, рыб, насекомых-опылителей, энтомофагов;
- 3) отсутствие фитотоксичности, влияния на вкусовые качества растительной продукции, опасности
- 4) накопления в окружающей среде и продуктах урожая токсических веществ;
- 5) отсутствие фактора привыкания;
- 6) возможность применения в любую фазу вегетации растений.

По токсикологической оценке, микробиологические препараты относятся к практически безвредным веществам: ЛД₅₀ для теплокровных животных составляет 6000-15000 мг/кг. (ЛД₅₀ – летальная доза, вызывающая смертность 50% организмов).

Срок ожидания (период от момента применения до сбора сельхозпродукции) не превышает 3-5 дней.

Широко известны и применяются также бактериальные препараты на основе кристаллообразующих бактерий группы *Bacillus thuringiensis* – лепидоцид и битоксибациллин. Лепидоцид высокоэффективен (до 90%) в борьбе с чешуекрылыми насекомыми (листовертки, пяденицы, моли, шелкопряды, пилильщики, яблонная плодожорка) в садах, на капусте и других овощных культурах – против каждого поколения гусениц младших возрастов капустной и репной белянок, капустной моли; на смородине, крыжовнике (гусеницы листоверток, крыжовниковая огневка).

Биометод борьбы с вредителями Более широким спектром действия обладает бактериальный препарат битоксибациллин благодаря содержанию в нем экзотоксина. Он эффективен и против колорадского жука. Применяют битоксибациллин на картофеле, томатах и баклажанах против личинок колорадского жука 1-2-го возрастов. Норма расхода препарата составляет 3-5 л/га. Наилучший эффект на картофеле достигается при трехкратной обработке в период массового появления личинок 1-го возраста, а затем с интервалом пять – шесть дней. На томатах и перце обработки проводят

против личинок 2-го возраста в период вегетации. Эффективен битоксибациллин и против паутинного клеща на огурцах в закрытом грунте (4-5 л/га),

Характерная особенность действия препаратов на насекомых – нарушение их метаморфоза (изменение формы и строения органов в процессе развития вследствие приспособления к выполнению различных функций превращения: яйцо – гусеница – куколка – бабочка). После обработки битоксибациллином личинок и гусениц образуется большое количество уродливых куколок или имаго, у внешне нормальных взрослых особей снижаются жизнеспособность и плодовитость.

Бактериальные препараты следует применять при температуре не ниже 20 °С. когда насекомые питаются наиболее интенсивно. Желательно, чтобы и среднесуточные температуры были достаточно высокими, в таких условиях у гусениц быстро развивается инфекционный процесс. При низких температурах препараты неактивны и эффективность их значительно снижается.

Важно помнить, что успех биологической борьбы с вредителями во многом зависит от возраста вредителя. Наиболее восприимчивы к биологическим препаратам личинки и гусеницы младших возрастов, поэтому обработки нужно проводить в период массового появления гусениц 1-2-го возрастов, то есть в самой уязвимой стадии.

При обработке растений микробиологическими препаратами гибель гусениц и личинок наступает не сразу. Насекомые вместе с кормом заглатывают споры и кристаллы бактерий. Кристаллы токсичны и вызывают отравление насекомых: гусеницы парализуются, становятся малоподвижными и перестают питаться. У них нарушается кислотность кишечника и создаются благоприятные условия для размножения бактерий. Из кишечника патоген проникает в другие органы насекомого, и оно погибает на пятый – десятый день.

Активность микробиопрепаратов сохраняется в течение восьми – десяти дней, затем она постепенно снижается, действие биологических средств продолжается до 20 дней. И если в этот период появятся вредители, чувствительные к споровым бактериям бацилус турингиензис, может произойти их массовая гибель.

Очень актуально применение биопрепаратов в открытом и защищенном грунте на овощных культурах, урожай которых потребляется в свежем виде на протяжении всей вегетации растений. Как показывает практика, успешное использование микробиологических препаратов зависит от рациональной технологии их применения.

Против болезней овощных культур широко применяют бактериальные биологические препараты – гаупсин, планриз, фитоцид и триходермин на основе гриба-антагониста.

Грибы рода триходерма подавляют развитие фитопатогенов за счет полного паразитирования, конкуренции за субстрат, выделения ферментов и других биологически активных веществ, повышают фунгицидную активность клеточного сока растений и, соответственно устойчивость к заболеваниям. Биопрепарат триходермин применяется для защиты томата, огурца, перца и других овощных культур от корневых, серой и белой гнилей, бактериозов.

Планриз и гаупсин – бактериальные препараты, полученные на основе неспоровых бактерий рода псевдомонас. Применение их снижает поражение овощных культур корневыми и серой гнилями, черной ножкой.

Фитоцид – бактериальный препарат длительного срока действия, создан на основе спорообразующей бактерии *Bacillus subtilis*, эффективен против альтернариоза, корневых гнилей, парши, фитофторы, фузариоза, мучнистой росы овощных, садовых, декоративных, зерновых культур. Биопрепараты применяются для обработки семян, рассады перед посадкой, обработки растений в период вегетации. Проведенные исследования показали, что включение в систему защиты овощных культур биологических препаратов позволяет защитить растения от грибных и бактериальных болезней, снизить пестицидный прессинг на агроценозы во время вегетации, гарантирует сохранение урожая при соблюдении экологической чистоты защищенного агроценоза. При этом максимально соблюдаются современные санитарно-гигиенические требования.

Хочу подчеркнуть, что биологические препараты дают надежный защитный эффект только лишь при правильно организованной профилактике и высокой агротехнике овощных культур и не лишены недостатков и негативного воздействия на биоценозы.

1.3 Задачи темы

Основными поставленными задачами темы являются:

- 1) Выделить чистые культуры местных штаммов сенной палочки – *Basillus subtulus*
- 2) Выделить чистые культуры местных штаммов фитопатогенных грибков рода *Fusarium*
- 3) Выделить чистые культуры местных штаммов плесневых грибков рода *Trichoderma*
- 4) Выявить антагонистическое действие бактерий *Basillus subtilis* на *Fusarium* чашечным методом
- 5) Выявить антагонистическое действие Триходерма на Фузариум чашечным методом
- 6) Выявить действие культуральной жидкости *Basillus subtilis* на всхожесть семян томата

1.4 Цели исследования

Изучить микробиологические методы борьбы с фузариозным увяданием томата. Экспериментально доказать антагонистическое действие бактерий *Basillus subtilis* и плесневого грибка *Trichoderma* на фитопатогенные грибы рода *Fusarium* и их положительное влияние на проростание семян томата в зараженной грибами *Fusarium* почве.

Для обеспечения благополучной фитосанитарной обстановки в теплицах и предотвращения потерь от вредных организмов разработан комплекс агротехнических, организационно-хозяйственных, профилактических и истребительных мероприятий (Бочкарев, 2003; Гораль, 1995; Павлюшина, 2001; Чичхиане, 1990). Широкое применение находят в теплицах инсектициды и фунгициды. Однако возбудители болезней и вредители быстро приобретают устойчивость к некоторым пестицидам, что вызывает необходимость увеличения числа обработок и повышения норм расхода препаратов. Многократное применение пестицидов создает опасность сохранения их остатков в плодах, ухудшает санитарно-гигиенические условия труда, приводит к повышенной гибели пчел, угрозе загрязнения остатками пестицидов почвогрунтов и водных источников (Скоблина, 2000). В связи с этим в последнее время стремятся сократить объемы применения химических средств, отдавая предпочтение мероприятиям, основанным на использовании биологических средств защиты растений (Интегрированная защита растений от вредителей и болезней, 1985). Пока объем применения биологических средств намного меньше масштабов химической защиты (Боярский, 2009). Вескими предпосылками для дальнейшего развития нехимических методов защиты растений от болезней являются следующие факторы:

- 1) против ряда распространенных и вредоносных болезней химические средства неэффективны или запрещены (Полякова, 2007; Соколова, 2009);
- 2) в соответствии с требованиями охраны здоровья человека и окружающей среды многим отраслям растениеводства необходимо сократить использование химических средств защиты растений (Кипрушкина, 2006; Романенко, 2008; Яркулов, 2007; ВаШоп, 1999; ШББОП, 1998);
- 3) биологические средства защиты, как правило, дешевле и проще в изготовлении, чем химические, и даже при меньшей технической эффективности их применение часто оказывается более целесообразным (Анисимов, 2009; Бондаренко, 1986; Кантемиров, 2007; Климова, 2001, 2002; Коваленков, 2007; Сергеева, 1994; Скоблина, 2002, 2003; Соколова, 2008; Трусевич, 2005).

Все это дает основания предполагать, что в ближайшее время основой интегрированных систем будет комплексная биологическая защита - это совокупность профилактических мероприятий с использованием устойчивых сортов, биопрепаратов, реализуемая на основе фитосанитарного мониторинга и направленная на максимально возможное достижение биоценотического равновесия в тепличном агроценозе (Кокорева, 2006; Климова, 2004; Лебедев, 2009; Мартынова, 1994; Миронова, 2008; Монастырский, 2009; Надыкта, 2004,2006; Рудаков, 2003,2008; Ткачева, 1999; Сагтарова Р.К., Рахимов У.Х., Хакимова Н.Т., Ахтямова Н.И., Маннанов Р.Н., Шарипов С.М. 2003- 2008). С целью разработки экологически безопасных и энергосберегающих способов защиты растений в последние годы интенсивно изучаются коллекции штаммов бактерий и грибов антагонистов, обладающих комплексной фунгицидной, бактерицидной и нематодцидной активностью. Проводится их поиск, в различных фитоценозах и регионах России. В результате лабораторных, вегетационных и полевых исследований впервые выделены штаммы бактерий из родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, обладающие фунгицидным, бактерицидным и нематодцидным эффектами, регулирующими численность нематод-вирусоносителей, но и антивирусным действием, включая вирусы, переносимые нематодами - лонгидоридами и триходоридами. Выделенные штаммы обладают стимулирующим действием на рост, вегетативную продуктивность и урожай различных видов тест — растений. Они могут рассматриваться в качестве природных регуляторов, снижающих численность и распространение в различных почвенных биоценозах нематод-вирусоносителей.

В последние десятилетия исследователи больше внимания уделяют разработке и использованию средств, обладающих полифункциональной активностью, созданных на основе микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие), энтомопатогенных нематод, феромонов насекомых и др. Это связано с тем, что насекомые, клещи и другие вредные организмы начали приобретать устойчивость к пестицидам, что заметно снизило их эффективность. Поэтому, специалисты обратили внимание на биологические пестициды широкого спектра действия, которые безопасны для человека и животных, пчел, энтомофагов и в целом для окружающей среды (Степанов, 2004; Сусидко, 1992).

Важным направлением в биологической защите растений является использование микробов-антагонистов и продуктов их жизнедеятельности - антибиотиков. Они эффективны в очень малых концентрациях и для защиты

растений требуется небольшое количество действующего вещества. Антибиотики не ядовиты для растений, способны проникать в растения через корни, листовую поверхность, верхушки побегов и сохраняться в их тканях продолжительное время, играя роль иммунологического фактора. Это позволяет использовать не только для профилактики и повышения болезнеустойчивости растения, но и для защиты уже заболевших растений, для их лечения. Для борьбы с семенной инфекцией и для обработки пораженных вегетирующих растений широко используются антибиотические вещества и полученные на их основе препараты. Против почвенных фитопаразитов эффективнее использовать микробы-антагонисты в виде чистых культур, компостов и сыпучих сред. Для обработки семенного и посадочного материала и вегетирующих растений используются жидкие и пастообразные живые культуры грибов и бактерий-антагонистов. Выявлены биоактивные штаммы грибов и бактерий-антагонистов, обладающие комплексной активностью (фунгицидной, бактерицидной и нематоцидной) с высокой биологической, хозяйственной и экономической эффективностью в борьбе с комплексом фитопаразитов на разных сельскохозяйственных культурах, включая нематод вирусоносителей (Романенко, 2004; Гринько, 1992; Надыкта, 2008; Менликиев, 2007; Биологические методы защиты растений от вирусных и бактериальных заболеваний, 1986).

Аэробные бактерии рода *Pseudomonas* - гетерогенная группа микроорганизмов принимают активное участие в процессах минерализации органических соединений, очистке окружающей среды от загрязнения. В то же время многие виды псевдомонад могут оказывать положительное или отрицательное влияние на развитие сельскохозяйственных культур. Некоторые виды патогенны для них, другие, например, сапрофитные псевдомонады, широко населяющие ризосферу, играют важную роль в защите растения от бактериальных и грибных заболеваний. Псевдомонады - один из немногочисленных родов бактерий, из которых получены к настоящему времени антибиотики Р-лактоны. Одним из них является обэфлюорин, синтезируемый штаммом *P. fluorescens* Sc 12936. Литическое действие псевдомонад на почвенные грибы описано Я.П. Худяковым еще в 1935г. Микроорганизмы, вызывающие это явление, названы миколитическими. Было показано, что *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* - один из наиболее активных видов в группе миколитических бактерий. Одновременно была предпринята попытка использовать явление антагонизма для борьбы с грибными болезнями полезных растений. Культуры бактерий, лизирующих

Fusarium graminearum и *Fusarium lini*, вносили в почву для борьбы с фузариозом пшеницы и льна. Позже был предложен термин "бактеризация" - обработка семян миколитическими бактериями, защищающими растение от патогенных грибов. Испытания миколитических бактерий, в первую очередь *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*, в борьбе с фузариозом различных сельскохозяйственных растений в лабораторных и вегетативных опытах дали положительные результаты (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 1994; Ижевский, 1986)

После продолжительного перерыва исследователи вновь проявили интерес к использованию живых культур бактерий рода *Pseudomonas* для борьбы с грибными заболеваниями растений. При этом псевдомонады проявляют способность к активной колонизации корневой системы и синтез разнообразных антифунгальных соединений. Микроорганизмы, активно размножающиеся на корнях и получившие название ризобактерий, состоят из нескольких групп;

- 1) "нейтральные" бактерии, не оказывающие влияния на растения;
- 2) вредные (их от 8 до 15%);
- 3) угнетающие прорастание семян;
- 4) уменьшающие длину корней, вызывающие на них некрозы и усиливающие инфекцию корней грибами и бактериями;
- 5) стимулирующие рост растений (их всего 2-5%).

Показано, что вредная микрофлора сахарной свеклы представлена родами *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Pseudomonas*, снижала урожай на 21-49 %. Бактерии, стимулирующие рост растений, вытесняли вредную микрофлору с поверхности корней и уменьшали на 21-72 % количество грибов родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и др. При обработке семян сахарной свеклы ризобактериями их количество достигало 105 КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 см корней. В необработанных бактериями семенах эти цифры составляли 90-600 КОЕ/см. Сходные данные были получены на картофеле, пшенице и других сельскохозяйственных культурах (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 1994; Изотова, 1987; Помазков, 1998; Менчер, 1991). Использование рост стимулирующих ризобактерий позволило повысить урожай картофеля на 5-33 %, сахарной свеклы - на 15 (при этом выход сахара повышался на 955-1227 кг/га), пшеницы - на 26-29, риса - на 3-16 % и т.д. Установлено, что наиболее активные ризобактерий принадлежали к видам *P. putida* и *P. fluorescens*. При этом одни авторы

указывают, что они гетерогенны по свойствам и не соответствуют биоварам, описанным у *P. fluorescens*; по другим данным - они чаще всего принадлежат к биоварам III и V *P. fluorescens* (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 2004).

Из бактерий рода *Pseudomonas* были выделены новые, своеобразные по структуре и спектру действия антибиотические вещества, в том числе аминокликозиды, монобактамы, псевдомоновые кислоты, эффективные в отношении антибиотико-резистентных возбудителей заболеваний. Использование бактерий-антагонистов из рода *Pseudomonas* для борьбы с грибными заболеваниями растений приобретает актуальность, а знание химической природы и биологической роли веществ, обуславливающих функциональное действие, знаменует новый этап этих исследований, первые попытки которых были предприняты более 15-20 лет тому назад (Рубан, 1986). Значительные успехи достигнуты в расшифровке механизма стимулирующего действия ризобактерий. Показано, что это действие связано с подавлением грибов и фитопатогенных бактерий антибиотиками и другими биологически активными метаболитами ризобактерий - антагонистов. Иллюстрацией может служить работа Хоуэлла и Степановича, которые использовали для защиты хлопка штамм *P. fluorescens* PF-5. Последний синтезировал два антибиотика - пирролнитрин, угнетающий рост фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*, и пиолтеорин, ингибирующий рост *Rhizoctonia solani* - важного патогена сеянцев хлопка. Обработка семян штаммом или антибиотиками увеличивала выживаемость растений на 28-71%. Штамм *Pseudomonas* Sp. 19 (идентифицированный затем как *P. fluorescens*) - продуцент феназин-1-карбоновой кислоты был с успехом использован А.А. Гарагулеи для защиты пшеницы от корневой гнили, вызванной *Fusarium oxysporum*. Позднее сообщили о выделении из ризосферы пшеницы штамма *P. fluorescens* 2-79, эффективного в качестве борьбы с заболеваниями ячменя и пшеницы, вызванным грибом *Graeumannomyces graminis* var. *tritici*. Антифунгальный эффект был обусловлен синтезом феназин-1-карбоновой кислоты. Мутанты, не образующие феназиновый пигмент, не обеспечивали защитного действия (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 1994; Корсак, 2010). Штаммы *P. fluorescens* были способны к синтезу значительных количеств

феназин-1-карбоновой кислоты. Интенсивность биосинтеза колебалась от 44 до 422 мг пигмента на 1 л культуральной среды и была непосредственно связана со степенью антагонистической активности продуцента. Феназин-1-карбоновая кислота - сравнительно слабый антибиотик, мало токсична для животных, но обладает значительной токсичностью по отношению к

некоторым растениям и водорослям. Ряд авторов антифунгальные свойства ризобактерий связывают с образованием антибиотических веществ. Подавляющее большинство исследований в этой области посвящено сидерофорам, синтезируемые бактериями рода *Pseudomonas* и играющими огромную роль в ограничении численности патогенов. Сидерофоры - соединения, осуществляющие транспорт железа, широко распространены у различных групп аэробных микроорганизмов. Многие из них обладают антибиотической активностью либо являются факторами роста для некоторых бактерий. К сидерофорам принадлежит и псевдобактин (пиовердин) - желто-зеленый флюоресцирующий пигмент бактерий рода *Pseudomonas*. (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 2004).

В настоящее время с целью разработки экологически безопасных и энергосберегающих способов защиты растений интенсивно изучаются коллекции штаммов бактерий и грибов антагонистов, обладающих комплексной фунгицидной, бактерицидной и нематицидной активностью, проводится их поиск в различных фитоценозах и регионах России. В результате лабораторных, вегетационных и полевых исследований были выделены штаммы бактерий из родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, обладающие не только фунгицидным, бактерицидным, нематицидным эффектом, но и высоким рост-стимулирующим действием на вегетативную продуктивность тест-растений черной и красной смородины, крыжовника и картофеля. (Смирнов, 1986, 1990; Романенко, 1994). Практический интерес представляет использование некоторых видов бактерий для борьбы с болезнями растений. Одним из наиболее перспективных объектов для получения биопрепаратов на основе бактериальных штаммов — антагонистов фитопатогенов являются ризосферные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*.

Основным механизмом антагонизма ризосферных псевдомонад против фитопатогенных грибов и бактерий является:

1. способность псевдомонад к синтезу различных вторичных метаболитов, в том числе антибиотиков (типа феназина),
2. сидерофоров, связывающих катионы железа в комплексы, недоступные фитопатогенам.
3. Кроме того, бактерии рода *Pseudomonas* способны продуцировать регуляторы роста растений и переводить фосфор в доступное состояние.

На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* штамм AP-33 разработан биопрепарат ризоплан. Этот препарат обладает эффективностью против

бактериозов капусты, фузариозной и гельминтоспориозной корневых гнилей табака, фитофтороза картофеля, церкоспороза свеклы.

В настоящее время в Беларуси создан биопрепарат пентафаг — лизат бактерий авирулентного штамма *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, бактериофагами пяти штаммов.

Механизм действия препарата основан на разрушении клеток фитопатогенных бактерий, в результате чего выделяется 100—200 новых частиц вируса, способных заражать новые клетки бактерий. Биологически активные вещества, образующиеся при лизисе бактерий — возбудителей болезней, индуцируют устойчивость растений к патогенам, угнетают развитие фитопатогенных грибов и стимулируют размножение микроорганизмов-антагонистов.

Пентафаг обладает профилактическим и лечебным действием против широкого спектра бактериозов плодовых, ягодных, овощных культур. Кроме того, препарат перспективен для защиты томатов от бактериальной пятнистости, бактериозов бобовых и зерновых культур.

Эффективно предпосадочное замачивание семян в 7-суточной культуральной жидкости бактерии *P. mucedora* штамм X-23 против корневых гнилей пшеницы, вилты хлопчатника, фузариоза льна, черной ножки капусты.

Хорошие результаты получены также при использовании бактерии *Bacillus subtilis* (сем. *Bacillaceae*). На основе этой бактерии разработаны биопрепараты бактоген, фитопротектин, фрутин, бетапротектин содержащие живые клетки микроорганизмов-продуцентов. Препарат снижает развитие патогенов на овощных, плодовых, технических культурах.

Сотрудниками Белорусского НИИ защиты растений выделен штамм бактерии *Bacillus thuringiensis* 683, который обладает антагонистической активностью и проявляет фунго-бактерицидное воздействие на возбудителей болезней капусты, томата, моркови, петрушки, сельдерея, лука репчатого. На основе этой бактерии разработан биологический препарат миколин.

Для борьбы с бактериальным корневым раком плодовых культур и винограда в 1972 г. в Австрии выделена бактерия-антагонист *Agrobacterium radiobacter*, которая сейчас применяется во многих странах мира. В США зарегистрирован штамм этой культуры К-84 для применения в полевых условиях на многих культурах.

В странах СНГ создан и с успехом применяется микробиологический препарат агрофил на основе бактерии *A. radiobacter* Beijerinck et. al. Он оказывает защитное и стимулирующее действие на растения томатов, льна и других культур. *A. radiobacter* способна быстро заселять ризосферу защищаемого растения и препятствовать размножению в ней фитопатогенов бактериального и грибного происхождения.

Глава III 3.1 Общая характеристика фузариозного увядания растений томата

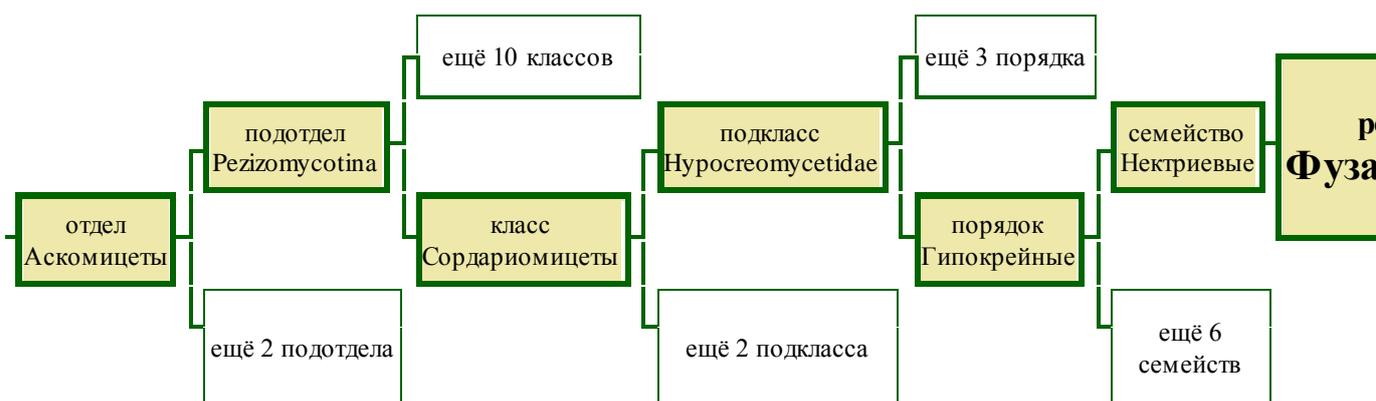
Фуза́риум, или **Фуза́рий** (*Fusarium*) — род анаморфных (несовершенных) плесневых грибов. Телеоморфы (совершенные, или половые стадии жизненного цикла) принадлежат родам *Gibberella* и *Haematonectria*, оба рода относятся к семейству Нектриевые (*Nectriaceae*) сумчатых грибов. У многих видов телеоморфа отсутствует или неизвестна. Представители рода имеют существенное значение как грибы, приносящие вред народному хозяйству и патогены, вызывающие заболевания или токсикозы у растений и животных, в том числе человека. Заболевания растений, вызываемые этими грибами, имеют название фузариозы, отравления животных и человека — фузариотоксикозы. Фузариозы растений могут проявляться в форме гнили корней, увядания (так наз. трахеомикозное сосудистое увядание), поражений плодов и семян; важную роль некоторые виды фузариума выполняют в развитии кагатной гнили корнеплодов. Зерно, поражённое фузарием *Fusarium sporotrichioides* содержит ядовитое вещество вомитоксин, его употребление в пищу приводит к заболеванию алиментарно-токсической алейкией («септической ангиной»); причиной отравлений могут стать и другие виды. Некоторые фузариумы способны паразитировать на человеческой коже, вызывая дерматиты. Мицелий у различных видов может быть разнообразной окраски — белый, розоватый, сиреневый или бурый.



(рис.№3)

Рис.№3 Мицелий гриба *Fusarium oxysporum* выращенный на агаровой среде

Могут иметься покоящиеся структуры, которые служат для перезимовки или перенесения других неблагоприятных условий. К таким структурам относят хламидоспоры и склероции. Хламидоспоры — отдельные клетки гиф, приобретающие толстостенные оболочки и отделяющиеся; они чаще всего бесцветные, у некоторых видов охряно-коричневых тонов. Могут быть собраны в группы, цепочки или одиночные. Иногда хламидоспоры образуются из конидий. Склероции представляют собой образования плотной консистенции, состоящие из тесно сплетённых гиф; они обычно белые, желтоватые, коричневые или синие. Склероции могут развиваться в отмерших тканях растительного субстрата или в почве. Конидии обычно имеются двух типов — микро- и макроконидии. Макроконидии продуцируются спороношениями, имеющими вид спородохиев — подушковидных скоплений конидиеносцев на поверхности воздушного мицелия или пионнотов — подушечек слизистой или желеобразной консистенции. Отдельные конидиеносцы в скоплениях могут быть простыми или разветвлёнными. Макроконидии являются фрагмоспорами, то есть состоят из нескольких клеток — имеют 3—5, реже 6—9 параллельных перегородок (септ), они имеют удлинённую форму — веретеновидную, серповидную или иногда ланцетовидную. В основании конидии может иметься более или менее чётко выраженная ножка, верхняя клетка также часто имеет характерную форму: удлинённую, заострённую, тупую, клювовидную и др. Окраска макроконидий в массе светлая, бело-охряная, розоватая или оранжевая, синяя, сине-зелёная. Микроконидии формируются простыми или сложными конидиеносцами, они формируют цепочки или собраны в головки, могут образовывать скопления между гифами. Микроконидии чаще всего одноклеточные, иногда бывают с 1—3 перегородками, форма их чаще всего эллипсоидная, реже шаровидная, грушевидная или веретеновидная. По способу формирования конидии фузариумов относят к фиалоконидиям. В современной систематике грибов род Фузариум относят к семейству Нектриевые (Nectriaceae).



Семейство входит в порядок Гипокрейные (Hypocreales), к которому относятся ещё 6 семейств. Порядок принадлежит подклассу Нуростреомыцетидеи класса

Сордариомицеты (Sordariomycetes); класс, в свою очередь, входит в подотдел Pezizomycotina отдела Аскомицеты (Ascomycota). В искусственной систематике дейтеромицетов род Фузариум относили к формальному порядку и классу гифомицетов (Hyphomycetales, Hyphomycetes).

Возбудитель фузариозного увядания - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Schlecht.) Snyd. Et Hans. Первый признак поражения томатов — нижние листья слегка увядают и становятся хлоротичными (желтовато-зелеными). Если разрезать поперек стебель, то в нижней части сосуды становятся темно-коричневыми (рис №1). Выраженность симптомов усиливается в жаркий день, со временем заболевание охватывает все растение. Гриб прорастает внутри тканей молодого растения и растёт вместе с ним. В период формирования плодов, когда растение ослабевает, возбудитель



Рис.№1 Изменение окраски сосудистой системы стебля

активизируется и вызывает увядание (рис.№2). С течением времени большая часть листьев засыхает, и растение гибнет. Некроз или отмирание сосудов уже обнаруживается и в верхней части стебля

и в черешках. Видно, что поражается сосудистая система и ткани растения (гниль корней, плодов и семян у многих культурных растений). При фузариозе поражение стеблей и гибель томата происходят вследствие закупорки сосудов мицелием гриба и выделения им

токсических веществ. Возбудитель болезни - гриб фузариум оксиспорум (лат.), обитает в почве. Его споры сохраняются в земле и на растительных остатках несколько лет, т.к. он может питаться и мертвой органикой. Фузариозное увядание очень распространенное заболевание, особенно в теплицах, где давно не менялся грунт или на огородах без соблюдения севооборота. Развитию фузариума благоприятствует температура воздуха и почвы около +28° С, короткий световой день и низкая освещенность. Источником инфекции является, как правило, грунт теплицы, а в огороде земля. Поэтому хорошая агротехника, перекопка почвы, своевременная замена субстрата в теплице, дезинфекция инструмента, соблюдение температурных режимов в теплице снизят вероятность появления. Второй



источник — через семена. Приобретение протравленных семян фунгицидами увеличит вероятность получить здоровую рассаду томата, а на юге дает возможность выращивать хорошие томаты прямым высевом в открытый грунт. Кроме того, прогревание семян перед посевом также ликвидирует семенную инфекцию.

Вредоносность фузариоза велика, это связано с расовым разнообразием патогена.

Рис. №2 Фузариозное увядание томата. Общий вид

Зараженные сеянцы отстают в росте, а их более старые листья и семядоли желтеют и увядают. При сильном заражении сеянцы часто погибают. На более крупных взрослых растениях первые симптомы болезни проявляются

как пожелтение более старых листьев. Целые ветки приобретают желтую окраску, что в полевых условиях напоминает "желтые флаги". Часто наблюдается пожелтение листочков с одной стороны сложного листа или листьев с одной стороны ветки. Пораженные листья увядают и отмирают, хотя не опадают с растения. Зараженные растения обнаруживают дневное увядание в солнечные дни и часто отстают в росте. При срезании стебля по диагонали или при отрыве боковых побегов от главного стебля видно характерное изменение окраски проводящей ткани на красно-коричневую, которое распространяется высоко вверх по растению (Гринько, 2007; Рудаков, 2000). Гриб может сохраняться в почве в течение нескольких лет и может распространяться в почве на сельскохозяйственной технике, зараженных растительных остатках и с поливной водой. Заражение происходит через ранения на корнях, вызванные почвообрабатывающим оборудованием, образованием придаточных корней и нематодами. Болезнь развивается быстро при высоких температурах почвы (28°C). Высокие концентрации микроэлементов, фосфора или аммиачного азота способствуют усилению болезни (Тимофеев, 1994; Хохряков, 1995).

3.2 Антагонизм и использование антагонизма для борьбы с фузариозным увяданием.

Антагонизм - (от греч. antagonisma - спор, борьба) – биологическая несовместимость микроорганизмов различных видов, подавление одних видов микроорганизмов другими. Распространён в природе. В одних случаях под влиянием антагонистов микробы перестают расти и размножаться, в других — клетки их лизируются, растворяются, в третьих — тормозятся или останавливаются биохимические процессы внутри клеток, например дыхание, синтез аминокислот. Наиболее резко антагонизм проявляется у актиномицетов, бактерий и грибов, наблюдается также среди водорослей и простейших. Механизм антагонизма различен и во многих случаях не ясен. Лучше изучен антагонизм, связанный с образованием антибиотиков или др. продуктов обмена веществ. Чаще всего антагонисты действуют на конкурентов продуктами обмена веществ, в том числе антибиотиками, либо вытесняют их вследствие более интенсивного размножения или преимущественно потребления пищи.

Антагонистами могут быть представители всех групп микроорганизмов; проявления антагонизма зависят от условий культивирования. Деятельность микробов-антагонистов – одна из причин очищения почвы от патогенных микроорганизмов.

Аменсализм - (от греч. α – отриц. частица и лат. mensa — стол, трапеза) – форма взаимодействия между популяциями, микробный антагонизм, всякое прямое или косвенное враждебное отношение между организмами, при котором выделяемые микроорганизмами, грибами или высшими растениями вещества подавляют или задерживают развитие видов, причём без извлечения пользы для себя и без обратного отрицательного воздействия со стороны подавляемой (антибиотики, жидкие и газообразные фитонциды, обеспечивающие устойчивость вида к другим организмам в результате химической интоксикации среды). Так, некоторые молочнокислые бактерии окисляют среду, в которой не могут развиваться гнилостные бактерии, нуждающиеся в щелочной или нейтральной среде. Таковы взаимоотношения между плесневыми грибами, продуцирующими антибиотики, и бактериями, жизнедеятельность которых при этом подавляется либо существенно ограничивается. Явление аменсализма впервые было обнаружено Б. Бабешом (1885) и переоткрыто А. Флеммингом (1929).

Антибиоз - (от др. греч. αντί – против, βίος – жизнь) – антагонистические отношения видов, когда один организм ограничивает возможности другого, невозможность сосуществования организмов, например из-за интоксикации

одними организмами (антибиотиками, фитонцидами) среды обитания других организмов. Случай, когда негативное воздействие направлено лишь в одну сторону называется аменсализм, обоюдное негативное влияние организмов описывается термином конкуренция.

Термин введён микробиологом Зельманом Ваксмэном в 1942 году.

Антибиотики – специфические химические вещества, образуемые микроорганизмами и способные в малых количествах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы и на клетки злокачественных опухолей. К антибиотикам в широком смысле относят также антимикробные вещества тканей высших растений (фитонциды) и животных. Первый эффективный для клинического применения антибиотик (пенициллин) открыт А. Флемингом в 1929, термин "антибиотики" предложил в 1942 г. З. Ваксман.

Антибиотики принадлежат к группе микробных продуктов, которые называются вторичными метаболитами, поскольку их синтез не связан с основными процессами роста, развития и энергетики микробной клетки. Физиологическое значение антибиотиков для продуцирующих их микроорганизмов неясно. Одни исследователи считают, что синтез антибиотиков даёт определённые преимущества микроорганизму-продуценту в борьбе за существование в природных популяциях. Согласно другой точке зрения, антибиотики представляют собой "отбросы" обмена веществ микроорганизмов и не имеют приспособительного значения.

Описано свыше 4 тысяч антибиотиков, но применяются лишь около 60. Основные источники антибиотиков – бактерии (главным образом актиномицеты) и микроскопические грибы. Важнейшее значение среди антибиотиков, получаемых из актиномицетов, имеют аминогликозиды, антибиотики тетрациклиновой структуры, макролиды, полиены, антибиотики с противоопухолевым действием. По химической природе антибиотики принадлежат к различным группам соединений. Среди них углеводородсодержащие антибиотики (аминогликозиды, группа ристомицина - ванкомицина и др.), макроциклические лактоны (макролиды, полиены и др.), хиноны и близкие к ним антибиотики (тетрациклины, антрациклины и др.), пептиды, пептолиды (пенициллины, цефалоспорины, грамицидин С, актиномицины) и др. Антибиотики разделяются на: антибактериальные, способные подавлять развитие бактерий (бактериостатическое действие) или убивать их (бактерицидное действие); противоопухолевые (оливомицин, рубомицин, актиномицин, карминомицин и др.), которые задерживают размножение клеток злокачественных опухолей; противогрибковые, подавляющие рост грибов (нистатин, гризеофульвин и

др.). Антибактериальные антибиотики широкого спектра действия подавляют рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (тетрациклины, аминогликозиды, полусинтетические пенициллины и цефалоспорины и др.), антибиотики узкого спектра действия активны, в основном, в отношении грамположительных микробов (пенициллины, макролиды, рифампицин и др.). По молекулярному механизму действия различают антибиотики, нарушающие синтез клеточной оболочки бактерий (пенициллины и др.), синтез белков (тетрациклины, макролиды, хлорамфеникол и др.), нуклеиновых кислот в клетках (противоопухолевые антибиотики), целостность цитоплазматической мембраны (полиены).

Антибиотики применяются для лечения инфекционных болезней человека, животных и растений (длительное их применение приводит к появлению устойчивых к антибиотикам форм патогенных микроорганизмов), в животноводстве для улучшения роста и развития молодняка (добавки антибиотиков к кормам), в пищевой промышленности (консервирующие средства). Антибиотики используются в биологических исследованиях при изучении тонких механизмов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот (тетрацилин, пуромицин и др.), механизма функционирования биологических мембран (грамицидин), трансформации нормальной клетки в злокачественную под воздействием онкогенных вирусов (рифампицин) и др. Подавляющее большинство антибиотиков получают микробиологическим синтезом и лишь небольшое число – путём химического синтеза. На основе природных антибиотиков путём химической модификации получено большое число полусинтетических антибиотиков (ампициллин, цефалексин и др.) Антагонистические взаимоотношения в мире микроорганизмов ученые наблюдали, начиная с XIX века. В конце XIX века были сделаны первые попытки применения микроорганизмов и продуктов их обмена для лечения болезней, вызванных бактериями – В. А. Манассеин (1871), А. Г. Полотебнов (1872) и др., но не имели успеха, т. к. работали с неочищенными препаратами.

Основоположником бактериотерапии можно считать Луи Пастера. Он установил, что некоторые микробы задерживают рост бацилл сибирской язвы, и что это явление может быть использовано для лечения ряда заболеваний. Как указывал Пастер, можно ввести животному бактерии сибирской язвы без того, чтобы оно заболело. Для этого достаточно, чтобы жидкость содержала суспензию заразных бактерий в смеси с обычными бактериями.

Учение об антагонизме бактерий впервые было изложено в трудах великого русского ученого И. И. Мечникова. Он полагал, что микробы, обитающие во

внешней среде и в человеческом организме, могут оказать большую помощь в борьбе против заразных болезней. Мечников писал, что в процессе борьбы друг с другом микробы вырабатывают специфические вещества как орудия защиты и нападения.

В 80-х годах XIX века ученый Бушар отметил, что при росте на искусственных питательных средах синегнойная палочка является сильным антагонистом многих бактерий. Активное антибактериальное вещество из этой палочки было получено в чистом виде Эммерихом и Левом и названо пиоцианазой. Пиоцианазой быстро растворяла клетки холерного вибриона и убивала палочки дизентерии, тифа, чумы, а также стафилококков, стрептококков, менингококков, пневмококков. Некоторое время пиоцианазу применяли местно, как антисептик. Это был первый антибиотический препарат. Однако скоро пиоцианазой утратила практическое значение, так как во многих случаях не обладала специфической активностью. Через некоторое время из синегнойной палочки по оригинальному методу русского ученого Н. Ф. Гамалеи был получен другой лекарственный препарат - пиокластин, очень активный в пробирке против многих микробов, а также мало токсичный для животных. Пиокластин был применен в качестве лечебного средства при гонорее.

В 1929 году англичанин Александр Флеминг изучал особенности развития болезнетворных микробов - стафилококков. Однажды на чашке Петри с питательной средой, вместе со стафилококками, выросли попавшие из воздуха плесневые грибы. Подобное явление нередко бывало в лабораторной практике. Однако Флеминг увидел здесь то, что не наблюдал прежде: вокруг выросших колоний плесени стафилококки перестали развиваться и, частично растворившись, погибли.

Это явление показалось ему удивительным, требующим объяснения. Дальнейшие исследования показали, что по соседству с плесневым грибом *Penicillium notatum* не размножаются многие бактерии. Это свидетельствовало о выделении плесенью какого-то антибиотического вещества, названного пенициллином ("анти" - против, "биос" - жизнь, что означает средство против жизни микробов).

Флеминг установил, что продукт жизнедеятельности плесневого гриба не только действует на микробов, но, в отличие от многих химических веществ, безвреден для лейкоцитов крови человека и животных.

На первых порах новое биологически активное вещество (несмотря на его поразительные свойства) Флеминг использовал только для лабораторных целей.

Антагонизм широко распространен в природных микробных сообществах, состоящих из бактерий, грибов, актиномицетов, дрожжей, водорослей, простейших и других микроорганизмов. Широкое понятие антагонизма включает и такие формы взаимоотношений, как конкуренция, хищничество, паразитизм. Антагонизм в мире микробов обусловлен образованием антимикробных веществ и, в частности, антибиотиков. Взаимоотношения, обусловленные продукцией любых антимикробных веществ, можно назвать активным или прямым антагонизмом. В отличие от него существует пассивный, или косвенный, антагонизм, при котором подавление одних микроорганизмов происходит за счет изменения другими микробами условий окружающей среды в неблагоприятную для развития сторону. Антагонизм может быть односторонним (микроорганизм подавляет развитие своего конкурента, не реагируя на воздействие соперника) и двусторонним (происходит взаимное угнетение микроорганизмов в сообществе). Существует еще понятие направленного (насильственного), или вынужденного, антагонизма. При этих взаимоотношениях наблюдается образование антимикробных веществ (вероятно, различной природы, обладающих разным механизмом действия) только при совместном выращивании двух различных микроорганизмов, которые в условиях изолированного культивирования этих веществ не образуют. Антагонизм между микроорганизмами можно наблюдать и в лабораторных условиях. Активность продуцентов антибиотиков обычно выражают массой антибиотика, содержащейся в единице объема питательной среды, в которой выращивали продуцент.

Много антагонистов найдено среди представителей родов *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, действующих преимущественно на близкородственных бактерий. Такой (межродовой) тип антагонизма, по-видимому, имеет место у большинства систематических групп бактерий.

Специфический характер антагонистической активности узкого спектра связан со способностью бактерий продуцировать белковоподобные вещества, способные подавлять рост микробов.

Неспецифический антагонизм определяется различной интенсивностью роста бактерий в ассоциациях, особенно при условии одинаковых потребностей в источниках питания. В искусственных условиях могут быть воспроизведены явления «насильственного антагонизма», при котором одни микробы вынуждены питаться за счет других вследствие отсутствия иных источников питания.

Антагонизм постоянно проявляется в ассоциациях бактерий, формирующихся естественным путем в нестерильных полостях организма

людей и животных, причем наиболее полно в условиях, оптимальных для физиологического развития микробов-антагонистов. В итоге изучения антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами различных и весьма отдаленных систематических групп особое значение приобрела специальная область микробиологии – учение об антибиотиках.

Термин «антибиотики», или «антибиотические вещества», предложенный в 1942 г. Ваксманом, первоначально обозначал химические соединения, образуемые микроорганизмами, которые обладают способностью подавлять рост и даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы. Это определение, как оказалось впоследствии, не совсем точно, так как в число антибиотиков нужно было бы включить вещества микробного происхождения, которые оказывают не специфическое, а общее антисептическое или консервирующее действие на живые клетки. К таким веществам относятся, в частности, спирты, органические кислоты, перекиси, смолы и др. К тому же антибактериальное действие эти соединения оказывают только в относительно высоких концентрациях. К антибиотикам следует относить только такие вещества, которые в незначительных количествах проявляют специфическое (избирательное) действие на отдельные звенья обмена веществ микробной клетки. Позже в тканях высших растений и животных были найдены соединения, способные в малых количествах специфически подавлять рост микробов. Более того, было показано, что некоторые сходные антибиотики (например, цитринин) могут синтезироваться как микробами, так и высшими растениями. Таким образом, круг организмов-продуцентов антибиотических веществ расширился, что также должно было найти отражение в термине «антибиотики». Установление структуры молекул многих антибиотиков позволило осуществить химический синтез ряда этих соединений без участия организмов-продуцентов.

Отношения молочнокислых и гнилостных бактерий; молочнокислые бактерии подавляют рост грамотрицательных энтеробактерий различных видов, в т. ч. условно-патогенных, населяющих кишечник человека и животных активное подавление синегнойной палочкой чумной палочки угнетение роста дрожжей актиномицетами, продуцирующими нистатин угнетение бацилл сибирской язвы, коринебактерий дифтерии и других гемолитическими стрептококками споры головни зерновых культур, попадая в почву, подвергаются воздействию почвенных антагонистов и быстро теряют жизнеспособность бактериофаги, относящиеся к вирусам, обладают способностью растворять бактерии. Болезни растений широко распространены и причиняют существенный вред. Для борьбы с ними используют химические средства, а также более безопасные для окружающей

среды биологические методы. Кроме того, большое значение имеет проведение профилактических мероприятий, так как некоторые патогенные организмы способны жить на растительных остатках в почве довольно долго. Освобождению почвы от фитопатогенных организмов способствует усиление размножения в ней микробов – антагонистов возбудителей тех или иных заболеваний. Антагонизм оказывает большое влияние на плодородие почв. Обильно развиваясь в почве, полезные микробы-антагонисты задерживают развитие многих фитопатогенных бактерий и грибов и этим оздоравливают почву. Этого можно добиться введением в севооборот соответствующих растений, стимулирующих развитие и размножение в почве микробов-антагонистов, однако для широкого практического применения этого приёма необходима его экспериментальная доработка.

Для лечения растений также можно использовать микробов-антагонистов. На грибах-паразитах нередко паразитируют другие грибы (паразиты второго порядка). Так, на мучнисторосяных грибах паразитирует пикнидиальный гриб *Cicinnobolus cesati*; на возбудителе бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia triticina*) – также пикнидиальный гриб *Darlucula filum*. Эксперименты с грибами-паразитами второго порядка, которых наносили в виде водных суспензий на поверхность растений в профилактических целях или при борьбе с заболеваниями, дали обнадеживающие результаты. Однако для профилактических целей отмеченные микроорганизмы пока не используются.

Использование сапрофитных микроорганизмов в борьбе с паразитными грибами и бактериями основано на антагонистических отношениях различных микробов. Особенно часто это явление наблюдается в почве, которая служит местом обитания разнообразных микроорганизмов.

Некоторые сапрофитные грибы и бактерии в процессе своей жизнедеятельности выделяют ядовитые вещества (токсины), с помощью которых подавляют развитие паразитных грибов.

Хороший эффект даёт использование культур микробов-антагонистов для обработки семян, заражённых фитопатогенами, или для внесения на поверхность вегетирующих растений, а также в заражённую почву. Микроб-антагонист, уничтожая вредителя, не причиняет вреда хозяину.

Исследования в этом направлении были начаты в Я. П. Худяковым (1935), который выделил бактерии рода *Pseudomonas*, лизирующие мицелий фитопатогенных грибов *Sclerotinia* и *Botrytis*. Этих микробов-антагонистов успешно использовали в полевых опытах для борьбы с фузариозом пшеницы, льна и т. д. Культурой *Pseudomonas* бактериализовали семена растений.

Оздоровлению сеянцев и саженцев сосны способствовало применение Н. А. Красильниковым миколитических бактерий при борьбе с фузариозом.

Культура *Azotobacter chroococcum* предупреждает заболевания сельскохозяйственных растений, вызываемые рядом грибов, например *Alternaria*.

По исследованиям проф. Т. Д. Страхова, споры головни зерновых культур, попадая в почву, подвергаются воздействию почвенных антагонистов и быстро теряют жизнеспособность; таким образом, почва «самоочищается» от головни.

Исследованиями многих ученых установлено также, что при корневых гнилях различных культур, вызываемых *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* и другими грибами, ограничивающим фактором являются почвенные грибы — антагонисты. К наиболее активным антагонистам относится гриб *Trichoderma* (из несовершенных грибов). В настоящее время в хозяйствах овощного направления в борьбе с корневыми гнилями используют биологический препарат «триходермин», предложенный ВИЗР (Н. С. Федоринчик).

Успешно бороться с мучнистой росой крыжовника, вызываемой грибом *Sphaerotheca mors-uvae*, позволяет опрыскивание растений настоем навоза. Это стимулирует размножение микроорганизмов на поверхности растения. В составе эпифитной микрофлоры находятся бактерии-антагонисты мучнисторосяных грибов (грибницу и плодовые тела которых они разрушают), которые после опрыскивания начинают размножаться.

Микробов-антагонистов можно использовать и против растений-паразитов. Положительные результаты были получены при борьбе с заразой арбузов (*Orobanchae aegyptiaca*) с использованием патогенного для заразы гриба *Fusarium orobanches*.

Некоторые культуры грибов-антагонистов применяют в борьбе с почвенной инфекцией. С. Н. Московец, В. И. Билай и другие исследователи установили, что грибы рода *Trichoderma* выделяют токсические вещества, поражающие микробов - фитопаразитов. Опыты показали, что внесение в почву культуры *Trichoderma lignorum* существенно уменьшает увядание хлопчатника, поражённого *Verticillium albo atrum*, грибные заболевания картофеля и других сельскохозяйственных культур. Рекомендуются вносить данную культуру, на основе которой создан препарат триходермин, при посеве растений.

Микробы-антагонисты не только угнетают фитопаразитов в зоне корня, но и вырабатываемые ими антибиотики проникают в ткани растений, что повышает устойчивость последних к возбудителям болезней.

Накопление микробов-антагонистов в почве зависит от различных условий. Повышенная температура и влажность почвы, удобрения, особенно органические, хорошая обработка почвы и другие благоприятствуют развитию и накоплению антагонистов, а, следовательно, и ускоряют процесс самоочищения почвы.

Накоплению антагонистов способствуют и пропашные культуры (кукуруза, картофель, кормовые бобы и др.), так как возделывание их требует обильных удобрений и междурядной обработки почвы, т. е. условий, необходимых для развития грибов-антагонистов.

Антагонистами могут быть и некоторые вирусы. Так называемый бактериофаг (в буквальном смысле — пожиратель бактерий) относится к вирусам, он обладает способностью растворять бактерии.

Опыты по применению бактериофага в борьбе с бактериальными болезнями растений, например с бактериальной рябухой табака, дали положительные результаты.

Для обеззараживания семян их опрыскивают культурой микроорганизма, разведённой в воде. Стерилизуется не только поверхность семени, но и зона корня, куда переходят микроорганизмы и начинают там размножаться.

При высадке рассады и саженцев их корни смачивают взвесью в воде соответствующих микробов-антагонистов. Водную взвесь микробов можно также использовать для опрыскивания надземных частей повреждённых растений, а также для профилактических целей.

Препараты, предназначенные для борьбы с почвенной инфекцией (типа триходермина), вносят в почву при посеве. Пока микробы-антагонисты систематического применения в сельском хозяйстве не получили.

Некоторые микробы угнетают рост других с помощью вырабатываемых ими веществ, называемых антибиотиками. Каждый антибиотик имеет характерный для него «спектр» действия, то есть подавляет развитие определённой группы микроорганизмов. В настоящее время антибиотики получают не только из микроорганизмов, но синтетическим путем. Так, созданы препараты стрептомицин, биомицин, пенициллин, микроцид и др.

Антибиотики различаются между собой характером их воздействия на микроорганизмы. Одни из них приостанавливают рост микробов или оказывают бактериостатическое действие, другие убивают микробные клетки, то есть действуют бактерицидно, третьи вызывают не только гибель, но и лизис (растворение) микробных клеток. Часто воздействие антибиотика меняется в зависимости от его дозировок.

Практически антибиотики стали применять в 40-х годах прошлого столетия, хотя, как уже отмечалось выше, явление микробного антагонизма было известно давно.

Сейчас внимание исследователей привлекает использование для борьбы с некоторыми болезнями растений антибиотических веществ, имеющих ряд преимуществ по сравнению с химическими. Химические препараты вредно действуют не только на фитопаразитов, но и на высшие растения, и на микрофлору почвы. Антибиотики же обладают селективным действием – убивают вредителя, а не растительный организм не влияют или, в некоторых случаях, дают стимулирующий эффект. Однако, вещества, токсически действующие на растения, могут быть и среди антибиотиков, и их не следует использовать в защите растений.

Применение в сельском хозяйстве антибиотиков медицинского назначения может содействовать появлению резистентных форм патогенных для человека и животных микроорганизмов. Поэтому микробиологами была проведена большая работа по изысканию антибиотических препаратов, специально предназначенных для использования в растениеводстве.

Основная часть в начальном периоде этих работ была выполнена Н. А. Красильниковым и его сотрудниками.

Так, С. А. Аксаровой был получен антибиотик актиномицетного происхождения, давший хороший результат при борьбе с гоммозом хлопчатника.

Р. О. Мирзабекян с успехом использовал антибиотик актиномицетного происхождения для борьбы с бактериальным увяданием абрикоса и персика, вызываемого неспорообразующей палочкой *Bac. armeniaca*.

Найдены антибиотики, предупреждающие развитие бактериального некроза у цитрусовых культур, вызываемого *Pseudomonas citriputealis*. Плоды, обработанные этими веществами, сохраняются в течение длительного времени без признаков порчи.

Препарат «триходермин» применяется для борьбы с вилтом хлопчатника. Продуцент этого препарата – гриб *Trichoderma lignorum*.

За рубежом используют «валидомицин» (продуцент *Str. hygrosopicus*), специфически активный против фитопатогенных грибов рода *Rhizoctonia*, вызывающих увядание листового влагалища риса. Этот антибиотик применяют также при борьбе с чёрной паршой и коричневой гнилью картофеля.

В США и Японии выпускают несколько препаратов, содержащих антибиотик актидион (циклогексимид), который готовят на основе *Str. griseus*. Эти препараты активны против ржавчины сосны, вилта дуба, цитоспороза

персика и сливы, мучнистой росы роз. Их используют при заболеваниях пшеницы и кукурузы, вызываемых грибами родов *Fusarium*, *Helminthosporium*, против твёрдой и пыльной головней ячменя, стеблевой ржавчины пшеницы и т. д.

В Японии для предупреждения заболевания риса очень опасной грибной болезнью – пирикулярриозом – и для лечения больных посевов широко применяют антибиотик бластицидин S. Продуцент – актиномицет *Str. griseochromogenes*. Он даёт соединение, которое в 10-100 раз токсичнее ртутно-органических препаратов. При частой обработке посевов вызывает некротическую пятнистость листьев риса и небезвреден для людей. Поэтому сейчас чаще используют для борьбы с пирикулярриозом другие антибиотики, особенно касугомицин (касумин), который получают из культуры *Str. casugoensis*. Он убивает также ряд грибов, поражающих овощные, технические культуры и плодовые насаждения. Этот антибиотик нефитотоксичен и безвреден для людей и животных. Применяют в Японии и антибиотик полиоксин D против увядания листового влагалища листа, альтернариоза груши и яблони. Помимо отмеченных, для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами за рубежом производят и другие антибиотики, продуцентами которых являются преимущественно актиномицеты и грибы.

Развитие паразитных грибов и бактерий может задерживаться и под действием некоторых антибиотических веществ, выделяемых растениями. Такие вещества получили название фитонцидов.

По мере развития науки об антибиотиках, полученных из низших растений, продолжается изучение фитонцидов-антибиотиков из высших растений.

Развитие растений нередко сопровождается выделением летучих веществ, обладающих антимикробными свойствами.

Способность живых растительных клеток выделять в процессе жизнедеятельности антимикробные яды названа советскими учеными фитонцидообразованием, а эти яды - фитонцидами (Б. П. Танин).

Фитонциды, как фактор самозащиты, не только предохраняют живые ткани от размножения в них микробов, но одновременно активизируют многие жизненные функции растений. Являясь побочными продуктами обмена веществ растений, фитонциды образуются только живыми клетками.

Практически любое растение обладает фитонцидными свойствами, но разные виды и даже разные органы одного и того же вида растений характеризуются разными фитонцидами. Фитонциды, образуемые одним видом растений, могут оказывать стимулирующее или угнетающее действие на другой вид,

изменять почвенную микрофлору, а также вызывать заболевания животных и человека.

Играя защитную роль, фитонциды оказывают бактерицидное или бактериостатическое действие. В большинстве случаев это не одно какое-либо вещество, а комплекс органических соединений, как, например, фитонциды чеснока, из которых выделен аллицин, дефензонат, сативин и выяснено химическое строение еще ряда препаратов. Из них полностью изучено химическое строение и осуществлен синтез лишь аллицина.

Разнообразие фитонцидов обеспечивается самой природой – они образуются почти всеми высшими растениями.

В шишках хмеля содержится смесь веществ особого характера – гумулоны и луполоны. Эти антибиотики активны во внешней среде против грамположительных и кислотоустойчивых микробов.

Летучие фитонциды лука, чеснока, хрена и других сильно действуют на патогенные грибы и бактерии.

По данным А. Д. Липецкой, споры головни быстро погибают под действием выделений лука и хрена (растертых в кашицу).

При обработке семян капусты соком чеснока, разбавленного водой в 3 раза, происходит их оздоровление от фомоза (по Е. К. Бурыхиной).

Таким образом, имеются большие перспективы применения биологического метода борьбы с болезнями растений.

3.4 Сенная палочка- *Bacillus subtilis*

Сенная палочка (*Bacillus subtilis*) — грамположительная, спорообразующая аэробная почвенная бактерия. Первоначально были описаны в 1835 Эренбергом как *Vibrio subtilis*, в 1872 были переименованы Коном в *Bacillus subtilis*. Название «сенная палочка» вид получил из-за того, что накопительные культуры этого микроорганизма получают из сенного экстракта. Является продуцентом некоторых полипептидных антибиотиков а также ферментов (амилазы, протеазы) получаемых промышленно.

Палочковидная бактерия, размер 3-5x0,6 мкм. Споры овальные, не превышающие размер клетки, расположены центрально (рис.№4). Перитриххальное расположение жгутиков, подвижная. Колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые. Край колонии волнистый. Растёт на МПА, МПБ, а также на средах, содержащих растительные остатки, простых синтетических питательных средах для гетеротрофов (рис.№5)

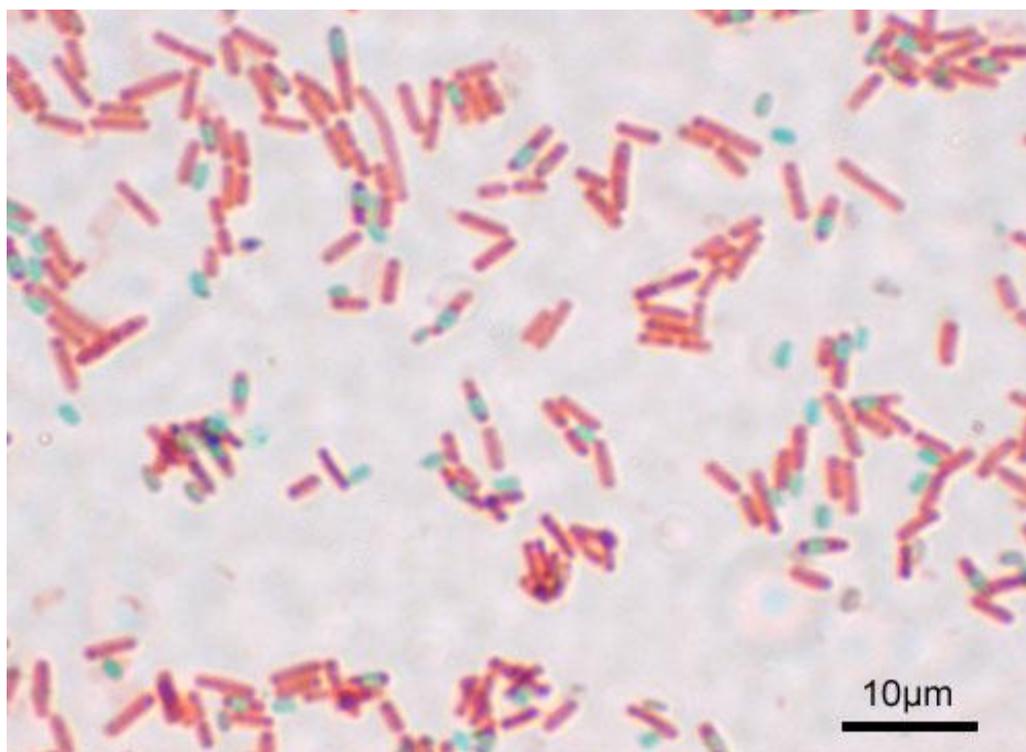


Рис.№4 Клетки *Bacillus subtilis* (споры окрашены в синий цвет)

Хемоорганогетеротроф, аммонифицирует белки, расщепляет крахмал, гликоген.

По данным из зарубежных источников не патогенна. Доказано, что штаммы *Bacillus subtilis* совсем не вредны для человека и животных. Отсутствие патогенности у штаммов *Bacillus subtilis* дало основание для присвоения им Управлением по контролю качества продовольственных и лекарственных

средств США статуса GRAS (generally regarded as safe) - безопасных организмов (К. Харвуд, 1992)

Геном *Bacillus subtilis* штамма 168 представлен кольцевой двуцепочечной молекулой ДНК размером 4214814 п.н. и содержит 5279 генов, из которых



Рис.№5 Колонии *Bacillus subtilis* на питательной среде

5163 кодируют белки, процент % Г+Ц пар составляет 43,51 %, геном содержит по крайней мере два *ori* сайта (сайта начала репликации). Изучено биологическое разнообразие штаммов *Bacillus subtilis* на уровне генома, гены, отвечающие за синтез антибиотиков, синтез клеточной стенки, споруляции, и прорастания спор являются высоковариабельными

B. subtilis является важным продуцентом протеаз, амилаз, аминокислот и некоторых полисахаридов. В частности, протеаза используется как компонент моющих средств и для удаления жира и белков при выделке шкур. Также является продуцентом полипептидных антибиотиков. Ввиду наличия антагонистических свойств против фитопатогенов используется в биозащите растений. Штамм грамм-положительной спорообразующей аэробной почвенной бактерии *Bacillus Subtilis*, депонированный в Депозитарии Института микробиологии и вирусологии НАН Украины (регистрационный № IBM В-7321 от 6 марта 2010 года), по составу биологически активных веществ способен к созданию на его базе лечебно-

профилактических препаратов для потребностей медицины и ветеринарии и после проведения с ним температурно-проточно-ультразвуковой обработки значительно повышается эффективность действия биологически активных компонентов, полученных из штамма IBM B-7321 *Bacillus Subtilis*.

Bacillus subtilis, благодаря продуцируемым антибиотикам и способности закислять среду обитания, является антагонистом патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, таких как сальмонелла, протей, стафилококки, стрептококки, дрожжевые грибки; продуцируют ферменты, удаляющие продукты гнилостного распада тканей; синтезируют аминокислоты, витамины и иммунноактивные факторы.

В качестве активного вещества препаратов используется лиофилизированная микробная масса живого антагонистически активного штамма *Bacillus subtilis* 534 или штамма *Bacillus subtilis* ЗН, селектированного по признаку хромосомной устойчивости к антибиотику — римфапицину из производственного штамма *Bacillus subtilis* 534. Российскими предприятиями 48 ЦНИИ Минобороны России ФГУ, г. Екатеринбург, ЗАО «Биофарма» и несколькими украинскими предприятиями производится лекарственный препарат Биоспорин, содержащий смесь *Bacillus subtilis* штамм 2335 (также называемый *Bacillus subtilis* 3) и *Bacillus licheniformis* 2336 (также называемый *Bacillus licheniformis* 31) в пропорции 3:1

Также зарегистрированы (были зарегистрированы) препараты, в которых основным действующим веществом являлись *Bacillus subtilis*: Споробактерин (штамм 534), Бактиспорин (штамм N ЗН). Препараты на основе сенной палочки *Bacillus subtilis* (Споробактерин, Биоспорин, Бактиспорин) и сходного микроорганизма *Bacillus cereus* (Бактисубтил) обладают антимикробной активностью и могут использоваться при бактериальных инфекциях при невозможности приема антибиотиков или для селективной деконтаминации тонкой кишки при синдроме избыточного бактериального роста. Споры этих бактерий, превращаясь в толстой кишке в активные формы, вырабатывают в процессе жизнедеятельности кислые метаболиты - органические кислоты. При этом рН в толстой кишке сдвигается в кислую сторону и подавляется рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (Белосува Е.А., Златкина А.Р.).

В состав лекарственного препарата Энзимтал, имеющего разрешение на применение на территории Украины, имеется грибковая амилаза — амилолитический фермент, получаемый из грибов *Aspergillus oryzae* и непатогенных бактериальных культур *Bacillus subtilis* (Кирик Д.Л., Полякова И.Ф.).

Кроме перечисленных выше лекарств-пробиотиков, штаммы *Bacillus subtilis* входят в состав пищевых добавок. В России продаются (продавались) БАДы, содержащие *Bacillus subtilis*: Бактистатин, Супрадин Киндер гель (производство Германии), Ветом и другие.

Штаммы *Bacillus subtilis* используются в ряде лекарств и продуктов для ветеринарии и сельского хозяйства. В частности, пробиотик «Субтилис» (жидкая форма «Субтилис-Ж» и порошок «Субтилис-С»), включающий в свой состав собой микробную массу живых спор бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* применяется в животноводстве, птицеводстве, рыбоводстве для профилактики и лечение заболеваний ЖКТ бактериальной этиологии, дисбактериоза, легочных инфекций, увеличения продуктивности, получения здорового потомства, подавления роста патогенных и условно патогенных микроорганизмов (сальмонеллы, кишечной палочки, аэромонад, псевдомонад и других).

Bacillus subtilis в растениеводстве

На основе штаммов *Bacillus subtilis* (сенной палочки) производят ряд микробиологических препаратов, предназначенных для защиты огородных, садовых, комнатных и оранжерейных растений от комплекса грибковых и бактериальных болезней: Фитоспорин, Алирин-Б, Гамаир, Био-Фунгицид и другие. По современной классификации вид *Bacillus subtilis* (сенная палочка) относится к роду *Bacillus* (бациллы), который входит в семейство *Bacillaceae*, порядок *Bacillales*, класс *Bacilli*, тип *Firmicutes*, царство Бактерии.

Антибиотики и бактерии, активные в отношении сенной палочки

В отношении представителей вида бацилл *Bacillus subtilis* (сенной палочки) активны следующие антимикробные средства: ванкомицин, нифурател. Некоторые виды бактерий, в частности, *Lactobacillus plantarum*, подавляют *Bacillus subtilis*.

3.5 Триходерма - Trichoderma

Триходерма, род гифомицетов. Мицелий бесцветный. Конидиеносцы вертикальностоящие, разветвлённые, бесцветные. Конидии одноклеточные, собраны в округлые головки(рис.№6). Сапротрофы в почве и на древесине, нек-рые паразитируют на др. грибах. 9 видов. Распространены широко. Из нек-рых видов Триходермы получают препарат триходермин, применяемый для борьбы с корневыми гнилями с.-х. растений, возможно его использование против вилта хлопчатника. Trichoderma - гриб-сапрофит отдела Ascomycota, семейства Нуростеасеае. Различные разновидности этого гриба используются в сельскохозяйственной практике в борьбе с различными фитопатогенами культур как открытого, так и закрытого грунта.



Рис.№6 Колония Trichoderma на питательной среде

Наибольшее биологическое и коммерческое значение имеют виды *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum* и *T. lignorum*, а также их биотипы. Действующим началом препаратов на основании гриба-антагониста являются его споры, мицелий и продукты метаболизма. В процессе развития *Trichoderma* синтезирует широкий спектр антибиотиков (глиотоксин,

виридин, триходермин, сацукаллин и др.), которые разрушают клеточные стенки фитопатогенных грибов, а также вырабатывает стимулирующие рост и развитие растений биологически активные вещества. *Trichoderma* способна подавлять более 60 видов патогенов (*Pythium*, *Botrytis*, *Phoma*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Ascochyta*, *Alternaria* и др.) на широком спектре растений (огурец, томаты, капуста, перец, различные цветочно-декоративные, зерновые и зернобобовые культуры). В практике применения биопрепаратов для защиты растений до настоящего времени часто бытуют неверные представления по данному вопросу. В частности, считается, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, а биопрепарат, введенный в почву или ризосферу, не способен влиять на фитопатогены в течение длительного периода времени. Поэтому биопрепараты эффективны для защиты семян от болезней проростков, но бесполезны для защиты растений в период вегетации. Считается также, что один биоконтрольный агент не может быть эффективен в различных условиях, на различных культурах и против широкого спектра патогенов, поэтому лучше применять смешанные препараты, а механизм действия биоконтрольного агента очень прост и контролируется только одним или несколькими генами и генными продуктами.

Мнение о том, что биопрепараты менее эффективны и доступны, чем химические пестициды, ошибочно. Действительно, сторонники биологического земледелия стремятся внедрить биопрепараты в систему, в которой пестициды занимают прочное положение и были более экономичными. Другими словами, они старались внедрить биопрепараты по схеме внедрения химических средств защиты. Но на международном рынке уже существует множество эффективных пестицидов для защиты семян, часто более дешевых; пестициды сохраняются на семенах дольше, чем биопрепараты, а химические средства более эффективно защищают семена при разных погодных условиях. Однако в сельском хозяйстве существуют ситуации, в которых биопрепараты могут быть более привлекательными, чем химические пестициды. Например, биопрепаратами можно заменять фунгициды с низкой эффективностью, к которым у патогенов развилась резистентность и которые не могут заменить другие химические средства. Замена или частичная замена биопестицидами опасных для окружающей среды химических пестицидов, применение биопрепаратов там, где использование химических средств невозможно. Наконец, без биологической защиты невозможно ведение биологического (органического) сельского хозяйства.

Первая ниша наиболее очевидна, и подобная ситуация часто приводится в качестве причины использования биопрепаратов вместо слишком «тяжелых» пестицидов, т.е. как более привлекательная альтернатива. В качестве примера можно привести борьбу с гнилью растений, вызываемых *Botrytis cinerea*. Для контроля этого фитопатогена используют только несколько химических фунгицидов, к которым уже появились резистентные штаммы. На мировом рынке представлено несколько биопрепаратов, являющихся аналогами отечественного Триходермина, которые могут быть альтернативой химическим средствам: ТопШилд (на основе *T. harzianum* TT22), Триходекс (*T. harzianum* TT39) и Триходерма Бленд Microzyme TR.

Вторая ниша — это замена опасных для окружающей среды пестицидов. Сельскохозяйственные рынки различаются по приоритетам, с точки зрения продаж химических пестицидов. Для большинства современных хозяйств, производящих зерновые, несмотря на наметившийся переход к биологическому земледелию, более выгодно применять химические средства. Однако тепличные хозяйства придерживаются более строгих мер по отношению к пестицидам. Международным законодательством (ЕРА) меры безопасности для рабочих тепличных хозяйств, в частности запрещающие в ряде случаев применение химических средств защиты растений. При использовании зарегистрированных биопрепаратов, не опасных для человека, поскольку они не обнаружены в продуктах питания, было показано, что время восстановления здоровья персонала составило 0 ч. Данный фактор сделал биопестициды привлекательными для многих растениеводов. В будущем, когда они будут стоить столько же, сколько и химические средства, но будут не менее эффективными, чем в закрытых системах (тепличные хозяйства, питомники), биопестициды полностью заменят химические препараты. Можно привести несколько примеров, когда потребители пестицидов чаще останавливают свой выбор на биопрепаратах. В Узбекистане такими объектами могут быть производственные, коллективные и индивидуальные сады, водоохранные и санитарно-курортные зоны, государственный лесной фонд, природоохранные и припасечные территории, районы производства сельскохозяйственной продукции для детского питания и возделывания лекарственных растений, овощехранилища и элеваторы.

Третья ниша. Действительно показано, что биопрепараты могут иметь преимущества по сравнению с пестицидами. Лучшими примерами могут быть ризосферокомпетентные штаммы, которые колонизируют подземную часть растений и обеспечивают защиту, по крайней мере, однолетних

растений. Более того, биологи могут производить биопрепараты на местах, в биолабораториях при тепличных хозяйствах и станциях защиты растений непрерывно, например, с помощью доступного для каждого хозяйства оборудования. Химические пестициды надо заранее закупать, складировать и только потом вносить. За счет местного производства стоимость биопрепарата резко снижается. Результаты по поражённости фитофторозом после обработки биопрепаратом и фунгицидом оказались сопоставимы. Однако после биопрепарата получена экологичная продукция, в агроценозах нами было отмечено снижение численности резистентных фитопатогенов и восстановление супрессивности. Еще одна ниша предполагает использование биопестицидов для биологического земледелия и является конечной целью всех производителей биопрепаратов. Следует отметить, что биопестициды автоматически не квалифицируются в качестве пригодных для биологического земледелия и требуется сертификация каждого нового микроорганизма, используемого для защиты растений. Следовательно, важно выбрать подходящую систему производства биопрепарата, если целью является его коммерциализация. Проигрышная ситуация для биопрепаратов складывается в нише, где доступны недорогие химические пестициды и отсутствуют дотации на биопрепараты. Еще одно ошибочное представление состоит в том, что только один биоконтрольный агент, введенный в почву или в ризосферу, не способен влиять на широкий спектр фитопатогенов в течение длительного периода времени. В результате биопестициды эффективны для защиты семян и болезней проростков, но бесполезны для защиты растения по вегетации. Действительно, во многих опубликованных работах отмечается, что биоконтрольные агенты «способны временно доминировать только в локальных зонах ризосферы только в определенных почвах и сезонах...», все коммерческие биопестициды активны как антагонисты только при внесении «прямо в зону инфекции, где они и нужны». Иными словами, если целью препарата является защита семян, то его применение будет обеспечивать только защиту семян и, возможно, благодаря этому будет увеличивать жизнеспособность проростков. Однако такое толкование помещает биопрепарат в ряд химических препаратов, с которыми трудно достичь коммерческого успеха. В настоящее время известно, по крайней мере, два механизма биологического контроля у грибов рода *Trichoderma*: ризосферная компетентность и индуцированная системная резистентность (SAR), которые обеспечивают долговременную защиту на значительном удалении от зоны инфекции. Увеличение урожайности растений

отмечается вследствие колонизации микроорганизмами корней растений. После обработки семян конидиями *Trichoderma* или внесения их непосредственно в почву интродуцированные конидии успешно колонизировали поверхность корней, увеличивая их всасывающую поверхность и создавая биологический барьер для фитопатогенов. Наблюдаемый эффект чаще всего не зависит от типа почвы или географической локализации испытываемой культуры. Количество жизнеспособных пропагул интродуцированного гриба *Trichoderma* и статус доминирующего вида сохранялся в течение всего сезона, а иногда и нескольких лет. Полная колонизация корней происходила, когда пропагулы *Trichoderma* вносили при обработке семян, или в гранулированном виде на поверхность вспаханной почвы, или при вспашке и рыхлении, а также при добавлении гранул препарата в почвенные смеси для теплиц, или в виде суспензии конидий в посадочную почву в теплице. Во всех случаях грибы проявляли хемотаксис и росли в сторону новой формирующейся корневой поверхности растения. Вследствие колонизации ризосферы грибами рода *Trichoderma*, происходило подавление болезней растений, ускорение роста, увеличение урожайности, повышение устойчивости к заболеваниям. Таким образом, можно сказать, что штаммы *Trichoderma* способствуют увеличению размера корневой системы, роста и жизнестойкости растений путем контроля ризосферной микрофлоры и влияя на обмен растения. Для достижения максимальной урожайности в присутствии биопрепарата на основе *Trichoderma* требуется на 38 % меньше азота в почве, чем в контроле. Биопрепарат на основе видов *Trichoderma* перспективен для интегрированной

защиты в полевых условиях, т.к. практически ни один фунгицид не был особенно токсичен в производственных дозах или наблюдалась быстрая приобретенная резистентность, что во многих случаях позволяло применять смешанные препараты (пестицид - биопестицид) для интегрированной защиты семян. Мнение, что один биоконтрольный агент не может быть эффективен в различных условиях, на различных культурах и против широкого спектра фитопатогенов и лучше применять смешанные препараты для защиты разных культур в различных условиях, ошибочно. Многие ученые придерживаются мнения о том, что биоконтроль высоко специфичен для каждого вредителя или болезни и не может быть эффективен в различных условиях, поэтому рекомендуется использовать смесь нескольких биоконтрольных агентов. Это мнение не подтверждается многими экспериментами, по крайней мере, для рода

Trichoderma. Большое число научных работ показывает, что отдельные штаммы рода *Trichoderma* способны контролировать различные фитопатогены. Так, в опытах *in vivo* и *in vitro* показано [5], что аборигенные штаммы *Trichoderma*, эффективны более чем против 10 видов местных рас фитопатогенов (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Botrytis* и др.) и на широком спектре растений (различных сортах огурца, томата, капусты, перца и декоративных культур, сеянцев сосны, зерновых и зернобобовых культур). Однако существует много фитопатогенов, устойчивых к действию *Trichoderma*. Результаты исследований по регуляции пораженности растений фитопатогенами в отдельных случаях были сопоставимы с действием пестицидов. Биопрепараты на основе *Trichoderma* способны подавлять возбудителей не только семенной, корневой и почвенной инфекции, но и развитие болезней плодов и листьев при нанесении препарата на поверхность этих структур. Препарат может быть эффективен против мучнистой росы (*B. cinerea*) в теплице, милдью, возбудителей болезней газонных трав, таких, как бурая пятнистость (*R. solani*), *Pythium* spp. и талерные бляшки (*S. homoeocarpa*). Для борьбы с такими фитопатогенами конидии *Trichoderma* следует вносить каждые 10 дней. При высокой заболеваемости *Trichoderma* может колонизировать новые здоровые листья, плоды и цветы, зрелые ягоды, прорастать на цветах, но не на листьях клубники. Получены интересные результаты о перенесении пропагул *Trichoderma* пчелами, т.к. конидии *Trichoderma* меньше по размеру, чем пыльца, поэтому они прилипают к тельцу пчелы, как пыльцевые зерна. Пчелы при вылете из улья и входе в улей контактируют с материалом, содержащим споры

Trichoderma. Они переносят достаточное количество конидий на цветы клубники, огурца и других растений. Такой способ распространения *Trichoderma* был более эффективен, чем опрыскивание биопрепаратом или фунгицидом. Однако существуют некоторые ограничения для использования биопрепаратов на основе *Trichoderma*: они являются превентивными, т.к. чаще всего не способны контролировать уже развившиеся заболевания. Развитие изолятов *Trichoderma* подавляется при высоком популяционном уровне фитопатогенов. Биопрепараты можно использовать только в определенных границах или как часть общей стратегии. В этом случае рекомендуется применять системные фунгициды. Биопрепараты на основе *Trichoderma* менее эффективны против системных заболеваний, чем против местных (например, они эффективны против фузариозной корневой плесени, но не активны

против фузариозного вилта), на фоне высокой инфекционной нагрузки. Например, протравливание семян одновременно фунгицидом и пестицидустойчивым биопрепаратом на основе *Trichoderma* приводит к колонизации корней растения и повышает эффективность биопрепарата. Создается общая картина положительного влияния *Trichoderma* на рост растений и урожайность, хотя это происходит не везде и не всегда. *Trichoderma* обеспечивает устойчивость к различным стрессам. В оптимальных условиях для роста растений визуальные эффекты от влияния изолятов *Trichoderma* не видны. Таким образом, *Trichoderma* представляет собой эффективный биоконтрольный агент, который улучшает рост растений. Грибы рода *Trichoderma* широко представлены в почве, чаще в супрессивной, поскольку успешно размножаются в корневой зоне здоровых растений. При отсутствии здоровых корней популяция *Trichoderma* снижается. Вероятно, некоторые виды гриба этого рода являются оппортунистическими колонистами ризосферы или даже симбионтами растений. Если это так, то приходится признать, что грибы должны были разработать много механизмов, которые обеспечили их существование в данной экологической нише, т.е. на здоровых корнях. К этим механизмам относят: микопаразитизм, антибиоз, конкуренцию за питательные вещества и за пространство, устойчивость к стрессам благодаря улучшению состояния корневой системы всего растения, индуцированную резистентность, способность к переводу в растворимые и доступные для растений формы неорганических ионов, инактивацию ферментов фитопатогенов. Первые три механизма являются самыми важными для всех грибов, и они описаны достаточно полно. Другие механизмы описаны гораздо хуже. Микопаразитизм считают самым важным механизмом действия биоконтрольных грибов рода *Trichoderma*. Показано, что регуляция микопаразитизма осуществляется многими генами и генными продуктами. Каждая функциональная ферментная группа представлена несколькими ферментами, различающимися по своим свойствам. Описано более 10 отдельных хитинолитических ферментов, установлена дивергентность и для β -1,3-глюканаз и протеаз. Регуляция каждой ферментной системы осуществляется по-разному, что делает регуляцию микопаразитизма чрезвычайно сложным процессом. Первый этап микопаразитизма обеспечивается более чем 20 генами и генными продуктами и регулируется сложными механизмами. Большинство генов синергичны друг другу. Сложный синергичный регуляторный механизм не обходим только для осуществления атаки видов *Trichoderma* против других фитопатогенов. Неудивительно, что этот род

объединяет много грибов, способных контролировать фитопатогенные грибы. Описано более 100 антибиотиков, выделяемых грибами рода *Trichoderma*. Антибиотики действуют синергично со многими ферментами, разрушающими клеточную стенку грибов. Долгое время считали, что антибиотики, выделяемые биологически активными видами *Trichoderma*, также обеспечивают их биоконтрольную активность. Однако получены мутанты, лишенные многих важных антибиотиков, но тем не менее сохранившие высокую биоконтрольную активность. Было сделано предположение, что «существуют молчащие метаболические пути, гены которых в норме не экспрессируются...». Мутации могут привести к «включению» регуляторных факторов, которые активируют молчащие пути. Штаммы могут обладать криптическими генами, которые не экспрессируются до тех пор, пока не произойдет мутация. Изменение экспрессии показывает, что биоконтрольные штаммы *Trichoderma* (и, несомненно, другие микроорганизмы) обладают генами, которые экспрессируются только при изменении регуляторных процессов. Конкуренция за местообитание и питательные вещества с фитопатогенами — один из «классических» механизмов биоконтроля у видов рода *Trichoderma*. Во многих случаях, когда очевидный микопаразитизм или антибиоз отсутствует, предполагается механизм конкуренции. Одним из возможных механизмов, привлекающих особое внимание, является устойчивость биоконтрольного агента к стрессам благодаря улучшению корневой системы и повышению жизнеспособности растений. Толерантность к высушиванию и повышенная усвояемость азота являются примерами этого механизма. Улучшение состояния корневой системы благодаря *Trichoderma*, возможно, приводит к появлению устойчивости к патогенам, которые непосредственно не контролируются. Например, грибы рода *Trichoderma* неспособны контролировать *Phytophthora* spp., поскольку не имеют механизмов разрушения или атаки на зооспоры. Однако имеются сведения о том, что растений, пораженных фитопфторой, было больше в контроле (без применения *Trichoderma*), чем в опытных вариантах с обработкой антагонистом. Единственным объяснением может быть то, что, по-видимому, колонизация корней *Trichoderma* привела к более развитой корневой системе, что снижало проявление отрицательного влияния фитопатогенов. В почве многие ионы постоянно переходят из нерастворимой в растворимую форму, что в значительной степени влияет на усвоение этих элементов корнями. Виды *Trichoderma* способны в значительной степени положительно влиять на переход многих ионов (фосфаты, цинк, Mn^{4+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) из

нерастворимых в растворимую форму, и показано влияние этого процесса на развитие болезни растений. Некоторые штаммы *Trichoderma* являются мощными индукторами системной резистентности растений (SAR). Исследуемый штамм *T. harzianum*, инокулированный на корни или листья, защищал растения от *B. cinerea*, независимо от места введения. Анализ листьев, устойчивых к фитопатогенам, показал, что на них нет *Trichoderma*. Установлено, что способность к контролю мучнистой росы связана с индукцией резистентности растений. В растениях огурца, выращенного с использованием биопрепаратов, отмечено увеличение размеров растения и урожайности. Показано, что мицелий гриба проникает в кортекс корней. В растениях, обработанных спорами *Trichoderma*, увеличена активность хитиназы и пероксидазы и обнаруживаются фитоалексины, что является показателем SAR. Инфекционность и способность поражать растения у многих фитопатогенов зависит от продукции пектинолитических, хитинолитических и целлюлолитических ферментов, сериновых протеаз, деградирующих клеточные стенки растительных клеток. Механизм биоконтроля, который могут реализовать виды *Trichoderma* — разрушение ферментов фитопатогенов, что приводит к снижению их инфекционности. В заключение можно сказать, что существует множество механизмов, посредством которых грибы *Trichoderma* осуществляют контроль фитопатогенов. Неудивительно, что разные штаммы обладают различными биоконтрольными способностями. Даже мутанты этих штаммов реализуют различные механизмы контроля фитопатогенов. Кроме того, что эти грибы вооружены самым разным «биологическим оружием», они относятся к высокоадаптивным к различным стрессовым факторам организмам и не специфичным по отношению к контролируемым ими фитопатогенам. Штаммы, лишённые одного механизма, быстро адаптируются и используют другой механизм. В настоящее время экономически выгодно использовать препараты *Trichoderma* в защищенном грунте на культуре огурца (против *S. sclerotiorum*, *Rhizium* spp. и других возбудителей корневых гнилей), поскольку в почве теплиц всегда имеются благоприятные для гриба гидротермические условия. Против фузариозного и ризоктониозного увядания огурцов наиболее эффективным оказалось дробное четырехкратное внесение препаратов *Trichoderma* в дозе 6-9 г/м². При этом поражение растений корневыми гнилями снижалось в 2-4 раза, урожай возрос на 14-27%. Стимулировался рост растений, ускорялось начало цветения (на 2-8 сут.), удлинялся срок вегетации на 14-20 сут. и увеличивалось накопление растениями зеленой массы на 25-41%. Важное влияние на эффективность

T. harzianum оказывает состав питательной среды, определяющий скорость роста мицелия гриба, соотношение продуцируемых им летучих и нелетучих антибиотических веществ. В целом препараты *Trichoderma* перспективны в борьбе с корневыми гнилями огурца, питиозной, фузариозной, ризоктониозной и вертициллезной гнилями корнеплодов сахарной свеклы, в борьбе с *Polymyxa betae* – грибным переносчиком вирусной инфекции – ризоманией сахарной свеклы, вилтом хлопчатника и люцерны, серой гнилью винограда, ризоктониозом картофеля и семян сахарной свеклы, фузариозом дыни, арбузов и гороха, корневой гнилью и ризоктониозом кенафа, угловатым и пустульным бактериозами сои, склеротинией подсолнечника и кукурузы, слизистым и сосудистым бактериозами капусты, вертициллезным увяданием баклажана. Высокая эффективность препаратов *Trichoderma* даже в пониженной дозе при обработке семян различных сельскохозяйственных культур суспензией спор гриба и их использование при дражировании или микрокапсулировании семян позволяют более широко использовать эти препараты для защиты посевов от болезней в полевых условиях. Наблюдаемая в ряде случаев слабая эффективность препаратов *Trichoderma* как в защищенном, так и в открытом грунте объясняется ошибками в подборе почвосубстрата, действием пестицидов или других ксенобиотиков. Выделенные из почвы после инкубации с различными концентрациями тяжелых металлов высокоэффективные штаммы *T. harzianum* либо утрачивали, либо существенно изменяли свои антагонистические свойства, в частности, полностью элиминировалась антигрибная активность, в то время как антибактериальное действие сохранялось. Цинк в меньшей степени, чем медь подавлял антигрибную активность, однако торможение развития мицелия антагониста наблюдалось при всех испытываемых концентрациях. Следовательно, в подверженных техногенному влиянию почвах применение препаратов *Trichoderma* должно быть строго дифференцировано. Необходимо учитывать возможность снижения его действия или даже полной инактивации при повышенных концентрациях в почве тяжелых металлов и других поллютантов.

После обработки семян триходермой или внесения ее непосредственно в почву, интродуцированные конидии колонизируют поверхность корней, увеличивая их всасывающую поверхность и создавая биологический барьер для фитопатогенов. Полная колонизация корней происходит, когда триходерму вносится при обработке семян или при вспашке и рыхлении, а

также при добавлении препарата в почвенные смеси для защищённого грунта. Вследствие колонизации, ризосферы грибами рода *Trichoderma*, происходит подавление болезней растений, ускорение ростовых процессов, увеличение урожайности. Период защитного действия 10-30 дней.

В результате действия продуцируемых ферментов хитиназы, целлюлазы и глюконазы способствует разложению полисахаридов и перевод веществ в доступные формы для растений, проводя гумификацию почв.

Глава IV Материалы и методы исследований

4.1 Выделение чистой культуры *Fusarium*

Наиболее простой метод определения заражения растения *Fusarium* это визуальная диагностика, но не точный, хотя в ряде случаев и удается достоверно установить патогенную природу заболевания (мучнистая роса, серая гниль) по его внешним признакам, а причину увядания растения или появления хлоротичных пятен безошибочно определить только при помощи визуальной диагностики достаточно сложно. В этом случае применяли микробиологическую методику идентификации патогенов бактериальной и грибной природы. Методика заключается в следующем:

- у отделенных листьев пораженного растения отрезали 5-7см черешка и делали несколько вырезов такой же длины из разных мест стебля, корень очищали от земли и все это тщательно промывали в проточной воде;
- фрагмент промытого корня закладывали во влажную камеру (или непосредственно на агаризованную среду), а черешками и частями стебля (предварительно обмакнуть их в спирт и обжечь) делали отпечатки на питательной среде (рис.№7). В качестве питательной среды использовали томатную среду и картофельно-глюкозный агар (Методы идентификации фитопатогенных грибов, 1984).



Рис.№ 7 Выделение культуры *Fusarium* из частей зараженного растения

- затем чашки Петри помещали в термостат. Начиная с 3 дня и на протяжении нескольких недель вели наблюдения. При обнаружении колоний бактерий или грибных налетов, проводили выделение чистых культур путем пересевов на агаризованную среду;
- родовую принадлежность патогенов определяли при помощи микроскопа и «определителей» (Основные методы диагностики фитопатогенных бактерий, 1990).

Питательная агаровая среда:

CaCO₃ 0.5 г

Сахароза 0.5 г

Агар-агар 2 г

Вода 100 мл

Картофельно-глюкозный агар (КГА)

Картофель очищенный нарезанный 200 г

Глюкоза 2 г

Агар-агар 1.7-2 г

Вода 100 мл

Для определения бактерий, которые были выделены в процессе исследований и ранее поддерживались в чистой культуре, к отряду грамположительные и грамотрицательные использовался КОН — метод (Основные методы диагностики фитопатогенных бактерий, 1990). Для постановки реакции КОН-методом необходимо на предметное стекло нанести каплю 3% раствора КОН и петлей для посева исследуемую культуру. Регистрируемый ответ: культура становится желеобразной и тянется за петлей - бактерии грамотрицательные, культура без изменений - бактерии грамположительные. Выделение культуры вели *in vitro* в совместных культурах в чашках Петри на картофельно-глюкозной среде.

4.2 Выделение чистой культуры *Bacillus subtilis*

Горсть сухого сена измельчают ножницами и помещают в химический стакан или другую посуду. Наливают воды по объему в 2 раза больше сенной массы и кипятят 10 – 20 минут. Затем настой профильтровывают, наливают в колбу, плотно закрывают пробкой, и ставят в темное место при температуре до 30°C. Сенная палочка начинает размножаться. Через 3 – 5 дней на поверхности сенного настоя образуется беловатая пленка сенных палочек. Получаем настой с колонией сенной палочки.

4.3 Выделение чистой культуры *Trichoderma*

Для выделения чистой культуры *Trichoderma* была найдена природная колония и пересеена на стерильную агаровую среду.

Путем пересева в стерильные чашки Петри была выделена чистая культура которая с помощью определителя (Основные методы диагностики фитопатогенных грибов и бактерий, 1990) была идентифицирована как *Trichoderma harzianum*.

4.3 Выявление антагонистического действия бактерий *Bacillus subtilis* на *Fusarium oxysporum* чашечным методом.

Испытания вели *in vitro* в совместных культурах в чашках Петри на картофельно-глюкозной среде. Изоляты бактерий- антагонистов были выделены и идентифицированы. Для исследования антагонизма использовали чашечный метод. Методика заключается в следующем: среду в чашках Петри засеивали с двух сторон у края чашки культурой бактерий, а в центре - сеяли гриб *Fusarium* (Журек, 1991). Между антагонистом и патогеном должна оставаться чистая среда (стерильная зона). После посева чашки с культурами ставили в термостат. Первый учет размера стерильной зоны проводили через неделю после посева.

4.4 Выявление антагонистического действия *Trichoderma* на *Fusarium* чашечным методом.

Для выявления антагонизма так же как и в предыдущем опыте был использован чашечный метод. По краям на стерильную среду засеивался с двух сторон мицелий *Trichoderma harzianum*, а по центру мицелий *Fusarium oxysporum*. После посева чашки Петри ставили в термостат. Учет размера вели через неделю после посева.

4.5 Выявление действия культуральной жидкости *Bacillus subtilis* на всхожесть семян томата в зараженной *Fusarium* почве

Семена томата сеяли в кассеты каждая кассета на 9 ячеек по два семени в ячейку (Казачко, 1995). Затем землю поливали 0,2% рабочим раствором бактерий. Для сравнения было засеяно 3 кассеты :

- 1 Кассета со стерильной почвой
- 2 Кассеты с зараженной *Fusarium oxysporum* почвой

Стерильная кассета являлась контролем по которому путем подсчета можно было сравнить эффективность препарата. Для исследования были взяты семена томата сорта Линда F1.

Приготовление рабочего раствора :

Вода 500 мл

Культуральный раствор *Bacillus sub.* 5мл

Бактерии выращивались в течение трех суток на качалке до дня использования. Первый учет проводили через две недели после посева. Поливались все кассеты так как о негативном влиянии *Bacillus subtilis* на прорастания семян не известно.

4.6 Результаты исследований.

По прошествии недели после засева чашек Петри культурами они были извлечены и визуально обследованы (рис.№8). Также было произведено измерение диаметра и площади занимаемой культурами (табл.№2)

Исследуемая культура	Толщина кольца колонии антагониста мм	Площадь освоен.антагонистом %	Диаметр колонии <i>Fusarium</i> мм	Толщина стерильной зоны мм
Контроль	0	0	100	0
<i>Bacillus sub.</i>	42	92	14	2
<i>Trichoderma harzianum</i>	35	80	23	0

Исходя из полученных данных можно считать проверку *Bacillus subtilis* и *Trichoderma harzianum* на антагонистическое воздействие на *Fusarium oxysporum* положительной.



Рис.№ 8 Выявление антагонистического действия *Trichoderma harzianum* на *Fusarium oxysporum* чашечным методом.

Скорость роста растений томатов является одним из показателей влияния бактерий-антагонистов. Разность между длиной стеблей у растений, измеренных после посадки семян в зараженную и стерильную почву через несколько недель могут служить доказательством возможности применения антагонистов в борьбе с фитопатогенными грибами рода *Fusarium* (рис№ 9,10,11). Данные, полученные в следующем опыте опытах приведены в таблице 3.

Состояние почвы	Количество засеянных семян	Количество проросших семян	Длина ростков (средн.) мм	Эффективность %
Стерильная	18	17	52	100
Заражена	18	11	38	73
Заражена	18	3	26	50



Рис.№9 Проросшие семена в стерильной почве политые культурой *Bacillus sub.*



Рис.№10 Проросшие семена в зараженной почве политые культурой *Bacillus sub.*



Рис.№11 Проросшие семена в зараженной почве политые водой

Выводы

- 1) Выделенные из пораженных тканей растений изоляты возбудителя фузариозного увядания томата идентифицированы как *Fusarium* и имеют различия по биологическим и вирулентным свойствам. Из 3 изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных их разных органов здорового и больного растения томата, самым патогенным является *Fusarium oxysporum*.
- 2) Доказана антогонистическая активность *Bacillus subtilis* к *Fusarium oxysporum*.
- 3) Доказана антагонистическая активность *Trichoderma harzianum* на *Fusarium oxysporum*.
- 4) Доказано положительное действие культуральной жидкости *Bacillus subtilis* на всхожесть семян томата в зараженной *Fusarium oxysporum*.
- 5) Приобретены предпосылки для создания эффективного метода микробиологической защиты растений от фузариозного увядания.

Заключение

Важным звеном в технологии возделывания томата, хлопчатника, пшеницы и других сельскохозяйственных культур является защита их от бактериальных и грибных заболеваний, значительно снижающих урожайность, и наносящих большой ущерб экономике сельского хозяйства. Поэтому вопросы разработки эффективных средств борьбы с фитопатогенными микроорганизмами постоянно находятся в центре внимания науки и производства. Массовое применение пестицидов нарушило экологическое равновесие в природе, привело к увеличению химических веществ в пищевых продуктах и в самой окружающей среде, а также является причиной появления новых, устойчивых к пестицидам, более агрессивных форм фитопатогенов. В этой связи, в настоящее время внимание ученых направлено на поиск эффективных биологических методов борьбы с фитопатогенами.

Основным препятствием к созданию экологически чистых биопрепаратов является недостаток знаний о биологии как возбудителей болезней, так и микробов – антагонистов, а также природы их взаимоотношений. Несмотря на значительные успехи в описании отдельных механизмов антагонистической активности микроорганизмов, глубокие биологические основы данного процесса требуют более детального изучения. Поэтому, проведение исследований в данном направлении является актуальной научной задачей для решения практических проблем защиты растений от фитопатогенов

Список использованной литературы

1. Каримов И.А. Мировой финансово-экономический кризис, пути и меры по его преодолению в условиях Узбекистана./ г.Ташкент, «Узбекистан», 2009 с 57-61
2. Каримов И.А. Узбекистан на пороге достижения независимости г.Ташкент, «Узбекистан» 2011 с 26
3. Андреева Е.И. Бактериозы сельскохозяйственных культур / Е.И. Андреева, Т.С. Пронченко. -М., 1982. - 26 с.
4. Анисимов А.И. Биологическая защита растений в органическом земледелии / А.И. Анисимов, О.В, Смирнов, С.А. Доброхотов // - 2009. - №2. -С. 33 - 36.
5. Бактериальные болезни растений / под.ред. М.В. Горленко. - М., 1981. - 287 с.
6. Барайщук Г.В. Вредители и болезни культур защищенного грунта / Г.В. барайщук, Н.Б. Юдкина. - Омск, 1995. - 73 с.
7. Биггс Т. Овощные культуры / Т. Биггс. - М., 1990. - 200 с.
8. Биологические методы защиты растений от вирусных и бактериальных заболеваний Защита растений /под ред. К.В. Новожилова. - Д., 1986. - 75с.
9. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / под. ред. П.А. Кожевича. - М., 2008. - 296 с.
10. Блинова З.П. Болезни и вредители томатов / З.П. Блинова // Защита растений. -1994. - №12. - С. 21 - 23.
11. Бондаренко Н.В. Биологическая защита растений / Н.В. Бондаренко. - М., 1986.-278 с.
12. Бочкарев С.В. Внимание - серая гниль / С.В. Бочкарев // Интегрированная защита растений и элементы технологии в тепличных комбинатах Российской Федерации: Объединенный сборник докладов III и IV

Всероссийских семинаров повышения квалификации специалистов защиты растений и агрономов-технологов. - М., 2003. - С. 41 - 46.

13. Бочкарев С.В. Роль препаратов серии «Нарцисс» в защите тепличных культур / С.В. Бочкарев // Интегрированная защита растений и элементы технологии в тепличных комбинатах Российской Федерации: Объединенный сборник докладов III и IV Всероссийских семинаров повышения квалификации специалистов защиты растений и агрономов-технологов. - М., 2003. - С. 17 - 34.

14. Бочкарев С.В. Эффективная защита от серой гнили / С.В. Бочкарев // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2006. - №4. - С. 43 - 45.

15. Боярский Н.М. Удобрения XXI века: применение в защищенном грунте / Н.М. Боярский // Гавриш. - 2009. - №1. - С. 17.

16. Будыков Н.И. Серая гниль томата защищенного грунта и меры борьбы с ней / Н.И. Будыков, Е.Ф. Никифорова, В.Н. Юваров // Гавриш. - 2000. - №1. - С. 12-14.

17. Буклагина Г.В. Капельное орошение в защищенном грунте / Г.В. Буклагина // Инженерно-техническое обеспечение АПК. - 2001. - №2. - С. 414.

18. Гавриш С. Ф. Томаты /С.Ф. Гавриш. - М., 2003. - 184 с.

19. Гораль В.М. Интегрированная защита тепличных культур / В.М. Гораль, Н.В. Лапа // Защита растений. - 1995. - №2. - С.6.

20. Григоров М.С. Томаты в защищенном грунте / М.С. Григоров, Л. Е. Шмакова // Главный агроном. - 2009. - №3. - С. 43 - 47.

21. Гринько Н.Н. Физиологическое и фузариозное увядание томатов в малообъемной гидропонике / Н.Н. Гринько // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2007. - №3. - С. 39 - 40.

22. Гринько Н.Н. Экологические аспекты биологической защиты огурца в защищенном грунте. Использование микроорганизмов-антагонистов для борьбы с болезнями / Н.Н. Гринько, Г.Д. Успенская // Овощеводство защищенного грунта. - 1992. - №6. - С. 161 - 166.

23. Джалилов Ф.Ф. Бактериальные болезни томатов / Ф.Ф. Джалилов // Мир теплиц. - 2000. - №8. - С. 63.

24. Еаи Ронен Вершинная гниль томата и перца - причины поражения и профилактика / Ронен Еаи // Гавриш. - 2006. - №6. - С. 29-33.
25. Журек Б. Антагонистическое действие сапротрофных бактерий против патогенных грибов рода *Fusarium* на томатах. Автореф. дисс. - С.-П., 1991. - 16 с.
26. Заринов Р.Г. Продуктивность гибридов томата для зимних теплиц / Р.Г. Заринов, А.Р. Шайхисламова // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2006.- №Ю.-С. 18.
27. Защита растений /под ред. В.А. Шкаликova. - М., 2004. - 245 с.
28. Защита растений от болезней в теплицах (справочник) / под ред. А.К. Ахатов. - М., 2002. - 463 с.
29. Игнатова С.И. Особенности выращивания гибридов F1 Болеро и F1 Рамзай / С.И. Игнатова, А.В. Ситников, А.В. Корнилов // теплицы России. - 2007. - №1.-С. 30-31.
30. Ижевский С.С. Словарь по биологической защите растений / С.С. Ижевский, В.В. Гулий. - М., 1986. - 222 с.
31. Изотова Т.Е. Биологическая защита растений / Т.Е. Изотова. — Казань, 1987.-75 с.
32. Интегрированная защита растений от вредителей и болезней / под ред. Н.Г. Берим.-Л., 1985.-80 с.
33. Казачко И.А. Эндofитные бактерии рода *Bacillus* - перспективные культуры для создания биологических средств защиты растений / И. А. Казачко, В.А. Вьюницкая, Т.Г. Бережницкая // Микробиологический журнал. - 1995. - №5. - С. 69 - 78.
34. Кантемиров Р.Ф. Организационно-экономические аспекты производства экологической сельскохозяйственной продукции в мире. Автореферат диссертации кандидата экономических наук, М., 2007. - 23 с.
35. Кипрушкина Е.И. Товарное качество и безопасность растительной продукции при применении биологических средств защиты / Е.И. Кипрушкина, В.С. Колодезная, В.К. Чеботарь // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2006. - №2. - С. 8 -10.

36. Клечковский Ю.Э. Значимость биологической защиты растений неоспорима / Ю.Э. Клечковский, Л.Г. Титов, Я.Б. Мордкович // Защита и карантин растений. - 2008. - №11. - С. 46 - 47.
37. Климова Е.В. Биологическая защита растений как фактор оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. - 2001. - №3. - С. 655.
38. Климова Е.В. Использование биопрепарата на основе *Bacillus subtilis* 494 в борьбе с болезнями огурцов и томатов в защищенном грунте / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. - 2002. - №1. - С. 149.
39. Климова Е.В. Исследование производства и применения в защите растений биологических препаратов / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. - 2004. - №3. - С. 697.
40. Климова Е.В. Оценка биологических препаратов в отношении фитопатогенных грибов *Didymella arplanata* и *Botrytis cinerea* / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. - 2004. - №2. - С. 433.
41. Климова Е.В. Состояние, проблемы и перспективы биологической защиты растений от вредителей / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. - 2001. - №3. - С. 753.
42. Князева Т.П. Томаты защищенного грунта / Т.П. Князева. - М., 2001. - 31 с.
43. Коваленков В.Т. Курс - на биометод / В.Т. Коваленков, Д.А. Глушко, В.В. Плотникова // Защита и карантин растений. - 2007. - №6. - С. 20 - 23.
44. Кокорева В.А. Биологический метод защиты растений в защищенном грунте / В.А. Кокорева // Картофель и овощи. - 2006. - №11. - С. 22 - 24.
45. Комарова М.С. Болезни огурца и томата в защищенном грунте / М.С. Комарова // НТИ и рынок. - 1997. - №2. - С. 17 - 20.
46. Король В. Г. Новое в овощеводстве защищенного грунта / В.Г. Король // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2006. - №9. - С. 2 - 6.
47. Король В.Г. Технология выращивания рассады томатов для зимне-весеннего оборота / В.Г. Король // Картофель и овощи. - 1995. - №5. - С. 27 - 29.

48. Корсак И.В. Испытание биопрепаратов против корневых гнилей огурца в защищенном грунте / И.В. Корсак, Н.Н. Сенаторова // Известия ТСХА. - 2010.-№3.-С. 115-122.
49. Костылев Д. Выращивание томата в теплице на грунтрре / Д. Костылев // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2008. - №6. - С. 17-21.
50. Кошникович В.И. Болезни томатов: видовой состав / В.И. Кошникович. - Новосибирск, 2008. - 198 с.
51. Крупатина Р.И. Выращивание томатов в тепличном комбинате ОАО Тепличный комбинат «Рудаково» / Р.И. Крупатина // Гавриш. - 2006. - №1. - С. 20-21.
52. Кузнецов Ю. В. Интенсивное потребление питательных веществ при разных приемах возделывания томатов / Ю.В. Кузнецов // Плодородие. - 2008.-№2.-С. 32-33.
53. Лебедев А.В. Новая форма биологического препарата для защиты растений на основе бактерий рода *Pseudomonas fluorescens* / А.В. Лебедев, В.И. Ащеулов, Н.П. Мышенков, О.Б. Горюнова, М.С. Стрельникова, Н.С. Марквичев, К.О. Костылев // Гавриш. - 2009. - №5. - С. 9 - 10.
54. Литвинов Б.В. Оптимальное питание рассады / Б.В. Литвинова // Картофель и овощи. - 2006. - №8. - С. 22.
55. Лоладзе З.П. В поисках альтернативных средств обеззараживания почвы / З.П. Лоладзе, М.А. Матиашвили, М.Ш. Парцвания // Защита и карантин растений. - 2005. - №12. - С. 30 - 31.
56. Луценко Н. Е. Перспективы выращивания томатов на закрытом грунте по технологии малообъемной гидропоники / Н.Е. Луценко // Научный журнал КубГАУ. - 2005. - №2(10). - С. 3.
57. Мартынова Г.П. Биотехнология защита растений / Г.П. Мартынова, Ф.Л. Гуцин // Защита растений. - 1994. - №12. - С. 16.
58. Мартынова И. П. Биопрепараты в защищенном грунте / И.П. Мартынова // Экологическая безопасность в АПК. - 2000. - №1. - С.23.
59. Мдивани Р.В. Вершинная гниль плодов / Р.В. Мдивани// Защита и карантин растений. - 1999. - №4. - С. 31.

60. Мдивани Р.В. Смешанные инфекции сельскохозяйственных растений / Р.В. Мдивани // Аграрная наука. -2005. -№11.-С. 9 -11.
61. Менликиев М.Я. Экологизация защиты растений / М.Я. Менликиев, А.А. Сахибгареев. - Екатеринбург, 2008. - С. 83 - 89.
62. Менчер Э.М. Биологическая защита растений: новые методические подходы / Э.М. Менчер, М.П. Тешлер. - Кишинев, 1991. - 64 с.
63. Методы идентификации фитопатогенных грибов / Метод, указания. - М., 1984.-32 с.
64. Миронова Э.В. Биопрепараты при возделывании томатов / Э.В. Миронова, Г.С. Марьин // Защита и карантин растений. - 2008. - №2. - С. 47.
65. Монастырский О.А. Нужны ли биопрепараты и биологическая защита растений сельскому хозяйству / О. А. Монастырский // Агро XXI. - 2006. - №4-6.-С. 14-17.
66. Монастырский О.А. Современные проблемы и решения создания биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей болезней / О.А. Монастырский, Т.В. Першакова // Агро XXI. - 2009. - №7-9.- С. 3-5.
67. Монастырский О.А. Состояние и перспективы развития биологической защиты растений в России / О.А. Монастырский // Защита и карантин растений. - 2008. - №12. - С. 41 - 44.
68. Мотов В.М. Агротехника томата в пленочной теплице / В.М. Мотов // Интегрированная защита растений и элементы технологии в тепличных комбинатах Российской Федерации: Объединенный сборник докладов III и IV Всероссийских семинаров повышения квалификации специалистов защиты растений и агрономов-технологов. - М., 2003. - С. 131 - 138.
69. Нагайцев А.С. Мир томатов / А.С. Нагайцев // Новый садовод и фермер. - 1998.- №5.- С.38-39.
70. Надыкта В.Д. Биозащита растений / В.Д. Надыкта, В.Я. Исмаилов, В.Г. Коваленков // Защита и карантин растений. - 1999. - №12. - С. 21 - 23.
71. Надыкта В.Д. Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистемы /В.Д. Надыкта // Технология создания биологических средств защиты растений на основе энтомофагов, энтомопатогенов, микробов-антагонистов и применения их в открытом и закрытом грунте:

международная научно-практическая конференция. - Краснодар, 2006. - 503 с.

72. Надыкта В.Д. Биологическая защита растений / В.Д. Надыкта. - Краснодар/ 2004.-238 с.

73. Надыкта В.Д. Роль биологической защиты растений в управлении процессами фитосанитарного оздоровления агроценозов / В.Д. Надыкта. - Краснодар, 2008. - С. 52 - 56.

74. Овощеводство / под ред. Г.И. Тараканова, В.Д. Мухина. - М., 2002. - 352 с.

75. Овощеводство защищенного грунта / под ред. В.А. Брызгалова. - М., 1995. -352 с.

76. Определитель бактерий Берджи. Т. 1 / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита. - М., 1997. - 432 с.

77. Основные методы диагностики фитопатогенных бактерий / под ред. Е.В. Матвеевой, Е.С. Семигоновой, Э.Ш. Пехтеревой. - М., 1990. - 50 с.

78. Полякова Е.В. Эффективность биопрепаратов на рассадных томатах / Е.В. Полякова // Картофель и овощи. - 2007. - №5. - С. 17 - 18.

79. Помазков Ю.И. Биологическая защита растения / Ю.И. Помазков, В.Г. Заец.-М., 1998.-75 с.

80. Попов Н;А. Защита томатов в Молдавии / Н.А. Попов, Е.Ф. Соловей, Д.С. Елисовецкая, Н.В. Рэйляну // Защита и карантин растений. - 2008. - №5. - С. 29 - 30.

81. Прищепа И.А. Основные бактериальные болезни огурца и томата защищенного грунта / И.А. Прищепа, В.В. Вабищевич. - Несвиж, 2008. - 50 с.

82. Романенко Н.Д. Разработка научных основ экологически безопасного производства посадочного материала земляники садовой / Н.Д. Романенко, Б.В. Буров // Тез. доклад Научно-практическое совещание «Паразитарное загрязнение мегаполиса Москвы». - 1994. - С. 12.

83. Романенко Н.Д. паразито-хозяйинные взаимоотношения микробных консорбентов агроценоза, как основа стратегии его защиты / Н.Д. Романенко. - М., 2004. - С. 152 - 170.

84. Романенко Н.Д. Перспективы использования бактерий-антагонистов против наиболее фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов / Н.Д. Романенко, И.О. Попов, С.Б. Таболин, Е.Н. Бугаева, В.Г. Заец // *Агро XXI*. - 2008.-№1-3.-С. 23-25.
85. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas* / Рубан Е.Л.-М., 1986.-200 с. ,
86. Рудаков В. О. Возможности биометода при производстве овощей в защищенном грунте / В.О. Рудаков, Г.Н. Гушенная // *Агро XXI*. - 2008. - №1-3.-С. 20-22.
87. Рудаков В.О. Биологические препараты компании ООО «Агробιοтехнология» в защите тепличных культур против комплекса патогенов / В.О. Рудаков, Н.В. Березина // *Интегрированная защита растений и элементы технологии в тепличных комбинатах Российской Федерации: Объединенный сборник докладов III и IV Всероссийских семинаров повышения квалификации специалистов защиты растений и агрономов-технологов*. -М., 2003. - С. 139 - 143.
88. Рудаков О.Л. Защита овощных культур закрытого грунта от корневых гнилей и болезней увядания / О. Л. Рудаков // *Защита и карантин растений*. - 2000.-№10.-С. 27-29.
89. Рудаков О.Л. Пособие по фитопатологии для закрытого грунта / О. Л. Рудаков, В.О. Олейник, В.О. Рудаков -М., 2001. - 143 с.
90. Сергеева М.Е. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении возбудителей бактериозов овощных культур / М.Е. Сергеева, И.И. Новиков. - М., 1994. - 91 с.
91. Система биологической защиты овощных культур от вредителей и болезней в теплицах / под ред. В.А Павлюшиной. - С.-П., 2001. - 71 с.
92. Скоблина В.И. Агросфера в XXI веке / В.И. Скоблина // *Экологическая безопасность в АПК*. - 2000. - №4. - С. 985.
93. Скоблина В.И. Действие фиторегуляторов на рост, развитие, урожайность и качество плодов томата в защищенном грунте / В.И. Скоблина / *А Экологическая безопасность в АПК*. - 2003. - №2. - С. 329.

94. Скоблина В.И. Применение препаратов серии «Нарцисс» в защищенном грунте / В.И. Скоблина // Экологическая безопасность в АПК. - 2002. - №2. - С.455.
95. Смирнов А.Н. Фитофтороз томата / А.Н. Смирнов, С.А. Кузнецов // Защита и карантин растений. - 2006. - №3. - С. 20 - 23.
96. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* - продуценты новых антибиотиков. Механизмы биосинтеза антибиотиков / В.В. Смирнов, Е.А. Киприянова. -М., 1986. - С. 149-161.
97. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприянова. - Киев, 1990. — 264 с.
98. Соколова М.Г. Бактериальные биопрепараты и их влияние на урожай томатов и картофеля / М.Г. Соколова, Г.П. Акимова, А.В. Рудиковский, А.К. Глянько, О.Б. Вайшля // Плодородие. - 2008. - №1. - С. 26 - 27.
99. Соколова М.Г. Эффективность внесения бактериальных препаратов под овощные культуры / М.Г. Соколова, Г.П. Акимова, И.И. Сотникова, Л.В. Нечаева // Сибирский вестник с.-х. науки. - 2009. - №1. - С. 25 - 29.
100. Соломин А.В. ОАО «Типличный»: сквозь трудности к обновлению / А.В. Соломин. - Калуга, 2004. - 190 с.
101. Степанов В.В. Современные биотехнологии в сельском хозяйстве / В.В. Степанов // Агро-Информ. - 2004. - №10-11. - С. 33-34.
102. Суркова Т.А. И защищенному грунту нужна защита / Т.А. Суркова // Защита и карантин. - 1997. - №9. - С. 14 -16.
- ЮЗ.Сусидко П.И. Проблемы защиты растений и охрана окружающей среды / П.И. Сусидко. - М., 1992. 40 с.
104. Твердюков А.П. Биологические методы борьбы с вредителями и болезнями в закрытом грунте (справочник) / А.П. Твердюков, П.В. Никонов, Н.П. Ющенко. - М., 1993. - 157 с.
105. Тимофеев А.Н. Болезни томатов / А.Н. Тимофеев, Р.А. Плюскина // Защита растений. - 1994. - №7. - С.14.
106. Тихвинская Г.П. Элементы технологии выращивания томатов в малообъемной культуре / Г.П. Тихвинская // Теплицы России. - 2005. - №3. - С. 31-34.

107. Ткачева Л.Б. Производство и применение биологических средств защиты растений в России / Л.Б. Ткачева // Агро XXI. - 1999. - №12. - С. 21-23.
108. Толмачева В.А. Особенности выращивания рассады на цеолитах/ В.А. Толмачева, Н.Н. Яковлева // Гавриш. - 1998. - №3. - С. 13 - 14.
109. Трусевич А.В. Бактериальные болезни томата в теплице / А.В. Трусевич // Защита и карантин растений. - 2002. - №11. - С. 19-20.
- ПО.Трусевич А.В. Использование препаратов серии «Нарцисс» для защиты томата от комплекса болезней в теплице / А.В. Трусевич // Гавриш. - 2005. - №5.-С. 20-24.
111. Трусевич А.В. Серая гниль томата / А.В. Трусевич // Гавриш. - 2000. - №3. -С. 18-20.
112. Тютюрев С. Л. Неинфекционные болезни растений / С.Л. Тютюрев. - СПб., 2000.-27 с.
113. Урбанский Б. Эффективная технология возделывания томатов / Б. Урбанский // Инженерно-техническое обеспечение АПК. - 2000. - №1. - С. 196.
114. Ущекон А.Т. Пасленовый минер и его паразиты / А.Т. Ущекон // Защита и карантин растений. - 2002. - №11. - С. 17-19.
115. Федоров А.В. Влияние элементов технологии на урожайность томата в зимне-весеннем обороте/ А.В. Федоров, В.М. Мерзлякова // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2005. - №1. — С. 33-35.
116. Фоминых Т.С. Вирусные болезни овощных культур защищенного грунта / Т.С. Фоминых // Овощеводство и тепличное хозяйство. - 2005. - №6. - С. 23 - 29.
117. Ханемаайер Я. Режимы питания томата / Я. Ханемаайер // мир теплиц. - 2007.-№3.-С. 27-30.
118. Холодецкий М. Питание томатов/ М. Холодецкий // Мир теплиц. - 2007. - №7.-С. 33 -36.
119. Хохряков М.К. Определитель болезней растений. Ч.3. Болезни корневлукбнеплодных культур и томатов / М.К. Хохряков. - Омск, 1995. - 324 с.

120. Чикин Ю.А. Внутривидовая дифференциация фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* Pers. в локальных популяциях. Автореф. Дисс. - М., 1997. - 17с.
121. Чичхиане Н.Р. Разработка комплексных мер борьбы с грибными болезнями и сорняками в посадках томатов в условиях Абхазии, автореф. дисс. - Тбилиси, 1990.-24с.
122. Чураков Б.П. Фитопатология / Б.П. Чураков. - Ульяновск, 2004. - 403 с.
123. Шмыгля В.А. Основы биологической защиты растений от болезней / В.А. Шмыгля, С.А. Петриченко. - М., 1993. - 38 с.
124. Штерншис М.В. Биологическая защита растений / М.В. Штерншис, Ф.С.-У. Джаликов, И.В. Андреева и др. - М., 2004. - 263 с.
125. Штерншис М.В. Биотехнология в защите растений / М.В. Штерншис, О.Г. Томилова, И.В. Андреева. - Новосибирск, 2001. - 154 с.
126. Штерншис М.В. Роль и возможности биологической защиты растений / М.В. Штерншис // Защита и карантин растений. - 2006. - №6. - С. 14 -17.
127. Шуваев Ю.Н. Ранние овощи из теплиц / Ю.Н. Шуваев. - М., 2001. - 414 с.
128. Яркулов Ф.Я. Борьба с болезнями овощных культур в теплицах / Ф.Я., Яркулов // Защита и карантин растений. - 1999. - №6. - С. 25.