НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

М.В. Штерншис, А.А. Беляев, В.П. Цветкова, Т.В.Шпатова,
А.А. Леляк, С.А. Бахвалов

БИОПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ЗДОРОВЬЕМ РАСТЕНИЙ

НОВОСИБИРСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
2016

УДК 632.937:579.26

Рекомендовано к печати Ученым советом Новосибирского государственного аграрного университета

Рецензенты:

Доктор биологических наук Л.А. Осинцева

Доктор биологических наук И.Г. Воробьева

Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-16-00101)

В монографии изложены результаты исследований, проведенных в регионе Западной Сибири, климатические условия которого определяют достаточно сильное влияние абиотических факторов на взаимодействия в системе триотрофа (растение – повреждающий организм – полезная бактерия). Результаты многолетней работы коллектива авторов обсуждены в рамках концепции управления здоровьем растений в контексте с данными отечественных и зарубежных авторов. Основное внимание уделено возможностям разработки и использования полифункциональных биопрепаратов на основе антагонистических и энтомопатогенных бактерий рода *Bacillus*, в максимальной степени отвечающим концепции управления здоровьем растений.

Книга предназначена для широкого круга читателей - специалистов в области биотехнологии, защиты растений и экологии, а также на преподавателей и студентов вузов биологического и сельскохозяйственного профиля.

ВВЕДЕНИЕ

Микробные препараты, основой которых являются природные микроорганизмы, включая бактерии рода *Bacillus*, многие годы производятся во всем мире и используются в рамках интегрированной защиты растений для микробиологического контроля вредных организмов, повреждающих растения. В XXI веке в литературе все чаще в качестве синонима «интегрированная защита растений» стали употреблять термин «управление здоровьем растений» [Cook, 2000; Sharma, Singh, 2007; Berg, 2009]. В то же время некоторые авторы указывали на отличие этих двух понятий, например, по мнению Р. Кука [Cook, 2000], последнему термину более всего соответствует биологический контроль болезней растений, включая индукцию болезнеустойчивости. В настоящее время под управлением здоровьем растений подразумевают биологический контроль повреждающих их болезней и вредителей, связанные с этим эффекты колонизации корневой системы и надземной части растений микробными агентами биоконтроля, последующее усиление роста и развития растений, индукцию системной устойчивости, повышение сопротивляемости растений неблагоприятному влиянию абиотических факторов, усилению поглощения из почвы питательных веществ (микро- и макро-нутриентов), что в конечном счете ведет к увеличению продуктивности культур [Aroca, Ruiz-Lozanni, 2009; Yang et al., 2009; Verma et al., 2010]. Управление здоровьем растений предполагает знание факторов, влияющих на вредителей, болезни и физиологию растений, что зависит от их вида или сорта, а также от климатических особенностей региона произрастания. Понимание и преодоление негативного влияния биотических и абиотических факторов, лимитирующих растение в плане полной реализации его генетического потенциала, отвечает требованиям управления здоровьем растений. При этом биологический контроль фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-фитофагов является наиболее значимым подходом к управлению здоровьем

растений, способным учитывать влияние факторов окружающей среды при сохранении биоразнообразия в экосистемах.

Во всем мире, в том числе в России, в последние годы усилились исследования по разработке биологических препаратов на основе таких природных полезных организмов как бактерии рода *Bacillus.* Изучены, например, многочисленные штаммы *B. subtilis,* отличающиеся природным источником выделения и географическим происхождением [Пашкевич, 2009]. Важна селекция выделенных из природы полезных штаммов и дальнейшие исследования по выявлению оптимальных условий их культивирования для получения препаративных форм биопестицидов. Биологические препараты на основе полезных бацилл для защиты растений от вредителей и болезней являются экологически безопасной альтернативой химическим (синтетическим) пестицидам. Однако в сельском и лесном хозяйстве замещение химических пестицидов биопрепаратами для улучшения здоровья растений происходит не столь быстрыми темпами, как можно было бы ожидать. В частности, это связано с тем, что производителям растениеводческой продукции импонирует скорость и более широкий спектр действия химикатов. С этой точки зрения следует искать подходы к усилению роли микробных агентов биоконтроля в управлении здоровьем растений. Резервом такого подхода являются исследования по расширению функций микроорганизмов, составляющих основу потенциальных биопрепаратов. В России на примере разработки биопрепаратов гамаир (*B. subtilis*, штамм М-22 ВИЗР) и алирин-Б (*B. subtilis*, штамм В-10 ВИЗР) предложена концепция создания полифункциональных препаратов комплексного действия с фунгицидной, бактерицидной и фиторегуляторной активностью [Новикова, 2005]. Другим аспектом проблемы полифункционального действия биопрепаратов явилась демонстрация проявления штаммом энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* одновременно инсектицидных и фунгицидных свойств наряду с ростостимулирующим эффектом [Гришечкина, Смирнов, 2010].

В развитие этих подходов вносят вклад исследования, показывающие, что при доминировании антагонизма одним штаммом бацилл дополнительно проявляются инсектицидные свойства, а в случае энтомопатогенных бактерий рода *Bacillu*s наблюдают одновременное подавление фитопатогенных микроорганизмов с учетом взаимодействий в системе триотрофа наряду с ростостимулирующим эффектом, а также способностью повышать устойчивость растений к действию факторов окружающей среды. При включении бацилл в качестве основы биопрепаратов в ризосферную или эпифитную микрофлору растений происходит определенная модификация окружающей среды, полезная как для здоровья растений, так и для здоровья животных и человека, потребляющих растительную пищу.

В настоящем издании представлены результаты исследований авторов по многофункциональному действию бактерий рода *Bacillus*, участвующим в управлении здоровьем растений. Приведены данные по взаимодействию растений с фитопатогенами и фитофагами как основными повреждающими факторами для растения, с одной стороны, и объектами для действия биопрепаратов на основе *Bacillus*, с другой стороны. Обращено внимание на проблемы, возникающие при создании бактериальных препаратов для управления здоровьем растений. Подчеркнуты такие аспекты как проявление ростостимулирующих и инсекто-фунгицидных свойств бацилл - основы биопрепаратов, их способность индуцировать устойчивость растений к биотическим и абиотическим факторам среды в зависимости от вида или сорта культуры. В целом, проанализированы и обобщены многолетние данные лабораторных и полевых экспериментов, проведенных в сибирских условиях, в контексте с публикациями отечественных и зарубежных ученых.

Г л а в а 1

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ, ФИТОПАТОГЕНАМИ, ФИТОФАГАМИ И ПОЛЕЗНЫМИ БАЦИЛЛАМИ

1.1. Влияние фитопатогенных организмов на растения

Круг известных фитопатогенов (более 40000 видов) включает разнообразные группы организмов. Доминируют по количеству фитопатогенных видов и хозяйственному значению грибы (царство *Mycota*) (более 80% возбудителей наиболее вредоносных болезней основных сельскохозяйственных культур). Существенное значение имеют также фитопатогенные бактерии (*Eubacteria*) и вирусы (*Vira*). Известны фитопатогены среди вироидов (*Viroids*), слизевиков (*Plasmodiophoromycota*), микоплазм (*Mollicutes*), актиномицетов (*Actinobacteria*), риккетсий (*Rickettsia*) и цветковых растений (*Magnoliophyta*).

Инфекционные болезни растений – это болезни, которые имеют причиной взаимодействие растения с болезнетворными микроорганизмами и для которых общим признаком является передача от зараженного организма к здоровому. Характерная особенность инфекционных болезней – обязательное наличие чужеродного болезнетворного организма, который развивается на поверхности или внутри растения, извлекает из его клеток питательные вещества и приводит растение к заболеванию. Такой организм называют паразитом. Соответственно, паразитизм – это форма взаимоотношений двух организмов, принадлежащих к разным видам и носящая антагонистический характер, при которой один организм (паразит) использует другого (хозяина) в качестве источника пищи и среды обитания [Фундаментальная фитопатология..., 2012].

Как известно, основными свойствами паразитического организма являются: хемотропизм – привлечение выделениями хозяина; агрессивность

– способность переходить на питание за счет хозяина; патогенность – способность вызывать болезнь хозяина, причинить вред [Гойман, 1954].

Микроорганизмы, использующие для питания мертвые органические вещества растительных и животных остатков называют сапротрофами. Если микроорганизм способен не только потреблять готовые мертвые органические вещества, но и убивать ещё живые, но ослабленные близлежащие клетки живых растений, выделяя токсины, а затем питаться этими мёртвыми тканями, такой организм является по образу жизни факультативным паразитом (а по способу питания некротрофом). К факультативным паразитам относятся, например, возбудители ризоктониоза картофеля, фузариоза малины, серой гнили и другие. Ряд микроорганизмов ведут паразитический образ жизни, но в определённых условиях могут развиваться и на мёртвом органическом субстрате. Их по образу жизни характеризуют как факультативных сапротрофов или полупаразитов, по способу питания они являются гемибиотрофами [Фундаментальная фитопатология..., 2012]. К этой группе, в частности, относятся возбудители антракноза и септориза смородины и крыжовника, рамуляриоза земляники, пурпуровой пятнистости малины. Паразиты, которые могут питаться исключительно за счёт живого хозяина, называются облигатными (по способу питания – биотрофами). Гибель хозяина приводит к гибели и облигатного паразита. К облигатным паразитам относятся вирусы и микоплазмы растений, грибы-возбудители ржавчины, настоящей и ложной мучнистой росы.

Фитопатогенные микроорганизмы характеризуются специализацией – способностью заражать определённый круг растений, вследствие приуроченности к ним как питательному субстрату. Растение-хозяин, во-первых, должно содержать питательные вещества в форме, доступной для метаболизма патогена; во-вторых, в растении-хозяине должны отсутствовать токсичные для патогена соединения, которые он не смог бы нейтрализовать.

Фитопатогены могут быть монофагами или полифагами, то есть быть приуроченными к определённой таксономической принадлежности хозяев – семействам, порядкам, классам (филогенетическая специализация); более узкая специализация – к определенным родам, видам и сортам рассматривается как физиологическая специализация (фитопатоген при этом внутри вида дифференцируется на специализированные формы, расы, биотипы и штаммы). Кроме того, фитопатогены могут быть приурочены к поражению растений в определённый период их развития (онтогенетическая или возрастно-физиологическая специализация), или к поражению определенных органов (органотропная специализация) или тканей (гистотропная специализация) [Шкаликов и др., 2005; Фундаментальная фитопатология..., 2012].

Наряду с инфекционными заболеваниями растения поражаются множеством неинфекционных болезней, которые имеют чрезвычайно разнообразную природу. Неинфекционными фитопатогенными факторами могут быть температурные колебания, засуха, избыточное увлажнение, дефициты питательных веществ, засоленность почвы и др. При воздействии на растение неблагоприятных факторов (стрессоров) в нем возникает напряженное состояние, отклонение от нормы – стресс. Стресс – это общая неспецифическая адаптационная реакция организма на действие любых неблагоприятных факторов. Выделяют три основные группы факторов, вызывающих стресс у растений: физические — недостаточная или избыточная влажность, освещенность, температура, радиоактивное излучение, механические воздействия; химические – соли, газы, ксенобиотики (гербициды, инсектициды, фунгициды, промышленные отходы и др.); биологические – поражение возбудителями болезней или вредителями, конкуренция с другими растениями, влияние животных, цветение, созревание плодов [Чиркова, 2002].

Различные стрессоры вызывают у растений общие изменения процессов обмена веществ:

– торможение синтеза гормонов роста и усиление образования ингибиторов;

– подавление энергетических процессов;

– нарушение функционирования мембран, увеличение их проницаемости, деполяризацию плазмалеммы;

– активацию синтеза специальных стрессовых белков на фоне общего снижения синтетических процессов;

– усиление процессов гидролиза и закисление цитоплазмы.

Если интенсивность действия стресс-факторов не превышает адаптивных возможностей растения, то умеренные, повторяющиеся стрессы способствуют закаливанию организма. Наоборот, превышение в интенсивности и/или продолжительности воздействия стресс-факторов генетически обусловленных границ адаптации растений приводит к немедленной гибели организма растения, либо к развитию в организме патологических процессов [Шпаар и др., 2004]. Кроме того, последствия стрессового воздействия могут остаться в растении в латентном состоянии и оказать влияние на формирование его устойчивости к другим абиотическим стрессам или инфекционным заболеваниям. В этом отношении следует принимать во внимание роль стресс-факторов в формировании предрасположенности растений к инфекционным заболеваниям, и, с другой стороны, существенное значение сопряженности инфекционных заболеваний растений с неинфекционными стрессами и патологиями [Шкаликов и др., 2005].

Предрасположенность растений к заражению более четко проявляется по отношению к факультативным паразитам и факультативным сапротрофам, чем к облигатным паразитам. Предрасположенность к заболеванию возникает ещё до заражения фитопатогеном и затем отражается на уровне устойчивости растения в процессе фактического взаимодействия с фитопатогенным организмом. Она может быть обусловлена как генетическими факторами (отсутствие генов устойчивости), так и

невозможностью или недостаточной реализацией генетического потенциала устойчивости, вследствие действия внешних стрессовых и патологических факторов.

Согласно сложившимся представлениям, у растений различают два основных типа иммунитета: врожденный (естественный, конституциональный) и приобретенный (искусственный). Врожденный иммунитет обусловлен факторами, действующими до заражения растения (пассивный иммунитет) и факторами, действующими в ответ на заражение (активный иммунитет). Приобретенный (или индуцированный) иммунитет возникает без изменения генома растения в результате перенесенного заболевания (инфекционный приобретенный иммунитет) или под влиянием внешних факторов, не связанных с данным возбудителем – абиотических и биотических индукторов (элиситоров), вызывающих фенотипическую иммунокоррекцию на основе изменения уровня экспрессии защитных генов растения [Шапиро и др., 1986; Озерецковская, 1994, 2002; Озерецковская, Васюкова, 2002; Тютерев, 2005; Шкаликов и др., 2005].

К пассивному иммунитету относится, в частности, система анатомо-морфологических барьеров, включающая такие факторы как габитус растения, наличие на поверхности органов волосков опушения, воскового и кутикулярного слоя, пробкового слоя, биохимические барьеры (химический состав тканей, наличие фитонцидов, алкалоидов, гликозидов), недоступность и пищевая неполноценность основных биополимеров растения, несоответствие ростовых процессов растения ритму развития вредного организмов и другие. К пассивному иммунитету относятся также компенсаторные реакции, обеспечивающие восстановление нарушенных функций, при сохранении благоприятных условий для развития вредного организма [Вилкова, Шапиро, 1984; Шапиро и др., 1986; Шкаликов и др., 2005].

Учитывая существенную роль экологических факторов в формировании предрасположенности растений к болезням необходимо

целенаправленно формировать условия выращивания культурных растений, в которых происходит реализация генетического адаптивного потенциала устойчивости как к абиотическим, так и биотическим стрессам и патологиям, в том числе при помощи экологически безопасных средств путем воздействия на растения и среду их обитания биоагентами, обладающими полифункциональными свойствами.

С учетом обсуждения в последующих главах результатов наших исследований, касающихся подходов к биологическому контролю болезней растений на примере ягодных культур и картофеля, рассмотрим взаимодействие растений с основными фитопатогенными грибами, вызывающими болезни смородины, крыжовника, малины, земляники и картофеля.

Септориоз смородины и крыжовника (возбудитель – гриб *Septoria ribis* (Lib.) Desm., половая стадия *Mycosphaerella ribis* (Fuckel) Lindau (Ascomycota, *Mycosphaerellaceae*)

Симптомы и вредоносность. Возбудитель заражает крыжовник, черную, красную, белую смородину. На листьях в нижнем ярусе куста пятна появляются обычно в конце июня – начале июля, имеют светлую окраску, 2-3 мм в диаметре, расположены с обеих сторон листа и окружены неширокой бурой каймой. С верхней стороны листа в центре пятна располагаются немногочисленные черные пикниды в виде точек. В верхнем ярусе куста пятна бывают коричневые, мелкие, окруженные более широкой бурой каймой. На ягодах пятна единичные, вдавленные, бурого цвета, впоследствии растрескиваются. Наибольший вред от болезни проявляется в снижении продуктивности и зимостойкости кустов из-за массового преждевременного листопада в июле-августе. Снижение урожая ягод может достигать 40-50% [Беляев и др., 2013].

Биологическое описание. Пикниды коричневатые, в диаметре 100-120 мкм, приплюснуто-округлой формы. Образуются преимущественно с верхней стороны листа, а также на пораженных ягодах. Пикноспоры,

размером 28-60×1,5-2,6 мкм, нитевидные, бесцветные, изогнутые, с 2-4 перегородками. В течение вегетации возбудитель распространяется пикноспорами воздушно-капельным путём.

Возбудитель зимует на опавших больных листьях и ягодах незрелыми псевдотециями. Псевдотеции имеют размеры до 100 мкм, созревают в мае-июне, формируя и рассеивая бесцветные, двуклеточные сумкоспоры, размером 26-35×3-3,5 мкм.

Факторы, способствующие развитию болезни

1. Повышенная влажность воздуха и почвы.
2. Загущенность насаждений.
3. Зимние, весенние (от резких перепадов t°) и летние (из-за засухи) стрессы растений.
4. Нарушения агротехники при обработке почвы.

Антракноз смородины (возбудитель – гриб *Gloeosporium ribis* (Lib.) Mont. et Desm., сумчатая стадия *Pseudopeziza ribis* Kleb. (Ascomycota, *Dermateaceae*))

Симптомы и вредоносность. Возбудитель узко специализирован к черной, красной смородине и крыжовнику.

Болезнь поражает преимущественно листья, особенно нижнего и среднего ярусов, намного реже – черешки, ягоды, плодоножки и зеленые побеги. На листьях в большом количестве образуются темно-бурые пятна, около 1 мм в диаметре, без окаймления. На поверхности пятна образуется черные, мелкие бугорки – плодоложа гриба. Ткань между пятнами желтеет, высыхает и лист преждевременно опадает.

На плодах пятна обычно одиночные, буроватые, со вздувшимся местом спороношения.

Массовый преждевременный листопад в июле-августе вследствие поражения антракнозом может приводить к вымерзанию 50% ветвей, снижению урожая на 30-75% в текущем и 50-80% в будущем году.

Биологическое описание.

Гриб зимует мицелием на опавших листьях в пораженных тканях. Апотеции образуются на опавших листьях весной. Сумки булавовидные, унитуникатные, сумкоспоры одноклеточные, бесцветные 12-17 × 7-8 мкм.

Конидии одноклеточные, бесцветные, серповидно изогнутые, размером 17,5-28,3 × 5,4-8,7 мкм. Инкубационный период составляет 6-15 суток. Возможно несколько генераций конидий вплоть до конца сентября.

Созревание аскоспор и их рассеивание приурочено к периоду цветения черной смородины. Аскоспоры и конидии в течение вегетации передаются на растения воздушно-капельным путем.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Повышенная влажность воздуха и почвы.
2. Загущенность насаждений.
3. Массовое развитие сорняков.
4. Нарушения агротехники при обработке почвы.

Фузариоз малины (возбудители – грибы рода *Fusarium,* в том числе виды *F. oxysporum* Schlecht*., F. avenaceum* (Fr.) Sacc*., F. sambucinum* Fuck., *F. sporotrichiella* Bilai*, F. culmorum* (Sm.) Sacc*., F. moniliforme* Shled*., F. argillaceum* (Fr.) Sacc*., F. semitectum var. majus* Wr., *F. lateritium* Nees*.,* и другие)

Симптомы и вредоносность. Фузариозная инфекция поражает однолетние побеги малины преимущественно в сопряженной форме, через повреждения тканей, вызванные питающимися в трещинах коры стеблей личинками малинной побеговой галлицы (*Resseliella theobaldi* Barn.). Грибная инфекция проявляется в виде разрастающихся пятен темной окраски. Места питания непосредственно под личинками, на сосудистом цилиндре слегка вдавлены и окрашены в темный, почти черный цвет. Через 2-3 недели вокруг некроза разрастается каллусный слой, на поверхности стебля образуются валики и вдавленности. Отмирают обширные участки

тканей внутри стебля. Вред проявляется в ломкости больных стеблей при укладке их на зиму, вымерзании, или усыхании весной и летом 2-го года вегетации.

Гибель побегов на плантации может достигать 30-80%, снижение урожая – в 5-6 раз.

Биологическое описание. Грибы рода *Fusarium* зимуют в стеблях малины в виде мицелия, микросклероциев, хламидоспор в коре и глубоких тканях стеблей. Успешно зимуют также на отмерших побегах и опавших листьях малины и других растений. Ряд видов может длительно сохраняться в почве. Передача инокулюма на стебли происходит воздушными течениями, главным образом, в пределах малинной плантации.

Поражение обычно обусловлено предварительным повреждением стеблей личинками малинной побеговой галлицей, которая откладывает яйца в трещины коры стеблей. Растрескивание коры резко усиливается после сильных морозов в предшествующем ноябре-декабре. В годы с холодной погодой в апреле-мае заболевание бывает мало вредоносным из-за замедленного, равномерного отрастания побегов и слабого их растрескивания. Ранняя, теплая весна и достаточное увлажнение плантации в июне, способствует бурному отрастанию однолетних побегов, массовому их растрескиванию (до 3-10 трещин на 1 побеге), раннему заселению галлицей, развитию глубокого фузариозного поражения и, как следствие, преждевременному отмиранию побегов до плодоношения.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Наличие трещин и повреждений коры побегов.
2. Низкие температуры в ноябре-декабре и ранняя, теплая весна.
3. Избыточное удобрение, вызывающее растрескивание коры.
4. Размещение малины на пониженных участках.

Пурпуровая пятнистость малины (возбудитель – гриб *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. (Ascomycota, *Didymellaceae*), анаморфа – *Phoma argillacea* (Bres.) Aa & Boerema)

Симптомы и вредоносность. Возбудитель поражает только малину, культурную и дикорастущую. Поражает все надземные вегетативные органы и корневище. На стеблях пятна буро-фиолетовой окраски, вытянутые вдоль стебля, в основном находятся в зоне 0-50 см от основания побега. В течение лета пятна увеличиваются, осенью становятся серебристо-серыми, покрываются черными точками (незрелыми псевдотециями). На листьях буро-коричневые пятна в нижнем ярусе куста на затененных, ослабленных листьях в августе-сентябре.

Недобор урожая достигает 25%, главным образом, вследствие поражения побегов.

Биологическое описание. Возбудитель зимует в коре стеблей в виде незрелых псевдотециев и мицелия на побегах. Формирует сумчатое спороношение в апреле-мае. Пикниды появляются во 2-й половине вегетации на пораженных листьях малины и в небольшом количестве на однолетних стеблях. Осенью пикниды разрушаются, а весной, в апреле-мае вновь в небольшом количестве формируются в коре двухлетних побегов и образуют пикноспоры, участвующие в первичном заражении наряду с аскоспорами до середины июля. Инкубационный период 20-25 дней.

Заражению благоприятствует влажная, теплая погода, наличие капельно-жидкой влаги на поверхности растений и разнообразные повреждения покровных тканей.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Повреждения коры побегов различной природы.
2. Загущение рядов вследствие нарушений в нормировании молодых и вырезке отплодоносивших побегов.
3. Размещение малины на сырых, плохо проветриваемых участках.

Серая гниль (ботритиоз) (возбудитель – гриб *Botrytis cinerea* Pers., телеоморфа *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Ascomycota, *Sclerotiniaceae*))

Симптомы и вредоносность. Возбудитель поражает многие культурные растения, из ягодных культур наибольший вред причиняет малине, землянике, винограду и черной смородине. Пораженные плоды покрываются серым, пылящим налетом спороношения возбудителя, становятся водянистыми, впоследствии усыхают и мумифицируются. В годы с сырой погодой в период плодоношения прямые потери урожая от серой гнили на землянике и малине могут достигать 50%. На малине через трещины и повреждения коры часто поражает молодые отрастающие побеги и вызывает их отмирание.

Биологическое описание. Гриб размножается преимущественно бесполым путем – конидиями. Спорообразование происходит на разнообразных растениях, на которых возбудитель питается.

Зимует на растительных остатках и в почве склероциями. Конидии в течение вегетации передаются воздушно-капельным путем.

Гриб нетребователен к температуре, для заражения растений и формирования спороношения пригоден интервал +5…+30ºС, оптимум +15…+20ºС. Более важен фактор увлажнения среды, особенно в сочетании с ослаблением устойчивости растения-хозяина. При этом имеет значение как локальная потеря устойчивости, отдельным органом (растрескивание тканей, механическое повреждение, повреждение насекомыми), так и общее ослабление растений.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Снижение устойчивости растений вследствие стрессов в период зимовки и во время вегетации.

2. Загущение рядов из-за нарушений в нормировании молодых и вырезке отплодоносивших побегов.

3. Сырые, плохо проветриваемые участки плантаций.

4. Задержки в сборах урожая и перезревание ягод.

Белая пятнистость земляники (возбудитель – гриб *Ramularia tulasnei* Sacc., телеоморфа *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau (Ascomycota, *Mycosphaerellaceae*))

Симптомы и вредоносность. Возбудитель болезни поражает только землянику и клубнику, культурную и дикорастущую.

Поражаются листья, черешки, цветоносы и плодоножки. Первоначально пятна имеют коричневую окраску, затем белеют и окружаются пурпуровой каймой. Со временем побелевшие ткани некроза могут выпадать. На листьях пятна обычно округлые, 1-3 мм в диаметре. На других органах – вытянутые продольно.

Вредоносность болезни обусловлена поражением до 70-80% листьев с отмиранием до половины листовой поверхности. Недобор урожая может достигать 15%.

Биологическое описание. Возбудитель зимует мицелием и склероциями в пораженных тканях живых и отмерших органов растения, а также незрелыми псевдотециями. Роль псевдотециев в цикле развития гриба незначительна.

Конидиальное спороношение формируется на пораженных пятнах в виде пучков конидиеносцев, выходящих обычно из устьиц. Конидии одноклеточные (реже с 1-2 перегородками), бесцветные, цилиндрические, размером 15-45 × 2,5-4,5 мкм. Первичное заражение листьев происходит в мае. Инкубационный период – 10-15 суток. Конидии на пораженных пятнах формируются через 7-9 суток после появления симптомов и продуцируются 2-3 недели, после чего пятно становится стерильным.

В течение вегетации гриб распространяется спорами с помощью воздушных течений. На новые участки фитопатоген передается обычно с зараженным посадочным материалом.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Нарушения технологии в обработке почвы.
2. Ослабленное состояние растений вследствие стрессов при недостатке питания или неравномерном увлажнении.
3. Загущенность посадок.

Ризоктониоз картофеля (черная парша) (возбудитель – гриб *Rhizoctonia solani* J.G. Kuhn, телеоморфа *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk (Basidiomycota, *Ceratobasidiaceae*)) [Ахатов, и др., 2013]

Симптомы и вредоносность

Заболевание распространено повсеместно в России и за рубежом. Поражает клубни, стебли, столоны и корни взрослых растений картофеля, а также ростки и всходы, вызывая их отмирание. Кроме картофеля поражает многие овощные, цветочные растения и сорняки (осот, хвощ, лебеда и др.).

Заболевание может проявляться в виде черной парши, углубленной (ямчатой) пятнистости, сетчатого некроза клубней, загнивания глазков и ростков, отмирания столонов и корней, а также в виде "белой ножки" стеблей.

Черная парша проявляется в виде расположенных на поверхности клубней черных коростинок (склероциев) различного размера, похожих на прилипшие комочки почвы. Склероции на поверхности практически не причиняют вреда клубню.

Отмирание ростков и корней происходит чаще в сырую и прохладную погоду, при температуре менее 8°С. Склероции на посаженных клубнях или из почвы прорастают мицелием, который проникает в ростки и корни и приводит к образованию на них темных вдавленных пятен, часто сливающихся и охватывающих ростки кольцом. Больные ростки погибают иногда еще до выхода на поверхность.

Углубленная (ямчатая) пятнистость проявляется в фазу бутонизации, при этом язвы на клубнях иногда могут иметь глубину более 2 см.

Сетчатый некроз на клубнях проявляется в сухую и жаркую погоду, которая устанавливается в фазе цветения картофеля (в период массового завязывания клубней), и когда они достигают диаметра 2-3 см. В ходе дальнейшего роста, при увеличении поверхности клубней пятна растрескиваются, образуя сетку.

Симптомы «белой ножки» формируются на стеблях, выживших после поражения всходов в фенофазу цветения – основание стебля загнивает, покрывается беловато-сероватой пленкой, образованной базидиальной стадией гриба. При этом затрудняется сокодвижение в стебле. Базидиоспоры со стебля могут смываться дождем в почву и заражать новые молодые клубни, образуя на них черные плотные склероции различного размера.

Потери и недобор урожая картофеля от ризоктониоза может достигать 20-25%.

Биологическое описание. Возбудитель зимует мицелием и склероциями на клубнях картофеля. На растительных остатках и в почве может сохраняться в течение 3-4 лет.

Грибница возбудителя из почвы проникает в растение через механические повреждения или в ослабленную ткань, а также через чечевички клубней. Базидиальная стадия не является обязательной для жизненного цикла возбудителя.

В течение вегетации гриб распространяется базидиоспорами с помощью воздушных течений. На новые участки фитопатоген передается обычно с зараженным посадочным материалом.

Факторы, способствующие развитию болезни:

1. Высокая влажность и умеренная температура внешней среды (оптимум 18°С).

2. Почвы, тяжелого механического состава, бедные питательными веществами.

Таким образом, на ягодных культурах и картофеле среди возбудителей болезней по количеству вызываемых заболеваний и вредоносному значению практически повсеместно доминируют грибы [Ахатов и др., 2013; Беляев и др., 2013]. Поэтому актуальной является задача экологического обоснования и практической разработки комплексных, экологически безопасных методов управления фитосанитарной ситуацией на этих культурах, направленных на укрепление здоровья растений.

1.2. Взаимодействие насекомых-фитофагов с растениями

Основу взаимоотношений насекомых с растениями составляют пищевые, или трофические, связи. Насекомое — потребитель пищи, или консумент, тесно связано с другим организмом — поставщиком пищи, или продуцентом (растением). По избирательному отношению отдельных видов и групп насекомых к различным источникам органического вещества насекомых, питающихся растениями, относят к фитофагам, или растительноядным насекомым. Они составляют свыше половины видов класса насекомых и широко представлены в отрядах чешуекрылых, жуков, двукрылых и др. [Бей-Биенко, 2008]. Повреждения, которые наносят фитофаги растениям, можно отнести к 3 категориям: 1) поедание растительных тканей при помощи грызущих ротовых аппаратов (гусеницы чешуекрылых, имаго и личинки жесткокрылых); 2) питание растительными соками (тли, клопы); 3) образование опухолей, наростов или галлов как изменение нормального вида частей растений. Самое большое значение для растениеводства имеет первая категория фитофагов, поскольку эти насекомые наносят наиболее существенный вред растению-хозяину. У поврежденных растений нарушаются процессы обмена веществ, ослабляется рост, уменьшается накопление запасных питательных веществ, снижается качество плодов и семян. Взаимоотношения «фитофаг –

растение» – это первое звено пищевой цепи, в котором вещество и энергия, накопленные продуцентами, передаются консументам.

Фитофагия занимает особое место среди многообразия взаимоотношений между растениями и насекомыми [Чернышев, 1996; Замотайлов и др., 2009]. Растение способно удовлетворить потребность насекомых в воде, аминокислотах, углеводах, липидах, витаминах и т.д. Пища может оказывать воздействие на плодовитость насекомого, быстроту его развития, подвижность, диапаузу, смертность насекомых (а, следовательно, и их численность), на характер группировок (внутривидовых популяций и биоценотических связей) на территории, на их географическое распространение, на строение органов и величину тела [Яхонтов, 1969]. Кроме того, кормовое растение в значительной степени влияет на трофическую специализацию насекомых [Баранчиков, 1987]. Разная степень пригодности пищи для насекомых-фитофагов, как правило, связывается с биохимическим составом кормовых растений, в первую очередь веществами первичного и вторичного метаболизма [Эдельман, 1962; Heil, 2008; Dick, Baldwin, 2010].

В настоящее время накопилось огромное число данных, свидетельствующих о существенном влиянии на жизнеспособность насекомых не только первичных, но и вторичных метаболитов растений-хозяев. Количественный и качественный состав метаболитов может существенно меняться в зависимости от действия различных факторов, в том числе и от уровня повреждения кормовых растений насекомыми [Бахвалов и др., 2010]. Как известно, растения сформировали ряд механизмов прямой защиты от атак насекомых-фитофагов. Одним из наиболее важных механизмов является производство вторичных метаболитов или аллелохемиков [Шапиро и др., 1986; Мартемьянов, Бахвалов, 2007; Rosental, Berenbaum, 1992, Karban, Baldwin, 1997; Agrawal et al., 1999; Haukioja, 2005; Khan, Mohammed, 2011]. Аллелохемики являются частью конституционного иммунитета растений и поддерживаются на

достаточно постоянном уровне в тканях растения. Кроме того, они являются частью индуцированного иммунитета и вырабатываются в ответ на повреждения фитофагом.

Питательные качества растительной ткани могут меняться в зависимости от пространственного местонахождения в пределах ареала, стадии развития растения (онтогенетической фазы), видов и генотипов растений и внешними факторами, связанными с географическим местоположением и сезоном [Chen et. al., 2010]. Фитофаги, которые питаются растениями с низкими питательными качествами, обычно проявляют более низкие темпы роста, снижение эффективности переваривания пищи и плодовитости [Awmack, Leather, 2002; Chen et. al., 2010; Rios et. al., 2013].

Растение-хозяин, являясь основанием трофической пирамиды, влияет на следующее ее звено – фитофага, определяя его функциональное состояние, с которым связана резистентность насекомого в отношении неблагоприятных факторов среды. В основе влияния растений на насекомых лежит качество кормового ресурса, определяемое содержанием первичных и вторичных метаболитов. Таким образам, индукция резистентности в растениях носит специфический характер и, по-видимому, процесс распознавания повреждающего агента растением играет одну из ключевых ролей при формировании индуцированной резистентности.

Одной из характеристик резистентности кормовых растений к фитофагам является качественный состав пластических веществ и других биологически активных химических соединений. К ним относятся как вещества первичного обмена, так и вещества вторичного метаболизма. Соединения первичного обмена – белки, жиры и углеводы, а также аминокислоты, азот, вода, являются необходимыми для насекомых-фитофагов в качестве источника энергии и незаменимых соединений [Чернышев, 1996; Haukioja, 2005; Haukioja et al., 2005]. Существует масса примеров, показывающих, что при питании фитофагов на растении с

пониженным содержанием этих соединений отмечается снижение жизнеспособности насекомых [Schwenke, 1968; Scriber, Fenny, 1979; Scriber, Slansky, 1981; Haukioja, 2003]. В результате недостаточного количества потребляемой энергии происходит задержка развития личиночной стадии, снижение репродуктивной способности и увеличение гибели насекомых [Kaitaniemi et al., 1998; Awmack, Leather, 2002]. Воздействие растений на насекомых обусловлено не только веществами первичного обмена, но и вторичными метаболитами растения [Feeny, 1968]. В результате антифидантного действия растения на фитофага происходит подавление процессов питания фитофага. Накопление вторичных метаболитов в листьях растений является энергетически затратным процессом и требует оптимального содержания в окружающей среде углерода и азота [Bryant et al., 1983]. В связи с этим в процессе эволюции у растений сформировалась индуцированная резистентность, т.е. запуск иммунных реакций растения осуществляется только после взаимодействия с раздражителем. К настоящему времени накопилось достаточное количество примеров, отображающих наличие индуцированной резистентности в различных видах растений, как однолетних, так и многолетних [Walling, 2000; Gatehouse, 2002, Haukioja, 2005; Haukioja et al., 2005]. Токсичными свойствами для насекомых обладают многие фенольные соединения, терпеноиды, алколоиды и т.д. [Запрометов, 1993; Schoonhoven et al., 1998]. В большинстве случаев вторичные метаболиты растений оказывают антагонистическое воздействие на организм фитофагов, которое может быть токсическим, антифидантным и антинутриентным [Запрометов, 1993; Чернышев, 1996; Felton, Gatehouse, 1996; Marquis, 1996; Kaitaniemi, et al., 1998; Bernays, Chapman, 2000].

Многочисленные примеры влияния факторов окружающей среды на кормовое растение свидетельствует, что в основном эти факторы действуют на питание фитофагов через изменение качества корма и условий его потребления. Действие таких факторов, как почвенно-растительные

условия, солнечная инсоляция и концентрация углекислого газа в атмосфере на физиолого-биохимические реакции растения изложены в гипотезе углерод-азотного баланса [Bryant et al., 1983; Price, 1997]. Данная гипотеза постулирует, что в процессе эволюции в зависимости от условий произрастания в растениях сформировались различные типы защитных реакций. Если растение произрастает в условиях низкой освещенности, но в то же время в почве содержится достаточное количество минеральных и органических веществ, то в растении доминирует синтез азотпроизводных соединений, т.е. алкалоидов и цианопроизводных гликозидов. Если растения произрастают в условиях достаточной освещенности и низкого содержания питательных элементов в почве, то в растении доминирует синтез углеродпроизводных соединений, таких как фенолы и терпеноиды. Следовательно, при увеличении содержания питательных элементов в почве листья растений первой группы будут более резистентными к фитофагам вследствие параллельного увеличения питательной ценности листьев и увеличения их защитных свойств за счет повышения концентрации азотсодержащих аллелохемиков. Для растений, защита которых основана на синтезе углеродсодержащих соединений наоборот, повышение содержания питательных элементов в почве приводит к увеличению потребления листвы фитофагами за счет повышения питательной ценности корма при неизменном содержании углеродпроизводных соединений.

Абиотические и биотические факторы среды в значительной степени определяют жизнеспособность насекомых, их поведение и уровень активности, ход обменных процессов, морфогенез и развитие [Чернышев, 1996; Замотайлов и др., 2009]. Их действие отражается на таких важнейших характеристиках популяции, как плодовитость, смертность, возрастной состав, соотношение полов, уровень стремления к миграции. Среди абиотических факторов, оказывающих существенное влияние на насекомых-фитофагов можно выделить температуру, влажность, солнечную активность, т.е. факторы, которые определяют погоду или влияют на нее.

Необходимо отметить что, в силу небольших размеров насекомых огромную роль играют микроклиматические условия, которые могут существенно отличаться в рамках небольшой области пространства. Среди биотических факторов, важное значение имеют качество и количество корма. Практически все абиотические факторы обладают модифицирующим воздействием на популяцию фитофагов (плотность-независимые факторы), т.е. создают условия, определяющие степень реализации биотического потенциала независимо от исходной численности популяции. Биотические факторы обладают в основном регулирующим воздействием на динамику численности фитофагов (плотность-зависимые факторы), сила воздействия этих факторов и их «направленность» в значительной степени зависят от плотности насекомых [Чернышев, 1996]. Трофический фактор в его количественном аспекте может быть модифицирующим на низких уровнях плотности и регулирующим при достижении популяциями критических уровней плотности [Исаев и др., 1984].

Поскольку для фитофагов кормовое растение является единственным источником энергии, то в процессе эволюции насекомые выработали целый ряд приспособлений, позволяющих избегать воздействия защитных реакций кормового растения. Адаптации узкоспециализированных монофагов и олигофагов, и широкоспециализированных полифагов имеют ряд особенностей. Так же, как и у растений, в насекомых выделяют конститутивную и индуцированную резистентность. Выделяют два типа адаптаций у насекомых: пассивные – присутствующие независимо от действия раздражителя, и активные – проявляющиеся при действии раздражителя, т.е. изменении резистентности растения [Gatehouse, 2002].

В значительной степени активность фитофагов определяет влияние погодных условий. С увеличением температуры, как правило, в организме насекомых увеличивается активность физиологических процессов, что приводит к ускорению развития особей от яйца до имаго. В то же время при

увеличении или уменьшении температуры за пределы оптимальной, отмечается замедление развития насекомых, а при ее экстремальных значениях – их гибель [Чернышев, 1996]. Немаловажным показателем является экстремальная температура в зимний период, особенно в сочетании с количеством выпавших осадков. В частности, при малоснежной зиме с низкими температурами может значительно снижаться выход диапаузирующих фитофагов [Tenow, Holmgren, 1987; Price, 1997; Virtanen et al. 1998].

Поскольку погода оказывает влияние не только на насекомых-фитофагов, но и на весь биоценоз в целом, то необходимо отметить и косвенное влияние климатических условий на насекомых через другие компоненты биоценоза. Например, изменение температуры и количества осадков может воздействовать на физиологическое состояние кормового растения или на популяции конкурентов. Так, засушливая и жаркая погода является стрессирующей для кормового растения и это зачастую способствует массовому размножению фитофагов, что показано на примере непарного и сибирского шелкопрядов и ряда других насекомых [Чернышев, 1996; Price, 1997].

Изложенные подходы определяют взаимоотношения растения-хозяина с фитофагом в различных климатических условиях. В свете этих представлений приведем результаты наших исследований по взаимодействию колорадского жука с растением картофеля в сибирских условиях.

Чрезвычайная экологическая пластичность супердоминантного вредителя – колорадского жука позволила ему охватить все основные зоны картофелеводства и овощеводства государств Северной Америки, Европы, Передней и Средней Азии, а в России – территории от Балтики до Енисея с изолированным очагом в Приморье [Васютин и др., 2000; Вилкова и др., 2001; Павлюшин и др., 2009; Фасулати, Иванова, 2015]. Оптимальной температурой для размножения жука считается 20-25°С и относительная

влажность воздуха 60-85% [Богданов-Катьков, 1947; Головин, 1956; Бирман, 1969; Санин, 1976]. Для полного развития колорадского жука от момента яйцекладки до выхода из почвы молодых жуков требуется сумма эффективных температур 360°С (при пороге +11,5°С), т. е. около 30-60 дней [Калинина, 2007; Мацишина, 2011, 2012].

Нами установлено [Цветкова, Чуликова, 2012], что благоприятные для развития колорадского жука показатели температуры, влажности и СЭТ в сибирском регионе отличаются от таковых в европейской зоне России. Весенний выход имаго колорадского жука в условиях Новосибирской области лимитируют такие абиотические факторы, как глубина промерзания почвы и высота снега в конце ноября – начале декабря и марте (r=0,84-0,98), температура почвы (r=0,98) и воздуха (r=0,54), количество осадков (r=-0,86) на момент появления имаго. Начало выхода колорадского жука из почвы отмечается при средней температуре воздуха +14,5°С и почвы – +14,7°С, при среднем количестве осадков около 102 мм и ГТК=1,8, САТ и СЭТ не менее +500°С и +88°С, соответственно. При избытке (ГТК>1,8) и недостатке (ГТК<1) влаги в почве выход насекомых затягивается.

Колорадский жук успешно адаптировался к погодно-климатическим условиям региона. Развитие фитофага происходит при температуре воздуха от +8,6 до +23,4°С и влажности воздуха от 55 до 89%, наиболее благоприятными условиями являются температура воздуха +12,8…+21°С и относительная влажность воздуха 71…78%.

Формирование одного поколения колорадского жука проходит при накоплении СЭТ, равной +253,6±108°С за 34±3 дня, при средней температуре воздуха +14,8±6,2°С. Второе поколение вредителя развивается на 70% при накоплении к моменту скашивания растений СЭТ, равной +391,6±92°С.

Таким образом, для сибирской популяции вредителя температурный оптимум воздуха находится ниже на 4-9°С, чем для европейской, а относительная влажность воздуха несколько выше (различия составляют 8…9%).

Жук адаптировался к местным природно-климатическим условиям Западно-Сибирского региона [Цветкова, Чуликова, 2012; Чуликова и др., 2012; Цветкова, 2013], численность и вредоносность его стабильно высокие, поэтому территория лесостепи Приобья в настоящее время относится к зоне натурализации фитофага [Гербер, Цветкова, 2007; Малюга и др., 2011].

По нашим наблюдениям [Цветкова, Чуликова, 2012; Чуликова и др., 2012; Цветкова, 2013] на протяжении 4-х вегетационных периодов колорадский жук присутствовал на посадках картофеля от всходов до скашивания надземной части. Однако, заселение разных сортов вредителем было различно. Первые имаго фитофага были обнаружены на растениях разных сортов во 2-й декаде июня. Максимальное количество особей присутствовало на сорте Луговской – 0,12 экз./куст, минимальное на сорте Хозяюшка – 0,03 экз./куст. В дальнейшем, количество фитофага начинает увеличиваться за счёт отрождающихся личинок, и к началу 1-й декады июля на растениях присутствуют имаго и личинки всех возрастов (рис. 1.1). На среднеспелых сортах пик численности фитофага наблюдали в 1-ю декаду июля (Луговской – 2,1 экз./куст, Югана – 1,76 и Хозяюшка – 1,40 экз./куст).

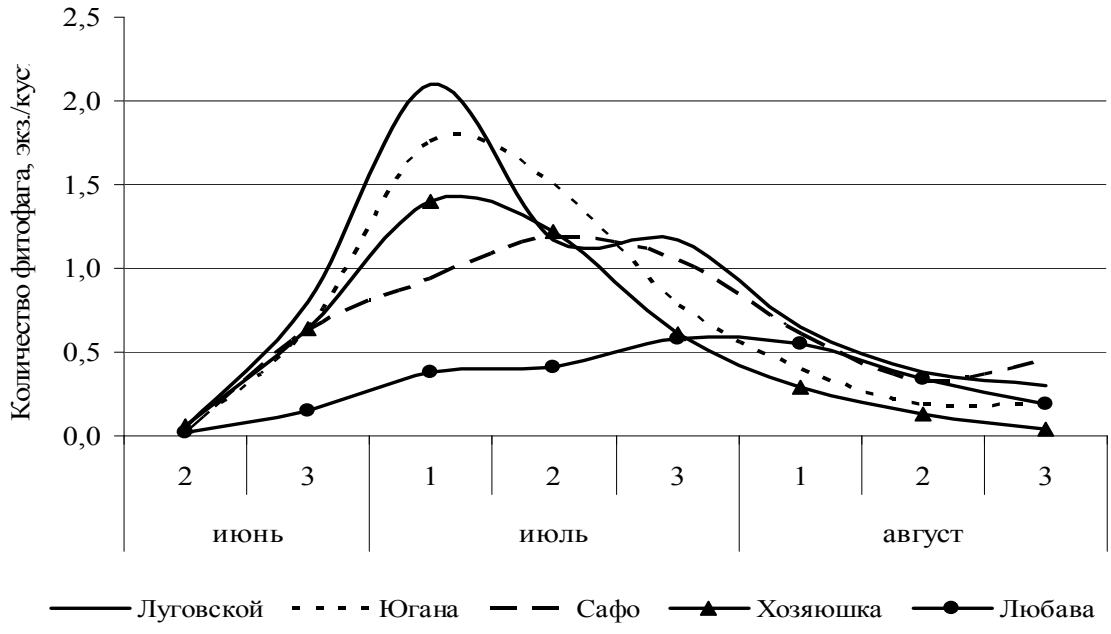

Рис. 1.1. Динамика численности колорадского жука на посадках разных сортов картофеля (2007-2010 гг.) $НСР_{05}$ по сорту 0,52

На среднераннем сорте Сафо максимальная численность вредителя приходилась на 2-ю декаду июля (1,19 экз./куст). Нарастание количества фитофага на раннем сорте Любава имело продолжительный характер, и пик численности наблюдался в 3-й декаде июля (0,58 экз./куст). Это объясняется некоторыми особенностями органогенеза растений, в данном случае, коротким периодом между цветением и отмиранием ботвы и коротким периодом вегетации в целом. Поэтому, к моменту появления личинок младшего возраста листья ранних и среднеранних сортов были уже менее питательными и не обеспечивали полноценного накопления жирового тела в организме листоеда.

С конца 3-й декады июля на всех сортах начинался выход жуков нового поколения. Массовое появление имаго наблюдали в 1-й декаде августа на среднеспелых сортах (Луговской – 0,83 экз./куст, Югана – 0,45 и Хозяюшка – 0,52 экз./куст), на ранних и среднеранних сортах во 2-й декаде августа (Любава – 0,81 и Сафо – 0,87 экз./куст). В течение вегетации максимальная численность фитофага отмечалась на сорте Луговской – 6,6 экз./куст, что превышало этот показатель на сорте Югана в 1,2 раза, а на сорте Любава – в 2,5 раз.

Таким образом, сорт Луговской оказался самым заселяемым, а наменее заселяемым – сорт Любава. На сортах среднеспелой группы (Луговской, Югана, Хозяюшка) увеличение численности вредителя шло более интенсивно, чем на сортах ранней и среднеранней групп спелости (Любава и Сафо). Однако, плотность популяции колорадского жука, еще не в полной мере определяет его вредоносность на разных сортах картофеля, в большей степени, она зависит от пищевых достоинств листьев, что определяет разную степень привлекательности растений и интенсивности их заселения. Проявляется это в антибиотических, морфологических, органогенетических, атрептических, физиологических, ингибиторных, оксидативных, некротических и репарационних свойствах растений, которые обуславливают

малую прожорливость насекомых на данных растения [Пайнтер, 1961, Шапиро, Вилкова, 1979;1986; Шапиро, 1985; 1991; Вилкова, 2004].

В настоящее время в мировом сортименте картофеля насчитывается более 4 тысяч сортов. В Российском «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию», изданном в 2015 году, представлено 399 сортов картофеля [Госреестр, 2015]. По результатам проведенной оценки выделены устойчивые к колорадскому жуку сорта: в группе раннеспелых – Даная, Алый парус, Гала, Эл Мундо, Музыка, Реал; в группе среднепоздних – Янка, Сиреневый туман, Сифра, Дельфине. Все они имели низкий средний балл поврежденности ботвы по шкале ВИЗР (0,5-1,2 балла, т.е. обычно менее 10% уничтоженных листьев), низкую долю кустов (обычно менее 10%) со значительными повреждениями листьев, превышающими пороговый уровень в 20% их уничтоженной площади, и более низкий уровень средней численности личинок – в пределах 130-430 экз. на 100 кустов против 360-1600 экз./100 кустов на остальных сортах. Это указывает на то, что выделенные устойчивые сорта действительно обладают комплексом механизмов самозащиты от колорадского жука, являясь прежде всего неблагоприятным кормом для его развития, т.е. лимитирующим биоценотическим фактором. По данным С.Р. Фасулати и О.В. Ивановой [2015], выделены сорта картофеля, обладающие целым рядом признаков устойчивости к колорадскому жуку: Виктория, Искра, Криница, Ладожский, Ласунак, Лига, Наяда, Петербургский, Радонежский, Раменский, Свитанок киевский, Холмогорский, но многие сорта, включенные в Госреестр РФ, не оценивались на устойчивость к вредителям. Поэтому, в связи с изменчивостью колорадского жука и биологической разнокачественностью его экотипов очень важен зональный подход в оценке сортоустойчивости [Павлюшин и др., 2009].

В результате проведенных нами исследований на 22-х сортах картофеля разных групп спелости в условиях Новосибирской области установлено, что менее привлекательными были ранние сорта по сравнению

со среднеранними и среднепозднеспелыми, за исключением сорта Хозяюшка (заселенность – по 60 личинок 2 и 3 возрастов на куст) [Цветкова, Штерншис, 2009]. Незаселенными колорадским жуком оказались сорта: Каменский, Серпанок и Явир. От 3 до 7 экземпляров на куст обнаружено на сортах Повинь и Якутянка; 13-18 экз. - на сортах Юбиляр и Любава.

На растениях среднеранних сортов высокая численность личинок (экз./куст) наблюдалась на сортах: Памяти Рогачева (86), Тулеевский (77) и Радонежский (71). В целом, только на сорте Чая было 28 личинок, в основном 2 возраста, а на остальных сортах – от 49 до 67 личинок на куст. Из среднепозднеспелых сортов наиболее заселенными были сорта Кетский и Луговской (96 и 73 экз. соответственно). На остальных сортах от 42 до 65 личинок на 1 куст картофеля.

Таким образом, из ранних устойчивыми были сорта: Каменский, Серпанок и Явир. Относительно устойчивыми – Повинь, Якутянка, Юбиляр и Любава. Из среднеранних сортов – Чая, Сафо, Рябинушка; из среднепозднеспелых – Симфония и Аврора.

Многообразие сортов картофеля создают для этого вида благоприятные условия в выборе тех растений, питание которыми способствуют реализации жизненного цикла (развитие, расселение, плодовитость, зимовка). Степень биологической вредоносности зависит от характера воздействия насекомых на растение и от устойчивости растений к насекомому. Сила воздействия жука на растения картофеля определяется его численностью и прожорливостью [Колорадский картофельный жук, 1981].

Личинки и имаго вредителя чрезвычайно прожорливы. Анализ полученных нами данных показал, что наиболее прожорливыми оказались имаго и личинки 4 возраста, прибавка в массе самой значительной была у личинок (24 мг) по сравнению с имаго (12 мг), однако съеденная листовая площадь оказалась на одном уровне. Значительную листовую поверхность (14,33 мм²) уничтожили личинки 3 возраста, но с минимальным приростом в массе (8 мг). Личинки 2 возраста увеличили массу тела на 24 мг (при

съеденной пищи 38 мг). И наименее прожорливыми оказались личинки 1 возраста. Они незначительно уменьшили площадь листа (1,55 мм²), но и уменьшили свою массу тела, что можно связать со стрессом молодых личинок при сборе на растениях картофеля и проведении опыта. Наши данные подтверждаются результатами других исследователей [Бирман, 1969; Калинина, Николаева, 2007], где показано, что личинки старших возрастов колорадского жука наносят значительные повреждения картофелю и являются наиболее прожорливыми.

Более подробные исследования взаимодействия насекомых с растениями проведены на пяти различных по спелости сортах картофеля [Цветкова, Чуликова, 2012]. В результате было установлено, что в условиях региона на прожорливость вредителя влияют следующие факторы: морфологические признаки сорта – опушение и толщина листовой пластинки (доля влияния 92,7%), фаза развития колорадского жука (доля влияния 84,2%), возраст личинок (доля влияния 76,4%)

В среднем по сортам за сутки одним фитофагом съедалось 3,5 $см^2$ листовой поверхности. Более прожорливыми были личинки 3 и 4 возрастов, съеденная ими площадь составляла 3,9 и 5,0 $см^2$/ экз. в сутки, соответственно. Имаго колорадского жука съедало меньше корма – 3,0 $см^2$, а одна личинка 2 возраста – 2,1 $см^2$/ экз. в сутки (табл. 1. 1). Более высокая прожорливость личинок старшего возраста по сравнению с имаго обоснована необходимостью увеличения массы жирового тела для дальнейшего нормального прохождения онтогенеза – окукливания и выхода молодых имаго.

Таблица 1.1

Прожорливость колорадского жука на разных сортах картофеля

Сорт	Съеденная листовая поверхность, $см^2$/экз. в сутки				Средние по сортам
	Имаго летнего поколения	личинки, возраст			
		II	III	IV	
Сафо	2,5±0,7	2,7±0,7	4,8±1,0	7,0±1,4	4,2±2,1
Луговской	3,4±1,3	3,1±1,0	4,0±1,3	4,9±1,0	3,8±0,8
Хозяюшка	2,8±0,7	1,8±0,6	3,5±1,3	4,5±0,6	3,2±1,1
Югана	3,2±0,7	1,3±0,5	4,1±1,3	4,1±1,3	3,2±1,3
Любава	3,0±0,7	1,6±0,6	3,2±0,7	4,5±0,6	3,1±1,2
Средние по фазам развития	3,0±0,3	2,1±0.8	3,9±0,6	5,0±1,1	3,5±0,5

Более привлекательными для питания личинок и имаго оказались листья сортов картофеля Сафо и Луговской, где в среднем за сутки имаго и личинки съедали 3,8-4,2 $см^2$/ экз. в сутки, а менее – Хозяюшка, Югана и Любава, в этом случае данный показатель составил 3,1-3,2 $см^2$/ экз. в сутки.

К сожалению, в настоящее время нет единого мнения о причинах различной прожорливости фитофага на разных сортах картофеля и других пасленовых. Чаще всего наблюдается лишь частичное отвержение насекомыми растений. Установлено, что меньше повреждаются сорта с плотными, грубыми листьями (толщина листа более 300 мкм) и с сильной опушённостью. Данные свойства растений вызывают затруднения процесса питания и пищеварения фитофага, ухудшение его физиологического состояния [Шапиро, Вилкова, 1979; Шапиро, 1985; Методы оценки …, 2003].

Нами подтверждено, что на прожорливость колорадского жука оказывали влияние морфологические особенности строения растений, в частности, толщина листовой пластинки и её железистое опушение (табл. 1.2). Максимально прожорливыми личинки 2 возраста были на листьях сортов Сафо и Луговской (2,7-3,1 $см^2$/ экз. в сутки), а минимально на Югане и Любаве (1,3-1,6 $см^2$/ экз. в сутки) (табл. 1.2). В то же время личинки 3

возраста были более прожорливы при питании на сорте Сафо – 4,8 см^2/ экз. в сутки, а менее на Любаве и Хозяюшке – 3,2-3,5 см^2/ экз. в сутки. Для питания личинок 4 возраста также был более предпочтителен сорт Сафо, где вредитель съедал 7,0 см^2/ экз. в сутки, а менее Югана – 4,1 см^2/экз. в сутки. Имаго летнего поколения больше съедали листву сорта Луговской (3,4 см^2/ экз. в сутки), а меньше – на Сафо (2,5 см^2/экз. в сутки).

Таблица 1.2

Влияние опушённости и толщины листовой пластинки картофеля на прожорливость колорадского жука

Сорт	Количество волосков, шт./ см² листа	Толщина листовой пластинки, мкм	Прожорливость личинок, см² /экз. в сутки			Прожорливость имаго, см² / экз. в сутки
			2	3	4	
Сафо	35,3	237,5	2,7	4,8	7,0	2,5
Луговской	38,0	304,0	3,1	4,0	4,9	3,4
Хозяюшка	39,8	301,7	1,8	3,5	4,5	2,8
Любава	81,7	385,5	1,6	3,2	4,5	3,0
Югана	126,0	302,0	1,3	4,1	4,1	3,2
$НСР_{05}$ по факторам: сорт – 1,0; количество волосков – 4,2; толщина листа – 2,7; фаза развития вредителя – 0,9.						

Таким образом, прожорливость личинок 2 возраста ограничена таким фактором, как опушённость листа (r= – 0,74); для личинок 3 и 4 возраста – толщиной листа (r = – 0,91 и r = – 0,64, соответственно). На питание имаго данные показатели не влияли (r = 0,2 и r = 0,3, соответственно).

При изучении прожорливости колорадского жука была отмечена также зависимость массы насекомого от питания на разных сортах картофеля. В среднем по сортам прирост массы одного фитофага за сутки составил 0,025 г (табл. 1.3). Увеличение массы тела личинок зависело от фазы развития колорадского жука. Так, в среднем за сутки, для личинок 3 и 4 возраста данный показатель составлял 0,028-0,030 г/экз., а для имаго и личинок 2 возраста – 0,020-0,024 г/экз. У личинок 4 возраста возрастание массы тела мало отличается от таковой у 3 возраста, хотя их прожорливость самая

высокая (5 $см^2$/ экз. в сутки). Это объясняется возрастной гетерогенностью личинок и их подготовкой к дальнейшему окукливанию, так как перед каждой линькой и окукливанием насекомое прекращает питание, освобождает кишечник и становится неподвижным. Различия в приросте массы тела имаго и личинок старшего возраста объясняемы биологическими особенностями онтогенеза насекомого, которые уже рассматривались ранее.

Значительный прирост массы имаго и личинок наблюдали при питании на сортах Любава и Луговской (0,042-0,046 г/ экз. в сутки), и небольшой – на листьях растений сорта Югана (0,004 г/ экз. в сутки). Минимальный прирост массы был у имаго (0,020 г/ экз. в сутки), тогда как у личинок данный показатель увеличивался в соответствии с их возрастом от 0,024 до 0,030 г/ экз. в сутки (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Прирост массы тела колорадского жука при питании на разных сортах картофеля

Сорт	Прирост массы фитофага, г/экз. в сутки				Средние по сорту
	имаго летнего поколения	личинки, возраст			
		II	III	IV	
Сафо	0,008	0,010	0,020	0,013	0,013
Луговской	0,038	0,039	0,050	0,056	0,046
Хозяюшка	0,012	0,020	0,028	0,030	0,023
Югана	0,006	0,002	0,004	0,004	0,004
Любава	0,034	0,048	0,050	0,035	0,042
Средние по фазе развития	0,020	0,024	0,030	0,028	0,025
$НСР_{05}$ по факторам: сорт – 0,009; фаза развития – 0,008					

Личинки 2 возраста максимально увеличивали массу тела при поедании листьев сорта Любава (0,048 г/ экз. в сутки), тогда как на сорте Югана – всего 0,002 г/ экз. в сутки. Наибольший прирост массы личинок старшего возраста наблюдали при питании их на сортах Луговской и Любава (0,05-0,056 г/ экз. в сутки), а наименьший – на Югане (0,004 г/ экз. в сутки).

Значительную прибавку массы у имаго отмечали на Луговском – 0,038 г/ экз. в сутки, а минимальную на сорте Югана – 0,006 г/ экз. в сутки.

Увеличение массы тела насекомого зависит не только от количества съеденного корма, но и от биохимического состава растения. Поскольку фитофагом усваивается около 50% потреблённого корма, а оставшаяся часть теряется с экскрементами [Chlodny et al., 1967, Колорадский картофельный жук…, 1981], ему необходимо употреблять более качественную пищу, но высокая концентрация сахарозы в листьях картофеля может приводить к снижению усвояемости потребляемого корма у фитофага.

Показано [Колорадский картофельный жук, 1981], что наиболее выраженную реакцию поедания листьев картофеля колорадским жуком, вызывает сахароза. На личинок сахароза действует более активно, чем другие углеводы – глюкоза, фруктоза и манноза. Также хорошими стимуляторами питания фитофага являются аминокислоты: L-аланин, L -аминомасляная кислота и L-серин, причём, молекулярный вес аминокислот, стимулирующих питание, не превышает 125. Из липидов достаточно заметную реакцию питания вызывают только лецитин и фосфатидил L-серин, хотя реакция личинок на эти вещества значительно слабее, чем на сахара и аминокислоты.

Исследованные нами сорта характеризовались высоким содержанием сахарозы – от 4,1% (Луговской) до 8,9% (Югана). Было установлено, что при питании фитофага листьями сортов с высокой концентрацией данного углевода в листьях, прирост массы вредителя снижался ($r = -0,9$). Так, на сорте Югана, увеличение массы колорадского жука минимальное – 0,004 г/ экз. в сутки, тогда как на Луговском, этот показатель составляет 0,046 г/ экз. в сутки (табл. 1.4).

Таблица 1.4

Прирост массы фитофага в зависимости от количества и качества кормового растения

Сорт	Массовая доля сахарозы на сухое вещество, %	Съеденная площадь листа, $см^2$/ экз. в сутки	Прирост массы тела, г/ экз. в сутки
Югана	8,9	3,2	0,004
Сафо	7,7	4,2	0,013
Любава	5,9	3,1	0,042
Хозяюшка	5,8	3,2	0,023
Луговской	4,1	3,8	0,046
$НСР_{05}$	0,1	0,1	0,001

Полученные нами данные подтверждают ранее установленные закономерности [Колорадский картофельный жук, 1981] снижения массы тела фитофага при питании картофеля с высоким содержанием углеводов.

Аналогичная зависимость прироста массы тела от содержания углеводов в растении прослеживается и по отдельным фазам развития колорадского жука. Исключение составляет имаго фитофага, где этот показатель зависит не только от качества ($r = – 0,8$), но и от количества потреблённого корма ($r = 0,6$). Следовательно, у личинок колорадского жука набор массы тела и соответственно роста, идет за счет потребленных углеводов, а не из-за количества съеденного корма, в отличие от имаго.

Таким образом, вне зависимости от сорта картофеля более прожорливыми являются личинки старших возрастов, а менее – имаго и личинки 1-2 возраста, что соответствует многочисленным данным других авторов. В настоящее время, колорадский жук адаптировался к местным природно-климатическим условиям Западно-Сибирского региона, численность и вредоносность его стабильно высокие, территория лесостепи Приобья в настоящее время, относится к зоне натурализации фитофага,

поэтому возрастает необходимость регуляции численности и вредоносности этого опасного фитофага.

1.3. Действие антагонистов на фитопатогенные микроорганизмы

Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus,* благодаря присущему им природному антагонизму в отношении фитопатогенных грибов, а также достаточно высокой степени адаптивности к неблагоприятным факторам окружающей среды, являются распространенными агентами биологического контроля болезней растений. Для подавления возбудителей болезней пригодны различные штаммы бактерий рода *Bacillus* [Новикова, 2005; Мелентьев, 2007; Jamalizadeh et al., 2008; Ramarathnam et al., 2011], поэтому биологическое подавление патогенов растений как альтернатива применению химических фунгицидов заслуживает все большего внимания во всем мире [Gerbore et al. 2014; Heydari, Pessarakli, 2010]

Как известно, бактерии подразделяются на эпифитные, эндофитные и ризосферные. Эндофиты обитают внутри растения, в природе они поступают в растение через устьица, поранения, корневую систему. Существенную роль в формировании эндофитной микрофлоры играет передача микроорганизмов через семена, а также их интродукция векторными организмами — беспозвоночными или грибами [Тихонович, Проворов, 2011, Hallmann et al., 1997].

Бактериальные эндофиты выполняют ряд функций, важных для растений [Pirttil et al., 2008]. Внимание к бактериальным эндофитам обусловлено также накоплением данных, указывающих на условность исторически сложившегося разделения микроорганизмов на фитопатогенные, патогенные для животных (человека) и непатогенные [Маркова и др., 2005]. Отмечено влияние абиотических факторов на жизнедеятельность эндофитных бактерий [Белимов, 2012].

Свойства, присущие эпифитным микроорганизмам и проявление их в вариативных условиях внешней среды, различны. Полагают, что наряду с другими факторами, обеспечивающими иммунитет у растений, эпифитная микрофлора служит первичным барьером для защиты растений от попадающих из окружающей среды сапрофитных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [Делова, Кузнецова, 1973].

Ризобактерии таксономически чрезвычайно разнообразны [Кравченко и др., 2002; Bashan, De Bashan, 2002; Polyanskaya et al., 2002; Weller et al., 2002; Whipps et al., 2001]. Они обитают в ризосфере (зона почвы, непосредственно соприкасающаяся с корнями), которая служит их основной экологической нишей с наиболее благоприятными условиями [Kuiper et al., 2004; Thomashow, 1996] и на поверхности корней. В ризосферу из корней активно поступают сложные смеси легкодоступных органических источников энергии и углерода, что обусловливает ее высокую микробиологическую активность и образование отличающихся от почвенного микробоценоза специфических ризосферных микробных сообществ [Кравченко, 2000; Lynch, 1990]. Разнообразие таких сообществ во многом определяется количественным и качественным составом корневых выделений, зависящим от вида, возраста и условий выращивания растения, а также от влияния комплекса почвенно-климатических факторов [Lynch, 1990, Bais et al., 2006]. В свою очередь, микробиологическая активность в ризосфере приводит к существенному изменению химических и физических свойств этой зоны и накоплению продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, биологически активных по отношению к растению. Для изучения взаимодействий растений с полезными формами бактерий в ризосфере продуктивна концепция, согласно которой ризобактерии образуют с растением единую растительно-микробную систему (ассоциацию) с новыми свойствами, детерминированными положительным взаимодействием партнеров [Bais et al., 2006; Siddiqui, 2005]. Нормальная жизнедеятельность высших растений происходит при их тесном взаимодействии с

микроорганизмами, заселяющими ризосферу и составляющими ассоциацию: «микроорганизмы – корневая система растения» [Мелентьев, 2007].

В системе «почва – микроорганизмы – растения» основой физиолого-биохимического воздействия являются консортивные взаимодействия, а центральным фактором ризосферного эффекта служит метаболическая активность корне. За счет этой активности обитающие в прикорневой зоне микроорганизмы получают доступные источники питания (моносахара, органические кислоты, аминокислоты, белки, вещества фенольной природы, антибиотики, липиды и ряд других) [Звягинцев и др., 1993].

Бациллы-антагонисты относятся как к ризосферным [Кузьмина, 1998; Алексеева, Потатуркина-Нестерова, 2014], так и к эндофитным [Чеботарь и др.2011; Курамшина и др., 2014; Chebotar et al., 2009], и эпифитным [Коптева, Ерина, 2015] бактериям. Спектр антагонистической активности у бактерий рода *Bacillus* широкий: их метаболиты, по большей части, представлены антибиотиками полипептидного и аминогликозидного ряда [Воронкович, 2011], которые обладают способностью подавлять как рост, так и развитие большого числа вредных объектов. В зависимости от штамма бактерии рода *Bacillus* могут быть продуцентами от 50 до 200 различных биологически активных веществ [Котляров, Седынина, 2013]. В частности, *B. subtilis* синтезирует более 70 антибиотиков, а также протеолитические, амилолитические и пектолитические ферменты. Именно широкий набор биологически активных метаболитов бактерий обеспечивает эффективное снижение численности патогенов, поскольку срабатывают различные механизмы воздействия. Например, на развитие возбудителя серой гнили бактерия оказывает не только одномоментный эффект, подавляя процесс прорастания спор гриба, но и длительное время подавляет рост мицелия [Воронкович, 2011].

Важной особенностью представителей рода *Bacillus*, которая делает перспективным их применение в защите растений, является способность бактерий к спорообразованию, что позволяет им переживать

неблагоприятные условия. В спорах бактерий постепенно накапливаются биологически активные вещества, поэтому в момент прорастания антагонистическая способность бактерий резко усиливается.

В первую очередь принято оценивать антагонистическую активность бактериальных штаммов *in vitro*. Так, в лабораторных условиях выявляли активность штамма *B. subtilis,* двух штаммов *B. amyloliquefaciens* и четырех штаммов *B. licheniformis* в отношении ряда фитопатогенных грибов [Леляк, Штерншис, 2014]. Высокую антагонистическую активность против возбудителей болезней растений: *Alternaria solani, Bipolaris sorokiniana, Phytophthora infestans, Botrytis cinerea*, грибов рода *Fusarium*, – показали штаммы *B. subtilis* ВКПМ B-16041, DSM 24613, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ B-10642, DSM 24614 и *B. amyloliquefaciens* ВКПМ B-10643, DSM 24615 (табл. 1.5.). На возбудителя альтернариоза *A. solani* наибольшее ингибирующее действие оказали штаммы *B. amyloliquefaciens* Ba-1 и Ba-2, *B. licheniformis* ВКПМ B-10561, DSM 24609 (Bl-1) и *B. subtilis* Bs-1. В подавлении роста возбудителя корневых гнилей *B. sorokiniana* высокую активность проявили штаммы *B. subtilis* Bs-1, *B. amyloliquefaciens* Ba-1и Ba-2. Эти же штаммы были максимально активными по сравнению с остальными по отношению к возбудителю серой гнили растений *B. cinerea*. В то же время установлено, что штаммы *B. licheniformis* не подавляли роста *B. cinerea* (штамм ВКПМ B-1006). Против фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и возбудителя фитофтороза пасленовых культур *Ph. infestans* все изученные нами бактерии *Bacillus spp.* показали высокий уровень ингибирующей активности. У бактерий *B. licheniformis* Bl-1; ВКПМ B-10562, DSM 24610 (Bl-2) и ВКПМ B-10564, DSM 24612 (Bl-4) отсутствовала антагонистическая активность в отношении *F. solani* ВКПМ B-163. Результаты исследования показали, что штаммы *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* проявляют ингибирующую активность в отношении фитопатогенных грибов, вызывающих болезни сельскохозяйственных культур, что явилось основой дальнейшего изучения их для управления здоровьем растений.

Таблица 1.5.

Ингибирующая активность бактерий в отношении фитопатогенных грибов, %

Наименование фитопатогенного тест-микроорганизма	*Штаммы бактерий-антагонистов**						
	Bs-1	*Ba-1*	*Ba-2*	*Bl-1*	*Bl-2*	*Bl-3*	*Bl-4*
A. solani A7 АКТЛ 112	68,5±1,19	71,4±2,07	71,4±1,55	71,4±1,80	65,7±2,19	68,6±2,23	37,1±1,07
A. solani A7 НКЛ 2в	66,7±2,09	50,0±1,85	56,7±1,90	66,7±2,44	66,7±2,70	66,7±2,19	66,7±2,17
A. solani A7 АКТЛ 125 3б	66,7±2,03	66,7±2,12	66,7±2,09	66,7±2,11	66,7±2,10	66,7±2,09	60,0±1,90
B. sorokiniana ВКПМ B-532	81,8±2,49	81,8±2,29	81,8±2,47	36,4±1,16	41,8±1,50	67,3±2,07	27,3±1,26
B. cinerea M-01	62,5±1,92	62,5±2,05	62,5±2,13	53,3±1,88	51,1±1,80	55,6±1,94	22,2±0,98
B. cinerea ВКПМ B-1006	50,0±2,24	50,0±2,17	50,0±2,01	0	0	0	0
B. cinerea M-4-2	68,7±2,30	68,7±2,46	68,7±2,41	68,8±2,03	48,6±2,11	68,7±1,95	37,5±0,88
Fusarium graminearum ВКПМ B-147	54,5±1,74	54,5±1,83	54,5±1,80	50,0±1,75	31,8±1,40	45,4±1,66	31,8±1,19
Fusarium solani ВКПМ B-163	44,4±1,33	44,4±1,40	44,4±1,37	0	0	33,3±1,18	0
A. solani A7 АКТЛ 112	68,5±2,20	71,4±2,69	71,4±2,55	71,4±2,71	65,7±2,38	68,6±2,30	37,1±1,15
A. solani A7 НКЛ 2в	66,7±2,07	50,0±1,92	56,7±1,84	66,7±2,04	66,7±2,12	66,7±2,29	66,7±2,31
A. solani A7 АКТЛ 125 3б	66,7±2,18	66,7±2,81	66,7±2,60	66,7±2,55	66,7±2,74	66,7±2,15	60,0±2,18
B. sorokiniana ВКПМ B-532	81,8±2,96	81,8±2,70	81,8±2,66	36,4±1,18	41,8±1,60	67,3±2,00	27,3±0,93
B. cinerea M-01	62,5±2,45	62,5±1,97	62,5±2,17	53,3±1,70	51,1±1,64	55,6±1,50	22,2±0,98
B. cinerea ВКПМ B-1006	50,0±1,74	50,0±1,66	50,0±1,54	0	0	0	0
B. cinerea M-4-2	68,7±2,15	68,7±2,26	68,7±2,33	68,8±2,40	48,6±1,83	68,7±2,01	37,5±1,14
Fusarium graminearum ВКПМ B-147	54,5±1,59	54,5±1,60	54,5±1,83	50,0±1,19	31,8±1,62	45,4±1,18	31,8±0,87
Fusarium solani ВКПМ B-163	44,4±0,75	44,4±1,13	44,4±1,04	0	0	33,3±0,60	0
Fusarium chlamydosporum ВКПМ B-899	76,2±2,29	76,2±2,61	64,3±2,16	52,4±1,67	47,6±1,32	61,9±1,70	16,7±0,29
Fusarium solani K 6	68,9±2,09	77,8±2,73	77,8±2,44	40,0±1,90	40,0±1,33	48,9±1,12	0
Fusarium oxysporum ВКПМ B-349	76,2±2,09	76,2±2,40	76,2±2,33	47,6±2,19	64,3±1,96	52,4±1,47	23,8±0,85
Fusarium avenacium ВКПМ B-623	76,1±2,44	76,2±3,85	76,2±2,41	59,5±1,94	64,3±1,87	64,3±2,03	23,8±0,70
Ph. infestans расы 3,4	80,0±2,55	80,0±2,79	80,0±2,64	66,0±1,95	66,0±2,04	68,0±2,17	50,0±1,03
Ph. infestans расы 1-11	70,0±2,69	75,0±2,70	75,0±2,13	62,5±1,98	57,5±1,72	67,5±2,03	25,0±0,81

Ba-1 - *B. amyloliquefaciens* ВКПМ B-10642, DSM 24614
Ba-2- *B. amyloliquefaciens* ВКПМ B-10643, DSM 24615
Bl-1- *B. licheniformis* ВКПМ B-10561, DSM 24609
Bl-2- *B. licheniformis* ВКПМ B-10562, DSM 24610
Bl-3- *B. licheniformis* ВКПМ B-10563, DSM 24611
Bl-4- *B. licheniformis* ВКПМ B-10564, DSM 24612
Bs-1- *B. subtilis* ВКПМ B-16041, DSM 24613

Антагонистическое действие штамма *B. subtilis* изучали другие авторы в отношении ряда возбудителей болезней сельскохозяйственных культур. Отмечено подавление фитопатогенных грибов родов *Aspergillus*, *Botrytis*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusaruim*, *Verticillium*, *Thelaviopsis*, а также фитопатогенных бактерий родов *Erwini*a, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*. Наиболее выраженный эффект отмечен в отношении *B. cinerea* [Лапа, Авдеева, 2010]. Это подтверждено и в лабораторном опыте по прорастанию конидий возбудителя серой гнили *B. cinerea* при использовании другого штамма антагонистической бациллы - *B. subtilis* 494, по данным автора процент непроросших конидий фитопатогенного гриба составил 97,8–100 % [Стадниченко, 2011].

При интродукции бацилл в биоценозы необходимо учитывать влияние факторов внешней среды, что связано с реальными агроклиматическими условиями. Известно, что для спорообразующих бактерий в почвенных процессах большое значение имеет сочетание температурных условий и влажности, температурно-водный режим оказывает влияние на формирование микробного ценоза почвы.

Качественный состав комплекса почвенных микроорганизмов меняется в зависимости от типа почвы, а количественный – подвержен сильным колебаниям при изменении ее физических характеристик (температуры, влажности, скорости протекания процессов минерализации). В частности, наибольшее количество бацилл наблюдается при умеренной или пониженной влажности [Калинина и др., 1997].

На примере внесения бактериальных штаммов *B. subtilis* ИБ-15 и *B. polymyxa* ИБ-37, выделенных автором из почв сельскохозяйственного назначения в ризосфере пшеницы, продемонстрирована зависимость их протекторного действия и формирования структуры урожая культуры от абиотических факторов [Кузьмина, 1998]. Установлено, что наибольшее влияние на плотность популяции интродуцированных бацилл в ризосфере пшеницы оказывает температурный режимы почвы. С повышением температуры численность интродуцированных в ризосферу бацилл-антагонистов возрастает, однако реакция на изменение температуры зависит от видовой принадлежности штамма. В то же время исследуемые штаммы бацилл были способны колонизировать ризосферу пшеницы не только при оптимальном влагообеспеченни, но и при недостатке почвенной влаги. Автором установлено, что в полевых условиях эффективное подавление развития корневых гнилей пшеницы происходит в основном в раннем периоде вегетации растений: выход в трубку - цветение. В целом, анализ динамики численности *B. subtilis* ИБ-15 в прикорневой зоне пшеницы в условиях трех полевых сезонов показал, что этот штамм успешно колонизирует ризосферу пшеницы, а сезонные отличия динамики обусловлены погодными факторами.

В условиях Западной Сибири в садовом биоценозе нами испытано действие штаммов бацилл двух видов на фитопатогенный гриб *D. applanata* - возбудителя пурпуровой пятнистости, вызывающего наиболее распространенное заболевание малины [Штерншис и др., 2010]. Предварительно *in vitro* выявлена антагонистическая активность штаммов *B. subtilis* и двух штаммов *B. licheniformes*, выделенных в сибирских условиях. На чистой культуре *D. applanata* три исследуемых штамма бактерий рода *Bacillus* (10^4 КОЕ/мл) в той или иной степени подавляли ее рост. Так, на седьмые сутки выявлено подавление развития патогена под влиянием всех исследуемых штаммов. Ингибирующая активность штаммов составила от 17,2 до 69,7%. При увеличении концентрации суспензии в 10 и 100 раз не

отмечено усиления ингибирующей активности штаммов в отношении *D.applanata.*

В 2008–2009 гг. проведены полевые опыты по изучению влияния суспензии трех штаммов, протестированных в лабораторных условиях, на поражение малины сорта Зоренька Алтая пурпуровой пятнистостью. В качестве сравнения использовали химический фунгицид топаз. Результаты действия препаратов на развитие пурпуровой пятнистости в полевом опыте 2008 г. представлены в таблице 1.6. Под влиянием биопрепаратов распространённость болезни уменьшилась в 1,9–2,9 раза, а развитие заболевания в 3,2–4,3 раза по сравнению с контролем. Развитие болезни в контроле превышало экономический порог вредоносности (ЭПВ) в 1,4 раза (ЭПВ – 25%). Различия по этому показателю между вариантами с использованием штаммов и химическим эталоном не существенны ($d<НСР_{05}=7,0$). Биологическая эффективность применения биопрепаратов была близка для всех тестируемых штаммов – от 69,1 до 76,9%.

Таблица 1.6.

Влияние бактериальных штаммов на поражение малины пурпуровой пятнистостью, 2008 г.

Вариант	Распространённость болезни, %	Развитие болезни, %	Биологическая эффективность, %
Контроль	92,5	35,0	-
B. licneniformis IC- 832-1	32,5	8,1	76,9
B. licneniformis IC-831-1	32,0	10,8	69,1
B. subtilis ВКПМ В -7092	42,5	10,6	69,7
Топаз	50	12,5	64,3
$НСР_{05}$		7,0	

Таблица 1.7

Влияние бактериальных штаммов на поражение малины пурпуровой пятнистостью, 2009 г.

Вариант	Распространённость болезни, %	Развитие болезни, %	Биологическая эффективность, %
Контроль	75,0	25,0	-
B. licneniformis IC- 832-1	43,2	10,8	56,8
B. licneniformis IC-831-1	34,1	8,5	66,0
Bacillus subtilis ВКПМ В -7092	38,6	9,7	61,2
Топаз	38,6	10,8	56,8
$НСР_{05}$		4,0	

В таблице 1.7. представлены результаты, полученные в 2009 г., отличавшемся по погодным условиям от предыдущего. В 2008 г. более активное проявление симптомов поражения пурпуровой пятнистостью могло быть связано с обильными осадками в июне, что обусловило проявление ранней инфекции – пурпуровой пятнистости. В 2009 г. в июне повышенное количество выпавших осадков способствовало проявлению симптомов заболевания, однако более активное проявление сдерживалось температурным фактором – в целом температурный режим в этот период был пониженным. В 2009 г. по сравнению с 2008 г. отмечались более частые и резкие перепады температуры и менее интенсивные осадки. Под влиянием биопрепаратов распространённость болезни уменьшилась в 1,7–2,7 раза по сравнению с контролем, а развитие заболевания в 2,2–2,9 раза по сравнению с контролем. Глубокого поражения побегов малины в этом году не было отмечено. Развитие болезни в контроле не превышало ЭПВ. Различия между вариантами с использованием биопрепаратов и химическим эталоном не существенны (d<НСР05=4,0). Биологическая эффективность применения биопрепаратов была близка как для штамма *B. subtilis*, так для двух штаммов

B. licheniformis, – от 54 до 66% Сравнение результатов по годам показало, что более всего влияние абиотических факторов отразилось на активности первого штамма, но не повлияло на эффективность двух остальных [Штерншис и др., 2010].

Кроме того, в полевых условиях нами изучена активность этих штаммов против септориоза черной смородины сорта Галинка, возбудитель *Septoria rubis* [Шпатова и др., 2011]. При испытании штаммов наиболее эффективными для защиты смородины черной от септориоза в течение вегетационных периодов 2008-2010 гг. оказались бактериальные штаммы *B. licheniformis* ВКПМ B-10561 и ВКПМ B-10562. Биологическая эффективность применения этих штаммов составляла в среднем за три года 74% (рис.1.2). Биологическая эффективность штамма *B. subtilis* ВКПМ B-10641 составила 60-69%, хотя в 2010 г. эффективность его применения (77%) превысила эффективность двух других штаммов, что можно объяснить аномальными условиями 2010 г. В первой половине вегетационного периода (май – июнь) в связи с низкими температурами до начала июня, холодными ночами в этот период проявление симптомов поражения грибными заболеваниями смородины отмечались единично. Более активное поражение септориозом наблюдали в июле и августе в связи с повышением температуры и более обильными осадками.

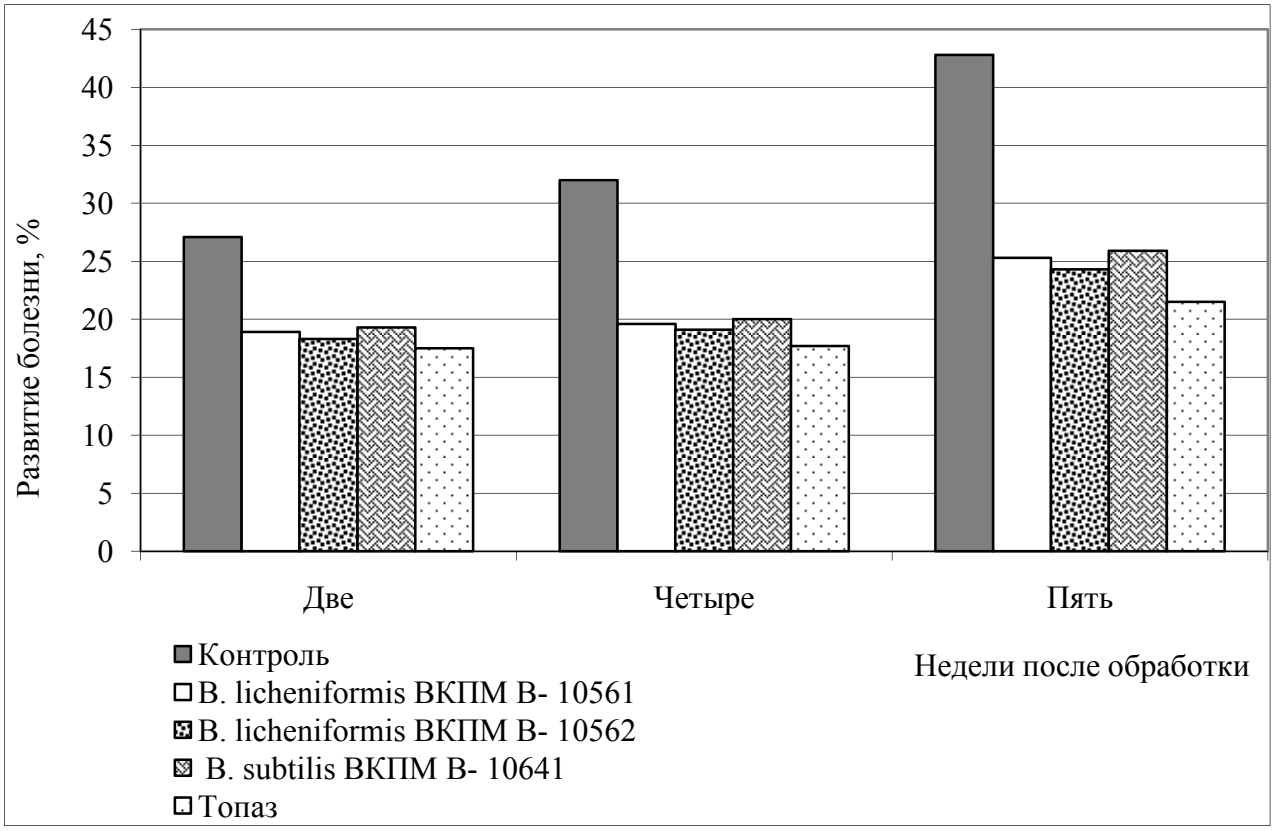

Рис. 1.2. Динамика пораженности черной смородины септориозом под влиянием обработок бактериальными штаммам и *B. subtilis* ВКПМ B-10641 и *B. licheniformis* ВКПМ B-10562, ВКПМ B-10561 (СХА «Сады Сибири») в среднем за 2008 - 2009 гг. ($НСР_{05}$ по препаратам – 0,21; $НСР_{05}$ по срокам – 0,17).

Биологическая эффективность химического эталона топаза в среднем за три года составила 85%, что объяснимо, так как данный препарат обладает более продолжительным периодом воздействия и менее подвержен влиянию погодных условий, чем экспериментальные препараты на основе бактериальных штаммов. Однако необходимо отметить, что в 2009 г. биологическая эффективность экспериментальных биопрепаратов достигла уровня химического фунгицида.

Проведенные исследования по снижению пораженности растений смородины септориозом показали, что результаты в целом сопоставимы с

данными, полученными при обработке этими же препаратами растений малины против пурпуровой пятнистости [Штерншис и др., 2010].

Что касается биологического контроля других болезней плодовых и ягодных культур, то изучено влияние *B. subtilis* на серую гниль земляники [Hang et al., 2005; Helbig, Bochow, 2001] и яблок при хранении [Peighami-Ashnaei et al 2009], а также на болезни виноградников [Furuya et al., 2011]. Подавление возбудителя серой гнили *B. cinerea* на растениях винограда и плодов яблони продемонстрировано также при применении штаммов бактерии *Bacillus* spp., причем наибольшую активность проявлял вид *B. licheniformis*[Haidar, 2016; Touré, 2004].

Интродукция бацилл для биологического контроля болезней ягодных и плодовых культур вместо применения химических пестицидов особенно ценно в связи с преимущественным потреблением плодов этих растений в свежем виде, а также их использованием в лекарственных целях.

Представляет интерес возможность использования штаммов бацилл для подавления болезней картофеля – одной из основных продовольственных культур в России – как в период вегетации, так и в период хранения клубней картофеля. В этом плане в отношении возбудителя фузариоза картофеля показана возможность подавления роста фитопатогенов *F. sambacinum, F. oxysporum* и *F. redolens*. Среди активных штаммов были представители рода *Bacillus*: *B. subtilis* штаммы 1-3, *B. weihenstephanensis* и *B. pumilis*. Штаммы *B. subtilis* № 2 и 3 проявили наибольшую способность к ингибированию роста колоний микромицетов, в том числе против возбудителей сухой гнили картофеля [Марданова и др., 2015]. Продемонстрированы также возможности антагонистического эффекта *B. licheniformis* в отношении болезней картофеля [Sadfi et al., 2002].

Отмечено снижение поражения растений картофеля возбудителем ризоктониоза - фитопатогенным грибом *R. solani* при использовании бактериальных штаммов. Эффект подавления болезни варьировал от 12 до 83% [Schmiedeknecht et al., 1998; Donmez et a.l, 2015].

В отношении возбудителей черной ножки картофеля *Erwinia carotovora var. Atroseptica* и *E. aroideae*, а также сухой фузариозной гнили *F. sambucinum* изучена активность более 200 штаммов бактерий рода *Bacillus* [Дорожкин и др., 1991]. По данным И.И. Новиковой с соавторами [2013], антагонистический эффект исследованных ими штаммов бацилл против возбудителей ризоктониоза и серебристой парши варьировал в зависимости от биоагента и фитопатогена. Наиболее выраженное действие оказали *B. subtilis* И-5 12/23 и *B. laterosporus Bl* 101(до 78% в отношении возбудителя серебристой парши *Helmintosporium soiani* и до 42% в отношении возбудителя ризоктониоза картофеля *Rhizoctonia solanii*.

Подавление возбудителей ризоктониоза, фузариоза и белой гнили (*R. solani, Sclerotinia minor* и *F. solani)* отмечено при изучении потенциальных биоагентов *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* и *B. subtilis* [Kai et al., 2007; Schisler et al., 2009, 2012; Catello et al., 2012]. В результате скрининга штаммов бацилл из Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР и ВКПМ ФГУП НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов по признаку антагонистической активности в отношении возбудителей болезней картофеля при хранении авторами были отобраны наиболее перспективные штаммы *B. laterosporus* Bl101, *B. subtilis* М-22 и *B. subtilis*-И5-12/23 [Рой и др., 2005].

Показано, что интенсивность развития болезней картофеля зависит от численности и состава антагонистов. При изучении биоразнообразия и антагонистической активности эпифитных микроорганизмов, выделенных с клубней картофеля, продемонстрировано, что наиболее активны штаммы рода *Bacillus* [Бельская и др., 1995].

Е. И. Кипрушкиной [2015] проведено детальное исследование возможностей использования бактерий-антагонистов для обработки клубней при холодильном хранении. При обработке клубней штаммами *B. subtilis* наблюдалась зависимость уровня снижения потерь от сорта картофеля. Показаны адаптивные возможности штамма *B. subtilis* 413, который после

инокуляции присутствовал в составе эпифитной микробиомы клубней картофеля при холодильном хранении. Использование бацилл-антагонистов для обработки клубней привело к продлению сроков хранения, повышению пищевой ценности и последующего увеличения урожайности культуры.

1.4. Взаимодействие *Bacillus thuringiensis* с фитофагами

Энтомопатогенные бациллы издавна известны как регуляторы численности насекомых в природе. В качестве агентов биологического контроля численности насекомых наиболее часто используются бактерии *Bacillus thuringiensis* [Гулий и др.,1982; Garczynnski, Siegel, 2007]. Бактерия получила свое окончательное название *Bacillus thuringiensis* Berliner в 1911г. после ее выделения Э. Берлинером в Германии (Тюрингия) из мельничной огневки *Ephestia kuhniella* Zell. и последующей идентификации [Berliner, 1911]. *B. thuringiensis* как спорообразующая бактерия во время споруляции продуцирует также параспоральный кристаллический белок, обладающий токсическим действием на насекомых. Это свойство и обусловило широкое использование *B. thuringiensis* как основы экологически безопасных энтомопатогенных препаратов в качестве альтернативы синтетическим химическим пестицидам.

Первоначально штаммы *B. thuringiensis* выделяли из насекомых отряда чешуекрылых и, соответственно, использовали для контроля численности этих же фитофагов [Heimpel, 1967]. Впоследствии выяснилось, что штаммы *B. thuringiensis* можно выделять из различных природных субстратов, включая почву, лесную подстилку, больных и погибших насекомых нескольких отрядов, а также с листьев растений и других объектов [Бурцева и др., 2001; Ермолова, 2016]. После продолжительного применения препаратов на основе этой бактерии исключительно против гусениц, в 1977 г. был выделен штамм *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, вызывающий заболевание и гибель насекомых отряда двукрылых [Маргалит, Бен-Дов, 2001]. Сначала в качестве хозяев этого подвида рассматривались только

кровососущие комары, но впоследствии среди насекомых-хозяев выявились и фитофаги. Через несколько лет в Германии был идентифицирован штамм *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis (morrisoni)*, токсичный для личинок отряда жесткокрылых [Krieg et al., 1983]. Данный подвид характеризуется пластинчатой формой кристаллов эндотоксина в виде плоских квадратов, прямоугольников и ромбов в отличие от бипирамидальной формы кристалла подвидов, действующих на гусениц или от округлой формы белкового кристалла *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

По мере обнаружения новых изолятов *B. thuringiensis* как агентов бактериологического подавления численности насекомых произошло разделение бактерии на патотипы (патоварианты) согласно специфичности их энтомоцидного действия на насекомых определенных отрядов [Hofte, Whiteley, 1989; Lereclus et al., 1993]. Наиболее значимы как основа биопрепаратов для биоконтроля численности насекомых три патотипа *B. thuringiensis (*A, B и C). Подвиды *B. thuringiensis*, кристаллы которых с наибольшей активностью поражают чешуекрылых, относятся к патоварианту A. B патовариант B включены штаммы, поражающие двукрылых, а в патовариант C - жесткокрылых. Подвиды *B. thuringiensis*, относящиеся к этим патотипам, чаще всего используются в качестве основы препаратов для биологического контроля насекомых-фитофагов, хотя в целом насчитывается большее число патовариантов *B. thuringiensis*, в том числе активных в отношении нематод и фитопатогенов [Смирнов, 2000; Bravo et al., 1998].

Рассматриваемый вид спорообразующей энтомопатогенной бактерии продуцирует вторичные метаболиты, активно участвующие в инфекционном процессе. К метаболитам *B. thuringiensis* относят ферменты, антибиотики и токсины, среди которых, как уже упоминалось, наибольшее значение для контроля численности насекомых имеет белковый δ-эндотоксин. Значимую роль в подавлении численности насекомых играет также продуцируемый

бактерией во внешнюю среду термостабильный β–экзотоксин нуклеотидной природы [Кандыбин и др.,2009].

Механизм действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на насекомых детально изучен [Bravo et al., 2007, 2013; Pardo-Lopez et al., 2013]. Сначала растворение белкового кристалла в среднем отделе кишечника насекомого происходит под действием щелочного pH кишечника. Высвобождающиеся полипептиды – протоксины имеют молекулярную массу (м.м.) 130 кДа для патоварианта А и 67 кДа – для патовариантов В и С. Следующая более важная стадия – активация под действием сериновых протеаз. Протоксины превращаются в истинные токсины, уменьшаясь в размерах примерно вдвое за счет отщепления N-терминальных аминокислотных остатков. Последовательно повышается инсектицидная активность получаемых токсинов. Интактный кристалл в 3,5 раза менее активен, чем протоксин, который, в свою очередь, в 6 раз менее активен, чем истинный токсин [Luthy, Wolfersberger, 2000]. Истинный токсин является по современной номенклатуре Cry-токсином. В настоящее время известно большое количество продуцируемых *B. thuringiensis* дельта-эндотоксинов. Это разнообразие обусловлено генетической пластичностью *B. thuringiensis.* В результате многочисленных работ по получению инсектицидных белков (путем включения кодирующих их генов в геном бактерии кишечной палочки), потребовалась систематизация как генов, так и продуцируемых ими токсинов *B. thuringiensis*. Во всем мире пользуются номенклатурой, предложенной группой ученых во главе с Н. Крикмор [Crickmore, 2000; Crickmore et al., 1998, 2014]. Гены, кодирующие инсектицидные белки дельта-эндотоксина, обозначены как *cry*, а сами токсины как Cry (сокращение от английского crystal – кристалл). В дополнение к инсектицидным Cry-белкам обнаружены цитолитические Cyt-белки у диптеро-специфичных штаммов (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) [Маргалит, Бен-Дов, 2001; Ben-Dov, 2014]. В основу номенклатуры токсинов положен принцип алгоритмов филогенетического дерева. Присвоенные генам и

белкам ранговые цифры и буквы указывают на степень филогенетического расхождения, что отражается в последовательности аминокислот в белке. Каждый токсин именуется по четырем рангам (арабские буквы), например, Cry1Ab или Cyt2Ba. Наименование зависит от местонахождения в филограмме, демонстрирующего степень идентичности аминокислотной последовательности между белками. Филограмма, а также список Cry и Cyt-белков представлены в обзорах [Crickmore et al., 1998; 2014; Schnepf et al., 1998]. Многие штаммы *B. thuringiensis* образуют более одного Cry-токсина, включенных в один кристалл дельта-эндотоксина [Luthy, Wolfersberger, 2000]. Cry и Cyt- белки относятся к классу PFT-токсинов (pore-forming toxins), образующих поры в клеточных мембранах [Bravo et al., 2007]. К белкам, токсичным для Lepidoptera, относятся, например, Cry1 и Cry9, для Coleoptera – Cry3, Cry7 и Cry8, а для Diptera – Cry11, Cry21 и Cyt-белки (Bravo et al., 2007).

Структура Cry- токсинов тесно связана с механизмом их действия. Эта структура включает три домена (рис. 1.3).

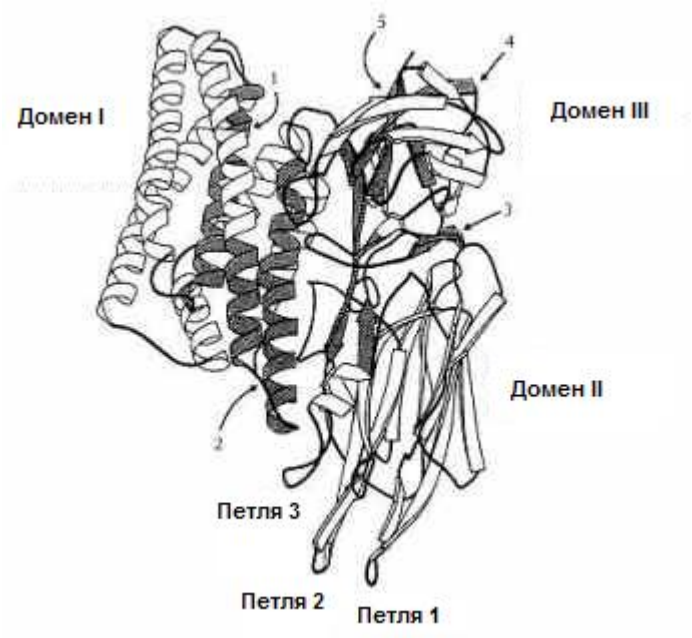

Рис.1.3. Структура Cry-токсина.

Домен II заканчивается тремя петлями, которые взаимодействуют с рецепторами клеточных мембран (Li et al., 1991).

Рентгеноструктурный анализ Cry белков *B. thuringiensis* обнаружил наличие трех составляющих их доменов [Grochulski et al.,1995; Garczynski, Siegel, 2007]. Домен I представляет пучок из 7 α-спиралей, одна из них опоясывает остальные шесть. Домен II состоит из трех антипараллельных β-структур. Бета-ленты каждой структуры заканчиваются тремя выступающими петлями. Домен III представляет сэндвич из двух β-структур. Проходя через перитрофическую мембрану, токсин связывается со специфическим участком (сайтом) на мембране цилиндрических клеток эпителия кишечника, затем образуются поры в мембране, через которые происходит проникновение в клетку токсина [Luthy, Wolfersberger, 2000]. При этом основная функция домена I заключается в увеличении проницаемости клеточных мембран, а домена II – в связывании с рецепторами. Связывание домена II с рецепторами – ключевой момент, отвечающий за специфичность действия. Для этого в структуре имеются специальные петли на конце домена II, которые зацепляются за рецепторы как за якорь. Охарактеризованы 4 типа рецепторов на примере Cry1A: кадхерин-подобный белок (CADR); гликозилфосфатидилинозитол (GPI), связанный с N-аминопептидазой (APN); GPI, связанный с щелочной фосфатазой (ALP); и 270-кДа гликоконъюгат (GCR) [Hua et al., 2004]. Рецепторы идентифицированы как белки или гликолипиды. В частности, рецептором для Cry 1Ac у капустной моли служит APN. Количество токсина, необходимое для гибели, определяется соответствием насекомого (его рецепторов) токсину. Так, гусеницы капустной белянки (массой 200-300 мг) погибают от 25-50 нг кристаллического белка, кодируемого cry1A генами, а для личинок комаров достаточно в 10 раз меньше белка, кодируемого генами cry4, cry10 и cry11. Домен III проявляет многофункциональность: защита токсина от протеолиза, связывание с

рецепторами и участие в образовании ионных каналов. Его влияние имеет особое значение в случае эндотоксина двойного действия (против чешуекрылых и двукрылых) [Bravo et al., 2007]. При введении сублетальной дозы эндотоксина поврежденный эпителий способен восстановиться, а устойчивость насекомого к определенному подвиду связана с отсутствием связывания с рецепторами [Luthy, Wolfersberger, 2000; Garczynski, Siegel, 2007]. В этом аспекте интересно исследование, где показано, что невосприимчивость гороховой тли к токсинам Cry 1Ac Cry 3Aa определяется отсутствием связывания их с эпителием кишечника насекомых [Li et al., 2011].

Таким образом, краткая схема действия Cry-токсинов выглядит следующим образом: 1) связывание с рецептором мембран клеток, 2) внедрение токсина в клеточную мембрану с последующей олигомеризацией и образованием пор и/или ионных каналов в мембране, 3) осмотический дисбаланс и лизис клетки. Внешне это проявляется в прекращении питания в течение 1 часа вследствие паралича кишечника, а затем гибели через 1-2 дня. Поврежденный эпителий перестает быть барьером для бактериальной инфекции (проникновения спор).

При растворении белкового эндотоксина *B. thuringiensis* патоварианта B образуется также Cyt-токсин, состоящий из единственного домена, включающего бета-слой, вокруг которого обвиты две альфа-спирали [Lopez , Ceron, 2007]. Механизм взаимодействия Cyt-токсина с клеточной мембраной отличается от механизма действия Cry-токсина [Маргалит, Бен-Дов, 2001; Ben-Dov, 2014]. Первоначальное связывание происходит с ненасыщенными фосфолипидами, поэтому токсин не действует на бактериальные протопласты, из которых удалены фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол. Существенным здесь является ацилненасыщенность в определенном положении фосфолипида мембраны. Сначала токсин связывается как мономер, затем образует агрегаты, формируя поры в мембране. Молекулярная масса агрегатов 300-400 кДа, что эквивалентно 16

молекулам токсина. Формирование пор приводит к цитолизу. Однако по другим данным, Cyt A не создает хорошо сформированные каналы, а действует как детергент, разрушая структуру мембраны. Результаты работы К. Ду с соавторами [Du et al., 1999] показали, что С-терминальная часть Cyt A и Cyt B токсинов, состоящая из β-структур, внедряется в мембрану с образованием пор. По данным П. Бутко [Butko, 2003] токсичность кристаллов *Bt* ssp. *israelensis* обусловлена комбинацией четырех белков Cyt 1A, Cry 4A, Cry 4B и Cry 11A. Синергизм между Cyt 1A и Cry 11A увеличивает токсичность каждого в 4-5 раз в сравнении с их индивидуальным действием. Подробный механизм действия эндотоксина представлен в обзорах А. Браво с соавторами [Bravo et al., 2007, 2013]. Считают также, что на основе структурных особенностей токсинов их можно отнести к трем категориям: трехдоменный токсин тип α-PFT, Cyt-токсин тип β-PFT и аэролизины (параспорины) тип β-PFT [Xu et al., 2014]. К последним принадлежат токсины, поражающие раковые клетки человека.

Что касается термостабильного β-экзотоксина (турингиензина), то долгое время считали, что он является антиметаболитом нуклеиновых кислот, механизм действия которого заключался в ингибировании синтеза ДНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы) [Farkas et al., 1976]. По последним данным, этот токсин представляет собой небольшую молекулу олигосахарида, включающую аденозин, глюкозу, фосфорную глюконовую кислоты с молекулярной массой 701 Да [Liu et al., 2014]. Вызывает тератогенез, наиболее ярко проявляющийся у взрослых насекомых. В головном отделе возможна атрофия или редукция глаз, усиков, ротового аппарата. Наблюдается атрофия или деформация конечностей и крыльев. Естественно, что нормальная жизнедеятельность таких уродливых особей невозможна. В первые же часы интоксикации наблюдаются качественные превращения гемоцитов. При инъекции в полость тела гусениц β-экзотоксин значительно токсичнее, чем при скармливании [Кандыбин, 1989]. Кроме

того, разными авторами показано, что личинки старших возрастов более восприимчивы к экзотоксину, чем младшие. В комплексе со спорами и кристаллами экзотоксин действует как синергист [Bravo et al., 2007]. Содержание β-экзотоксина расширяет сферу применения *B. thuringiensis* за счет иного механизма действия экзотоксина по сравнению с эндотоксином. Экзотоксин может действовать не только через кишечник, но и через покровы насекомых, а в комбинации со спорово-кристаллическим комплексом проявляет синергизм. Поэтому экзотоксинсодержащие препараты рекомендованы не только против гусениц, но также против таких опасных вредителей, как колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say и паутинный клещ *Tetranichus urticae* Koch.

Вызывает интерес еще один класс экзотоксинов *B. thuringiensis* - вегетативные инсектицидные белки (Vip-белки), активные против широкого спектра чешуекрылых насекомых [Lee et al., 2003; Garczynski., Siegel, 2007]. Эти белковые экзотоксины секретируются во время вегетативного роста некоторых штаммов *B. thuringiensis*. В частности, показано, что препарат секретируемых белков *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (штамм 5м) вызывал гибель 60% гусениц черемуховой моли. Электрофоретический анализ данных секретируемых белков в SDS-PAGE показал, что у этого штамма присутствовал белок с молекулярной массой порядка 89 кДа [Калмыкова и др., 2009]. Это соответствует данным по вегетативному инсектицидному белку Vip 3A, который проявляет активность против широкого спектра личинок Lepidoptera, лизируя эпителиальные клетки среднего кишечника [(Donovan et al., 2001]. Индийские ученые [(Sattar et al., 2008] впервые продемонстрировали действие Vip-белка на насекомых отряда Homoptera, что особенно важно для биоконтроля численности этих фитофагов. В последующие годы интерес к вегетативным инсектицидным белкам стал возрастать [Hernandez-Rodriguez et al., 2009; Hernandez-Martinez et al., 2013; Silva et al., 2016]. При изучении действия токсина Vip 3Aa16 на гусениц двух видов насекомых: мельничной огневки *Ephestia kuehniella* и Египетской

хлопковой совки *Spodoptera littoralis* показано, что узнавание рецепторов в кишечнике гусениц этим токсином определяет его активность в отношении разных насекомых- хозяев [Abdelkefi-Mesrati et al., 2011]. Выявляется все большее разнообразие экзотоксинов Vip3A. Так, Vip3Aa45 и Vip 3Ag4 из испанской коллекции *B. thuringiensis*, отличающиеся от Vip 3Aa1, высокотоксичны для гусениц трех видов насекомых [Palma et al., 2013], Vip3Ad нетоксичен для 8 видов насекомых, а Vip3Af проявлял активность только в отношении гусениц кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* [Escudero et al., 2014]. Проанализирован механизм действия Vip3Aa и Cry1Ia10 токсинов *B. thuringiensis* на гусениц совок четырех видов *Spodoptera spp*. *In vitro* показано, что эти два токсина не конкурируют за один и тот же рецептор мембран ворсинок среднего отдела кишечника [Bergamasco et al., 2013]. При этом вегетативный инсектицидный белок более активен, чем Cry токсин, а их смешивание приводит к синергизму в отношении трех видов совок. Только в случае совки *S. eridania* выявлена возможность конкурирования токсинами за один рецептор, тогда более высокую активность проявляет Cry1Ia10 токсин. На примере озимой совки *Agrotis segetum* экспериментально доказано, что Vip3Aa16 специфически связывается с ворсинками среднего кишечника гусениц и не ингибирует при этом связывание Cry1Ac токсина с другим рецептором мембран ворсинок и наоборот. Авторы считают, что этот результат важен для использования Vip-токсина в качестве нового биоагента контроля численности насекомых [Hamadou-Charfi et al., 2013].

Экологические факторы, включающие абиотические и биотические, воздействуют на оба сочлена системы энтомопатогенная бактерия – хозяин при развитии патологического процесса насекомого под влиянием биоагента.

Из абиотических факторов наиболее значимы температура, влажность и солнечный свет, из биотических – микрофлора окружающей среды, биологически активные вещества растений. Все эти факторы могут в разной степени влиять на течение инфекционного процесса и на сами патогены,

сохраняющиеся в окружающей среде. Рассмотрим влияние основных экологических факторов, влияющих взаимодействие энтомопатогенных бактерий с фитофагами, что часто ведет к затруднениям в их использовании как основы биологических препаратов.

Влияние температуры и влажности

Температура и влажность, как правило, неоднозначно влияют на бактериальные агенты биологического контроля насекомых, как обитающих в естественных условиях, так и внесенных в биоценозы в составе биопрепаратов. Следует иметь в виду, что насекомые как пойкилотермные животные практически имеют температуру тела, равную температуре окружающей среды.

В случае бактериальных инфекций насекомых, температура оказывает определенное влияние на сохранность вегетативных клеток, спор и токсинов энтомопатогенных бактерий, а также на течение инфекционного процесса. Влияние температуры на токсины *B. thuringiensis* зависит от их химической природы. Так, белковый дельта-эндотоксин значительно менее устойчив к температуре, чем бета-экзотоксин нуклеотидной природы. Температура достаточно сильно влияет на течение инфекционного процесса при заражении насекомых *B. thuringiensis*. Обычно оптимальная температура составляет 24…32°C, нижний температурный предел 13…15°C, верхний – 36…50°C (для разных пар хозяин-паразит) [Бурцева и др., 2001]. При изучении остаточной активности *B. thuringiensis* из трех бактериальных препаратов (Delfin, Dipel и Foray) в хвойном лесу установлено, что через 8 дней после обработки оставалось около половины первоначального количества бацилл при температурах 10…23°C [Gindin et al., 2007]. Эти данные свидетельствуют о значении температуры окружающей среды при внесении в биоценозы бактериальных энтомопатогенов для эффективного их использования.

Влияние влажности на течение инфекционного процесса при действии энтомопатогенных бактерий незначительно. Однако при хранении в водной суспензии разрушение бацилл происходит гораздо быстрее, чем при хранении в сухом виде [Штерншис, 1995].

Влияние солнечной радиации

Солнечная радиация, главным образом ультрафиолетовое облучение (УФО) - самый мощный фактор инактивации энтомопатогенных микроорганизмов. В лесных массивах влияние солнечного излучения несколько ослаблено за счет кроны.

Существует некоторая разноречивость мнений относительно разной восприимчивости спор и кристаллов экзотоксина к УФО. Как правило, исследователи указывают на более высокую, а иногда абсолютную устойчивость кристаллов. Но имеется ряд отечественных и зарубежных работ, где отмечается, что под влиянием инсоляции эндотоксин инактивируется [Лескова, 1987], и в ряде случаев быстрее, чем споры Батурин, Батурина, 1987].

Для *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* продемонстрировано снижение инсектицидной активности спор и эндотоксина под влиянием солнечной и УФ- радиации. При этом соотношение скорости инактивации спор и скорости инактивации кристаллов под действием естественной солнечной радиации выше, чем это же соотношение под действием УФО [Петров и др., 1989]. Это подтвердили и данные зарубежных авторов [Pozsay et al., 1987; Pusztai et al., 1991]. В наших опытах по облучению спор и кристаллов эндотоксина уже через 20 минут при длинах волн 290-340 нм жизнеспособность спор уменьшалась в 30 раз, а для уменьшения количества кристаллов потребовалось облучение в течение 4 часов [Штерншис, 1995].

Под влиянием солнечной радиации разрушается, хотя и медленнее, и β-экзотоксин *B. thuringiensis* [(Кандыбин, 1989]. Так, количество экзотоксина на листьях и в поверхностном слое почвы снижается соответственно на 12 и

60% через 1 сутки после нанесения и на 75 и 86% через 15 суток. По данным К. Иньоффо [Ignoffo, 1992], под действием солнечной радиации активность эндотоксина и жизнеспособность спор на листьях уменьшается быстрее, чем активность β-экзотоксина.

Другие факторы окружающей среды

Интересно, что повреждение микроорганизмов под действием УФО зависит также от влияния кислорода воздуха. Высказана гипотеза [Ignoffo, Garcia, 1978], что при инсоляции энтомопатогенов поверхностные биомолекулы образуют органические перекиси, ответственные за уменьшение жизнеспособности и патогенности биоагентов. Известно, что поглощение света в живых организмах с участием фотосенсибилизаторов в присутствии кислорода ведет к процессам повреждения биологических объектов [Фут, 1979]. Взаимодействие кислорода с фотосенсибилизаторами происходит через процесс свободнорадикального окисления биологических макромолекул микроорганизмов, что приводит к их повреждению. Можно полагать, что выживание аэробных микроорганизмов в атмосфере кислорода связано со сложным взаимодействием между биологической генерацией свободных радикалов и способностью организма контролировать эти частицы. Контроль свободных радикалов кислорода осуществляется супероксидисмутазной и антиоксидантной системами клетки. Эти данные согласуются с концепцией отрицательного влияния кислорода как компонента внешней среды на энтомопатогенные микроорганизмы, что подтверждено экспериментами по интенсивной обработке кислородом спорокристаллического комплекса *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* (штамм 69-6). Оказалось, что при этом количество живых спор уменьшается более чем на порядок, а процент гибели насекомых - тест-объектов снижается более чем вдвое [Штерншис, 1995]. При добавлении в обрабатываемую суспензию спор и кристаллов антиоксидантов как ингибиторов свободных радикалов сохранность биоагентов резко возрастала. В условиях высокой скорости

подачи кислорода добавление антиоксиданта в концентрации 0,2% сохраняло споры и кристаллы. Эти опыты свидетельствуют о необходимости учета и данного экологического фактора. Игнорирование роли этого фактора в исследованиях энтомопатогенов связано с неочевидностью повреждений и традиционной оценкой кислорода как необходимого компонента в жизни аэробных микроорганизмов. В природе энтомопатогенные бактерии испытывают неблагоприятное воздействие кислорода в комплексе с другими факторами: температурой, влажностью, УФО. Под влиянием всех этих факторов могут быть созданы благоприятные условия запуска свободнорадикальных механизмов повреждения микроорганизмов. В этой связи уместно привести данные по влиянию углекислого газа на активность энтомопатогенных бактерий. При изучении действия атмосферного углекислого газа на активность *B. thuringiensis*, распределенных на листьях, в отношении насекомых, выявлена прямая зависимость от концентрации газа в воздухе [Coviella, Trumble, 2000]. По мнению авторов, при прогнозируемом в будущем увеличении концентрации CO_2 в атмосфере повысится и эффективность энтомопатогенных бактериальных препаратов в полевых условиях. Эти результаты также находятся в согласии с концепцией влияния кислорода на микроорганизмы.

К абиотическим факторам окружающей среды антропогенной природы относятся различные химические соединения, в том числе соли, химические инсектициды и другие агрохимикаты. Как правило, кратковременное воздействие их не оказывает влияние на энтомопатогены. В то же время нельзя полностью исключать отрицательного действия химикатов. Восприимчивость к энтомопатогену фитофага может зависеть от химического состава растения, на котором он питается. Еще до попадания в организм насекомого на патогены воздействуют фитонциды и другие биологически активные вещества, продуцируемые растениями.

Одними из первых бактериостатическое и бактерицидное действие хвои на *B. thuringiensis* отметили сибирские ученые [Полтев, Печерская,

1967]. Авторы полагали, что фитонциды могут защищать насекомых от болезней, подавляя энтомопатогены, попадающие на растения. При нанесении на зерно пшеницы и кукурузы бактериального препарата наблюдали снижение активности δ-эндотоксина и β-экзотоксина уже через 15 суток [Salama et al., 1996]. Учитывая отсутствие солнечного излучения и осадков, можно полагать, что ингибирующее влияние на токсины оказывали биологически активные вещества зерен.

В то же время в опытах Н.В. Кандыбина [1989] по влиянию фитонцидов и экстрактов листьев тополя душистого, яблони и других плодовых культур на *B. thuringiensis* не обнаружено существенного влияния на бактерии этих растений. По другим данным, белок эндотоксина может инактивироваться танинами, экстракт листьев хлопка уменьшал его активность сильнее, чем экстракт хвои [Garczynski, Siegel, 2007]. Кроме того, и высокая (pH 1) и низкая (pH 11) кислотность поверхности листьев инактивирует белок токсина [Burges, Jones, 1998]. Изучены взаимодействия в системе триотрофа: разновидности капусты – капустная моль – *B. thuringiensis*. В качестве растительного субстрата использовали капусту белокочанную, цветную, китайскую и краснокочанную [Jafary et al., 2016]. *B. thuringiensis* наиболее активно подавлял численность гусениц моли при их питании на менее привлекательном растении (краснокочанная капуста) по сравнению с более привлекательным кормовым ресурсом (китайская капуста). Такая тенденция выявлена и в наших опытах [Андреева и др., 2013] по восприимчивости гусениц фитофагов к бактериальному препарату в зависимости от разновидности капусты. На менее благоприятном для развития насекомых растении-хозяине их восприимчивость к биопрепарату (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki)* была выше, хотя и варьировала в зависимости от численности в определенных условиях года. Такая зависимость подтверждается результатами ряда работ, где изучалось влияние растения-хозяина на эффективность *B. thuringiensis* в отношении насекомых-

фитофагов [Meade, Hare, 1993; Janmaat, Myers, 2005]. Величина $ЛК_{50}$ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, используемого против гусениц 3-го возраста лугового мотылька, значительно варьировала в зависимости от вида растения. Наименьшую $ЛК_{50}$ отмечали при питании на свекле, в то время как на моркови значения были в 5,5-6,0 раза выше [Андреева, 2009]. При испытании *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* против гусениц *Malacosoma disstria* Hub., питающихся на разных субстратах, показано, что $ЛК_{50}$ для личинок 3–го возраста была в 100 раз больше на тополе, чем на сахарном клене [Kouassi et. al., 2001]. Бактериальный токсин Cry1Ac при испытании против совки *Helicoverpa armigera* оказался более эффективным на растениях хлопчатника и сорго [Paramasiva et al., 2014]). Учет влияния кормового ресурса в системе триотрофа служит резервом повышения активности *B. thuringiensis* в контроле численности фитофагов.

Влияние на энтомопатогенные бактерии и на течение инфекционного процесса оказывают представители эпифитной, почвенной и другой микрофлоры окружающей среды (биотические факторы). Например, при изучении влияния грибов рода *Beauveria* на *B. thuringiensis* subsp. *dendrolimus* выявлено подавляющее действие грибов на эту бактерию [Громовых, 1982].

Почва является экологической средой как для энтомопатогенов, поражающих наземных насекомых, но персистирующих там до встречи с объектом – мишенью, так и для энтомопатогенов, паразитирующих на почвообитающих насекомых. В почве патогены подвергаются действию уже рассмотренных абиотических и биотических факторов, исключая солнечное излучение. А.Я. Лесковой [1987] установлено существенное значение для сохранности энтомопатогенных бактерий типа почвы, а также показателя кислотности. Бактерии не размножались в почвах с низким pH и отмирали при pH 5,0-5,6. Бациллы сохранялись в почве около двух лет, причем у реизолятов через 2 года выявлены изменения физиолого-биохимических свойств. При инкубировании спор и кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* в почве показано, что хорошая выживаемость спор через 2 недели пребывания

в почве обусловлена их неспособностью прорастать в этой среде [Petras, Casida, 1985].

Очевидно, сохранность спор и кристаллов *B. thuringiensis* зависит от типа почвы, ее кислотности, влажности, почвенной микрофлоры. Около 90% кристаллов эндотоксина утрачивают токсичность в нестерильной почве в течение 1000 дней [West, Burges, 1985]. Время выживания в почве спор и кристаллов в основном составляет от нескольких дней до нескольких месяцев на глубине не более 10 см [Garszynsky, Siegel, 2007].

В целом бактериальные метаболиты меньше, чем споры, зависят от абиотических факторов окружающей среды (температура, влажность, УФО).

Влияние всех описанных экологических факторов в сочетании, например, с повышенной плотностью популяции насекомого, может привести к возникновению эпизоотий. Процесс можно рассматривать как взаимодействие популяции патогенного паразита с популяцией его хозяина в конкретных условиях внешней среды. Чаще эпизоотии возникают в лесных биоценозах или в насаждениях многолетних культур. Эпизоотии, как уже отмечалось, являются источником выделения из погибших насекомых возбудителей болезней, которые и являются потенциальной основой биопрепаратов. Хотя в лесу наиболее распространены вирусные эпизоотии, именно при бактериальной эпизоотии сибирского шелкопряда Е.В. Талалаевым выделена бактерия – основа первого отечественного бактериального препарата дендробациллин. Многолетние исследования эпизоотий сибирского шелкопряда, вызванные *B. thuringiensis*, проводил В.С.Кулагин [1987]. По мнению автора, куколки сибирского шелкопряда представляют оптимальную экологическую среду для размножения и сохранения энтомопатогенных бацилл в лесном биоценозе. Хитиновая оболочка и размещение коконов с нижней стороны веток предохраняют размножившиеся микроорганизмы от УФ-облучения и смыва.

Таким образом, абиотические и биотические факторы в большей степени влияют на биологические агенты по сравнению с химическими веществами –

основой синтетических инсектицидов. Это отражается как на сохранности биоагентов при хранении и применении, так и на скорости действия на целевой объект. Поэтому многочисленные исследования направлены на преодоление нестабильной эффективности биопрепаратов, наблюдающейся в практике и мешающей часто увеличению доли их использования в управлении фитосанитарным состоянием биоценозов.

Г л а в а 2

СОЗДАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЗДОРОВЬЕ РАСТЕНИЙ

2.1. Общие принципы разработки биопрепаратов на основе бацилл

Большинство биологических препаратов для защиты растений от фитофагов и фитопатогенов как в России, так и во всем мире производят на основе бактерий рода *Bacillus.* Биотехнология получения этих бактериальных препаратов достаточно проста. В производстве биопрепаратов основным является культивирование исходного штамма-продуцента на питательной среде (ПС) и получение необходимой препаративной формы. Выделим общие проблемы производства биопрепаратов. В первую очередь, для производства биопрепарата нужны активные исходные штаммы, а это требует селекции микроорганизмов. Селекцию ценных в отношении получения бактериальных препаратов бактерий осуществляют при выделении штаммов из природных источников, а также при получении экспериментальным путем (мутагенез, генная инженерия). Пока преимущественным направлением в селекции бактерий остается поиск и отбор активных природных штаммов из почвы, больных насекомых, зараженных тканей и органов растений. Критериями отбора являются: стабильная однородность популяции, высокая степень продуцирования спор и биологически активных веществ (БАВ), вирулентность и спектр патогенности для целевого объекта. Результатом такого отбора является штамм, превосходящий по качеству эталонные культуры продуцента препарата, необходимого для производства. Выделение бактерий в чистую культуру - необходимый этап после их извлечения из природных источников. В первую очередь для биотехнологии нужны активные исходные штаммы, а это требует селекции микроорганизмов. Критериями отбора новых штаммов являются: технологичность (однородность популяции, высокая степень продуцирования активного начала и т.д.), вирулентность и спектр

действия. Если в течение многочисленных циклов культивирования свойства биологического агента не сохраняются или претерпевают существенные изменения, то данный биологический агент неприемлем и не может быть рекомендован для крупномасштабных технологических разработок. Результатом отбора должен быть штамм, превосходящий по качеству эталонные культуры существующего продуцента необходимого препарата. Важная роль принадлежит специализированным банкам биологических агентов (коллекции микроорганизмов). Коллекции культур обеспечивают сохранение жизнеспособности и генетических свойств штаммов. В России такие коллекции есть при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрябина (ВКМ), а также в некоторых других научных учреждениях.

С селекцией связана проблема хранения штамма. Культуры микроорганизмов хранят на среде из свежезастывшего агара под вазелиновым маслом [Сираева и др., 2010] или без него; в лиофилизированном состоянии, в стерилизованной почве [Похиленко и др., 2009]. При хранении в пробирках на агаризованных питательных средах стабильность штамма обеспечивается при пересевах каждые 3-4 месяца. Поддержание чистой культуры штамма-продуцента является главной задачей любого микробиологического производства, поскольку высокоактивный, не претерпевший нежелательных изменений штамм может служить гарантией получения целевого продукта с заданными свойствами. Из отселектированных штаммов готовят маточную культуру, из нее – посевную, предназначенную для посева в ферментеры. Посевную культуру выращивают глубинным способом в небольшом посевном ферментере или в колбах на качалках [Патент 2128915, 1999; Патент 2295562, 2007; Гришечкина, Ермолова, 2015]. При получении посевного материала принципиально важным является способ выведения пропагул

хранящейся маточной культуры из анабиоза, состав среды и режим культивирования. Мониторинг процессов в главном ферментере проводят по нескольким параметрам: температуре, pH, количеству растворенного кислорода и другим [Couch, 2000]. Выбирают оптимальные сроки культивирования, показатели pH и температуры для выращивания бактерий рода *Bacillus* [Асатурова, 2009; Гришечкина, Ермолова, 2015]. Следует отметить, что в ряде случаев технологичность перспективных штаммов связана с их фагоустойчивостью [Романовская и др., 2007].

Качество питательной среды – одно из важнейших условий получения высокоактивных препаратов. При конструировании питательной среды необходимо учитывать физиологические потребности микробной культуры в элементах азотистого, углеводного и минерального питания. Принимают в расчет протеолитическую способность культуры. Если активность микробных протеаз невысока, следует брать низкомолекулярные белки, а лучше расщепленные белковые соединения. Например, для экзотоксинсодержащего штамма *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* (BtH 10) № 25, обладающего энтомоцидной и антифунгальной активностью, наилучшие показатели были получены на среде с гороховой мукой, заменяющей соевую. При росте на этой среде титр спор в культуральной жидкости $4x10^9$/мл, активность экзотоксина ($ЛК_{50}$) для тест-объекта составила 3,1 мкл/г корма, ингибирующая активность для *Fusarium oxysporum* 70,0 %, для *B. cinerea* 75,0 % [Патент 2514023, 2014].

Заключительным этапом производства биопрепаратов является получение приемлемой препаративной формы. Препаративная форма тесно связана с технологией применения биопрепаратов и со сроком их хранения. Проблема стабильности микробиологических препаратов актуальна, например, из-за необходимости накопления резервных запасов биопрепаратов. К концу приготовления препаративной формы должна сохраняться биологическая активность биологического продукта. Особенно это касается сухих форм, где часто требуется использование высокой

температуры для высушивания биомассы. При использовании псевдоожиженных систем на входе температура колеблется от 180 до 215°С, на выходе 70-80°С [Couch, 2000]. Сухие формы представлены, как правило, смачивающимися порошками и диспергируемыми гранулами, а жидкие – водными концентрированными суспензиями и масляными эмульсиями [Штерншис и др., 2006]. В жидкие водные формы и смачивающиеся порошки вводят различные защитные ингредиенты.

Предложена концепция защиты активности биопрепаратов при хранении [Штерншис, 1995]. Суть ее в том, что в процессе хранения происходит взаимодействие кислорода воздуха с компонентами поверхностных макромолекул. Взаимодействие биологических систем с кислородом наиболее полно описывается через механизм свободно радикального окисления макромолекул. Так, для бактериальных препаратов поверхность спор и кристаллов представляют белки и полисахариды. Поэтому механизм их взаимодействия с кислородом подчиняется основным законам свободно-радикального процесса, идущего через образование осколков молекул - свободных радикалов. Характерной чертой такого процесса является возможность управлять им с помощью инициаторов или ингибиторов свободных радикалов [Хекли, 1979]. Накопление свободных радикалов влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. В связи с этим было показано, что снижение активности бактериальных препаратов объясняется образованием свободных радикалов. Этот процесс тормозится при введении антиоксидантов в малых концентрациях. В реальных условиях хранения препараты, смешанные с антиоксидантами, значительно меньше снижали свою активность, чем контрольные [Штерншис, 1995].

Защитный экранирующий эффект на микроорганизмы оказывают также активированный уголь, окись титана, яичный альбумин и т.д. В этих целях при получении бактериальных препаратов перспективно также микроинкапсулирование [Ma et al., 2015]. Инкапсулированные препараты очень устойчивы к облучению. Кроме того, значительно увеличивается

удерживаемость препарата на поверхности растения за счет адгезионных свойств оболочки. Современные разработчики биопрепаратов учитывают необходимость оптимизации препаративной формы, что недооценивалось на первых этапах развития биотехнологии. Так, предложена иммобилизованная форма. Клетки, иммобилизованные на или в массе носителя, менее подвержены воздействию света, температурным колебаниям и другим абиотическим и биотическим факторам. Это обеспечивает более длительные сроки хранения биопрепаратов. Например, проведено исследование антифунгальной активности в процессе хранения биопрепарата на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g, иммобилизованного на гранулированном минеральном удобрении с определением численности адсорбированных бактериальных клеток в процессе хранения [Асатурова, Козицын, 2015]. Авторы пришли к выводу, что лучшими условиями сохранения численности адсорбированных клеток на поверхности гранул минерального удобрения «ОМУ» при высушивании является способ перемешивания гранул при температуре $+60^0$С в орбитальном шейкере.

Особое внимание уделяется стандартизации готового продукта. Основные показатели стандартизации зависят как от активности исходного штамма, так и от препаративной формы биопестицидов [Kabaluk et al., 2010]. Стандартизация биопрепаратов проводится по числу спор, включений, метаболитов и по биологической активности. Последний показатель более значим. При этом надо иметь в виду, что биологическая активность биопрепаратов отличается от активности штаммов-продуцентов, поскольку в препаративные формы включены различные ингредиенты. Стандартизации подлежат все препараты на основе бактерий независимо от способов их производства.

Количество жизнеспособных спор в 1г препарата определяют методом посева на питательные среды с подсчетом выросших колоний. Для посева используют разведение препарата, обеспечивающее рост не более 300 и не менее 50 колоний в одной чашке Петри. Разведение определяют делением

предполагаемого титра на 300 и 50. Выросшие колонии подсчитывают при открытой чашке Петри и определяют титр препарата [Штерншис и др., 2006].

Титр препарата определяют по формуле:

$$X = \frac{N}{n}, \text{ где}$$

N – среднеарифметическое число колоний из двух серий параллельных разведений;

n – максимальное разведение.

Общее количество спор или клеток можно подсчитать и более простым методом — в камере Горяева. Камера предназначена для подсчета количества клеток в заданном объёме жидкости. Она представляет собой предметное стекло с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой. Размеры малых делений клетки сетки составляют 0,05 мм, а больших — 0,2 мм. При этом сетка нанесена на площадку (участок стекла), расположенный на 0,1 мм ниже, чем две соседние площадки. Эти площадки служат для притирания покровного стекла. Успешное притирание характеризуется появлением радужных колец (колец Ньютона). В результате объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет 0,004 микролитра. Подсчитав количество клеток над большим квадратом, определяют плотность спор в суспензии по формуле [Гулий и др., 1982]. Недостаток этого метода состоит в том, что подсчитывается общее количество спор, в том числе нежизнеспособных.

В стандартизации и оценке качества биопрепарата главным показателем является его биологическая активность [McGuere et al., 1997]. Биологическая активность измеряется реакцией тест-объекта на действие биопестицида. Тест-объекты – возбудители болезней растений, насекомые либо клещи. Для более точной оценки биологической активности препаратов с целью сравнения используются стандарты, т.е. образцы микроорганизма-продуцента или биопрепарата, отвечающие всем необходимым условиям и требованиям.

Существующие требования к стандартам: 1) идентичность механизма действия, 2) неизменность физико-химических свойств, 3) неизменность содержания БАВ, 4) неизменность биологической активности, 5) однородность состава, 6) срок хранения 5-10 лет при 5°С, 7) стандарт изготавливается для одной или нескольких стран. Обычно производители препаратов используют внутренний стандарт, который должен периодически калиброваться с международным [Штерншис и др., 2006]. Для энтомопатогенных препаратов необходимыми требованиями к тест-объектам являются: 1) тест - объекты не должны быть карантинными вредителями; 2) должны легко разводиться в лабораториях и 3) регулярно восполняться при сборах в природе. Для биопрепаратов, предназначенных для подавления болезней растений, выбирают возбудителя болезни растений, легко выделяемого из природы, с одной стороны, и способного хорошо расти на ПС в лабораторных условиях, с другой стороны.

При использовании стандартов биологическая активность испытуемого препарата (Е) подсчитывается делением $ЛК_{50}$ стандарта на

$ЛК_{50}$ образца, где $ЛК_{50}$ - средняя концентрация суспензии, вызывающая гибель 50% целевых организмов.

Стандартизация биопрепаратов включает дополнительно определение таких характеристик, как смачиваемость, стабильность рабочей суспензии, адгезионная способность и срок хранения. Для определения стабильности рабочей суспензии предложена методика, основанная на определении оптической плотности суспензии бактериального препарата при 400 нм. При этой длине волны величина оптической плотности пропорциональна концентрации препарата [Штерншис, 1985]. Стабильность суспензии вычислялась в процентах, исходя из измерений оптической плотности надосадочной жидкости через 30 мин и 4 часа после приготовления рабочей суспензии. Для определения адгезионной способности 1 мл 1%-й суспензии препарата распределяли на дно стеклянной чашки Петри, подсушивали, а

затем заливали 1 мл стерильной воды. Через 2 часа отбирали пробы для оценки количества КОЕ в 1 мл. Вычисляли процент биологического агента, который удерживался на стекле.

Для определения срока хранения образцы биопрепаратов помещают в боксы с разными температурными режимами. Как правило, образцы хранят при комнатной температуре, при +5º и -20º, хотя можно использовать и промежуточные интервалы. Ежемесячно в течение первого года, затем через 1,5, 2 и 3 года отбирают пробы и оценивают их титр и биологическую активность. Как правило, жидкие препаративные формы хранятся меньше [Штерншис, 1995; Сираева и др., 2010].

2.2. Создание биопрепаратов для подавления болезней растений

Бактерии рода *Bacillus* Cohn. широко используются в медицинской и ветеринарной биотехнологии в качестве продуцентов биологически активных веществ, ферментов, антибиотиков, а также, являясь пробиотическими микоорганизмами, входят в состав лекарственных средств и биологически активных добавок для человека и животных [Азизбекян, 2013].

Ранее применение бактерий рода *Bacillus* в биологической защите растений было ограничено, в основном, одним видом – *B. thuringiensis*, варианты которого послужили действующим началом применяемых в настоящее время эффективных биоинсектицидов. Однако многолетнее изучение свойств бактерий рода *Bacillus* позволило рассматривать их в качестве перспективных агентов биологического контроля болезней растений.

Наиболее известным и часто включаемым в состав биофунгицидов является *Bacillus subtilis*. Бактерии *B. subtilis* относятся к грамположительным факультативно аэробным палочковидным бактериям. Клетки палочковидные, эндоспоры овальные, расположены центрально или парацентрально, не раздувают клетку при спорообразовании. Длина клетки -

(2-3) мкм, ширина - (0,7-0,8) мкм. Капсулу не образуют. По Грамму окрашиваются положительно. Штаммы являются олигофильными, размножаются при 25 – 45°С, оптимальный рост наблюдается при температуре 33 – 37 °С. pH среды: минимальная 5,7; максимальная 8,0; оптимальная 7,0 - 7,2. Не растут в анаэробных условиях, не образуют ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес - Проскауэра, ферментируют с образованием кислоты глюкозу, маннозу, фруктозу, рибозу, ликсозу, целлобиозу, трегалозу, мальтозу, туранозу. Гидролизуют крахмал, мочевину и эскулин. Обладают лецитиназной, каталазной активностью. Толерантны к концентрациям хлорида натрия в питательной среде в диапазоне 1 – 9 % [Смирнов и др., 1982].

Бактерии *B. subtilis* являются продуцентами широкого спектра ферментов: протеаз [Холодная, 1999], липазы, амилазы [Патент РФ 2298032, 2007], ксиланазы [Патент РФ 2509149, 2014], эндонуклеазы (рестриктазы) [Патент РФ 2270859, 2006] и других [Широков, 2004**].** Другие продукты, синтезируемые бактериями рода *Bacillus*, - биологически активные вещества различного состава и происхождения, коферменты, аминокислоты, полипептиды, бактериоцины оказывают антагонистическое влияние на патогенные микроорганизмы, в том числе на фитопатогены, и позволяют использовать данный вид бактерий в качестве основы для биофунгицидов. Поскольку факторы, определяющие будущую эффективность биопрепарата на основе бактерий *Bacillus*, весьма обширны и до сих пор до конца не изучены, наиболее распространенным способом поиска антагонистически активных штаммов является их выделение из объектов окружающей среды, чаще всего, природных экологических ниш: почвы, воды, растительных остатков, ризосферы растений, с последующим отбором перспективных вариантов по критерию антагонизма к фитопатогенам [Патент РФ 2289621, 2006; Патент РФ 2295562, 2007; Патент РФ 2314693, 2008; Патент РФ 2444366, 2012].

Выделенные в чистую культуру штаммы подвергают дальнейшему изучению [Нетрусов и др., 2005]. Основными критериями будущей пригодности их в качестве действующего начала биофунгицида являются: наличие антагонистической активности к широкому спектру фитопатогенов, технологичность промышленной наработки, способность расти на питательных средах различного состава, давая при этом максимальный выход биомассы, и стабильность свойств, при длительном хранении. Кроме того, штаммы, которые предполагается использовать в промышленной биотехнологии, не должны обладать токсическим воздействием на биологические объекты, в том числе культурные растения, членистоногих, теплокровных. Некоторые авторы практикуют более широкий подход к выбору штамма, который включает, помимо перечисленного выше, изучение ферментативной активности, симбиоза с почвенной микрофлорой, совместимость с наиболее применяемыми химическими пестицидами и агрохимикатами с целью возможности дальнейшего использования в баковых смесях с ними [Патент РФ 2478290, 2013]. Тем не менее, первым критерием оценки является спектр антагонистической активности выделенных изолятов, которую проверяют классическим методом отсроченного антагонизма [Егоров, 2004] либо методом агаровых блоков на средах Чапека, Гаузе, картофельно-глюкозном агаре [Билай, 1982].

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* обладают широчайшими возможностями в плане подавления возбудителей болезней растений. Так, авторы, занимавшиеся селекцией, отмечали наличие антагонизма к следующим фитопатогенным грибам: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *A. solani* Sorauer, *A. brassicae* (Berk.) Sacc., *A. tenius* Samuel Paul Wiltshire, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker , *Botrytis cinerea* Pers., *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*(Schwein.) Petch), *F. oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen, *F. sambucinum* Fuckel var. ossicolum (Berk. et Curt.), *F. sporotrichioides* Sherb., *F. solani* (Mart.) Appel

et Wr., *F. culmorum* (Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *Helminthosporium solani* Durieu and Mont., *Gliocladium roseum (Clonostachys rosea f. rosea* (Link) Schroers, *Microdochium nivale* (Schaffnit) E. Müll., *Oospora pustulans (Polyscytalum pustulans* (M.N. Owen & Wakef.) M.B. Ellis, *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč. and M. Petrov, *Phoma exigua var. solanicola* Sacc., *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Pythium sp.* Pringsheim, *Penicillium citrinum* Thom C., *P. expansum* Link, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Verticillium dahliae* Kleb., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, и многим другим. Бактерии рода *Bacillus* являются основным объектом поиска новых антагонистов для подавления патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Вновь найденные штаммы часто сравнивают в отношении активности подавления фитопатогенных микроорганизмов с уже существующими и зарегистрированными. Так, авторы [Патент РФ 2295562, 2007] сравнивают активность найденного ими в ризосфере риса штамма *Bacillus spp.* KR-083 со штаммом *B. subtilis* ВНИИСХМ 128, являющимся действующим началом биопрепарата фитоспорин. В таблицах 2.1 и 2.2 представлены сравнительные результаты по антагонистической активности двух штаммов по отношению к фитопатогенным микроорганизмам (бактериям и грибам).

Таблица 2.1.

Антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогенным бактериям

Штамм антагониста	Зона ингибирования роста, мм				
	*Erwinia carotovora*Jones, Waldee A-1	*Pseudomonas syringae*Van Hall 8300	*P. syringiae*Van Hall 2314	*E. carotovora* Jones, Waldee3391	*Clavibacter michiganensis* Davis te al. 17-1
B. subtilis 128	14,2±1,3	18,9±1,6	11,8±0,9	28,8±2,1	16,0±1,2
Bacillus spp. KR-083	27,0±1,8	26,0±2,1	18,0±1,3	32,0±2,8	28,0±2,2

Из данных, приведенных в таблице 2.1, видно, что используемый авторами штамм бактерий *Bacillus spp*. KR-083 обладает большей антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным бактериям по сравнению с прототипом - штаммом *B. subtilis* 128 ВНИИСХМ - продуцентом биопрепарата фитоспорин.

Таблица 2.2.

Антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* по отношению к фитопатогенным грибам

Штамм антагониста	Зона ингибирования роста, мм				
	*Phytophtora capsici*Leonian	*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn	*F. culmorum* (Sm.) Sacc.	*F. solani* (Mart.) Appel et Wr.	*Pythium sp.* Pringsheim
B. subtilis 128	26,5±2,2	16,7±1,8	16,2±1,3	16,4±1,3	22,1±2,5
Bacillus spp. KR-083	36,1±2,8	30,7±1,7	34,0±4,4	23,7±1,7	28,1±2,9

Из данных, приведенных в таблице 2.2, видно, что штамм бактерий *Bacillus spp.* KR-083 обладает также и большей антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам по сравнению с прототипом - продуцентом биопрепарата фитоспорин.

Обычно, для выделения бактерий рода *Bacillus* используют метод прямого посева суспензии исходного материала (например, почвы) на питательные среды общего назначения (мясо-пептонный агар, агар Хоттингера и пр.) [Меджидов, 2003; Поляк и др. 2008; Поляк, 2005, 2006].

Поскольку особенностью данного рода бактерий является образование спор в неблагоприятных условиях, суспензию подвергают нагреву до температуры 80°С в течение 10 – 15 минут, что позволяет избавиться от лишней вегетативной микрофлоры. Выделенный в чистую культуру штамм поддерживают на плотных питательных средах различного состава (агаризованная среда NBY, плотная среда Эшби, мясо-пептонный агар) в

пробирках на скошенном агаре. Для длительного хранения обычно используют лиофилизацию [Патент РФ 2289621, 2006; Патент РФ 2528058, 2014].

Когда все этапы выделения и идентификации штаммов для будущего биофунгифида пройдены, приступают непосредственно к наработке бактериальной биомассы. Чаще всего для этой операции применяют жидкие питательные среды. Технологический процесс получения готового биопрепарата складывается из нескольких этапов: получение клонов антагонистически активных вариантов штамма, выращивание их на плотных питательных средах, с которых производится засев маточных посевных колб. Маточные культуры в колбах дают начало следующему этапу производства – наработке биопрепарата в промышленном масштабе в ферментере или специальных сосудах для культивирования. Завершающей стадией процесса становится стандартизация полученной биомассы по титру спор и оценка ее на предмет микробиологической чистоты и антагонистической активности в отношении фитопатогенов [Патент РФ 2298032, 2007].

При выборе оптимальных питательных сред для масштабной наработки бактериальной биомассы авторы руководствовались физиолого-биохимическими особенностями спорообразующих бактерий рода *Bacillus* с целью обеспечения их всеми необходимыми для роста веществами. Известно, что споровые бациллы являются в большинстве своем мезофилами (исключение составляет термофильный вид *Bacillus stearothermophilus*, растущий при 65°С и выше), их рост возможен в интервале 15-35 °С, оптимальная для роста и спорообразования температура (35±1) °С. Бактерии рода *Bacillus* являются аэробами, поэтому при глубинной ферментации на жидкой питательной среде нуждаются в аэрации и перемешивании. Был предложен способ выращивания бактерий рода *Bacillus* на доступной по составу среде с целью получения биопрепарата для предпосевной обработки семян [Патент РФ 2140138, 1999]. Питательная среда содержала (в %): отруби пшеничные – 4,0; мел – 0,3. Культуру бактерий нарабатывали в

условиях аэрации на качалке или в ферментере при температуре 30±1°С в течение 24-36 часов, при этом авторам удавалось получить титр порядка 10^7 клеток/мл. Готовый биофунгицид получали путем смешивания 50 мл культуральной жидкости и наполнителей: стерильного мела – 107 г, эмульсия ПВА – 50 мл, вода – 50 мл. При этом природный мел использовался авторами в связи со способностью штамма к его активной колонизации, а эмульсия ПВА служила прилипателем.

Диапазон кислотности питательной среды составляет обычно 5,5 - 8,0, однако оптимальным для роста и спорообразования бацилл является pH 6,8 - 7,2. В качестве источников углеводов бактерии этого рода используют глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, арабинозу. Общеупотребительными источниками углерода и азота с повышенной питательной ценностью являются продукты специальной обработки тканей и органов животных: мясная вода, пептоны, казеин, дрожжевой автолизат и гидролизат. Все среды, используемые для культивирования в промышленных масштабах, можно разделить на: натуральные, полусинтетические и синтетические [Поляк и др., 2008]**.** Примером полусинтетической среды может служить предложенная среда следующего состава (компоненты указаны в %): меласса - 0,5; $К_2HPO_4$ - 0,03; $MgSO_4$ - 0,01; NaCl - 0,05; KNO_3 - 0,1; $CaCO_3$ - 1,0 [Патент РФ 2289621, 2006]. Другими авторами [Патент РФ 2482174, 2013] была предложена трехкомпонентная среда из доступных ингредиентов (указаны в %): пептон мясной ферментативный – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; натрия хлорид – 0,5. Чаще используют полусинтетические среды. Вне зависимости от состава и происхождения (заводские готовые среды или среды, сделанные из отдельных компонентов непосредственно на производстве), для успешного культивирования и получения стабильно высокого выхода биомассы требуется контроль качественных параметров сред. В качестве показателей качества используют, главным образом, прозрачность и цветность среды, pH, содержание аминного азота (именно эта форма азота наиболее легко усваивается бактериями), стерильность, скорость роста.

Конечная препаративная форма биофунгицида может ограничиваться культуральной жидкостью, содержащей споровую биомассу, без внесения каких-либо добавок. Однако, такая форма имеет рад недостатков, самым существенным из которых является необходимость хранения при пониженных температурах (4 – 10 °С) с целью недопущения прорастания спор и потери титра и биологической активности. Более удобными с точки зрения хранения являются сухие и пастообразные формы биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus*. Получение их достигается иммобилизацией жидкой биомассы на различных носителях. Так, было предложено [Патент РФ 2314693, 2008] для увеличения срока жизнеспособности микроорганизмов и придания препарату формы пасты в смесь культуральных жидкостей вносить каолин в количестве 20 - 30 % от общего состава препарата и соевую муку в количестве 20 - 30 %. А в качестве отдушки и источника микроэлементов и витаминов в полученный состав дополнительно предложили добавлять гидролизат смеси хвойного экстракта и хлорофилло-каротиновой пасты в концентрации 2,3 - 4,0 %. Другие авторы [Патент РФ 2444366, 2012] предложили высушивать споровую биомассу на сахарно-крахмальной смеси, при этом массовая доля наполнителя составляла 1 – 10 %. После получения биомассы в сухом виде (порошок) авторы смешивали ее со вспомогательными веществами в соотношении 2:1 - 3:1 и таблетировали. В качестве вспомогательных веществ использовали (массовая доля указана в %): стеарат кальция (0,5 - 1,0), тальк (2,5 - 3,0) и (или) крахмал (0,5 - 1,0) и (или) аэросил (0,5 - 0,8), глюкозу (5,0 - 20,0), сухое молоко (10,0 - 30,0) и (или) метилцеллюлозу (или поливинилпирролидон) (0,1 - 0,5). Таким образом, получали таблетированную препаративную форму, удобную в использовании с точки зрения хранения и дозирования.

Для иммобилизации культуральной жидкости бактерий *B. amyloliquefaciens* B-11475 был выбран мелкодисперсный диатомит, который является натуральной осадочной горной породой, состоящей преимущественно из останков диатомовых водорослей [Патент РФ 2528058,

2014]. Природный диатомит - обычно рыхлая или слабо сцементированная, светло-серого с желтоватым или розоватым оттенком порода. Химически диатомит более чем на 80% состоит из водного кремнезема. Легко стерилизуется (выдерживает температуру до 1400 °С), представляет собой легкие пористые мельчайшие гранулы с размером частиц по фракциям - от 0.1 до 10.0 мм; эффективный диаметр пор - 50-100 нм, с насыпной плотностью не более 620 кг/м^3. Является инертным материалом, не вступающим во взаимодействие с большинством агрессивных сред. Диатомит - природный материал, обладающий необходимыми потребительскими свойствами для создания биопрепарата: стерилен, химически инертен, легкий, сыпучий, не слеживается, негорючий, биологически стойкий и экологически чистый, не подвержен процессам гниения, воздухо- и водопроницаем, обладает высокими адсорбционными свойствами и может впитывать до 120 % воды по массе. Благодаря высокопористой микроструктуре гранулы диатомита сберегают и продлевают действие вносимого биофунгицида не только при обработке зерна, но способны при внесении в почву предотвращать заражение зерновых культур в процессе всего вегетативного роста. Преимуществом такого препарата является то, что он хорошо хранится, удобен для транспортировки, дает стабильный объем, не слеживается, а фунгицидные свойства проявляет как при обработке семян зерновых растений, так и в почве в процессе вегетативного роста.

После первого зарегистрированного в России препарата бактофит (ГНЦ прикладной микробиологии – пос. Оболенск, Московской обл. и ПО «Сиббиофарм») появились фитоспорин (Башкортостан), алирин-Б и гамаир (ВИЗР), и другие биопрепараты, зарегистрированные или находящиеся в стадии испытаний.

Препарат бактофит, выпускаемый в виде суспензионного концентрата и смачивающегося порошка, в качестве действующего начала содержит штамм *B. subtilis* ИПМ 215 в количестве не менее 2 млрд/мл (г). Применяется

на зерновых и овощных культурах против корневых гнилей, винограде против оидиума, а также против бактериоза капусты.

Фитоспорин-М, Ж. Содержит в качестве действующего начала бактерии *B. subtilis,* штамм 26 Д с титром не менее 1 млрд живых клеток и спор/мл. Применяется на зерновых культурах (яровая и озимая пшеницы) против корневых гнилей, в том числе фузариозной и гельминтоспориозной, мучнистой росы, бурой ржавчины; на овощных культурах открытого и защищенного грунта против корневых гнилей, альтернариоза, фитофтороза, ризоктониоза, мучнистой росы; для защиты фруктов, овощей, корне- и клубнеплодов при хранении; на плодово-ягодных культурах (яблоня, земляника) против парши, мучнистой росы, корневых гнилей [Менликиев и др., 1991]. Такой же спектр применения имеют препараты фитоспорин-М, ПС и фитоспорин-М, П, отличающиеся от выше указанного препаративной формой (порошок) и количественным содержанием действующего начала (не менее 100 млн живых клеток и спор/г и не менее 1 млрд живых клеток и спор/г соответственно).

Другим фунгицидом на основе спорообразующих бацилл является препарат алирин-Б, содержащий бактерии *B. subtilis* штамм В-10 ВИЗР. Выпускается в нескольких препаративных формах: таблетки с титром не менее 10^9 КОЕ/г; смачивающийся порошок с титром не менее 10^{11} КОЕ/г; жидкость с титром не менее 10^9 КОЕ/г. Алирин-Б применяют для защиты от корневых гнилей на рассаде, овощных культурах открытого и защищенного грунта; фитофторозом, ризоктониозом, альтернариозом, мучнистой росой, серой гнилью картофеля, огурцов и томатов.

Аналогичным спектром применения обладают препарат гамаир, действующим началом которого является *B. subtilis*, штамм М-22 ВИЗР.

Препарат витаплан, смачивающийся порошок, содержит два штамма с титром не менее 10 млрд. спор в грамме: *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605 D. Производитель рекомендует применять препарат для протравливания семян и предпосевной обработки клубней, а также

опрыскивания в период вегетации для подавления развития возбудителей грибных и бактериальных заболеваний озимой и яровой пшеницы, рапса, сои, картофеля, овощных культур и плодово-ягодных культур.

Представляет интерес разработка препаратов на основе энтомопатогенной бактерии, способных контролировать численность возбудителей болезней [Гришечкина и др., 2002; Смирнов, Гришечкина, 2010; Гришечкина, Лошакова, 2013], что будет подробнее обсуждено в следующей главе. Среди биофунгицидов, находящихся в стадии испытаний, следует отметить препарат фитоп 8.67, разработанный ООО НПФ «Исследовательский центр» в наукограде Кольцово. В его состав входят штаммы *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, антагонистически активные в отношении широкого спектра фитопатогенов грибной и бактериальной этиологии. Многолетние испытания данного биофунгицида [Коробов и др., 2014; Коробов и др., 2015] показали его эффективность в защите от корневых гнилей яровой пшеницы, при этом наблюдалось снижение развития болезни в 1,8 – 3,9 раза, а распространенность болезни снижалась в 1,1 – 3,7 раза относительно контроля. Данный биофунгицид также был успешно испытан на садовой землянике [Беляев и др., 2012, 2015].

Среди производителей импортных аналогов на первом месте стоит Bayer Crop Science – дочерняя фирма немецкой компании Bayer AG – один из крупнейших мировых поставщиков биологических фунгицидов, в состав которых входят бактерии рода *Bacillus* [Crop Science United States: [Электронныйресурс]. Линейка препаратов включает несколько позиций. Препарат серенада Опти (*SerenadeOpti*), действующим началом которого является штамм *B. subtilis* QST 713, по информации производителя, ингибирует прорастание спор фитопатогенов, нарушает целостность мембран инфекционной гифы и не дает ей проникнуть в растение. Препарат совместим с микроэлементами, инсектицидами и другими фунгицидами. Применяется на винограде, землянике, картофеле, семечковых культурах и орехе для борьбы с серой и белой гнилями, бактериозами, вызываемыми р.

*Xanthomonas*Dowson и p. *Erwinia* Winslow et al. Серенада Соил (*Serenade Soil*) содержит штамм *B. subtilis* QST 713 и эффективно подавляет таких почвенных патогенов, как *Pythium* Pringsheim, *Rhizoctonia* D.C., *Fusarium* Link, а также некоторые штаммы *Phytophthora*. Обозначенный штамм действует в ризосфере, обладает как прямым антагонизмом к фитопатогенам, так и активизирует иммунитет растений и их устойчивость к стрессам, обладает ростостимулирующим действием. Серенада Соил рекомендован для применения на томатах, огурцах, картофеле, землянике, цитрусовых культурах и луке.

Соната - еще один препарат из линейки биофунгицидов в состав которого входит штамм *Bacillus pumilus* QST 2808, эффективен для борьбы с ложной и настоящей мучнистой росой и ржавчиной семечковых культур, винограда и томатов.

2.3. Разработка энтомопатогенных бактериальных препаратов

Наибольшее распространение во всем мире получили препараты на основе *B. thuringiensis.* По составу действующих агентов их можно разделить на 3 группы. В первую входят препараты, содержащие споры и кристаллы эндотоксина бактерий в качестве действующего начала. Это наиболее многочисленная группа. Ко второй группе относятся препараты, содержащие дополнительно к спорам и кристаллам термостабильный β–экзотоксин. Наконец, бактериальные препараты могут содержать только очищенные токсины, вырабатываемые бактерией *B. thuringiensis.* Как правило, для получения бактериальных энтомопатогенных препаратов используют культивирование исходных штаммов в жидкой питательной среде – глубинный способ.

Штаммы энтомопатогенных бактерий подвержены изменчивости, что проявляется в форме и размерах микробных клеток, интенсивности продуцирования вторичных метаболитов, таких как ферменты или токсины, чувствительности к фагам и т.д. Для разработки биопрепаратов, как правило,

используются штаммы энтомопатогенов, выделенных из природы, хотя предложены и рекомбинантные штаммы как продуценты препаратов. В данной работе обсуждение будет касаться только природных штаммов энтомопатогенов. Роль селекции штаммов *B. thuringiensis* в создании бактериальных биопрепаратов хорошо известна. В ряде работ авторы связывали вирулентность с формой и размерами кристаллов эндотоксина, однако это не подтвердилось большинством исследований [Бурцева и др., 2001]. При отборе наиболее пригодных для создания биопрепаратов штаммов *B. thuringiensis*. уже на первых этапах учитывали явление спонтанной изменчивости [Барайщук, Покровская, 1985]. Изменение морфологии колоний *B. thuringiensis* связано с изменением вирулентности. Так, шероховатые формы колоний подвида *galleriae* были более вирулентными для тест-объекта, чем гладкие [Гулий и др., 1982]. Для повышения активности природного штамма *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-2 проведена селекционная работа с использованием мутагенов, что привело к получению штамма Z-52, образующего как бипирамидальные, так и кубоидальные кристаллы эндотоксина. Этот штамм с повышенной активностью и стал основой распространенного российского препарата лепидоцид [Зурабова, 1986]. Селекционные критерии разработаны и для отбора перспективных штаммов *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* [Смирнов, 2000]. Штамм этого подвида BtH_{10} №25 как основа препарата бацикол растет на дрожжеполисахаридных средах на основе соевой муки, кукурузного крахмала, кормовых дрожжей [Патент 2514023, 2014]. Штамм хранится на скошенном рыбном агаре в пробирках при 4-5°С с периодическим пересевом 1 раз в 6 месяцев, в лиофилизированном состоянии в запаянных ампулах и методом криоконсервирования в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (RCAM).

Из отселектированных штаммов энтомопатогенных бацилл готовят маточную, затем посевную культуру, которую используют для инокуляции

жидкой питательной среды в основном ферментере. При соблюдении оптимальных условий споры и кристаллы образуются через 18 ч. При лизисе клеток до 80% снижают pH и температуру, что приводит к полному лизису клеток и освобождению спор и кристаллов. Для глубинного культивирования *B. thuringiensis*. в заводских условиях предложено использовать две среды: кукурузно-глюкозную и дрожжеполисахаридную [Фрейман и др., 1981]. Усовершенствование сред позволяет увеличить выход бактериальных биопрепаратов [Чиликин и др., 1989]. Серьезным осложнением при культивировании *B. thuringiensis.* может служить фаголизис микробной культуры. В частности, фаголизис явился причиной снятия с производства одного из первых отечественных препаратов – энтобактерина и перехода на производство препаратов на основе *B. thuringiensis.* других подвидов. Впоследствии были найдены достаточно простые способы предотвращения фаголизиса культуры *B. thuringiensis.*ssp. *galleriae.* Например, этого добивались путем добавления хитозана в питательную среду [Кочкина и др., 1996].

Культуральную жидкость, содержащую споры и кристаллы, центрифугируют (сепарируют), осажденную биомассу как основу препарата высушивают. Стадия высушивания исключается, если требуется жидкая препаративная форма. При отсутствии стадии сушки сокращается расход энергоносителей и соответственно происходит снижение себестоимости продукта на 20-25% Так, для получения лепидоцида СК (жидкая форма) используют культивирование *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода муку зерновых культур, источника аминного азота - дрожжи кормовые, муку бобовых культур предварительно обработанные кавитационно-вихревым диспергатором в течение 60 минут при 50-60° С и гидромодуле 1:5. Культуральную жидкость подвергают процессу фильтрования или центрифугирования, добавляют глицерин, парафин нефтяной жидкий, неонол (антиоксидант), отдушку хвойную [Патент РФ 2314691, 2008].

Эффективность бактериальных инсектицидов в отношении фитофагов тесно связана с оптимизацией их препаративной формы. Для создания оптимальной препаративной формы необходимо решить ряд проблем, обеспечивающих: 1) стабильность препарата при хранении и применении, включая защиту от УФО и 2) активирование микроорганизма – продуцента препарата.

На первых этапах разработки биопрепаратов основное внимание уделялось выделению активных штаммов микроорганизмов. Поэтому исходные штаммы - продуценты отечественных препаратов не уступали по всем показателям продуцентам зарубежных препаратов. Что касается препаративных форм бактериальных препаратов, то при их разработке вначале были механически перенесены принципы создания препаративных форм химических инсектицидов. Так, используемый издавна наполнитель каолин стали добавлять в бактериальные препараты. Не была учтена принципиальная разница между химическими и микробными инсектицидами. Отличие состоит в том, что препаративная форма микробного биопестицида должна обеспечивать оптимальные условия для проявления действия микроорганизма как регулятора численности фитофагов, а также для его защиты от вредного влияния факторов внешней среды. Приготовление препаративной формы является важным завершающим этапом в производстве энтомопатогенных препаратов. К концу приготовления препаративной формы должна сохраняться инсектицидная активность. Введение различных добавок при создании бактериальных инсектицидных препаратов позволяет повысить биологическую активность и сохранность инсектицидного препарата. Для повышения эффективности инсектицидных препаратов в их состав включают активаторы, антиоксиданты, прилипатели и другие вещества, способствующие повышению физической и биологической стабильности препарата, улучшению контакта растения с препаратом. Так, для увеличения инсектицидной активности бактериальных препаратов предложено добавлять

к спорово-кристаллическому комплексу активаторы, усиливающие действие эндотоксина как разобщителя окислительного фосфорилированияи дыхания. Выявленное действие дельта-эндотоксина как разобщителя процессов окислительного фосфорилирования и дыхания с активированием фермента АТФазы послужило основой для выбора некоторых солей для усиления действия эндотоксина [Штерншис, Каменек, 1986**].** Было показано, что при включении сернокислого магния или сернокислой меди в бактериальный энтомопатогенный препарат при его производстве, инсектицидная активность при применении повышается [А.с. 1510813, 1989].

Проблема стабильности бактериальных препаратов при хранении актуальна из-за необходимости накопления резервных запасов биопрепаратов. На начальных этапах создания отечественных биопрепаратов возникали проблемы в связи с малым сроком их хранения. Для первых бактериальных препаратов срок хранения не превышал года. Для разработки препаратов с увеличенным сроком хранения была привлечена концепция быстрой утраты активности биопрепаратами в процессе хранения за счет взаимодействия кислорода воздуха с компонентами поверхностных макромолекул. Исходя из этого, было предложено вводить в препаративные формы антиоксиданты не только для защиты от УФО, но и для пролонгирования срока хранения [Штерншис, 1995]. В реальных условиях хранения при разных температурных режимах препараты, смешанные с антиоксидантами, значительно меньше снижали свою активность, чем контрольные. Этот подход оказался перспективным в отношении бактериальных препаратов и в жидкой, и в порошкообразной формах.

В препаративные формы необходимо включать ингредиенты для повышения прилипаемости. Известно, что для предотвращения смыва биопрепаратов с поверхности растения-хозяина фитофага используют пленкообразующие полимеры (поливинилпирролидин, поливиниловый спирт и т.д.). Образуемые ими пленки могут защищать и от солнечного излучения. В качестве примера приведем создание препаративной формы *B. thuringiensis*

- биоинсектицида с включением поливинилового спирта (ПВС) [А.с. 10501150, 1982]. После сепарирования культуральной жидкости к пасте, содержащей споры и кристаллы *B.thuringiensis,* добавляли ПВС из расчета 0,5% сухого ПВС к массе пасты. Предварительно порошок ПВС кипятили с водой до полного растворения, а после введения в пасту лиофилизировали и смешивали с хлористым натрием (1:1). Готовый продукт, содержащий 50% NaCl и 7% ПВС, обладал высокими показателями инсектицидной активности, адгезивных свойств и стабильности рабочей суспензии.

Важно создавать такую препаративную форму, в которой один ингредиент обладал бы сразу несколькими функциями. Естественно, что любой новый инградиент должен быть не токсичным как для патогена, так и для окружающей среды. В качестве примеров комплексного подхода приведем разработку жидкой формы и стабилизированного порошка бактериальных препаратов на основе разных подвидов *B. thuringiensis* патоварианта А. В жидкую препаративную форму, где наполнителем служил глицерин, нами предложено вводить антиоксиданты для защиты от УФО и продления срока хранения, а также ДМСО для увеличения инсектицидной активности. Глицерин выполнял функцию стабилизатора рабочей суспензии и прилипателя [Штерншис, 1995]. Такой препарат хранился при комнатной температуре в течение года.

Что касается сухой препаративной формы, то при ее усовершенствовании в качестве стандарта использовали первую разработанную форму - лепидоцид концентрированный с титром 100 млрд спор в 1 г. В его состав помимо спорово–кристаллического комплекса входили остатки питательной среды и наполнитель – каолин. Эта препаративная форма не обеспечивала реализации потенциальной активности исходного штамма, так как отсутствовали ингредиенты, защищающие действующее начало биопрепарата от неблагоприятных факторов внешней среды или усиливающие его инсектицидную активность. Каолин как наполнитель препятствовал созданию стабильной рабочей

суспензии, что приводило к забиванию опрыскивателей при применении препарата. В связи с этим нами разработана препаративная форма, которая включала максимально возможный набор ингредиентов-активаторов [Патент 1792281, 1993]. Новая препаративная форма (ЛЕСТ) отличалась тем, что каолин был полностью заменен на водорастворимый компонент, который одновременно усиливал инсектицидное действие дельта-эндотоксина *Bt.* Углекислый натрий добавляли в таком количестве, чтобы pH 5%-й водной суспензии препарата была на уровне 8,5-10,5. Кроме того, в качестве протекторов от ультрафиолетового излучения и кислородных радикалов введены антиоксиданты (0,1-1%), а в качестве прилипателя и стабилизатора рабочей суспензии – концентрат сульфитно–спиртовой барды (30-50%). Исключение каолина способствовало повышению стабильности рабочей суспензии препарата.

Препарат ЛЕСТ с титром 70 млрд спор в 1 г показал более высокую биологическую эффективность по сравнению с лепидоцидом концентрированным (100 млрд спор в 1 г). Например, для использования против непарного шелкопряда требовалось в 2 раза меньше препарата ЛЕСТ, чем лепидоцида концентрированного. Срок хранения ЛЕСТа также увеличивался в 2 раза (до 3 лет). Последующие усовершенствования привели к выпускаемым сейчас предприятием «Сиббиофарм» двух препаративных форм лепидоцида (СК и П).

Стандартизация бактериальных инсектицидов, как уже было отмечено выше, включает определение титра спор (колониеобразующих единиц – КОЕ) в 1 г или 1 мл препарата и оценку биологической активности. Помимо количественной оценки спор требуется определение количества эндо- и экзотоксинов, входящих в состав энтомопатогенных препаратов. Для определения содержания β-экзотоксина в битоксибациллине и других содержащих его препаратах используют методы хроматографии и спектрофотометрии [Бубенщикова и др., 1982; Данилова, Барбашова, 1985].

Спектрофотометрический метод, например, основан на способности нуклеотидов поглощать в области 260-290 мм. Для концентрирования и извлечения β-экзотоксина из битоксибациллина применяют осаждение его ионами кальция. Осажденный из препарата β-экзотоксин гидролизуют хлорной кислотой и гидролизат спектрофотометрируют. Определяют величину поглощения при 260, 270 и 290 нм. Для вычисления содержания экзотоксина используют формулу Спирина, предложенную для определения содержания фосфора в нуклеотидах. При этом разница значений оптической плотности при 260 и 270 нм не должна превышать 15% [А.с. 1338135, 1987]. Содержание δ-эндотоксина в бактериальных препаратах измеряют по УФ-спектрам при 280 нм или иммуноферментным анализом [McGuere et al., 1997].

В стандартизации биопрепаратов важен правильный выбор тест-объектов. Для российских бактериальных инсектицидов обычным тест-объектом является непарный шелкопряд. Для этого используют природные яйцекладки насекомого. Собранные яйцекладки, выдержанные в холодильнике, освобождают от пушка легким трением в марлевом мешочке. Очищенные яйца, перенесенные в другой мешочек, стерилизуют погружением в 1%-й раствор марганцевокислого калия. Затем промывают водой, переносят на фильтровальную бумагу и высушивают. Для получения отродившихся гусениц яйца помещают в чашки Петри на круг стерильной фильтровальной бумаги с вырезанным сектором. Для создания необходимой влажности на место вырезанного сектора кладут ватный тампон, смоченный водой, не допуская, чтобы он касался фильтровальной бумаги, на которой лежат яйца. Чашки ставят в термостат и инкубируют при 22^{o} С в течение нескольких суток, ежедневно просматривая до массового отрождения гусениц. Во время массового отрождения гусениц на внутреннюю сторону крышки чашки помещают корм из расчета 5 г на 0,7 г яиц. Гусениц, перешедших на корм в течение первых суток, отделяют от яиц, перенося

крышку с гусеницами на чистое дно чашки Петри. Питающихся гусениц содержат без смены корма до первой линьки при температуре 22°С и освещения в течении 16 ч в сутки. По мере накопления экскрементов дно чашки меняют [Гулий и др., 1982]. При постановке биотестов гусениц младших возрастов содержат на искусственных питательных средах. Примером может служить среда, в составе которой есть предварительно замоченная и выдержанная фасоль, размельченная до однородной массы, дрожжи, сахароза, фолиевая кислота, льняное масло, метабен, растворенный в спирте, ионы калия и 40%-й формалин. Дальнейшие действия состоят в том, что расплавленный агар смешивают с фильтровальной бумагой и вносят в приготовленную выше смесь, добавляют аскорбиновую кислоту. После перемешивания полученная среда должна иметь pH 6,6-6,7.

Разработана методика биотестов на гусеницах лугового мотылька [Штерншис и др., 1990**].** Луговой мотылек разводится на искусственной питательной среде следующего состава: пищевой агар, дрожжи пивные, люцерновая мука, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, растительное масло.

Диапаузирующую фазу (коконы с пронимфой) хранят в термостате при 8…10°С в стеклянных стаканах или банках объемом 250-500 мл по 30-50 коконов. Бабочек лугового мотылька содержат в стеклянных сосудах емкостью 3 л, покрытых марлей, подкармливают 14%-м раствором меда. Бабочек рассаживают по 20 особей при соотношении самок к самцам 1,2:1. В садки вкладывают вертикальные бумажные «гармошки» для откладки на них самками яиц. Изоляторы с бабочками помещают в термостат с температурой 24…26°С, относительной влажностью воздуха 60-75% и 16-часовым световым днем. Отложенные на бумаге и марлевой крышке кладки яиц ежедневно вырезают вместе с бумагой или марлей и раскладывают по 200-250 шт. в чашки Петри. Чашки Петри с яйцами помещают в климатическую камеру с температурой 24…26°, относительной влажностью воздуха 60-75%

и выдерживают 4-6 суток до начала отрождения гусениц. Массовый отбор стандартных гусениц проводят вручную на 2-3-й день после линьки на 2-й возраст. Стандартных гусениц 2-го возраста используют для определения биологической активности препарата, подсчитывая процент погибших через 48 часов. Водная суспензия препарата при этом готовится в концентрациях 0,25; 0,06; 0,015; 0,004 и 0,001%.

Тестируемых насекомых заражают агентом биоконтроля для определения летальной концентрации.. При постановке эксперимента используют обычно чашки Петри, в которые помещают естественный корм или искусственную питательную среду, смешанную с суспензией биопрепарата из расчета 1 мл на 3 г корма. В каждую чашку затем высаживают 10-15 особей тест-объекта одного возраста. Число повторностей 3-5. В контрольном варианте корм смешивают с водой.

Величина $ЛК_{50}$ обычно определяется двумя способами: графическим методом пробитов или по формуле Кербера. В первом способе выявляют зависимость «эффект-доза». Чтобы эта зависимость была прямой, предложено по оси абсцисс дозу представлять в виде логарифма, а по оси ординат – процент гибели, преобразованный в так называемые пробиты [Finney, 1971]. Процент гибели гусениц подсчитывают по формуле Аббота [Abbott, 1925]. Более прост, но менее точен способ подсчета $ЛК_{50}$ по формуле Кербера [Ашмарин и др., 1974]: $\lg ЛК_{50} = \lg C_м - \sigma (\Sigma Li - 0,5)$,

где См - максимальная из испытанных концентраций,

σ - логарифм кратности разведения суспензии,

Li - гибель особей в долях смертности

Обычно для оценки $ЛК_{50}$ берут наряду с концентрацией, вызывающей 50% гибели, не менее двух ниже и двух выше [McGuere et al.,1997]. Для каждой группы препаратов должен быть свой признанный стандарт с такими же характеристиками, как и у испытуемого препарата.

Российскими учеными разработан достаточно большой ассортимент бактериальных препаратов. Из них дендробациллин и энтобактерин были первыми препаратами, которые в последние годы в массовом масштабе не производятся в России, но зарегистрированы в Украине [Kabaluk et al. 2010].

Дендробациллин создан на основе спор и кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *dendrolimus* (*sotto*) (патовариант А). Бацилла выделена в 1949 г. профессором Иркутского государственного университета Е.В. Талалаевым во время эпизоотии сибирского шелкопряда *Dendrolimus superans sibiricus* Tchetw. в таежных лесах из погибших гусениц. Первая партия препарата дендробациллина в количестве 3 т была наработана в 1958 г. на Московском заводе бактерийных препаратов и прошла успешные испытания против сибирского шелкопряда.

Энтобактерин – препарат на основе спор и кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* (патовариант А). В 50-е годы XX в. в ВИЗР во время эпизоотии гусениц большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. выделен возбудитель болезни – *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*. В 1963 г. первый промышленный выпуск энтобактерина произведен на Бердском заводе биопрепаратов Новосибирской области (сейчас ПО «Сиббиофарм»).

Лепидоцид разработан на основе спор и кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (патовариант А). Во время эпизоотии мельничной огневки *Ephestia kuehniella* Zell. Э.Р. Зурабовой [1986] выделен возбудитель болезни гусениц – *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki.* Следует отметить, что после 1970 г. большинство энтомопатогенных бактериальных препаратов в мире производится на основе данного подвида, впервые выделенного в 1962 г. американским ученым польского происхождения Э. Курстаком.

Бактокулицид (бактицид) – препарат на основе спорово-кристаллического комплекса *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (патовариант В). Первый отечественный препарат на основе этого подвида создан совместно ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии и Киевским университетом под названием «бактокулицид» и первоначально

предназначался для подавления численности кровососущих комаров и мошек. Впоследствии ПО «Сиббиофарм» стал выпускать его под торговой маркой «бактицид».

В России также разработаны, но не производятся по разным причинам децимид и колорадо на основе *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (*morrisoni*), зарегистрированные в Украине.

Битоксибациллин (БТБ) на основе *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (патовариант А) относится ко второй биотехнологической группе биопрепаратов – содержит помимо спор и эндотоксина водорастворимый β-экзотоксин. Разработан во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, зарегистрирован в России и в Украине. Первый отечественный препарат, содержащий кроме спор и белковых кристаллов водорастворимый β-экзотоксин.

Турингин-1 – представитель третьей группы препаратов на основе токсинов без спор. Это жидкий препарат, содержащий в растворенном виде β-экзотоксин (0,3%), продуцируемый *B.thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. В настоящее время в России не производится, но зарегистрирован в Украине.

К этой же группе препаратов можно отнести битиплекс, зарегистрированный в начале XXI в. в России. Битиплекс содержит активированный эндотоксин *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (пептиды). Разработан в Ульяновском государственном университете [Каменек, 1998].

На основе *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* разработан препарат бацикол, пока не вошедший в Каталог. Действующим началом является спорово-кристаллический комплекс и β-экзотоксин [Гришечкина, Ермолова, 2015].

2.4. Использование биопрепаратов на основе антагонистов фитопатогенов

Как отмечено выше, важная роль в подавлении развития болезней растений принадлежит антагонистическим бактериям рода *Bacillus*. В основе

использования бактериальных препаратов против болезней растений лежит механизм антибиоза, регулирующий взаимоотношения микроорганизмов в природе. В настоящее время бактериальные препараты против болезней растений более распространены, чем грибные [Коваленков и др., 2007; Новикова и др., 2005; Франк и др., 2008; Dua, Sindhu, 2012; Janisiewicz, Korsten, 2002; Liu et al., 2011]. Зарегистрированные в России препараты на основе *B. subtilis* разрешены к применению в сельском и личном подсобном хозяйствах против болезней картофеля (ризоктониоз, фитофтороз), цветочных культур открытого и/или защищенного грунта (корневые гнили, пятнистости), капусты белокочанной («черная ножка», бактериоз), томата открытого и/или защищенного грунта (корневые гнили, фитофтороз, альтернариоз), плодово-ягодных культур, некоторых зерновых, сахарной свеклы, винограда и др [Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов…, 2016]. За рубежом также активно используют биологические препараты на основе антагонистических бацилл на различных культурах для управления здоровьем растений. Приведем примеры, представленные в российских и зарубежных источниках.

Большое количество публикаций посвящено использованию первого российского бактериального препарата бактофит против болезней различных культур в разных регионах России. Показано, что при использовании бактофита наибольший эффект получают для обработки сначала семян, а затем путем опрыскивания растений во время вегетации [Санин, 2013].

Обзор данных, представленных в российской литературе, указывает на предпочтительное использование биопрепаратов, в том числе бактофита, в условиях юга России. По данным В.П. Боровой [2008; 2009] при использовании бактофита биологическая эффективность в отношении корневых гнилей пшеницы составила 65%, а против сетчатой пятнистости до 70%. По другим данным, в условиях Краснодарского края при применении бактофита против септориоза листьев на озимой пшенице биологическая эффективность составила 72 и 43%, соответственно, против септориоза

колоса – до 41 и 63%, соответственно. При применении бактофита для обработки семян против семенной инфекции биологическая эффективность не превышала против корневых гнилей – 53%, против снежной плесени – 46% [Коваленков и др., 2012]. При применении биопрепарата бактофит его биологическая эффективность против стеблевой ржавчины пшеницы составляла 74,6%, против септориозной и гельминтоспориозной пятнистостей – 65,0 и 78,8% соответственно. При снижении пораженности бурой ржавчиной озимой пшеницы эффективность препарата была значительно ниже и составила не более 41% [Кольбин и др., 2012].

Использование бактофита против темно – бурой пятнистости на озимом ячмене вызывало подавление данного заболевания на 18-31%, а ринхоспориозом до 43%, при поражении озимого ячменя мучнистой росой отмечено снижение пораженности заболеванием до 61% [Грошев и др., 2006]. На этой же культуре бактофит показал высокую (на уровне 70 %) биологическую эффективность против возбудителей корневых гнилей [Боровая, 2009].

В испытаниях, проведенных сотрудниками Северо-Кавказского НИИ садоводства и виноградарства показано, что при использовании бактофита на виноградниках в условиях повышенной влажности препарат обеспечивал высокоэффективную защиту (80,6–99,4 %) от оидиума. При использовании этого биопрепарата в период роста ягод винограда и до созревания биологическая эффективность биопрепарата достигала 99% [Юрченко и др., 2010]. Примененный для оздоровления виноградников Дагестана, пострадавших от массивных пестицидных нагрузок бактофит, при использовании двукратно опрыскиванием рабочей суспензией при норме расхода 3,0 л/га, показал биологическую эффективность против милдью на уровне 89-95 % [Астарханова и др., 2010].

Продемонстрировано также, что при использовании препарата бактофит отмечено выраженное снижение пораженности яблони грибными заболеваниями (паршой и мучнистой росой). Биологическая эффективность в

отношении парши достигала 99%, при подавлении мучнистой росы - 96% [Якуба, Гусин, 2010].

При использовании бактофита для защиты насаждений персика от поражения клястероспориозом, монилиозом и паршой показано снижение поражения этими болезнями с эффективностью до 50-60% [Осташева и др., 2007]. На посадках земляники в Краснодарском крае эффективность бактофита в отношении серой гнили достигала 51% [Гринько, Стрелков, 2008].

В условиях Ставропольского края применение бактофита на сое против комплекса листостебельных и корневых инфекций обеспечило биологическую эффективность на уровне 70-92% [Коваленков и др., 2006]

Продемонстрировано антагонистическое действие бактофита отношении септориоза листьев и колоса озимой пшеницы в центральной части России, биологическая эффективность составила до 54% [Комков и др., 2004]. По результатам 6-ти опытов во ВНИИ фитопатологии в 2006 – 2009 гг. протравливание семян озимой пшеницы алирином-Б и бактофитом для подавления корневых гнилей и снежной плесени было равноценно химическим эталонам по эффективности (35-70 %) и по сохраненному урожаю (1,1 – 3,6 ц/га) [Захаренко, 2015].

В условиях Западной Сибири после обработки бактофитом зараженность семян грибом *B. sorokiniana* снизилась в 3 раза, одновременно препарат полностью оздоровил семена пшеницы от грибов рода *Fusarium* На фоне бактофита средний индекс развития болезни (по четырем органам корневой системы) оказался в 2,6 раза ниже контроля. Но сильнее всего под его влиянием оздоровились первичные корни (в 3,1 раза), что, по мнению авторов, свидетельствует о качественной, на уровне химического эталона, обработке семенного материала [Коробова, Гаврилец, 2005, 2006].

Нами было проведено детальное изучение влияния бактофита на возбудителя пурпуровой пятнистости малины в условиях Западной Сибири. Использовали два сорта малины, различающихся по устойчивости к болезни :

относительно устойчивый сорт Колокольчик и менее устойчивый к болезни сорт Киржач. Предварительно выясняли действие бактофита на чистую культуру возбудителя пурпуровой пятнистости. Результаты *in vitro* в отношении *D. applanata* приведены в таблице 2.3.

Диаметр колоний возбудителя пурпуровой пятнистости снизился под влиянием биопрепарата, причем разница между контролем и опытом была существенной и препарат подавлял возбудителя в 1,3-1,6 раза.

Таблица 2.3

Влияние биопрепаратов на диаметр колонии гриба *D. applanata*

Вариант	Диаметр колонии, см				Ингибирующая активность, %			
	3-и	5-е	7-е	10-е	3-и	5-е	7-е	10-е
Контроль	4,1	6,1	6,9	8,6				
Бактофит	2,4	2,7	3,1	3,3	41,5	55,7	55,1	61,6
$НСР_{05}$ по вариантам – 0,3 $НСР_{05}$ по суткам – 0,2								

Следующий этап исследований включал испытание биопрепарата в условиях искусственного заражения стеблей малины фитопатогенов.

Данные по влиянию изучаемого биопрепарата через 7 и 30 суток после инокуляции на менее устойчивом сорте Киржач, а также в конце вегетации (в сентябре), на развитие пурпуровой пятнистости по размерам некротического участка и количеству плодовых тел гриба, представлены в таблице 2.4.

Таблица 2.4.

Влияние биопрепарата бактофит на размеры некротического участка и спороношение *D.applanata* при искусственном заражении сорт Киржач, инокуляция 24 июня, итоговый учет поражения 22 сентября

Вариант	Площадь пятна, $см^2$			Количество плодовых тел / $см^2$
	7-е сутки	30-е сутки	Конец вегетации	
Бактофит	1,0*	1,2*	7,0*	2,5*
Контроль (искусственный инфекционный фон)	3,9	4,1	19,9	8,1
$НСР_{05}$ по вариантам	2,6			4,7

*различия существенны

Уже на 7-е сутки площадь пятна под действием бактофита была в 3,9 раза меньше. В конце вегетации в обоих случаях наблюдали достоверное уменьшение площади некротического пятна в 1,6 – 2,8 раза. В проведенных исследованиях нами отмечено активное подавление фитопатогена под влиянием биопрепарата бактофит. Количество плодовых тел достоверно уменьшалось под влиянием бактофита (в 3,2 раза).

Данные по влиянию биопрепарата на развитие пурпуровой пятнистости на более устойчивом к болезни сорте Колокольчик представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5.

Влияние биопрепарата бактофит на размеры некротического участка и спороношение *D.applanata* при искусственном заражении (сорт Колокольчик, инокуляция 24 июня, итоговый учет поражения 22 сентября

Вариант	Площадь пятна, $см^2$			Количество плодовых тел / $см^2$
	Через7 сут	Через 30 сут	В конце вегетации	
Бактофит	0,8	0,9	4,0*	3,6
Контроль (искусственный инфекционный фон)	1,6	2,1	11,2	7,8
$НСР_{05}$	2,6			4,7

*различия существенны

Хотя различия между контролем и опытным вариантам по площади пятна были не существенны на 7-е сутки и 30-е сутки, наблюдалась тенденция к уменьшению этого показателя в 2 и более раз при обработке биопрепаратом. Только в конце вегетации подавление возбудителя болезни было достоверным. Эта же тенденция проявлялась в показателе количества плодовых тел на 1 кв. см (табл.2.5).

В 2013-2014 гг. проведены исследования в полевых условиях по оценке действия биопрепарата на пораженность однолетних побегов малины пурпуровой пятнистостью на двух сортах малины с разным уровнем устойчивости (табл.2.6.). Сроки обработки определялись при появлении первых симптомов болезней.

Таблица 2.6

Влияние обработки бактофитом на пораженность сортов малины пурпуровой пятнистостью в 2013 г. Обработка 12 июля

Варианты	Сорт					
	Киржач			Колокольчик		
	Развитие болезни, %					
	19.08	29.08	13.09	19.08	29.08	13.09
Контроль	22,5	26,3	28,1	10,0	12,5	13,1
Бактофит	10,6	11,3	13,1	5,0	6,1	6,9
Топаз	7,5	8,8	10,0	3,8	5,6	6,3
НСР $_{05}$: по вариантам =1,1; по сортам = 0,8						

В 2013 г. развитие пурпуровой пятнистости в контроле на все даты учета было достоверно более чем в 2 раза больше на менее устойчивом к болезни сорте Киржач. На растениях сорта Киржач, обработанных бактериальным препаратом или химическим фунгицидом топаз, поражение болезнью снижалось примерно вдвое. На сорте Колокольчик при значительно меньшем поражении болезни в контроле степень влияния биопрепарата относительно контроля была примерно такой же как на сорте Киржач. Топаз в конце августа и середине сентября показал одинаковую эффективность с бактофитом.

В таблице 2.7. представлены данные по поражению побегов малины пурпуровой пятнистостью в течение вегетационного периода 2014 г. На протяжении трех сроков учета поражение более устойчивого сорта Колокольчик в контроле было примерно вдвое меньше, чем на менее устойчивом сорте Киржач.

Таблица 2.7

Влияние обработки бактофитом на пораженность сортов малины пурпуровой пятнистостью 2014 г. Обработка 18 июля

Варианты	Сорт					
	Киржач			Колокольчик		
	Развитие болезни, %					
	20.08	31.08	10.09	20.08	31.08	10.09
Контроль	13,8	15,9	22,5	7,5	8,3	9,4
Бактофит	6,3	7,4	10,6	3,8	4,2	5,0
Топаз	4,4	5,4	8,1	2,5	3,5	4,4
	НСР $_{05}$ по сортам = 0,5; НСР $_{05}$ по препаратам =0,7					

В 2014 г. на сорте Киржач наблюдалась тенденция к более высокой эффективности бактофита. Топаз на обоих сортах показал более высокую эффективность по сравнению с биопрепаратом.

Отметим, что бактериальный препарат бактофит, зарегистрированный в России для контроля листовых болезней овощных и зерновых культур, впервые апробирован нами в отношении возбудителя пурпуровой пятнистости малины в опытах *in vitro*, а также в полевых условиях при контролируемой и неконтролируемой инфекционной нагрузке. Опыты в лабораторных условиях показали, что в использованных концентрациях бактофит эффективен в отношении подавления роста *D. applanata*. В продолжение лабораторных опытов оценивали воздействие биопрепарата бактофит на возбудителя пурпуровой пятнистости *D. applanata* в модельном эксперименте на искусственном инфекционном фоне на двух сортах малины Киржач и Колокольчик по показателям размера некротического пятна и количества плодовых тел на см^2.

На все три даты учета (табл. 2.7) бактофит при контролируемой инфекционной нагрузке оказывал сильное влияние на возбудителя

пурпуровой пятнистости малины по показателям площади некротического пятна (примерно вдвое) на сорте малины, неустойчивом к пурпуровой пятнистости. Что касается устойчивого сорта Колокольчик, только в конце вегетации обнаружены существенные различия между контролем и опытным вариантом, с одной стороны и биопрепаратом, с другой. Под влиянием бактофита количество плодовых тел уменьшалось значительно сильнее на сорте, слабоустойчивом к фитопатогену.

В 2013 и 2014 гг. в полевых испытаниях на естественном фоне заражения стеблей возбудителем пурпуровой пятнистости для сравнения использовали топаз. В оба года поражение сорта Колокольчик пурпуровой пятнистостью было примерно вдвое ниже. Бактофит в полевых условиях подавлял развитие пурпуровой пятнистости, хотя и в меньшей степени чем топаз. Однако в конце вегетации бактофит показал одинаковую эффективность с топазом. Возможно, это связано с высокой степенью выживания и размножения спор бацилл [Bouizgarne, 2013].

При сравнении результатов активности биопрепарата на двух сортах малины с разной степенью устойчивости к дидимелле выявлено следующее. В год, более благоприятный для развития болезни (2013), на неустойчивом сорте малины бактофит проявлял более высокую антагонистическую активность, хотя разница не столь велика как в предыдущих опытах, на устойчивом сорте проявлялась лишь тенденция к увеличению активности бактофита, зато и разница в активности бактофита с химическим стандартом была несущественной, что может быть связано с накоплением биоагента. В следующем году погодные условия в меньшей степени способствовали развитию болезни.

Таким образом, проведенные исследования впервые показали возможность снижения пораженности малины пурпуровой пятнистостью препаратом бактофит с разной степенью эффективности в зависимости от устойчивости сорта и погодных условий. Препарат более эффективен на

сорте малины, неустойчивым к пурпуровой пятнистости [Shternshis et al, 2016].

Высокая эффективность получена при испытаниях бактофита на других культурах в разных регионах России [Франк, Кищенко, 2008]. Например, продемонстрировано использование бактофита против болезней лесных культур в питомниководстве. Биопрепарат вызывал снижение пораженности мучнистой росой дуба черешчатого, шиповника собачьего, а также поражение культур корневой гнилью. Биологическая эффективность достигала 93% [Максименко, Титаренко, 2004].

Наряду с применением бактофита накоплено множество примеров эффективного биологического контроля болезней растений другими бактериальными препаратами (фитоспорин М, алирин-Б, гамаир и др).

Так, обработка семян пшеницы фитоспорином-М против корневых гнилей способствовала снижению пораженности растений в 3-4 раза. Биологическая эффективность биопрепарата была в интервале 72,4–92,5% в зависимости от возбудителя заболевания [Захарова и др, 2006]. Успешное использование фитоспорина против листостебельных инфекций пшеницы продемонстрировано рядом авторов [Горянин и др., 2015; Давлетшин и др., 2010; Коренюк, 2014; Немченко и др., 2014]. При использовании фитоспорина–М при протравливании семян против корневых гнилей эффективность составила 40%, против мучнистой росы, септориоза и бурой ржавчины - до 47% [Кузнецов и др., 2012]. Применение фитоспорина-М для обработки семян яровой пшеницы перед посевом в дозировке 1 л/т с последующим опрыскиванием в фазу флагового листа с расходом препарата 1,5 л/ га [Немченко, Цыпышева, 2014] повышало полевую всхожесть до 59 % (в сравнении с 54 % в контроле), прибавка урожайности при этом составила 3,1 ц/га к контролю.

Показана возможность использования фитоспорина–М против ризоктониоза картофеля. Разработанная схема обработок фитоспорином-М картофеля, включающая двукратное применение препарата, способствовала

снижению пораженности ризоктониозом в 8,5 раз по сравнению с контролем, при этом биологическая эффективность достигала 88 % [Пусенкова и др., 2010]. Выявлено снижение пораженности картофеля фитофторозом при использовании данного биопрепарата как в период вегетации [Ишкова и др., 2008], так и при хранении клубней [Герасимова и др., 2010].

По данным В.Э. Лазько и др., [2014] применение фитоспорина-М привело к активному подавлению ряда грибных заболеваний на бахчевых культурах, например, пероноспороза, фузариоза и антракноза на дынях и арбузах более в 2-3 раза в зависимости от заболевания и культуры. В целом, достаточное количество публикаций посвящено использованию фитоспорина на зерновых, овощных, кормовых, плодовых и ягодных культурах против ряда болезней в разных климатических зонах [Жернова, Жернов., 2008; Гришечкина и др., 2010; Холод, 2014]. Так, при использовании биопрепарата фитоспорин–М пораженность заболеваниями черной ножкой и бактериозами снижалась на растениях капусты. Биологическая эффективность достигала 62% против черной ножки, против слизистого бактериоза – до 73%, сосудистого бактериоза – до 85%. Кроме того, обработка препаратом подавляла фитофтороз на листьях томата до 59%, на плодах до 92%. [Гришечкина и др., 2010].

Испытания нового бактериального препарата витаплан на посевах льна-долгунца [Захарова, Дьяконов, 2013] показали его биологическую эффективность против бактериоза до 100%, против пасмо – до 96,9 %, при этом витоплан не только обладал фунгицидным действием, но стимулировал рост культуры, увеличивая длину стебля, выход и массу семян.

Во многих случаях успешным было использование алирина Б для подавления болезней на разных культурах. Алирин Б эффективно сдерживал развитие корневых гнилей, пятнистостей, увяданий различной этиологии, мучнистой росы огурца и томата, фитофтороза томата в разных регионах России [Новикова, 2003; Помелов, Дудин, 2009]. Показана возможность его применения против фузариозов зерна при хранении с эффективностью до

90% [Алябьева и др., 2014]. Этот препарат сдерживал развитие пятнистостей земляники на уровне 91% [Холод, 2013; 2014], отмечено активное снижение пораженности парши яблони при использовании этого препарата [Якуба, 2004]. Есть сведения о возможности применения алирин Б для подавления грибных болезней смородины, при его использовании наблюдали снижение развития заболевания мучнистой росой с биологической эффективностью до 93% -96% [Козлова, Лысенко, 2008; Лысенко и др., 2009]. Другими авторами в разных климатических условиях показана возможность использования алирина Б в биологическом контроле возбудителей болезней овощных культур [Полякова, 2008; Попов, Толопило, 2008; Антонова, 2015].

В полевых испытаниях против альтернариоза картофеля [Байрамбеков, Корнева, 2009] на момент уборки биологическая эффективность алирина-Б составила 38,6 % относительно 52,7 % у эталона (ридомил голд МЦ, вдг). Кроме этого, авторы отмечали достоверную прибавку урожая на уровне 20 % и увеличение выхода крупных клубней на 8 % в сравнении с контролем.

Довольно много примеров успешного использования гамаира для биоконтроля болезней растений [Павлюшин и др., 1999, Новикова, 2005; Полякова, 2008]. Изучено влияние гамаира на силу начального роста семян озимой пшеницы и на снижение пораженности этой культуры корневой гнилью. Обработка препаратом существенно повышала энергию прорастания и активно снижала развитие заболевания [Зимоглядова и др., 2009]. Л.Д. Гришечкиной с соавторами [2010] отмечено подавление семенной инфекции, а также существенное снижение пораженности зерновых культур корневыми гнилями (до 85%). При защите насаждений смородины от американской мучнистой росы биопрепаратом гамаир эффективность достигала 96% в зависимости от применения на сортах различного уровня устойчивости [Лысенко и др., 2009; Козлова, 2013, 2014].

Нами дана оценка влияния гамаира на пурпуровую пятнистость малины в условиях Западной Сибири [Шпатова, Штерншис, 2012].

Сначала проверили действие биопрепарата *in vitro* в отношении возбудителя *D. applanata*. В лабораторных условиях отмечено подавление роста фитопатогенного гриба под влиянием биопрепарата. Биологическая эффективность в отношении фитопатогена варьировала от 59 до 67%. В полевом опыте под влиянием обработки растений малины гамаиром выявлено снижение пораженности однолетних побегов пурпуровой пятнистостью (табл.2.8).

Таблица 2.8.

Влияние препаратов на поражение малины пурпуровой пятнистостью (СХА «Сады Сибири», сорт Зоренька Алтая, в среднем за 2010-2011гг.)

Вариант	Распространенность, %	Развитие, %	Биологическая эффективность, %	Урожайность, т/га
Контроль	80,0	21,9	-	2,04
Гамаир	55,5	14,3	34,7	2,18
Топаз	43,6	11,2	48,9	2,22
$НСР_{05}$	-	1,6	-	0,19

Проведённые полевые испытания показали, что под влиянием биопрепарата распространённость и развитие болезни уменьшились в 1,4 раза по сравнению с контролем. Различия между опытным вариантом и контролем существенны. Под влиянием топаза распространенность и развитие заболевания сокращались в 1,8 раза по сравнению с контролем. В вариантах с применением, как биопрепарата, так и химического эталона топаз урожайность была одинаковой. Статистических различий между вариантами по урожайности (гамаир и топаз) не выявлено. Таким образом, полевые испытания подтвердили антагонистическое действие микробного препарата выявленное в лабораторных условиях, где ингибирующая активность достигала 67%.

Помимо имеющихся в Российском каталоге бактериальных препаратов испытание проходят экспериментальные, еще не зарегистрированные препараты на основе бацилл. Имеется достаточно публикаций по применению таких биопрепаратов на разных культурах. В отношении корневых гнилей выявлено снижение пораженности на зерновых культурах при использовании экспериментальных препаратов на основе штаммов *B. subtilis* BZR 336g и *B. subtilis* BZR 517 – биологическая эффективность против корневых гнилей 45-68 %; бурой ржавчины – 18 %; желтой пятнистости листьев 26-49 % [Надыкта и др., 2015]. В отношении поражения озимой пшеницы фузариозом данные препараты показали достаточно высокую биологическую эффективность (до 78%) при обработке семян [Асатурова и др., 2014]. При использовании экспериментального биопрепарата на основе *Bacillus amyloliquefaciens* штамм ВКПМ –В 11008 при протравливании семян против ряда болезней яровой пшеницы отмечено снижение пораженности культуры. Против обыкновенной корневой гнили и септориоза - на 100%, альтернариоза и фузариоза до 98% относительно контроля [Сираева, Захарова, 2012

Показана возможность подавления ризоктониоза и фитофтороза на картофеле экспериментальным препаратом баксис. Биологическая эффективность применения баксиса на основе комплекса метаболитов бактерий *B. subtilis* составила 58% против ризоктониоза, против фитофтороза при умеренном развитии заболевания - 76% по листьям и до 73% при обработке клубней [Герасимова и др, 2010]. На подсолнечнике при использовании баксиса против фомопсиса отмечено снижение пораженности заболеванием, эффективность составила до 67%, против ложной мучнистой росы до 69% [Диденко и др., 2010]. В отношении пораженности картофеля фитофторозом и другими болезнями клубней при хранении показана возможность использования другого экспериментального препарата бацилон. Биологическая эффективность составила 24%. [Давидюк и др., 2004].

На томатах и огурцах применяли препарат бактоген на основе бактерии *B. subtilis* против ряда болезней. Биологическая эффективность против бактериозов достигала 97%, против пероноспороза - 86%, аскохитоза – 72%, корневых гнилей -75%, против белой и серой гнилей – 61% [Максимова и др., 2001]. При использовании экспериментального препарата на основе штамма *B. subtilis* Ал-5 против бактериального рака стеблей отмечено снижение пораженности растений томата на 48% [Суркова, 2008].

При применении препарата фитоцид – Р на основе штамма *Bacillus subtilis* наблюдали снижение пораженности болезнями проростков в 1,5 раза по сравнению с контролем при замачивании семян огурца. Выявлено, что эффективно использование данного препарата разными способами: обработка семян, внесение в лунки при посадке рассады и трехразовый полив растений на протяжении вегетации. Пораженность корневыми гнилями снижалась более чем в 3,5 раза. Эффективность применения данного препарата достигала 74% [Ткаленко, Болоховская, 2012].

Применение экспериментальных биопрепаратов D 7-1 и бациллин в условиях юга России обеспечивало снижение поражения подсолнечника стеблевой формой проявления белой гнили от 2,4 до 11 раз, при этом биологическая эффективность составила 54,5-100%, при эффективности эталонов 33,9-54,5 %. В среднем за два года наибольшая биологическая эффективность против стеблевой формы проявления белой гнили составила 83 %. Пораженность растений корзиночной формой болезни снижалась в 1,5-3,9 раза [Фирсов и др., 2009]. При использовании бациллина в отношении серой гнили на землянике его эффективность достигала 77% [Холод, 2010]. Успешными были испытания бациллина на яблоне против альтернариоза на юге России, биологическая эффективность препарата превышала 70% [Якуба, Гусин, 2006; Якуба, 2007].

Из новых перспективных биопрепаратов, разработанных в институте микробиологии НАН Беларуси, препарат на основе *B. amyloliquefaciens*

позволял свести к минимуму пораженность плодов яблони в период хранения плодовой и пенициллезной гнилями (до 1%) [Купцов и др., 2014].

За рубежом биологические препараты на основе бактерий рода *Bacillus* также зарекомендовали себя как эффективные, экологически безопасные и альтернативные синтетическим пестицидам [Colins et al., 1994; Burkhard et al., 1991]. Следует отметить биологический фунгицид для контроля листостебельных инфекций серенада MAX (на основе *Bacillus subtilis* штамм QST 713). Этот препарат применяется методом малообъемного опрыскивания с целью контроля черной бактериальной пятнистости, пустульного бактериоза, мучнистой росы, склеротиниоза и питиоза. Способствует эффективному снижению развития бактериальной пятнистости и склеротиниоза [Kim et al., 1999], а также ботритиоза [Paulitz, Belanger, 2001].

2.5. Применение энтомопатогенных бактериальных препаратов

Конкуренция фитофагов и человека за потребление растительной пищи обусловливает применение специальных мероприятий по контролю численности насекомых и клещей. Периодически возникающие в природе эпизоотии насекомых являются реализацией природного механизма биологического контроля численности фитофагов, что защищает растения без вмешательства человека. Однако природные эпизоотии проявляются не столь часто, поэтому по мере необходимости следует вносить биологические агенты – естественные регуляторы численности фитофагов в виде энтомопатогенных биопрепаратов для защиты лесных и сельскохозяйственных культур.

Биологическую защиту растений считают важнейшим фактором оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства, управления здоровьем растений. Российские ученые в ряде случаев были пионерами в развитии биологических методов защиты растений. Первый в мире биопрепарат для защиты растений был создан И.И. Мечниковым более 100

лет назад, и это положило начало развитию микробиологического метода защиты растений в мире [Lord, 2005]. К середине 80-х годов прошлого века в нашей стране были созданы все условия для наращивания темпов производства и применения биопрепаратов, при этом была обеспечена всесторонняя поддержка со стороны государства. Произошедшие в российском обществе в 90-е годы XX в. изменения социально-экономических условий резко ухудшили эту ситуацию, и только в начале XXI в. наметился подъем в использовании биологических препаратов для защиты растений. В данной главе приведены основные результаты использования энтомопатогенных бактериальных препаратов для контроля численности фитофагов (насекомых и клещей).

Прежде всего, необходимо отметить, что использование энтомопатогенов в качестве основы бактериальных препаратов, как и других агентов регуляции численности видов, повреждающих растения, определяется стратегиями, которые предложены в результате многолетнего обсуждения этого вопроса учеными стран, входящих в глобальную международную организацию по биологическому контролю вредных видов [Eilenberg et al., 2001]. Применение возбудителей болезней насекомых и клещей, которые используются не для искоренения, а для регуляции численности фитофагов до хозяйственно неощутимого уровня, определяется четырьмя основными стратегиями:

- интродукция в популяцию вредных видов биологического агента из удаленного ареала для его долговременного обоснования и постоянной регуляции численности фитофагов;

- однократное применение биологического агента с целью его дальнейшего размножения и функционирования как регулятора численности в течение продолжительного срока (но не постоянно);

- многократное использование биологического агента для оперативного сдерживания фитофагов;

- сохранение, активизация и учет деятельности природных полезных энтомопатогенов различными способами.

Примеры успешной реализации всех четырех предложенных стратегий имеются и в России, и в других странах. Активный путь подавления численности насекомых заключается во внесении инфекционного начала в биоценоз в виде препарата и может осуществляться двумя способами: 1) однократное применение препарата в очаге размножения вредителя в расчете на возникновение искусственной эпизоотии, 2) не менее, чем двукратное внесение биопрепарата по типу инсектицида. Это соответствует второй и третьей стратегиям (однократное и многократное использование биопрепаратов).

Для некоторых систем энтомопатоген - хозяин возможно однократное внесение агента для создания искусственной эпизоотии. Значимость эпизоотийного направления отмечали И.И. Мечников [1879] и Э. Штейнхауз [1952]. При реализации эпизоотологического направления количество внесенного энтомопатогена может быть незначительным в расчете на инициацию вспышки заболевания.

После разработки первых отечественных бактериальных препаратов сторонниками создания искусственных эпизоотий явились Е.В. Талалаев, Н.В. Кандыбин и др. Однако, следует отметить, что далеко не всегда удается вызвать искусственную эпизоотию при однократном внесении энтомопатогена. С большей вероятностью это происходит в лесных биоценозах. Работами школы профессора Е. В. Талалаева (Иркутский государственный университет) показана возможность создания искусственных эпизоотий при однократном внесении бактериальных препаратов в лесной биоценоз. Так, В. С. Кулагин [1987] отмечает, что вероятность эффективного подавления численности сибирского коконопряда в результате возникшего эпизоотического процесса определяется количеством энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis* в биоценозе, численностью вредных насекомых и экологическими условиями.

Следует отметить, что более распространена в современных условиях третья стратегия использования биопрепаратов для подавления численности вредных насекомых и клещей в открытом и закрытом грунте. Оперативное сдерживание фитофагов осуществляется не менее чем двукратным применением биопрепаратов на основе энтомопатогенов или их метаболитов. При сохранении той же степени экологической безопасности этот способ регуляции численности насекомых (по типу биологического инсектицида) более надежен. В данном случае ориентируются на быстрый эффект энтомопатогена, внесенного в данный очаг, а не на возникновение искусственной эпизоотии.

Далее будут представлены примеры использования биопрепаратов с учетом вышеперечисленных стратегий для защиты сельскохозяйственных и лесных культур. Рассмотрено включение биопрепаратов в системы защиты растений, разработанных, в первую очередь в России и, преимущественно, в условиях Сибири.

Замена химических инсектицидов на биологические препараты наиболее целесообразна на овощных и плодово-ягодных культурах, продукция которых употребляется в пищу в свежем виде, часто для диетического питания. Для региона Сибири и Дальнего Востока в 80-е гг. XX в. была разработана система защиты основной овощной культуры открытого грунта - белокочанной капусты, где предложена максимальная замена химических инсектицидов на биологические препараты [Штерншис и др., 1987]. Позднее продемонстрирована возможность почти полного биологического контроля всех насекомых - фитофагов, заселяющих ее в период вегетации [Осинцева, 1995; Штерншис и др., 1995; Shternshis, 2004]. Чешуекрылые вредители: капустная совка *Mamestra brassicae* L., капустная белянка *Pieris brassicae* L., капустная моль *Plutella xylostella* L., луговой мотылек *Pyrausta sticticalis* L. способны полностью уничтожить урожай капусты. Отечественные препараты на основе *B. thuringiensis* патоварианта А (дендробациллин, лепидоцид и др.) стали полноценной заменой химических

инсектицидов. Для подавления численности наименее восприимчивых к *B. thuringiensis* гусениц капустной совки более всего пригодны лепидоцид (с более высоким, чем у других бактериальных инсектицидов содержанием эндотоксина) или экзотоксин-содержащие препараты (БТБ, бикол). В условиях Сибири на посадках капусты встречается также садовая совка *Mamestra suasa* L. Гусеницы садовой совки обладают более высокой чувствительностью к биопрепаратам, что важно при определении норм их расхода [Осинцева, 1995]. Для защиты от белянки и моли, как правило, применяют меньшие из рекомендованного в Каталоге пестицидов диапазона норм расхода биопрепаратов.

По мере того, как регистрировались новые препаративные формы биологических инсектицидов, уточнялись и технологии их применения. Так, в Кемеровской области на сортах капусты разных сроков созревания испытывали лепидоцид СК и лепидоцид [Шульгина, Штерншис, 2004]. Оказалось, что лепидоцид СК в жидкой препаративной форме предпочтительней стандартного сухого лепидоцида П, так как обеспечивает значительное уменьшение нормы расхода при достижении одинакового защитного эффекта. Оптимальная норма расхода лепидоцида СК – 1 л/га. Показано также, что погодные условия в большей степени влияют на эффективность препарата против менее восприимчивого вредителя - капустной совки. В Иркутской области при использовании лепидоцида СК и П против чешуекрылых вредителей капусты биологическая эффективность достигала 74-80%, при этом требовались значительно меньшие нормы расхода жидкой препаративной формы по сравнению с порошком [Пахтуев и др., 2002].

Выявлена разная восприимчивость гусениц фитофагов к бактериальному препарату в зависимости от разновидности капусты [Андреева и др., 2013]. На менее благоприятном для развития насекомых растении-хозяине их восприимчивость к биопрепарату была выше, хотя и варьировала в зависимости от численности в определенных условиях года. В

полевых испытаниях на 2-х разновидностях капусты гибель гусениц капустной моли от лепидоцида зависела от кормового субстрата (табл. 2.9).

Таблица 2.9.

Действие лепидоцида на гусениц капустной моли на 2-х разновидностях капусты, Новосибирский р-н, 2009 г.

Вид капусты	Вариант	Количество живых особей, экз./100 растений, по суткам			Биологическая эффективность, % по суткам	
		До обработки	3	7	3	7
Белокочанная	Контроль	183,3	131,3	62,5	-	-
	Лепидоцид	193,3	37,8	18,3	73	72
Краснокочанная	Контроль	269,5	131	66,8	-	-
	Лепидоцид	260,3	59	40	53	48
$НСР_{05}$	Факторы А, В	67,1	32,6	25,7	-	-
	АВ	94,9	46,1	36,3	-	-

Примечание: фактор А – разновидность капусты, В – препарат.

Биологическая эффективность препарата на белокочанной капусте сорта Подарок (где численность вредителей была меньше) на 3-7 сутки после обработки была выше на 20-24% по сравнению с краснокочанной капустой сорта Марс. Такая зависимость подтверждается результатами ряда работ, где изучалось влияние растения-хозяина на эффективность *B. thuringiensis* в отношении насекомых-фитофагов [Андреева, 2009; Janmaat, Myers, 2005; Meade, Hare, 1993,1995]. Полученные результаты находятся в русле общей концепции триотрофа, отраженной в работах российских и зарубежных исследователей [Шапиро и др., 1979; Kouissi et al., 2001]. Согласно этой концепции, различия в биохимическом составе растения-хозяина могут изменять восприимчивость насекомого (консумента I порядка) к энтомопатогену (консументу II порядка). Аллелохемики (вторичные метаболиты растений) способны защищать растения, уменьшая выживаемость насекомых за счет ухудшения качества кормового ресурса, а

также прямо или опосредовано влиять на энтомопатогенный микроорганизм [Cory, Hoover, 2006].

Против ранних вредителей капусты - крестоцветных блошек (*Coleoptera: Chrysomelidae*) в России испытан разработанный во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, еще не зарегистрированный препарат бацикол на основе *B. thuringiensis* ssp. *darmstadiensis*, содержащий как споры, так и эндо- и экзотоксины. В ряде регионов его эффективность достаточна для подавления численности этих вредителей капусты [Смирнов, 2008; Гришечкина, 2015]. Таким образом, численность всех основных видов фитофагов капусты успешно контролируется применением биологических препаратов.

Выращивание овощных культур в закрытом грунте играет важную роль в получении ранней и диетической продукции, однако возможности бактериальных препаратов здесь ограничиваются только экзотоксин-содержащими. Опыт использования битоксибациллина против основного вредителя овощных культур (огурца, томата, перца, зеленных культур) – обыкновенного паутинного клеща *Tetranichus urticae* Koch. в хозяйствах Иркутской, Кемеровской и Новосибирской областей показал, что при неоднократном опрыскивании растений суспензией в концентрации 0,7-1,0% гибель вредителя достигает 70% [(Неудачина, 1985; Штерншис, 1988; Андреева, Штерншис, 1995]. Успешно использовали препарат в этой же концентрации суспензии против *T. urticae* при выращивании розы в теплицах [Долженко, 2013; Яковлева и др., 2013]. При учете кормового ресурса более высокая биологическая эффективность битоксибациллина, как в лабораторных опытах, так и в теплицах, отмечена на растениях баклажана, по сравнению с растениями сои и огурца [Андреева, 2011].

Среди плодовых культур в России в целом и в Сибири, в частности, большое внимание уделяется яблоне. Для подавления численности основного вредителя яблони яблонной плодожорки *Carpocapsa pomonella* L. также используют бактериальные препараты. Для получения высокой

эффективности важно точно определить срок обработки биопрепаратами, поскольку отродившиеся гусеницы плодожорки короткий срок находятся на поверхности листьев и плодов, затем вгрызаются в плод. Поэтому обработки биопрепаратами следует проводить через 5-7 дней после откладки яиц или сразу после отрождения гусениц. В точном определении этого срока в условиях Западной Сибири помогают феромонные ловушки [Цветкова и др., 2008]. Из бактериальных инсектицидов применяют все препараты *B. thuringiensis* патоварианта А. В России разработана система защиты яблони от фитофагов с максимальным применением биопрепаратов для Центрального черноземного региона [Колесова, 1994]. Наибольшая эффективность от препаратов получена при их применении в фазе розового бутона яблони или сразу после цветения, т.е. против гусениц младших возрастов. Замена высокотоксичных химических инсектицидов биопрепаратами активизирует деятельность природных энтомофагов, что дает дополнительный эффект. В ряде хозяйств Воронежской и Липецкой областей был испытан препарат баксин *(B. thuringiensis* ssp. *dendrolimus*), который также показал высокую эффективность против листогрызущих вредителей. Апробация лепидоцида (2 кг/га) и баксина (1 кг/га) продемонстрировала возможность их использования для защиты плодов летних и осенних сортов яблони от яблонной плодожорки. По данным автора, однократное применение этих препаратов через неделю после пика лета бабочек перезимовавшего поколения позволило снизить поврежденность съемных плодов до 0,4-0,8% против 12,5% (без обработок). В южном регионе установлено, что микробиологические препараты более эффективны во второй половине вегетации. В Краснодарском крае выявлена достаточно высокая эффективность полученных в условиях малотоннажного производства биопрепаратов лепидоцид, бацикол и других, в защите яблони от фитофагов [Ярошенко и др., 2002]. В этом же регионе наибольшую эффективность против яблонной плодожорки показали смеси препаратов димилин + лепидоцид и матч + лепидоцид, в результате применения которых

удалось сохранить от повреждений 96 и 94 % плодов соответственно. Смесь лепидоцида с димилином обладает также наибольшим овицидным действием с эффективностью 91 % [Иванова, 2009].

В рекомендациях М.И.Болдырева и Н.Я. Каширской [2009] по Центральной черноземной зоне в систему защиты яблони от яблонной плодожорки включены все препаративные формы лепидоцида и БТБ.

Защита плодовых и ягодных культур экологически безопасными биопрепаратами чрезвычайно важна в регионах с холодным климатом, где природа за короткий вегетационный период не способна быстро восстановиться от стрессов, вызванных высокой пестицидной нагрузкой. В Сибири помимо яблони выращивают облепиху, смородину, крыжовник, малину, землянику. Облепиха, как известно, является ценной поливитаминной культурой. Ее повреждают гусеницы непарного шелкопряда, восприимчивые к бактериальным препаратам. Гусеницы облепиховой моли *Gelechnia hyppophaella* L. успешно подавляются битоксибациллином [Штерншис, 1988].

На черной смородине в условиях Западной Сибири применение лепидоцида сдерживало численность крыжовниковой огневки на уровне химических инсектицидов. Оптимальная норма расхода лепидоцида КЭ составила 0,6 - 1.2 л/га [Васькин, Штерншис, 2006]. В результате обработки смородины биопрепаратом в таких нормах расхода достигается значительное снижение численности сопутствующих насекомых-вредителей, в частности, таких как крыжовниковая побеговая тля *Aphis grossulariae* Kalt. Отмечена зависимость эффективности биопрепаратов в отношении гусениц огневки от погодных условий. Дождливая погода с температурой воздуха около 18^{o}С ухудшала эффективность обработки из-за частичного смыва препарата каплями дождя с поверхности ягод; а также отсутствия системного действия биопрепаратов. Урожайность черной смородины была примерно на одном уровне при обработке биопрепаратами и химическим инсектицидом (табл. 2.10). Однако преимуществом при этом является сохранение природных

энтомофагов, вносящих свой вклад в естественную регуляцию численности фитофагов черной смородины.

Т а б л и ц а 2.10

Урожайность черной смородины (СХА «Сады Сибири», 2003 – 2005г.)

Варианты	Урожайность т/га			
	2003	2004	2005	среднее
Контроль	6,02	6,09	5,05	5,72
Лепидоцид 0,6л/га	9,06	9,20	9,04	9,10
Лепидоцид 0,8л/га	9,52	9,38	9,21	9,37
Лепидоцид 1,25л/га	10,38	9,77	9,94	10,03
Фуфанон 2,5л/га	10,83	10,06	10,09	10,33
$НСР_{05}$	0,51	0,39	0,30	

В условиях Новосибирской области сравнивали влияние лепидоцида и фуфанона на энтомофагов, обитающих в садовом ценозе, где выращивали ягодные культуры, включая кокцинеллид, сирфид и жужелиц, пауков [Васькин, Штерншис, 2004]. Численность всех энтомофагов резко снижалась на участках, обработанных химическим инсектицидом фуфанон. После опрыскивания фуфаноном в концентрации 0,2% численность пауков и жужелиц на данном участке восстанавливалась достаточно долго (около месяца). В то же время обработка лепидоцидом практически не оказала вредного воздействия на количество энтомофагов. Их численность сохранялась такой же, как и при обработке растений водой (контрольный вариант). В условиях Ленинградской области на смородине и крыжовнике с высокой эффективностью применяли битоксибациллин против крыжовникового пилильщика.

В Сибири красная малина и садовая земляника – одни из самых распространенных ягодных культур, как при промышленном возделывании, так и на приусадебных участках. Красная малина занимает по площади второе место после черной смородины. Наиболее вредоносным фитофагом малины в этом регионе является малинная побеговая галлица *Resseliella theobaldi* Barnes [Белых и др., 2004]. Особенность этого вредителя –

сопряженность с заболеванием, вызываемым фитопатогенными грибами, главным образом *D. applanata*, поэтому оценка действия препаратов проводится по развитию так называемого галлицевого ожога [Беляев, 2004; Shternshis et al., 2002].

Для сдерживания численности малинной побеговой галлицы перспективно использование препарата бактицид на основе *B. thuringiensis* ssp. *israelensis.* Выбор этого препарата обусловлен тем, что была показана эффективность его действующего начала (*B. thuringiensis* патовариант B) против некоторых видов насекомых отряда *Diptera*, в частности, рисового комарика [Кандыбин и др., 1995].

Полевые опыты по оценке влияния бактицида на галлицевый ожог проводили в насаждениях малины в Новосибирской области на восприимчивом к вредителю сорте Новосибирская крупная. Использовали двукратное опрыскивание суспензией препарата с интервалом 10 дней. Контрольный участок не обрабатывали. В качестве химического стандарта применяли актеллик. Под влиянием обработок бактицидом, 0,2%, развитие галлицевого ожога достоверно снижалось в 1,4 - 1,9 раза. Различия с химическим эталоном - актелликом, 0,2%, были несущественны. Следует отметить, что бактицид не оказал влияния на независимую грибную инфекцию малины, что свидетельствует о восприимчивости именно галлицы к биопрепарату. Необходимым условием для эффективного контроля численности малинной побеговой галлицы является своевременное определение начала лета фитофага, так как упущенные сроки отрицательно сказываются на биологической эффективности биопрепаратов. Оптимальным сроком проведения обработки является начало массового лета галлицы. В этом отношении представляет интерес использование феромонных ловушек. Проведенные испытания феромонов малинной побеговой галлицы, предоставленных нам английским энтомологом Джерри Кросс (Jerry Cross), показали их высокую специфичность и уловистость по сравнению с традиционно применяемыми водными ловушками [Беляев и др., 2010].

В последние годы наблюдается экспансия опасного вредителя картофеля колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. во многие регионы России, в том числе в Сибири. Что касается бактериальных энтомопатогенных препаратов для подавления численности этого фитофага, большее распространение получили экзотоксин-содержащие. В России зарегистрированы против колорадского жука битоксибациллин и бикол. Так, по данным Н. В. Кандыбина и др. [2009], при трехкратных обработках картофеля битоксибациллином при норме расхода БТБ 2 кг на 1 га эффективность подавления колорадского жука была стабильно высокой. При этом отмечена необходимость своевременной первой обработки во время массового появления личинок первых возрастов. Вторая группа бактериальных препаратов против колорадского жука имеет своей основой *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis (*иное название - *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni,* штамм *tenebrionis)*. После открытия в 1983 г. этого подвида достаточно быстро были разработаны первые биопрепараты против колорадского жука в США. Два таких препарата M-Trak® и Foil® показали высокую эффективность в подавлении личинок всех возрастов жука и хорошо сочетались с яйцеедом *Coleomegilla maculata* De Geer [Hilbeck et al., 1998]. В начале 90-х годов XX в. в СНГ впервые был успешно испытан для защиты картофеля от этого фитофага препарат новодор датской фирмы «Ново Нордиск» [Король и др., 1994]. Эти результаты явились стимулом для разработки отечественного препарата колорадо [Азизбекян и др.,1996]. Однако к 2010 г. из мирового ассортимента разработанных препаратов действующим остался лишь новодор. Причинами этой неудачи называют строгую специфичность этих препаратов, максимальную эффективность против личинок 1-2 возрастов, труднодоступных при опрыскивании, и быструю инактивацию в полевых условиях [Gelender, 2004]. В настоящее время новодор больше всего используется в органическом земледелии и в городских парках против ильмового листоеда *Xanthogaleruca luteola* Muller.

В условиях Сибири колорадский жук стал опасным вредителем картофеля значительно позже, чем в Европейской части России. При использовании БТБ против колорадского жука в норме расхода 5 кг/га в Новосибирской области эффективность достигала 95%, в Кемеровской области – 78% [Пахтуев и др., 2002], что было сравнимо или несколько ниже уровня химических инсектицидов. В Омской области применяли этот препарат в норме расхода 2 кг/ га [Барайщук, Штерншис, 2008]. Наибольшая эффективность БТБ наблюдалась для личинок 1 и 2 возрастов – 87%, меньшая для личинок 2 и 3 возрастов – 79% и самая низкая для личинок 3 и 4 возрастов – 25%. Гибель личинок от химического инсектицида сумицидин и БТБ достоверно не отличалась в отношении личинок 1 – 2 возрастов колорадского жука. Лишь в отношении личинок 3–4 возрастов наблюдалась достоверно более высокая эффективность сумицидина по сравнению с бактериальными препаратами. В Новосибирской и Ленинградской областях успешно испытан бацикол для подавления численности колорадского жука на посадках картофеля [Гришечкина, 2015].

В лесных массивах внесение биопрепаратов помимо прямого эффекта приводит к возникновению долговременных очагов инфекции вредителей. Накоплен достаточно большой опыт использования бактериальных препаратов для защиты леса как в России, так и за рубежом [Талалаев, 1970; Бахвалов, 1995; Голосова, 2004; Гниненко, 2007]. Огромные массивы леса сосредоточены в Сибири, что обусловило интерес сибирских ученых к разработке бактериологического метода подавления численности лесных фитофагов. Объектами исследований стали такие опасные вредители лесов как сибирский шелкопряд *Dendrolimus sibiricus superans* Tschetv., непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L., шелкопряд-монашенка *Lymantria monacha* L. и другие. Проведены теоретическое обоснование и практическая реализация использования бактериальных препаратов дендробациллина, инсектина, гомелина в регуляции численности шелкопрядов. Так, Е. В. Талалаевым [1970]

предложено для защиты от сибирского шелкопряда инфицирование хвои в межлетном году для создания очагов инфекции. По данным В. С. Кулагина [1987] при качественной и своевременной обработке лесных насаждений бактериальные препараты способны сдерживать численность сибирского шелкопряда в нескольких поколениях вредителя. В 1965 г. получены первые успешные результаты бактериологического подавления численности непарного шелкопряда в сосновых лесах Красноярского края [Машанов и др.,1981]. Наряду с непарным шелкопрядом действие бактериальных препаратов распространялось также на сопутствующего вредителя - гусениц черно-желтой ванессы *Vanessa xanthomelus* L. В Омской области успешно подавлены очаги непарного шелкопряда в лесхозах в 2005-2006 гг. [Барайщук, 2008]. Проведена наземно–очаговая обработка лесов усовершенствованным препаратом лепидоцид, СК–М против гусениц непарного шелкопряда аэрозольным генератором ГРД. Биологическая эффективность препарата составляла от 73 до 80% в 2005 г., и от 78 до 94% в 2006 г.

Бактериальные препараты достаточно широко применяли в лесах Дальнего Востока. Так, способом ультрамалообъемного опрыскивания (3 л/га) лепидоцидом СК без разбавления водой подавляли численность гусениц сибирского шелкопряда 3-4 возраста (300-400 особей на дерево) в Приморском крае. Биологическая эффективность составила.82,5% [Кутеев, 1998]. По данным Т. С. Малоквасовой и Л. П. Челышевой [1998] в период нарастания численности гусеницы шелкопрядов относительно устойчивы (эффективность до 45%). В эруптивную фазу вспышки восприимчивость к дендробациллину и лепидоциду в среднем за многие годы была достаточно высокой. При этом восприимчивость к биопрепаратам гусениц шелкопрядов амурских популяций всех возрастов в продромальную и эруптивную фазы выше по сравнению с приморской популяцией.

В лесах Ульяновской области с высокой эффективностью применяли битиплекс против хвое- и листогрызущих вредителей при отсутствии

отрицательного эффекта в отношении энтомофагов [Каменек и др., 2005]. При эффективной бактериальной обработке дубрав Самарской области против дубовой зеленой листовертки Ю. А. Сергеевой [2007] отмечено щадящее влияние лепидоцида СК на паразитов этого фитофага.

Применение биопрепаратов важно также и в полезащитных лесных полосах. Показана перспективность использования биопрепаратов как экологически безопасных средств защиты лесных полос при вспышке массового размножения дубовой зеленой листовертки и непарного шелкопряда [Белицкая, 2004]. Высокий защитный эффект (до 90%) получен при использовании дендробациллина и битоксибациллина. В лесных и городских насаждениях Северного Кавказа многолетними исследованиями выявлена высокая эффективность авиационного применения бактериальных препаратов против опасного вредителя – американской белой бабочки без отрицательного влияния на энтомофагов [Кобзарь и др., 1991].

При обсуждении использования биопрепаратов для подавления численности вредителей сельского и лесного хозяйства нельзя не коснуться проблемы их безопасности для человека и окружающей среды, отражающей главное достоинство этих средств защиты растений. Естественно, что основное преимущество биологических препаратов - специфичность действия, является залогом безопасности их для здоровья человека. Тем не менее, для включения любого биопрепарата в Каталог зарегистрированных для применения, необходимо получить доказательства его безвредности для человека, животных, полезной энтомофауны и других нецелевых объектов.

Такие доказательства получают при проведении специальных экспериментов по внутривенным и внутриутробным инъекциям, пероральному введению агента с последующими морфологическими исследованиями подопытных животных. Существуют также тесты на хроническую токсичность и канцерогенность. По свидетельству И. Танада [Tanada, 1984], его учитель Э. Штейнхауз (основоположник патологии насекомых как науки) первым выпил суспензию *B. thuringiensis*, чтобы

доказать безвредность бактерии для человека. В нескольких странах проводились проверки безопасности энтомопатогенных бактерий на добровольцах с последующим тщательным медицинским обследованием, которое не обнаруживало отрицательных последствий для здоровья человека.

Препараты на основе *B. thuringiensis*, содержащие термостабильный экзотоксин, проявляют большую токсичность, чем не содержащие его. В связи с тем, что термостабильный экзотоксин обладает тератогенным действием на насекомых, а в опытах на лабораторных животных установлено ингибирование синтеза РНК, важное значение приобретают исследования, направленные на выявление мутагенного гонадотоксического, тератогенного и других возможных эффектов воздействия. Есть данные по токсичности турингиензина для легочной ткани крыс [Xu et al., 2014]. Однако следует иметь в виду, что в этих исследованиях содержание β-экзотоксина намного превышает те концентрации, в которых он поступает в окружающую среду с препаратом.

При безусловно высоком уровне экологической безопасности биологических препаратов их применение не всегда дает стабильный эффект. Это связано со сложностью взаимодействия энтомопатогенов с организмом насекомого-хозяина и с внешней средой. Гибель насекомых, как правило, наступает не моментально, а по истечении определенного периода времени, необходимого для развития заболевания. Кроме того, действующее начало препаратов подвергается разрушительному влиянию ряда абиотических факторов при попадании в окружающую среду. Поэтому важны исследования, способствующие повышению эффективности биопрепаратов при их применении.

В качестве одного из таких подходов, в 1971 г. в Канаде стали использовать хитиназу в качестве фермента, разрушающего молекулы хитина в перитрофической мембране насекомых, для усиления действия препаратов на основе *B. thuringiensis* [Smirnoff, 1971]. В сибирских условиях подтверждена правомерность такого подхода к энтомопатогенным

бактериальным препаратам [Дужак и др., 1995]. Для этого использовали ферментный препарат (ФП) с хитиназной активностью, который добавляли к бактериальным препаратам. Действие хитиназы, содержащейся в ФП, при совместном применении с дендробациллином выражалось в ускорении гибели насекомых. Через сутки после заражения гусениц лугового мотылька суспензией дендробациллина с ФП (в концентрации менее 0,02%) гибель насекомых увеличивалась в 1,5-2 раза. Кроме того, результаты свидетельствовали о возможности существенного снижения концентрации биопрепарата за счет введения ФП. Это же наблюдалось и при оценке влияния лепидоцида с хитиназой в отношении гусениц капустной совки [Овчинникова и др., 2009]. В лабораторных условиях гибель гусениц капустной совки от лепидоцида в концентрации 10^8 спор/мл была такой же, если снижали на порядок эту концентрацию за счет добавления фермента (табл. 2.11). Результаты полевой оценки представлены в таблице 2.12. В полевых условиях концентрацию лепидоцида уменьшали в 5 раз за счет добавления хитиназы.

Т а б л и ц а 2.11

Влияние смеси лепидоцида с хитиназой на гусениц капустной совки в лабораторных условиях

Вариант опыта	Биологическая эффективность по суткам, %			
	3	5	7	10
Лепидоцид (10^8 спор/мл)	26,7	50,0	60,0	70,0
Лепидоцид (10^7 спор/мл) + хитиназа (0,5 мЕ/мл)	33,3	53,3	60,0	66,7
Хитиназа (0,5 мЕ/мл)	0	0	0	0
$НСР_{05}$	11,1	13,0	11,1	12,2

Т а б л и ц а 2.12

Полевая оценка биопрепаратов на посадках капусты сорта Делус против гусениц чешуекрылых вредителей

Вариант опыта		Биологическая эффективность по суткам, %				Урожайность, т/га
		3	5	7	10	
Лепидоцид ($1{,}25 \cdot 10^8$ спор/мл)	Совка Моль Белянка Σ	8,4 44,7 45,3 33,2	29,2 55,6 76,7 57,9	41,7 64,4 86,5 68,8	66,9 74,7 96,2 84,7	42,4
Лепидоцид + хитиназа ($6{,}25 \cdot 10^7$ спор/мл)	Совка Моль Белянка Σ	6,8 37,5 29,6 24,0	30,5 58,5 48,7 43,6	53,1 68,9 68,5 63,2	66,1 68,0 89,2 79,6	40,8
Контроль		-	-	-	-	34,8

$НСР_{05} = 4{,}3$

Усиливающая роль хитиназы в отношении инсектицидной активности *B. thuringiensis* подтверждена зарубежными авторами на примере токсина Cry 1C по отношению к гусеницам полифага *Spodoptera littoralis* Hb. [Regev et al., 1996]. В присутствии экзогенной хитиназы, Cry 1C в концентрации 3 мкг/мл вызывал такой же токсический эффект, как при использовании токсина в концентрации 20 мкг/мл, но без хитиназы. Кроме того, авторы показали, что хитиназа образовывала поры в перитрофической мембране, полагая, что это и связано с повышением активности токсина.

Из материала, изложенного в главах 1 и 2, следует, что в щелочной среде происходит деградация кристаллического белка *B. thuringiensis* до наиболее активной фракции. На этом основании мы использовали углекислый натрий как активатор при растворении его в суспензии бактериального препарата с последующей оценкой инсектицидного эффекта. С увеличением концентрации этого вещества от 0,005% до 0,2% и соответствующим повышением pH от 8,5 до 10,5 гибель тестируемых насекомых значительно возрастала [Штерншис, 1995]. Интересно, что

активированный раствором Na_2CO_3 кристалл *B. thuringiensis* становился токсичным для имаго совок *Heliothis virescens* F. и *Spodoptera exigua* Hubn., на которых не оказывал влияния без активации в щелочной среде [Grove et al., 2001].

Для увеличения инсектицидной активности бактериальных препаратов предложено добавлять к спорово-кристаллическому комплексу *B. thuringiensis* активаторы, усиливающие действие эндотоксина как разобщителя окислительного фосфорилирования и дыхания. Выявленное действие дельта-эндотоксина как разобщителя процессов окислительного фосфорилирования и дыхания с активированием фермента АТФазы послужило основой для выбора некоторых солей для усиления действия эндотоксина [Штерншис, Каменек, 1986]. Увеличение активности фермента наблюдали при добавлении к *B. thuringiensis* таких используемых в растениеводстве солей как сернокислый магний и сернокислая медь. Добавление этих соединений в концентрациях 0,025-0,05% в лабораторных опытах с подвидами *galleriae* и *dendrolimus* привело к увеличению гибели гусениц капустной белянки вдвое на 2-е сутки после заражения и в 4-5 раз для непарного шелкопряда. В полевых опытах против вредителей капусты биологическая эффективность увеличивалась более, чем в 1,5 раза при сохранении урожая на 25% [Штерншис, 1995].

Таким образом, энтомопатогенные бактериальные препараты достаточно широко представлены в сельском и лесном хозяйстве как экологически безопасные средства защиты растений и управления их здоровьем.

Г л а в а 3

ОПТИМИЗАЦИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ЗДОРОВЬЕМ РАСТЕНИЙ

3.1. Основы полифункционального действия агентов биоконтроля организмов, повреждающих растения

В главе 2 представлен накопленный опыт исследований по применению биопрепаратов на основе антагонистических бацилл для подавления фитопатогенов и на основе энтомопатогенных бацилл для подавления фитофагов в рамках биологического контроля численности вредителей и болезней растений. В данной главе мы уделим основное внимание результатам, отражающим многоцелевое (полифункциональное) влияние бактерий рода *Bacillus* и препаратов на их основе, что отвечает требованиям управления здоровьем растений. Это означает, что наряду с собственно биологическим контролем фитопатогенов и фитофагов будут рассмотрены связанные с этим эффекты усиления роста и развития растений, индукции системной устойчивости, повышения сопротивляемости растений неблагоприятному влиянию абиотических факторов, влиянию на продуктивность культур. Наличие инсекто-фунгицидного эффекта как одного из аспектов управления здоровьем растений будет показано на примере *B. thuringiensis.*

Прежде всего остановимся на обсуждении исследований, отражающих основы полифункционального действия бацилл в рамках управления здоровьем растений. В последние годы все больше внимания при оценке механизма действия бактерий рода *Bacillus* уделяют образованию бациллами биологически активных веществ и ферментов. Первоочередной интерес представляет продукция циклических липопептидов и хитиназ, отвечающих и за антагонистический, и за инсектицидный эффекты бактерий.

Продукция липопептидов бактериями рода *Bacillus.* Достаточно большое количество работ, особенно в последнее десятилетие, посвящено

образованию антагонистическими и энтомопатогенными бактериями рода *Bacillus* липопептидных циклических антибиотиков, ответственных и за прямой антагонистический эффект, и за индукцию устойчивости растения к болезням и вредителям [Lee et al., 2007; Ongena et al., 2007; Li et al., 2008; Kim et al., 2010; Yanez-Mendizabal et al., 2012; Mnif et al., 2015, 2016]. Липопептиды содержат в молекуле пептидную цепь, с которой ковалентно связан остаток жирной кислоты. Молекулы известных липопептидов содержат от 4 до 16 аминокислотных остатков линейных пептидных цепей. Липопептиды включают группы (семейства) сурфактинов, итуринов и фенгицинов [Baruzzi et al., 2011]. Сурфактины (сурфактин, лихенизины и пумилацидины) продуцируются такими бациллами как *B. subtilis, B licheniformis, B. natto, B. pumilis* и содержат циклические гептапептиды, образующие лактоновые мостики с β-гидрокси -жирными кислотами. Длина углеродной цепи жирных кислот от C_{13} до C_{18}. Группа итуринов состоит из A, C, E и D изоформ, бацилломицина D, F и L и микосубтилина. Все они содержат циклический гептапептид, ацилированный β-амино -жирными кислотами с длиной цепи C_{14} – C_{16}. Фенгицины, включая плипастатин как стереоизомер, состоят из β-гидрокси -жирных кислот, связанных с N-концом декапептида [Stein, 2005].

Связь структуры и функций липопептидов выражается разной степенью антагонистического действия в зависимости от патогена, хотя в целом все они вызывают возникновение пор в клеточных мембранах.

Циклические липопептиды, относящиеся к биосурфактантам, образуют *B. subtilis* [Мелентьев, Кузьмина, 2005; Kim et al., 2010; Ongena et al., 2007; Yunez-Mendizabal et al., 2012], *B. amyloliquefaciens* [Lee et al., 2007], *B. licheniformis* [Li et al., 2008], *B. thuringiensis* [Kim et al., 2004].

B. subtilis. В зависимости от штамма *B. subtilis* и мишени-фитопатогена большую или меньшую антагонистическую активность проявляли продуцируемые бактериями итурин А, фенгицин или сурфактин А. Все эти липопептиды действуют на фосфолипиды и способны формировать поры в

клеточных мембранах грибов и бактерий [Avis, 2007]. Специфические механизмы образования пор различны для липопептидов разных семейств, что обуславливает их разную активность [Etchegaray et al. 2008; Falardeau et al. 2013]. Выяснилось, что, как правило, штаммы с более высоким содержанием липопептидных антибиотиков обладают более высокой антагонистической активностью и спектром действия. Так, штамм *B. subtilis* CMB32 продуцирует все названные липопептиды, которые ответственны за антифунгальную активность в отношении *Colletotrichum gloeosporioides*, вызывающего антракноз у растений [Kim et al., 2010]. Итурин, выделенный из штамма *B. subtilis* KS03, *in vitro* ингибировал активность возбудителя антракноза *Gloeosporium gloeosporioides* [Cho et al., 2003]. В модельном опыте по инфицированию корней арабидопсиса бактерией *Pseudomonas syringae. B. subtilis* образовывал биопленки, продуцирующие сурфактин, который ингибировал фитопатогенную бактерию [Bais et al., 2004]. При изучении антигрибных соединений, продуцируемых штаммом *B. subtilis* ИБ-54 -антагониста почвенных микромицетов, авторы пришли к выводу, что антагонистическая активность бациллы обусловлена способностью синтезировать липопептиды, близкие к сурфактинам и итуринам [Мелентьев и др., 2010].

Показано, что при определенном подборе питательной среды при размножении бактерий наиболее активным становится сурфактин [Ali et al., 2010], в другом случае добивались увеличения выхода итурина [Mizumoto et al., 2007]. Выход сурфактинов *B. subtilis* повышали добавлением в питательную среду сульфатов магния и железа [Abushady et al., 2005].

Имеются сведения, что фенгицин, продуцируемый выделенным из почвы штаммом D1/2 ингибирует *Fusarium graminearium* - возбудителя болезни кукурузы и пшеницы [Chan et al., 2009]. Штамм GA1 образует фенгицин, содержание которого коррелирует с фунгицидной активностью против серой гнили на яблоне [Toure et al., 2004]. Бацилломицин и фенгицин

штамма UMAF6614 более активны по сравнению с сурфактином при подавлении грибных и бактериальных патогенов дыни [Zeriouh et al., 2014].

Доказано, что синтез липопептидов *B. subtilis* - ключевой момент в подавлении фитопатогенов в природных условиях, при этом продукция итуринов и фенгицинов модулируется присутствием в окружающей среде фитопатогенов [Cawoy et al., 2015]. В то же время растительные полисахариды стимулируют образование сурфактина – главного бактериального ингредиента, продуцируемого в первые часы взаимодействия бацилл с тканями корней [Debois et al., 2015]. Помимо прямого действия путем образования пор в мембране микробных клеток сурфактины и фенгицины *B. subtilis* предотвращают адгезию конкурентных микробов на растении и индуцируют их устойчивость к болезни [Falardeau et al., 2013]. Совместное действие липопептидов разных семейств приводит к аддитивному или синергетическому эффектам относительно антифунгального действия [Liu et al., 2014]. При образовании биопленок на корнях растений обнаружен синергический эффект сурфактина и бацилломицина в антагонистическом действии мутантного штамма *B. subtilis* 916 [Luo et al. 2015]. Для определения количества антибиотиков, продуцируемых бациллой на корнях огурца, экстрагировали сурфактин и итурин А из корней и ризосферы [Kinsella et al., 2009]. Оказалось, что с увеличением возраста растений усиливается продукция сурфактина и итурина А, причем последнего значительно больше.

Показано, что усиленная продукция микосубтилина, относящегося к семейству итуринов, штаммом *B. subtilis* BBG100 увеличивало его антагонистическую активность [Leclere et al. 2005]. Выявлено, что при действии штамма NCD-2 на болезнь хлопчатника, вызванную *Rhizoctonia solani,* главную роль играют липопептиды фенгицинового ряда [Guo et al., 2014]. На листьях дыни ключевую роль в антагонизме четырех штаммов *B. subtilis* по отношению к возбудителю болезни *Podosphaera fusca* играли липопептиды семейств итуринов и фенгицинов [Romero et al., 2007], а в

защите бобовых растений от *Pythium ultimum* основное значение имели фенгицины, продуцируемые *B. subtilis* [Ongena et al., 2005].

Получены прямые доказательства эффективного биосинтеза липопептидов в ризосфере бактерий. Так, штамм *B. subtilis* BGS3 утилизировал основные субстраты из растительных экссудатов для продукции сурфактинов [Nihorimbere, 2009].

Наряду с проявлением антифунгальной активности четырех штаммов *B. subtilis* в отношении мучнистой росы огурца обнаружена их антибактериальная активность против *Xanthomonas campestris* и *Pectobacterium carotovorum*. При этом отмечено, что за антифунгальную активность ответственны сурфактин, итурин и фенгицин; антибактериальная активность при выращивании растений огурца связана только с продукцией итурина [Zeriouh et al., 2011].

Продемонстрировав *in vitro* и в полевых условиях фунгицидный эффект липопептида, выделенного из тунисского штамма *B. subtilis,* авторы предложили именно эту фракцию использовать в качестве потенциальной основы нового биопрепарата [Mnif, Ghribi, 2015].

B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis. Обнаружена продукция липопептидов разными штаммами этих бактерий, выделенных из разных географических регионов. Так, *B. amyloliquefaciens,* штамм LP03, выделенный из почвы, продуцировал липопептид бамилоцин А, идентифицированный методами хроматографии и масс-спектрометрии [Lee et al., 2007] и проявлял значительный ингибирующий эффект на фитопатогенные грибы. Этот липопептид отличался от сурфактинов тем, что лейцин, валин и аспарагиновая кислота в положении 3, 4 и 5 были замещены на метионин, лейцин и пролин, соответственно. У другого штамма *B. amyloliquefaciens* FZB42 антифунгальный эффект ассоциировался с синтезом бацилломицина D [Koumoutsi et al., 2007]. При взаимодействии растений с *B. amyloliquefaciens* S499 отмечено влияние абиотического стресса на продукцию сурфактинов [Pertot et al., 2013]. Корейский штамм *B.*

amyloliquefaciens CNU114001 проявил антагонизм против 12 грибов, включая представителей родов *Alternaria, Botrytis, Sclerotinia,* и выделенный из него итурин подавлял серую гниль томатов и мучнистую росу огурца и тыквы в теплицах [Ji et al., 2013].

Обнаружено, что за антагонистический эффект штамма *B. amyloliquefaciens* S13-3 в отношении возбудителя антракноза земляники ответственны итурин А, фенгицин и сурфактин, при этом авторы отметили, что итурин и сурфактин одновременно запускали индуцированную системную устойчивость растений [Yamamoto et al., 2015]. Продемонстрировано, что другие штаммы *B. amyloliquefaciens* (MEP218 и ARP23) продуцируют эти же три липопептида, которые участвуют в подавлении стеблевой гнили сои [Alvarez et al., 2012]. Эпифитный бактериальный штамм PPCB004 и выделенные из него итурин, фенгицин и сурфактин проявляли антифунгальную активность в отношении 7 фитопатогенов цитрусовых при хранении плодов. Из них итурин был самым сильным ингибитором возбудителей болезней [Arreleda et al., 2010]. Сурфактины штамма *B. amyloliquefaciens*, изолированного из апельсиновых насаждений, ингибировали *F. oxysporum* [Vitullo et al., 2012]. Выделенный из колосьев пшеницы штамм S76-3 продуцировал итурин, плипастатин (стереоизомер фенгицина) и сурфактин, проявивших разную активность по отношению к *F. graminearum* [Gong et al., 2015]. Выяснили, что источником липопептидов (сурфактина, итурина А, бацилломицина D и фенгицина) служит штамм 32a, активно участвующий в ингибировании грибных и бактериальных патогенов, включая *Agrobacteria tumefaciens* [Ben Abdallak et al., 2015]. Показано, что у штамма SQR9 ведущую роль в подавлении *F. oxysporum* играет бацилломицин D [Xu et al., 2013]. Ассоциированные с растениями штаммы *B. amyloliquefaciens*, $MEP_2$18 и $ARP_2$3, продуцирующие набор липопептидов, подавляли *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* и *in vivo* [Alvarez et al., 2011]. Другой штамм этой бактерии, NJN-6, продуцировал три

гомолога семейства итуринов и 2 гомолога семейства фенгицинов, которые подавляли *F. oxysporum* [Yuan et al., 2012].

На примере *B. amyloliquefaciens*, штамм S499, изучена продукция липопептидов в условиях ризосферы. В окружении корней наблюдали максимальное количествово сурфактина по сравнению с итурином и фенгицином. Показано, что это зависит от набора нутриентов. Продукция липопептидов в ризосфере не всегда коррелирует с таковой *in vitro* [Nihorimbere et al., 2012]. Штамм *B. amyloliquefaciens* subsp *planetarium* БИМ В-439Д продуцирует низкомолекулярные липопептиды и является основой белорусского препарата, проявляющего высокую антагонистическую активность к ряду фитопатогенов [Бережная и др., 2014].

Относительно меньшее число работ посвящено выделению и анализу липопептидов из *B. licheniformis*. Так, еще в 1999 г. [Grangemard et al., 1999] из штамма *B. licheniformis* IM 1307 выделена серия 9 лактонных липопептидных биосурфактантов – представителей группы лихенизинов. По свидетельству авторов, они были по крайней мере в 10 раз активнее сурфактинов. Позднее методами хроматографии и масс-спектрометрии идентифицированы 9 липопептидов (сурфактины и лихенизины), продуцируемые *B. licheniformis* HSN221 [Li et al., 2008]. Изучены физические свойства и химическая структура липопептида лихениформина, продуцируемого *B. licheniformis* и показана его связь с антифунгальной активностью [Biria et al., 2010]. Продемонстрировано влияние питательной среды на продукцию липопептидов *B. licheniformis*. При варьировании состава питательной среды, штамм продуцировал либо сурфактины, либо лихенизины [Li et al., 2008].

Как и в случае с *B. subtilis*, анализ липопептидов *B. licheniformis*, выделенных в семи разных географических ареалах, показал различие в их содержании в зависимости от местности нахождения [Price et al., 2007]. Продемонстрировано, что влияние экстракта липопептидов из *Bacillus* spp. SS-12.6 на ингибирование роста 15 грибов, поражающих лекарственные

растения, такое же как самого бактериального изолята, что подтверждает ключевую роль липопептидов в антифунгальном действии [Dimkic et al., 2015].

Bacillus thuringiensis. Как отмечалось в предыдущих главах, *B. thuringiensis* – наиболее распространенная бактерия, вызывающая болезни насекомых. Она продуцирует множество Cry-токсинов, ответственных за проявление инсектицидной активности. Однако более 15 лет назад из *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, штамма, являющегося основой многих биологических инсектицидов во всем мире, были выделены липопептидные антибиотики с антифунгальной активностью, названные курстакинами, [Hathout et al., 2000]. В дальнейшем выделен и охарактеризован циклический липопептид, продуцируемый энтомопатогенной бактерией *B. thuringiensis* [Kim et al., 2004]. Обнаружено, что по химической структуре он близок к фенгицину, продуцируемому *B. subtilis,* и проявляет фунгицидную и бактерицидную активность наряду с инсектицидной. Методами ПЦР и масс-спектрометрии подтверждена продукция курстакина новым изолятом *B. thuringiensis* CIP 110220. Те же праймеры использованы авторами для идентификации курстакина несколькими штаммами подвидов *kurstaki, thuringiensis,* и *pulsiensis* [Abderrahmani et al., 2011]. Позднее показано, что штамм *B. thuringiensis* SM1 выделенный из почвы, продуцировал фенгицин, структура которого позволяет предполагать антимикробные свойства [Roy et al., 2013]. В обзоре М. Бешет с соавторами [Bechet et al., 2012] обсуждена информация о курстакинах – липопептидах, выделенных из *B. thuringiensis.* Все они являются липогептапептидами, проявляющими антифунгальную активность.

В плане использования штаммов *B. thuringiensis* для управления здоровьем растений важно проявление ими антагонистических свойств наряду с инсектицидными. Подробное исследование полифункционального действия Cry-белков *B. thuringiensis* проведено в МГУ, когда впервые была обнаружена способность белков эндотоксинов к антимикробному действию

[Егоров и др.,1990; Юдина, 2006]. Выявлена зависимость проявления этого свойства от подвида *B. thuringiensis* и концентрации суспензии. Т.Г. Юдина [2006] предположила, что общность энтомоцидного и антимикробного действия состоит в образовании ионных каналов в мембранах эпителиальных клеток насекомых и цитоплазматических мембранах микробных клеток. В дальнейшем, в работах Л.К. Каменек с соавторами продемонстрировано влияние дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* на фитопатогенные бактерии и грибы [Каменек и др., 2000, 2005]. Наряду с проявлением инсектицидной активности два штамма *B. thuringiensis* продемонстрировали значительную антифунгальную активность против хлопковой совки *S.littoralis in vitro* [Mohammad et al., 2013].

В Институте микробиологии НАН Беларуси изучена биологическая активность двух энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis*. Обнаружено, что эти два штамма были эффективны и в отношении насекомых, и в отношении возбудителей болезней растений. По мнению авторов, эти штаммы перспективны как основа полифункциональных препаратов [Романовская и др., 2007].

Другими авторами показано, что 14 штаммов *B. thuringiensis* проявляли *in vitro* антифунгальную активность, из них 4 в условиях теплиц подавляли мучнистую росу растений огурца и ячменя [Choi et al., 2007]. Недавно впервые показано, что инсектицидный штамм *B. thuringiensis* C25 эффективно контролирует возбудителя болезни шелковицы *Ciboria shiraiana* [Sultana, Kim, 2016].

Следует отметить, что существует еще один антибиотик - цвиттермицин А, ответственный и за инсектицидные, и за антифунгальные свойства *B. thuringiensis* [Emmert et al., 2004; Saraf et al., 2014]. Интересно, что ген цвиттермицина обнаружен как у *B. thuringiensis* BS8, так и у *B. amyloliquefaciens* BS6 [Athukorala et al., 2009]. Известно также, что некоторые штаммы *B. thuringiensis* продуцируют бактериоцины, например, турицин-17 с

антибактериальной и ростостимулирующей активностью [Subramanian, Smith, 2015].

Хитиназы бацилл. Несмотря на то, что подавляющее количество работ посвящено определяющей роли липопептидов в антагонистическом действии рассмотренных выше бактерий, имеется ряд указаний на то, что важное значение имеют также продуцируемые бактериями ферменты, в частности, хитиназа [El-Mougy et al., 2011; Karunya et a.l, 2011; Solanki et al., 2012; Saber et al., 2015]. Так, в лабораторных условиях показано, что *B. subtilis* ингибирует рост фитопатогенных грибов *F.solani* и *R.solani*, и степень их ингибирования соотносится с активностью хитинолитических ферментов [El-Mougy et al., 2011]. В другой работе после скрининга *in vitro* бацилл *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* проведена оценка их антагонистической активности в отношении ризоктониоза растений томата в теплицах. Авторы пришли к заключению, что эта активность связана с уровнем хитиназы и других ферментов [Solanki et al. 2012].

В то же время российские исследователи [Актуганов и др. 2003, 2008; Широков, 2004; Лукьянцев, 2010] показали, что далеко не всегда есть корреляция антагонистической активности бацилл с активностью хитиназ. Например, при изучении 18 штаммов *B.subtilis*, продуцирующих хитиназу, не отмечено эффекта на фитопатогенный гриб *Bipolaris sorokiniana* [Актуганов и др., 2008]. По данным А.В. Широкова [2004], миколитический комплекс бактерий *Bacillus* Cohn включает Р-1,3-глюканазы, хитиназы, хитозаназы и протеазы. При этом ключевую роль в лизисе клеточных стенок мицелия ферментами бацилл играет Р-1,3-глюканаза. Как отмечает автор, роль хитиназы и протеазы в процессе миколизиса носит вспомогательный характер. Поэтому синтез миколитических ферментов, как единственный признак, не может служить строгим критерием антагонистических свойств *Bacillus* Cohn, поскольку доля низкомолекулярных веществ неферментной природы в проявлении антигрибной активности составляет 70-90 %. По мнению М.А. Лукьянцева [2010], изучавшего эндофитные штаммы *B. subtilis*

49РН, 26Д и 11В, их антагонистическая активность к фитопатогенным грибам обусловлена не продукцией бактериями высокоактивных внеклеточных хитиназ и глюканаз, а связана с синтезом антибиотиков.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хитинолитическая активность бацилл-антагонистов не может служить достоверным критерием их эффективности в подавлении роста грибов, поскольку хитиназы многих штаммов аэробных спорообразующих бактерий проявляют низкую антигрибную активность *in vitro*. В этой связи интересна работа, где показано, что у штамма *B. licheniformis* N1 выявлен ген хитиназы, но он оказался молчащим, не проявляющим антигрибной активности [Lee et al., 2009]. Тем не менее, для отдельных штаммов очевидна непрямая роль хитиназ как эффекторов, усиливающих общую антигрибную активность других метаболитов.

Для дальнейшего изучения этого вопроса и оценки перспектив применения хитинолитических ферментов различных штаммов бацилл в биологическом контроле патогенных грибов необходимо более детальное и скорректированное исследование биологической активности хитиназ большого числа видов, а также выявление специфических особенностей их антагонистического действия на различные виды микромицетов. Следует отметить, что есть данные по антифунгальному действию и других ферментов, например, β-глюконазы [Kim, Chung, 2004].

Полифункциональное действие агентов биоконтроля связано также с продукцией фитогормонов (ауксинов, цитокининов), что в свою очередь обусловливает индукцию защитной реакции растений, усиление их роста и развития [Кудоярова и др., 2011]. Т.Н. Архиповой с соавторами показано, что основным цитокинином, продуцируемым *B.subtilis,* был зеатин-рибозид [Arkhipova et al., 2005]. Инокуляция растений салата бациллами увеличивало содержание цитокинина как в корнях, так и в проростках в 10 раз больше, чем в контроле. Это накопление фитогормона связано с увеличением роста и веса корней на 30%.

Продемонстрирована продукция цитокининов штаммами *B.subtilis* и *B.licheniformis* [Hussain, Hasnain, 2009]. Лучшим по количеству продуцируемого зеатина и зеатин-рибозида был *B. licheniformis,* выделенный из ризосферы амаранта. Другие исследователи наблюдали положительную корреляцию между продукцией ауксина бактерией *Bacillus* sp. и стимуляцией роста растений мягкой пшеницы *Tritivum aestivum* под влиянием индолилуксусной кислоты (ИУК) [Ali et al., 2009]. Оказалось, что это же соединение отвечает за ростостимулирующий эффект *B. amyloliquefaciens,* штамм FZB42 [Idris et al., 2007] и *B. amyloliquefaciens,* штамм SQR9 [Shao et al., 2015; Liu et al., 2016].

При обработке семян огурца бактериями *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* для подавления фитопатогенных грибов рода *Phytophthora*, наблюдали также более высокий уровень прорастания семян и увеличение высоты растений [Islam et al., 2016]. Выделен региональный штамм *B. amyloliquefaciens* в Татарстане со свойствами антагонистической активности, а также способностью стимуляции роста и развития [Сираева, 2012].

Ряд работ посвящен ростостимулирующей активности наряду с антибактериальной, проявляемой *B. thuringiensis,* главным образом при обработке растений дельта-эндотоксином [Каменек и др., 2005; 2010; Климентова и др., 2010; Коробов и др., 2014]. Так, показана активность дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-52 в отношении некоторых фитопатогенных бактерий. Возможным механизмом антибактериального действия этого агента авторы считают разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания у объекта действия [Kamenek et al., 2012]. Эти токсины подавляли симптомы бактериозов огурца, овса и фасоли с высокой биологической эффективностью на искусственном инфекционном фоне, созданном на растениях фасоли.

В полевых условиях продемонстрировано положительное влияние дельта-эндотоксина на всхожесть семян, рост и развитие белокочанной капусты и ее продуктивность, при этом из трех концентраций энтомоцидного

токсина выбрана оптимальная – 0, 75 мг/мл [Климентова и др., 2010]. Ростостимулирующий эффект дельта-эндотоксина обнаружен также при обработке раствором кристаллов семян и растений перца стручкового, наблюдали увеличение всех морфометрических показателей [Коробов и др., 2014].

Считают, что за стимуляцию роста растений сои ответственны и ауксины, и сурфактины, и другие внеклеточные белки [Buensanteai et al., 2008]. Все эти фракции увеличивали прорастание семян, длину корней и биомассу растений, а также защищали растения сои от стресса. Вероятно, несколько факторов может отвечать за усиление роста и развития растений при действии бацилл. Стимуляция роста растений при обработке бациллами делает растения более устойчивыми к болезням, и, наоборот, подавление болезней улучшает здоровье растений [Mnif, Ghirbi, 2015; Wu et al., 2015].

Известно, что метаболиты ризобактерий могут индуцировать в растениях системную устойчивость к патогенам и неблагоприятным абиотическим факторам [Тютерев, 2015]. В этом отношении интересны данные о том, что липопептидные антибиотики могут восприниматься клетками растений как сигнал инициации защитных механизмов, то есть быть элиситорами [Raaijmakers et al., 2010]. Показано, что очищенные сурфактины и фенгицины индуцировали защитную реакцию растений бобов и томата [Ongena et al., 2007]. Эти же липопептиды как элиситоры иммунного ответа растения-хозяина обеспечивали значительную индукцию защитной реакции растений фасоли против возбудителя серой гнили *B. cinerea* [Chowdhury et al., 2015]. Наблюдали строгую корреляцию между индуцированной защитной реакцией и концентрацией сурфактинов нескольких изолятов *B. subtilis/B. amyloliquefaciens* [Cawoy et al., 2014].

Изучение взаимодействия липопептидов с растительными клетками на молекулярном уровне показало, что добавление сурфактина к суспензии растительных клеток вызывало стимуляцию защитных энзимов [Jourdan et al., 2009]. Возможно, способность липопептидов проникать через клеточные

мембраны и служить элиситорами, во многом определяет одновременное действие бактерий-антагонистов на фитопатогенов и фитофагов-насекомых.

Продукция бактериальных метаболитов как основа инсектофунгицидных свойств бацилл. Во всем мире расширяются исследования по проявлению не только антимикробного, но и инсектицидного действия некоторых антагонистических штаммов *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis.* Обнаружены инсектицидные свойства штамма *B. subtilis* SPBI, продуцирующего липопептид, в отношении совки *Spodoptera littoralis* [Ghribi et al., 2012a]. Гистопатология средней кишки показала разрушение эпителиальных клеток. Авторами экспериментально доказано связывание липопептида с белком 45 кД – его предполагаемым рецептором, отличающимся от того, который связывает Cry1C или Vip3A *B. thuringiensis.* Этот же липопептид из *B. subtilis* SPB1 проявил инсектицидную активность, к тому же устойчивую к абиотическим факторам, против мельничной огневки *Ephestia kuehniella* [Ghribi et al., 2012b] и вредителя запасов в Тунисе *Ectomyelois ceretoniae* [Mnif et al., 2013]. Вероятно, влиянием липопептидов можно объяснить данные по почти одинаковой инсектицидной активности антагонистов *B.subtilis* и *B. amyloliquefaciens* и энтомопатогенного гриба в биоконтроле двух видов совок [Gopalakrishnan et al., 2011]. Интересно также, что *B. subtilis* ssp. *subtilis* продуцировал москитоцидный липопептид, идентифицированный как сурфактин, причем увеличения его продукции штаммом добивались изменением состава питательной среды. Сурфактин, продуцируемый этим штаммом, проявил токсичность для личинок и куколок комаров [Manonmani et al. 2011]. Действие липопептидов *B. subtilis* на личинок комаров показано и другими авторами [Revathi et al., 2013]. Получены данные о снижении поврежденности стеблей ярового ячменя злаковыми мухами как следствие обработки биопрепаратами на основе *B. subtilis*, что связывают с их влиянием на растения как элиситоров [Бобрешова и др., 2013].

Представляют интерес сравнительные испытания двух штаммов: антагониста *B. subtilis* и энтомопатогена *B. thuringiensis* на клеверных полях против хлопковой совки, в которых выявлена более высокая инсектицидная активность антагонистической бациллы *B. subtilis* [Abd El-Salam et al., 2011].

Результаты, значимые для проявления инсекто-фунгицидного эффекта бацилл, продемонстрированы в работах по действию хитиназ, выделенных из антагонистических бактерий, на некоторых фитофагов. Так, внеклеточная хитиназа, продуцируемая *B. subtilis*, оказывала инсектицидный эффект на гусениц 1-3 возрастов совки *Spodoptera litura* [Chandrasekaran et al., 2012]. Обработка листьев с гусеницами совки выделенной из *B. subtilis* хитиназой приводила к уменьшению потребления насекомыми пищи, уменьшению их веса и дальнейшей гибели. Изучено влияние очищенной хитиназы *B. subtilis* на некоторые кишечные ферменты гусениц табачной совки *S. littoralis* [Chandrasekaran et al., 2014]. Во всех использованных в этом исследовании концентрациях хитиназа уменьшала активность кишечных ферментов, значительно повреждая перитрофическую мембрану эпителия кишечника гусениц, что свойственно инсектицидным токсинам *B. thuringiensis*. Отметим, что с продукцией хитиназы штаммом связывали антифунгальную активность энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ITV20 в отношении биоконтроля нескольких фитопатогенных грибов *in vitro* и при защите семян сои от фитопатогенного гриба *Sclerotium rolfsii* [Reyes-Ramirez et al., 2004]. В то же время из приведенных выше данных по антагонистическому действию энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* разных штаммов можно заключить о доминирующей роли продуцируемых ею липопептидов.

Очевидно, в целях управления здоровьем растений полезно проявление синергизма в совместном действии как метаболитов одного штамма бацилл, так и разных. Некоторые работы указывают на возможность таких проявлений. Например, продемонстрировано, что для штамма *B. thuringiensis* subsp. *sotto* хитиназа может быть синергистом Cry-токсина [Zhong et al.,

2005]. Значимое исследование проведено в отношении слияния протопластов, выделенных из *B. thuringiensis* и *B. subtilis* соответственно [Revathi et al., 2014]. Полученные гетерокарионы обнаружили синергетический эффект в проявлении инсектицидной активности против совки *Spodoptera litura*, авторы наблюдали уменьшение $ЛК_{50}$ по сравнению с этой величиной для индивидуальных бацилл, значительно уменьшалось потребление корма гусеницами хлопковой совки всех возрастов. В этом отношении полезным подходом является создание инсектофунгицидного биопрепарата Ксантрел на основе двух штаммов разных видов бактерий – *B. subtilis* БИМ В-712Д, обладающего антимикробными свойствами и *B. thuringiensis* БИМ В-711 Д с энтомоцидными свойствами. Для совместного глубинного культивирования этих бактерий авторами оптимизирована питательная среда, где источником углерода стала ржаная обдирная мука, а источником азота – сульфат аммония [Рубель и др., 2012]. Выявлено также, что использование в питательной среде кормовых дрожжей обеспечивает лучшее формирование кристаллов эндотоксина, с одной стороны, и, с другой стороны, повышает уровень антимикробной активности.

С позиций представленных в этом разделе данных будут обсуждены последующие результаты.

3.2. Многоцелевое влияние бацилл-антагонистов фитопатогенов

Изложенные в предыдущем разделе принципы полифункционального влияния бацилл-антагонистов рассмотрим на примере результатов наших исследований, отражающих, главным образом, такие аспекты как стимулирование роста и развития растений, индукция системной устойчивости, повышение устойчивости к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды, усиление способности поглощения нутриентов из почвы наряду с основной ролью антагонистических бактерий в качестве агентов биологического контроля болезней растений. В итоге

суммарное действие бацилл на растения выражалось в увеличении продуктивности культур.

Исследования полифункционального действия бактериальных штаммов проводили на ягодных культурах в модельных, полевых и производственных опытах в сельскохозяйственной артели «Сады Сибири» в 2010-2015 гг. Хозяйство расположено в подзоне дренированной лесостепи Приобья, почва опытных участков – серая лесная. Климатические условия Западной Сибири предполагают, что возделываемые здесь культуры подвергаются повышенному уровню стресса, включая перепады температур и засухи, что вызывает необходимость поиска биологических агентов, способных к антистрессовому действию. Объектами являлись штаммы видов рода *Bacillus* из коллекции культур НПФ «Исследовательский центр» (Кольцово): *B. subtilis* ВКПМ В 10641; *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В 10642; *B. licheniformis* ВКПМ В 10562; а также, в отдельных случаях изучали действие смеси из 3-х штаммов: *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В 10642, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В 10643, *B. subtilis* ВКПМ В 10641 в виде экспериментального препарата фитоп 8.67. Испытывали влияние штаммов при нанесении на корневую систему растений перед посадкой, или внесение в почву после посадки с поливной водой, а также обработку надземной части путем опрыскивания бактериальной суспензией.

Изучение влияния бактериальных штаммов на рост, развитие и фитосанитарное состояние земляники в модельных опытах в 2013-2014 гг.

В модельных экспериментах проведено комплексное изучение действия предпосадочной обработки корневой системы штаммами бактерий рода *Bacillus* на ростовые процессы земляники сорта Юния Смайдс и поражение рамуляриозом (возбудитель *Ramularia tulasnei* Sacc.) в условиях искусственного стрессового фона. В каждом варианте опыта высаживали по 10 растений в обычную почву (полевая серия) на участке производственного маточника, одновременно аналогичную группу опытных растений

(вегетационная серия) высаживали в вегетационные сосуды – пластиковые горшки (контейнеры объемом 500 мл), которые размещались рядом с растениями полевой серии. Схема опыта полностью повторялась в обеих сериях [Belyaev et al., 2016]

В 2013 г. посадка растений проведена одновременно в вегетационной и полевой сериях опыта – 11 июня 2013 г. При посадке рассада имела по 2-3 листа. В дальнейшем на посаженных в опыте растениях формировались новые (молодые) листья. Старые листья высаженной рассады изначально были слабо поражены рамуляриозом в виде единичных пятен со средним фоном распространенности 5-10% растений и представляли основной источник инфекции для последующей передачи возбудителя.

Растения, высаженные в пластиковые горшки (вегетационная серия) испытывали более значительные перепады влажности и температуры почвы, чем растения с корневой системой в почве на грядах маточника (полевая серия). Таким образом, в горшках был создан стрессовый фон для растений. Мы предполагали, что на стрессовом фоне может повыситься восприимчивость земляники к рамуляриозу, что позволит в модельных условиях оценить влияние биоагентов на развитие растений и их поражение болезнью. Влияние штаммов сравнивали с влиянием препарата на основе гуминовых веществ феникс (ООО "НПП ТЕЛЛУРА-БИС", г. Бийск). Известно, что гуминовые удобрения увеличивают поглощение нутриентов, положительно влияя на состав почвенной микрофлоры [Calvo et al., 2014], рост растений и увеличение биомассы продукта, в том числе земляники [Arancon et al., 2004; 2006]. Нутриенты могут уменьшать развитие болезней растений [Dordas, 2008; Nicot et al., 2013]. В свою очередь бактерии рода *Bacillus* способны усилить поглощение растениями питательных веществ из почвы [Van Loon, 2007].

На старых листьях растений, в обеих сериях опыта не было отмечено достоверное снижение степени поражения болезнью под влиянием

бактериальных штаммов при первом учете 22 июня (через 12 суток после посадки) (рис. 3.1, рис. 3.2).

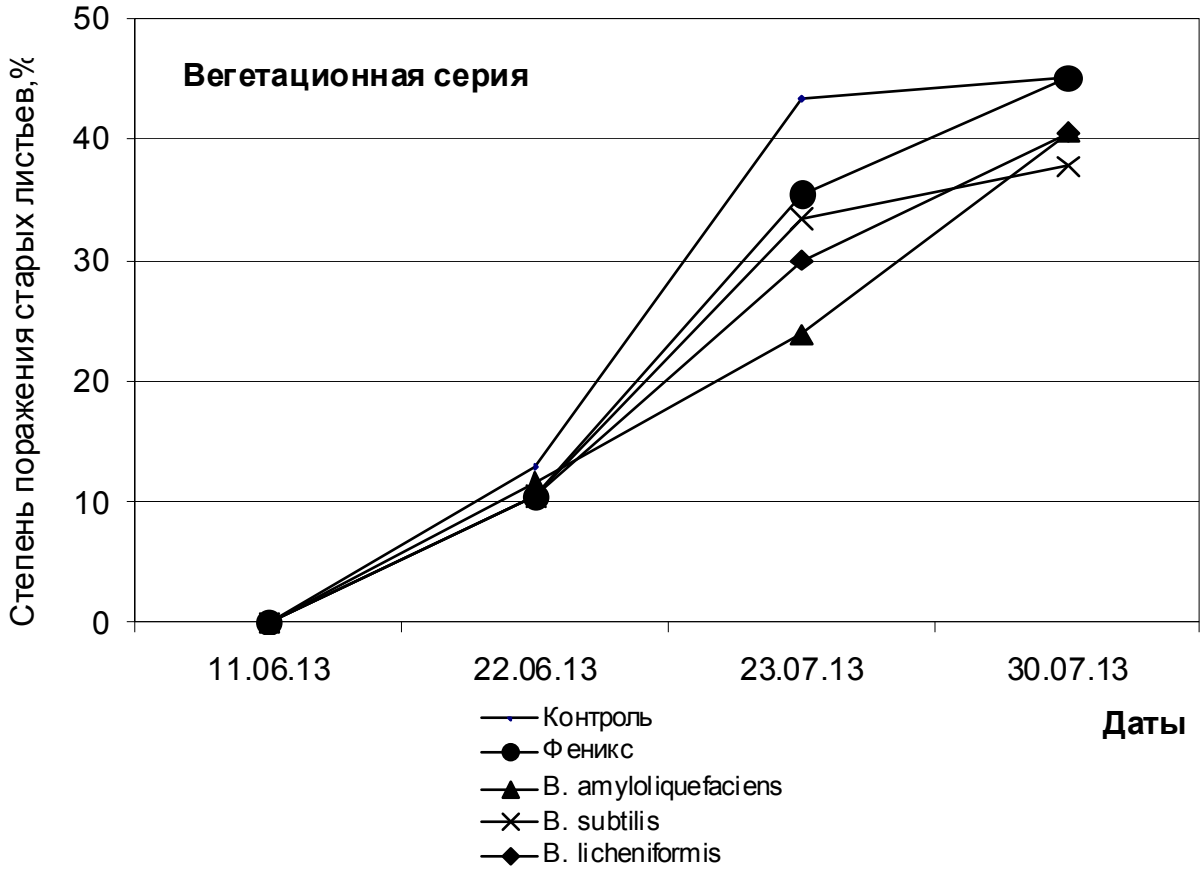

Рис. 3.1. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом старых листьев растений земляники при выращивании в пластиковых горшках в 2013 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 1,9%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

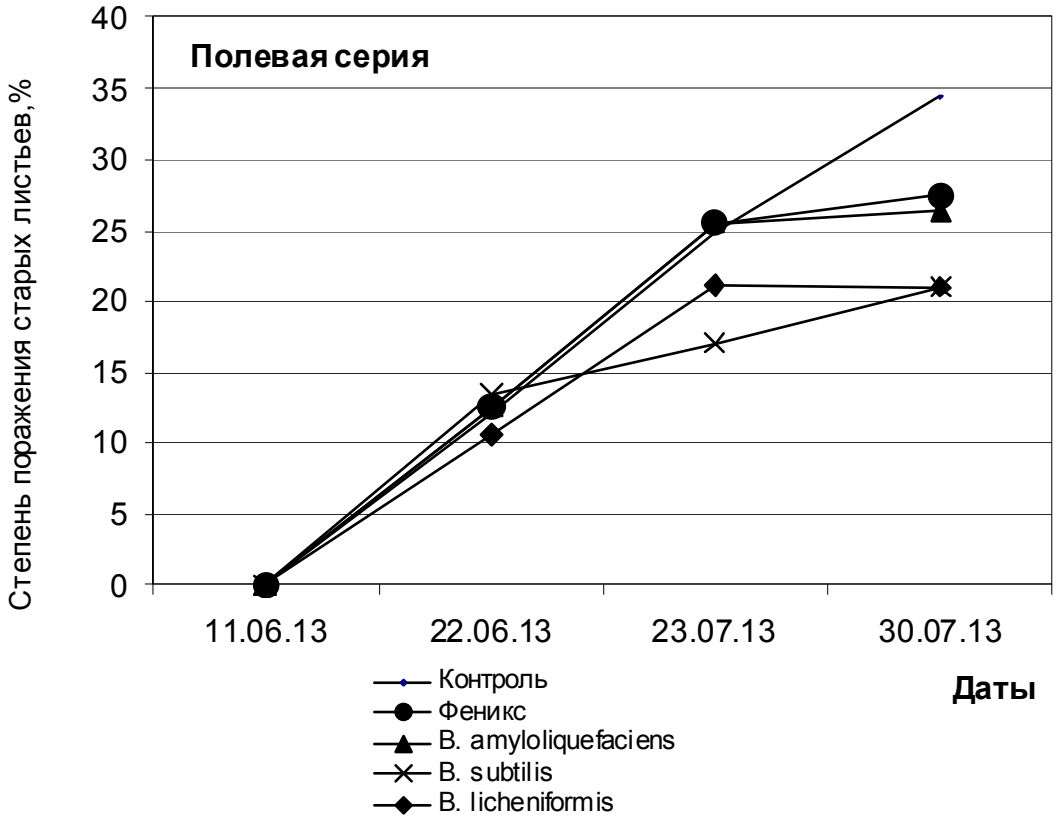

Рис. 3.2. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом старых листьев земляники при выращивании в почвенной гряде в 2013 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 1,9%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

К 23 июля на растениях полевой серии степень поражения белой пятнистостью достоверно снижалась на 3,9-8,0% (в 1,2-1,5 раза) в вариантах с использованием штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis*, при этом в контроле степень поражения достигла 25,0%.

На растениях вегетационной серии поражение достоверно снижалось во всех вариантах с применением *B. amyloliquefaciens, B. licheniformis*, *B. subtilis* и Феникс, соответственно на 19,4; 13,3; 9,8 и 7,8% (в 1,2-1,8 раза), в контроле степень поражения болезнью достигла 43,3% (в 1,7 раза выше, чем у растений, не подвергнутых стрессу).

К концу июля пораженные рамуляриозом старые листья начинали отмирать, особенно у стрессированных растений. В связи с этим к 30 июля в вегетационной серии эффекты снижения пораженности под влиянием

бактериальных штаммов существенно ослабли до 1,1-1,2-кратного уровня. В полевой серии эффект снижения степени поражения сохранился на растениях, обработанных *B. subtilis*, *B. licheniformis*, а под влиянием Феникс и *B. amyloliquefaciens* проявился на слабом уровне (снижение – в 1,3 раза). Таким образом, развитие рамуляриоза на старых листьях было сильнее на фоне стрессовых условий. На максимальном уровне болезни в условиях стресса эффективными в подавлении ее развития были все бактериальные штаммы и гуминовый препарат с максимальным эффектом у *B. amyloliquefaciens* и минимальным у Феникса. В полевой серии сильнее снижали пораженность болезнью обработки штаммами *B. subtilis* и *B. licheniformis*.

Поражение рамуляриозом вновь отрастающих листьев началось в июле. К 23 июля на молодых листьях растений вегетационной серии степень поражения болезнью достоверно снижалась под влиянием штамма *B. subtilis* и препарата Феникс, соответственно, на 7,8 и 3,2% (рис.3.3). На растениях полевой серии существенных эффектов не было отмечено (рис. 3.4).

К 30 июля в полевой серии степень поражения молодых листьев достоверно снижалась под влиянием всех бактериальных штаммов и препарата Феникс на 6,2-10,5% (в 1,6-2,6 раза). На растениях вегетационной серии степень поражения достоверно снижалась только при обработке бактериальными штаммами – в 1,1-1,6 раза.

К концу вегетации значительно возрастал уровень поражения молодых листьев (в связи с их физиологическим старением) во всех вариантах. На этом фоне, к 3-й декаде августа на растениях полевой серии достоверный эффект снижения степени поражения болезнью сохранился лишь в варианте со штаммом *B. licheniformis* – на 7,1%. На растениях вегетационной серии поражение достоверно снижалось в вариантах *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно, на 13,1 и 8,2%.

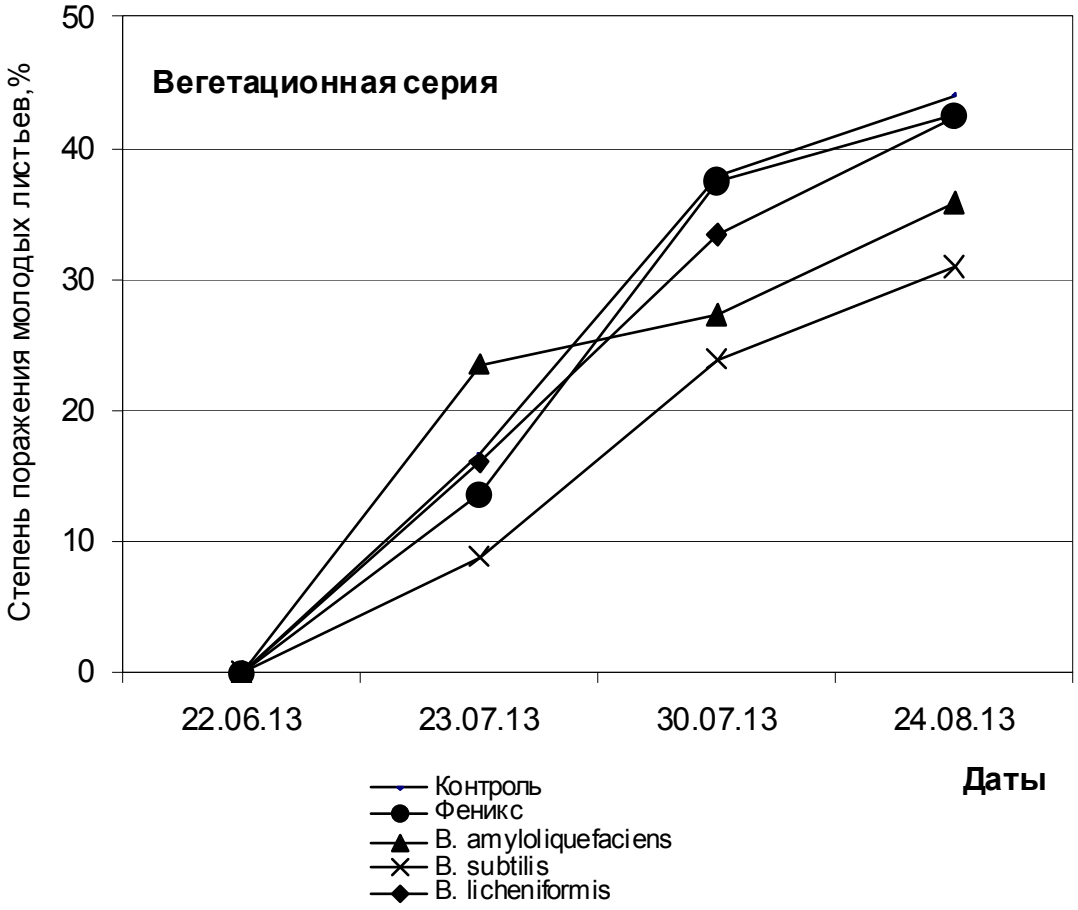

Рис. 3.3 – Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом молодых листьев растений земляники при выращивании в пластиковых горшках в 2013 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 1,9%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

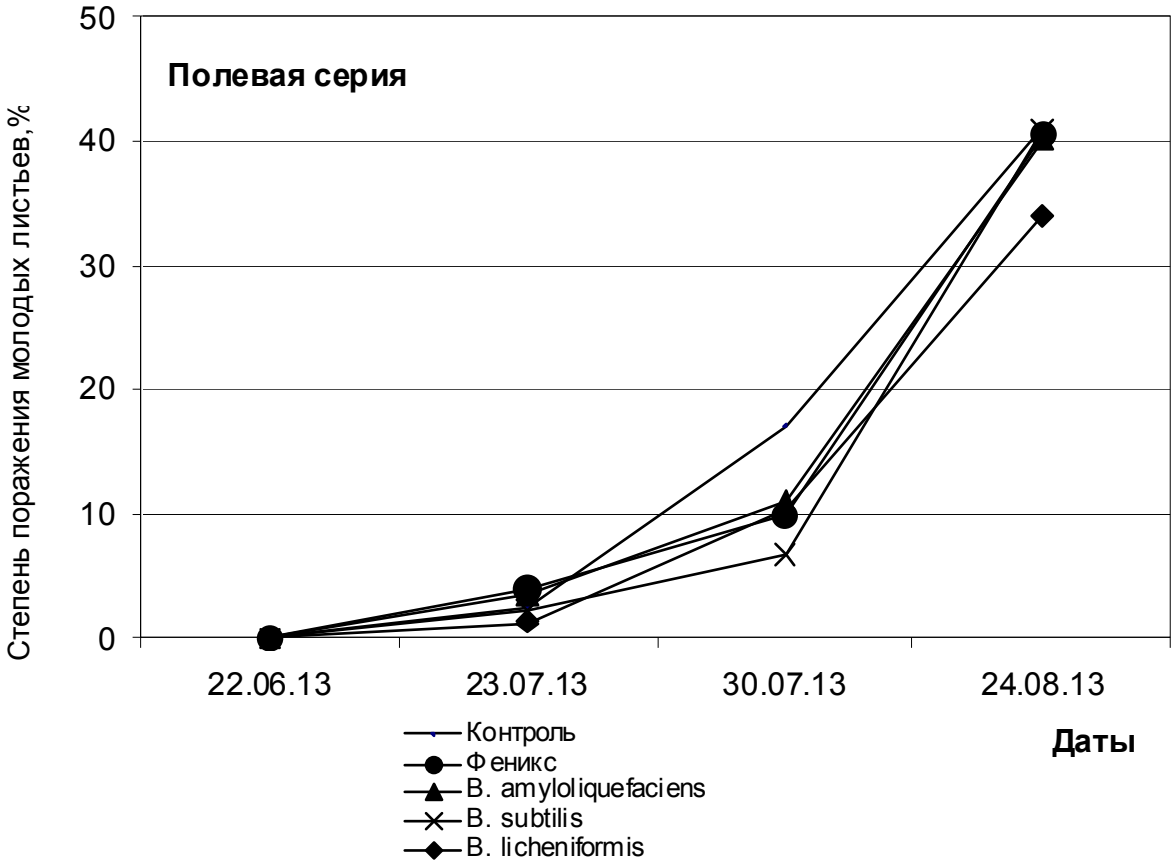

Рис. 3.4. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом молодых листьев земляники при выращивании в почвенной гряде в 2013 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 1,9%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

Полученные результаты показали, что поражение молодых листьев (также как и старых до начала их отмирания) статистически достоверно снижалось в большей степени (в абсолютных значениях) при действии бактериальных штаммов на стрессовом фоне – на растениях вегетационной серии. При этом максимальный эффект снижения пораженности достигался при предпосадочной обработке корней рассады штаммами *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Также можно констатировать, в целом, наибольшую эффективность данных штаммов в снижении пораженности рамуляриозом листьев земляники разного возраста.

Параметры роста и размножения растений также зависели от абиотических условий 2013 г. и использованных агентов биоконтроля (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Влияние бактериальных штаммов на рост и вегетативное размножение земляники (итоговый учет – 05.09.2013 г.)

Расположение корневой системы	Вариант предпосадочной обработки	Длина надземной части, см	Длина корней, см	Количество усов, шт.	Количество розеток, шт.
В почвенной гряде (полевая серия)	Контроль	27,1	22,0	2,5	0,9
	Феникс	25,9	21,1	2,9*	1,4
	B. amyloliquefaciens	26,3	21,3	3,2*	1,6*
	B. subtilis	29,4*	20,9	3,3*	2,4*
	B. licheniformis	23,0	27,1*	2,4	2,1*
В горшках (вегетационная серия)	Контроль	18,1	15,4	0,0	0,0
	Феникс	18,9	17,8*	0,1	0,2
	B. amyloliquefaciens	18,6	15,0	0,1	0,0
	B. subtilis	18,2	16,2	0,1	0,1
	B. licheniformis	21,0*	17,3	0,0	0,0
$НСР_{05}$ по вариантам		1,7	2,3	0,4	0,7
$НСР_{05}$ по расположению корневой системы		1,0	1,3	0,3	0,4

* - различия с контролем по препаратам статистически достоверны ($P<0,05$)

Длина надземной части растений полевой серии достоверно возрастала при предпосадочной обработке корневой системы штаммом *B. subtilis* – на 2,3 см, у растений вегетационной серии – при обработке *B. licheniformis* – на 2,9 см.

Длина корневой системы растений полевой серии достоверно возрастала под влиянием штамма *B. licheniformis* – на 5,1 см, у растений

вегетационной серии – при обработке препаратом Феникс – на 2,4 см, под влиянием остальных штаммов (кроме *B. amyloliquefaciens*) наблюдалась слабая тенденция удлинения корней на 0,8-1,9 см.

Влияние бактериальных штаммов на количество усов у растений полевой серии было достоверным при использовании штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* – увеличение количества на 0,7-0,8 усов/куст, число дочерних розеток достоверно увеличивали штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis* – на 1,5-1,2 розеток/куст. На растениях вегетационной серии усы и розетки практически не формировались из-за стрессовых условий.

Показатель биомассы растений земляники однозначно указывает на существенный негативный вклад стрессовых условий выращивания на здоровье растения (резкое уменьшение биомассы, в среднем, в 5 раз под влиянием стресса в вегетационной серии). Тем не менее, предпосадочная обработка бактериальными штаммами увеличивала биомассу в обеих сериях опытах (рис. 3.5). Биомасса 1 растения в полевой серии достоверно увеличивалась под влиянием штамма *B. subtilis* на 7,8 г/растение, под влиянием *B. licheniformis* – на 5,2 г/растение (рис. 3.5), эффект от применения этих штаммов был максимальным.

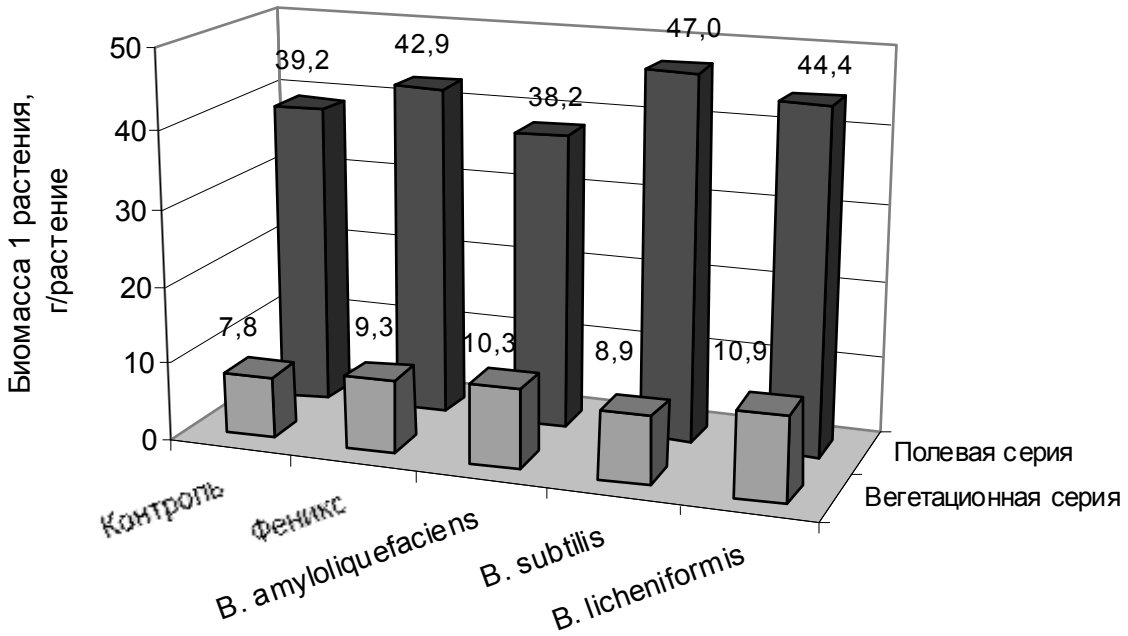

Рис. 3.5. Влияние бактериальных штаммов на общую биомассу растений земляники (г/растение, итоговый учет 05.09.2013 г.)
$НСР_{05}$ по вариантам = 3,4 г/растение;
$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 2,0

Биомасса одного растения в вегетационной серии увеличивалась также при обработке *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* на 2,5-3,1 г/растение.

Прирост общей биомассы одного растения относительно контроля в при предпосадочной обработке бактериальными штаммами в полевой серии составил, в среднем, 9,6% (3,8 г/растение). У растений вегетационной серии (с корневой системой в горшках) прирост биомассы составил в среднем 28,9% (2,3 г/растение). Этот факт также подтверждает наличие ярко выраженного антистрессового действия изучаемых бактериальных штаммов.

Влияние бактериальных штаммов на рост, развитие и поражение растений земляники рамуляриозом в 2014 г.

В 2014 г. посадка опытных растений была проведена 13 июня. У растений, вегетационной серии достоверное снижение степени поражения болезнью относительно контроля обнаружено во всех вариантах к 26.07.14 г. (через 1,5 месяца после посадки растений) (рис. 3.6). При этом степень

поражения болезнью в контроле составила 49,5% – в 2,8 раза выше, чем у контрольных растений полевой серии, не подвергавшихся стрессу. Под влиянием штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* степень поражения

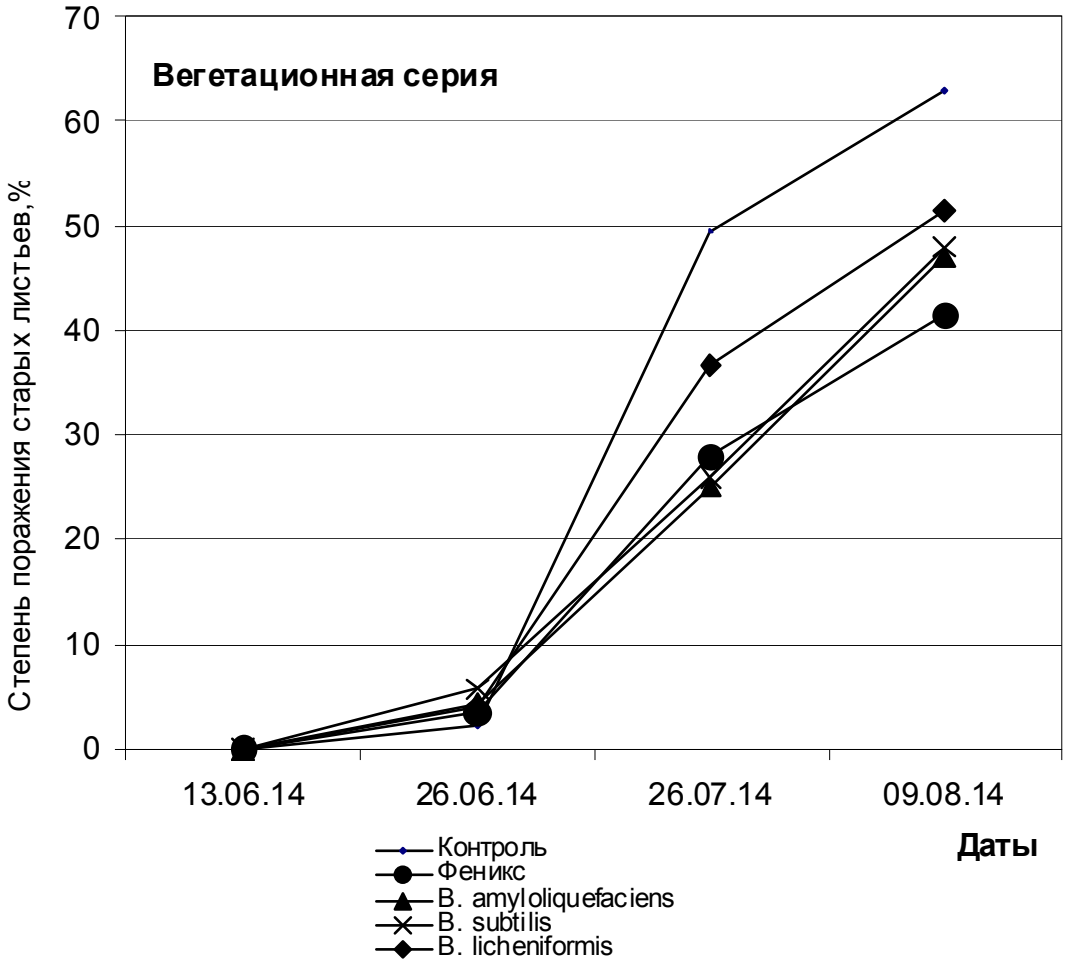

Рис.3.6. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом старых листьев растений земляники при выращивании в пластиковых горшках в 2014 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 2,0%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

болезнью снизилась до уровня 25,0% (в 1,5 раза, $P<0,05$), биологическая эффективность обработки (БЭ) составила 49,6%. Данные штаммы показали наилучший эффект, который также достоверно превзошел действие эталона – гуминового препарата феникс (БЭ = 43,4%). Штамм *B. licheniformis* действовал слабее, снижал поражение, примерно, в 1,3 раза. К моменту окончания наблюдения за старыми листьями (09.08.14 г., в связи с

их прогрессирующим отмиранием) степень поражения в контроле достигла 63,0%, а достоверный эффект снижения пораженности в лучших вариантах с применением *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* уменьшился до БЭ=27,7-28,8%.

У растений полевой серии опыта (рис. 3.7) снижение праженности молодых листьев относительно контроля проявилось через 2 недели после посадки (26.06.14 г.). Через 1,5 месяца после посадки растений (26.07.14 г.) степень поражения болезнью в контроле составила 18,0%, максимальный эффект отмечен под влиянием обработки штаммами *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* – снижение поражения в 1,3-1,4 раза (БЭ=34,4-43,9%). К моменту окончания наблюдения за старыми листьями степень поражения в контроле составила 28,5%, а наибольший эффект в её снижении – в 1,4 раза, (БЭ=42,8%) сохранился при обработке *B. amyloliquefaciens*.

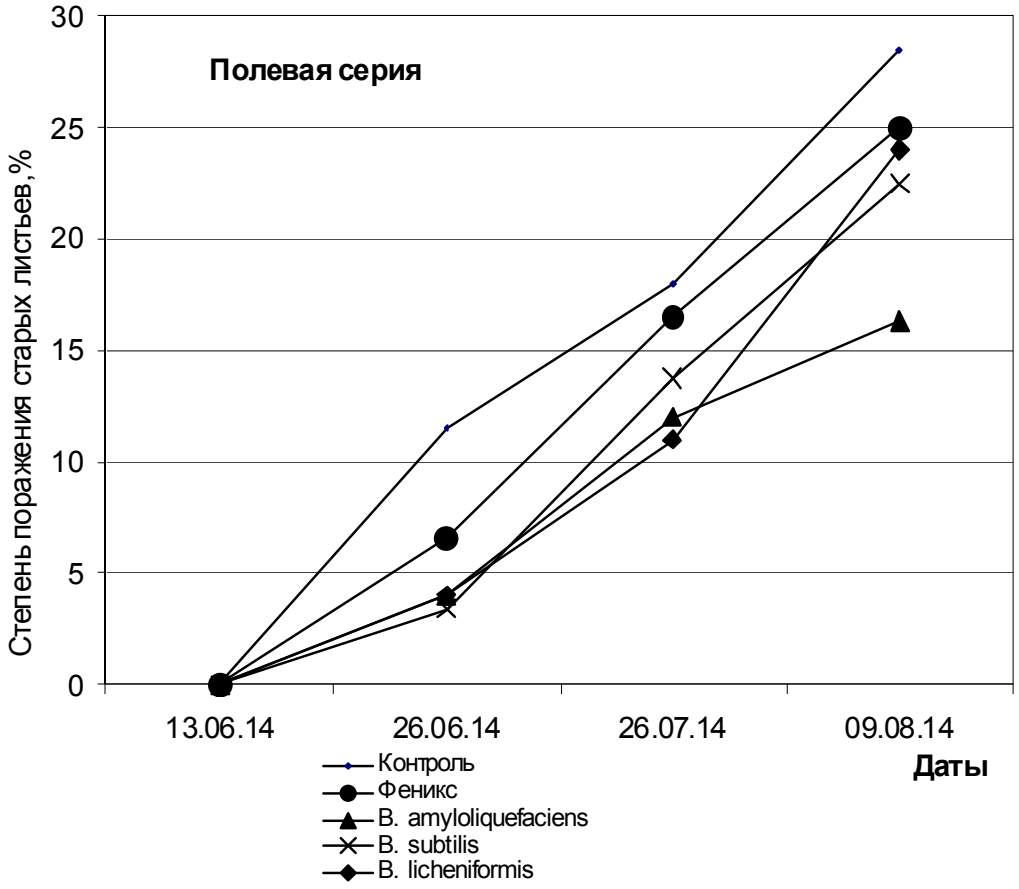

Рис. 3.7. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом старых листьев земляники при выращивании в почвенной гряде в 2014 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 2,0%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

При сравнении данных, полученных в 2014 и в 2013 гг. можно констатировать, что в течение 2 лет подтвердились достоверные эффекты наибольшего снижения пораженности белой пятнистостью старых листьев при выращивании растений земляники в вегетационной серии под влиянием штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. В полевой серии наибольшее снижение пораженности выявлено после обработок штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*.

Формирующиеся молодые листья оставались совершенно не пораженными белой пятнистостью, примерно в течение 1 месяца после посадки растений.

На растениях вегетационной серии первые симптомы рамуляриоза на молодых листьях были обнаружены во 2-й декаде июля. К 3-й декаде июля степень поражения болезнью в контроле достигла 15,6% (рис. 3.8). Достоверно ниже в 1,3-1,5 раза поражение развивалось во всех опытных вариантах с применением штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* и гуминового препарата Феникс. Однако, к концу 1-й декады августа (через 8 недель после посадки растений) уровень пораженности стрессированных растений резко возрос до 42,0% в контроле. Под влиянием предпосадочной обработки штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* степень поражения болезнью в этот момент была ниже в 1,6-1,7 раза (БЭ, соответственно 58,6 и 66,4%). До конца эксперимента (22.08.14г.) сложившаяся ситуация практически сохранилась (БЭ=52,4% и 61,2%). Следует отметить, что эффективность применения *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* в снижении поражения белой пятнистостью, примерно в 2 раза превышала эталонный вариант с гуминовым препаратом Феникс, что может косвенно указывать на увеличение способности растения к поглощению нутриентов из почвы под влиянием антагонистических бацилл.

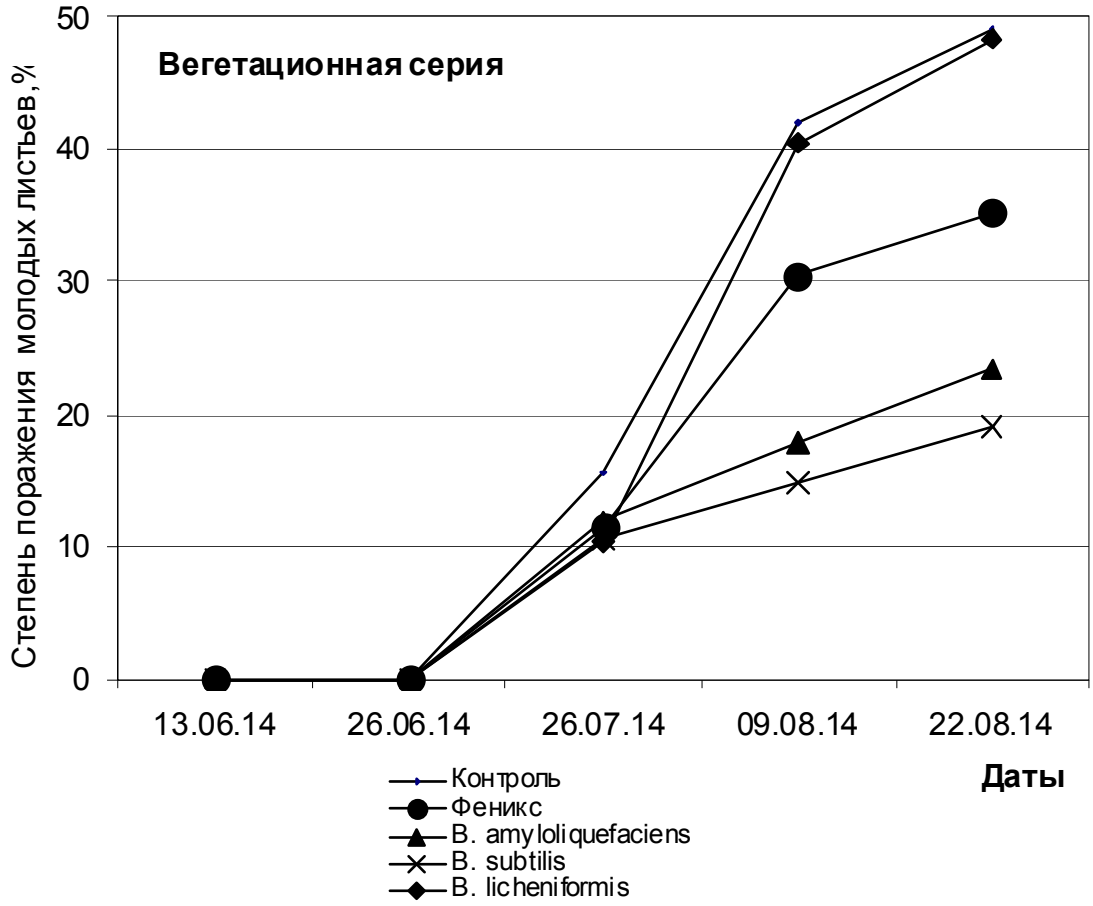

Рис. 3.8. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом молодых листьев растений земляники при выращивании в пластиковых горшках в 2014 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 2,0%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

В полевой серии первые симптомы рамуляриоза на молодых листьях контрольных растений были отмечены в 3-й декаде июля. Уже в 3-й декаде августа на растениях, обработанных штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis,* степень поражения была в 1,6-1,7 раза слабее, чем в контроле. Эффекты действия данных штаммов в основном сохранились до конца вегетации – БЭ, соответственно, 69,4% и 60,0%.

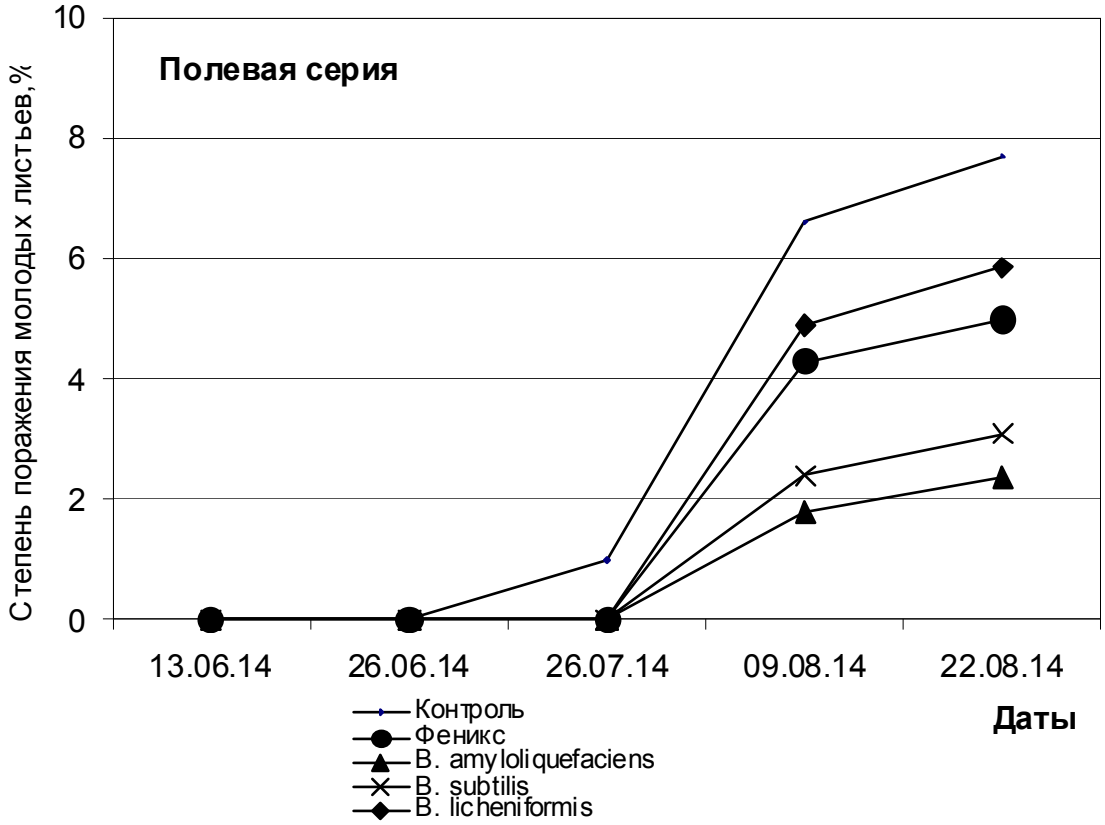

Рис. 3.9. Влияние бактериальных штаммов на поражение рамуляриозом молодых листьев растений земляники при выращивании в почвенной гряде в 2014 г.

$НСР_{05}$ по вариантам и датам = 2,0%;

$НСР_{05}$ по расположению корневой системы = 1,1

Обобщение данных, полученных в 2014 и в 2013 гг. показывает, что в течение 2 лет подтвердились достоверные эффекты наибольшего снижения пораженности белой пятнистостью молодых листьев при выращивании растений земляники в горшках (вегетационная серия) под влиянием штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. При этом эффект ослабления поражения стабильно сохранялся в течение вегетации. В условиях полевой серии снижение пораженности рамуляриозом молодых листьев доказано у всех 3-х испытанных штаммов. Полученные результаты показывают, что предпосадочная обработка бактериальными штаммами позволяет повысить устойчивость растений земляники к белой пятнистости. По-видимому,

иммунизация происходит на основе смягчения стрессового состояния тканей, что противодействует их преждевременному физиологическому старению.

Учеты ростовых параметров, проведенные в конце вегетации 2014 г. (табл. 3.2), показали, что длина надземной части у растений полевой серии достоверно возрастала на 3,4 см под влиянием предпосадочной обработки *B. amyloliquefaciens*, в вегетационной серии – при использовании *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* на 2,6-3,5 см.

Количество молодых листьев у растений полевой серии не изменялось. Однако у растений вегетационной серии количество молодых листьев увеличивалось при обработке штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* – на 11,5-23,1%, при 2,6 лист/растение в контроле.

Длина корней у растений полевой серии достоверно возрастала во всех опытных вариантах на 2,6-6,5 см (в 1,2-1,5 раза). У стрессированных растений вегетационной серии длина корневой системы возрастала при предпосадочной обработке штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* – на 2,7-3,8 см (в 1,2-1,3 раза) и примерно соответствовала уровню эффекта от обработки гуминовым препаратом Феникс.

Под влиянием обработки штаммами бацилл биомасса одного растения полевой серии достоверно ($P<0,05$) увеличивалась во всех опытных вариантах на 7,5-9,5 г/растение (в 1,4-1,6 раза относительно контроля) (рис. 3.10). У растений вегетационной серии биомасса также увеличивалась на 2,6-3,7 г/растение, однако достоверно эффект доказан лишь при обработке штаммом *B. subtilis* – увеличение относительно контроля в 1,6 раза. Полученные эффекты были на одном уровне или превосходили стимулирующее влияние гуминового препарата Феникс.

Таблица 3.2.

Влияние бактериальных штаммов на рост и вегетативное размножение земляники (итоговый учет – 22.08.2014 г.)

Расположение корневой системы	Вариант предпосадочной обработки	Длина надземной части, см	Количество молодых листьев, листьев/ растение	Длина корней, см	Количество усов, усов/ растение	Длина усов, см	Количество розеток, розеток/ растение
В почвенной гряде (полевая серия)	Контроль	22,3	3,4	14,3	0,8	10,2	0,5
	Феникс, 0,05%	26,7*	3,5	18,8*	1,2*	16,8*	0,8
	B. amyloliquefaciens	25,7*	3,0	16,9*	1,5*	21,9*	0,5
	B. subtilis	23,6	3,3	19,3*	1,2*	17,4*	0,5
	B. licheniformis	22,1	3,5	20,8*	1,3*	14,5	0,8
В горшках (вегетационная серия)	Контроль	15,6	2,6	11,1	0,0	0,0	0,0
	Феникс, 0,05%	16,6	2,9*	14,4*	0,0	0,0	0,0
	B. amyloliquefaciens	18,2*	3,2*	14,9*	0,0	0,0	0,0
	B. subtilis	19,1*	2,9*	13,8*	0,0	0,0	0,0
	B. licheniformis	15,7	2,8	11,0	0,0	0,0	0,0
$НСР_{05}$ по вариантам		1,5	0,3	1,5	0,4	5,9	0,4
$НСР_{05}$ по расположению корневой системы		0,8	0,2	0,9	0,2	3,4	0,2

Влияние штаммов на количество усов, формируемых растениями полевой серии было достоверным во всех вариантах – увеличение количества на 0,4-0,7 усов/куст (в 1,5-1,9 раза) относительно контроля. Максимальный эффект проявлялся под влиянием штамма *B. amyloliquefaciens*. Длину усов достоверно увеличивали препарат Феникс, штаммы *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* на 6,6-11,7 см.

На растениях вегетационной серии усы и розетки практически не формировались из-за стрессовых условий.

Обобщение данных, полученных в модельных опытах 2013 и 2014 гг. показывает, что предпосадочная обработка корневой системы растений земляники бактериальными штаммами в полевой серии (норма) стимулировала биомассу растений, длину корней, длину усов и количество дочерних розеток во всех опытных вариантах.

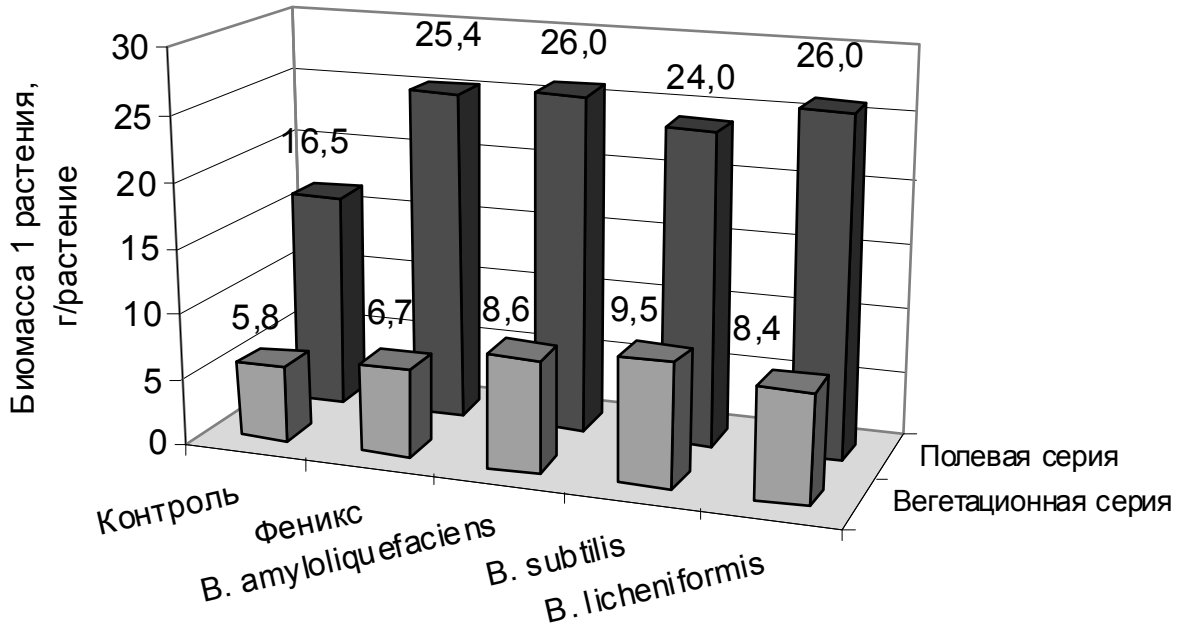

Рис. 3.10. Влияние бактериальных штаммов на общую биомассу растений земляники (г/растение, итоговый учет 22.08.14 г.)

$НСР_{01}$ по вариантам = 3,4 г/растение;

$НСР_{01}$ по расположению корневой системы = 2,0

Максимальный эффект стимулирования роста и вегетативного размножения проявлялся в варианте с обработкой штаммом *B. subtilis.* В вегетационной серии (на стрессовом фоне) обработка бактериальными штаммами увеличивала количество отрастающих молодых листьев, длину надземной части и корневой системы. Максимальные ростостимулирующие эффекты проявились под влиянием штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis.*

Проведенное исследование показало наличие у трех антагонистических бактериальных штаммов в разной степени выраженного ростостимулирующего и антистрессового действия на растения земляники. На этой основе происходило индуцирование устойчивости к рамуляриозу и стимулирование вегетативного размножения растений. В целом, по результатам испытаний в модельных опытах на землянике можно констатировать наличие наиболее выраженного полифункционального действия у штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis.*

Испытание действия бактериальных штаммов в насаждениях плодоносящей земляники

В течение 2010-2012 гг. при закладке производственных насаждений земляники сорта Юния Смайдс проводили предпосадочную обработку корневой системы саженцев, путем погружения в суспензии бактериальных штаммов в концентрации 1×10^5 КОЕ/мл с экспозицией 2 часа. В засушливых погодных условиях (ГТК = 0,6-0,8) приживаемость в среднем за 3 года составила 82,4% (табл. 3.3). После обработки корневой системы бактериальными препаратами проявлялась общая тенденция повышения приживаемости, причем при использовании штамма *B. amyloliquefaciens* приживаемость растений достоверно ($P<0,05$) увеличивалась на 14,3%.

Таблица 3.3.

Влияние обработок корневой системы бактериальными штаммами в год посадки на приживаемость и параметры роста земляники (средние за 3 года: 2010-2012 гг., итоговые учеты в 1-й декаде сентября)

Вариант	Приживаемость, %	Биомасса, г		Длина, см		Количество, шт./куст	
		общая	корневой системы	надземной части	корней	молодых листьев	усов
Контроль	82,4	26,6	6,0	21,5	16,6	2,5	1,9
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	94,2*	37,6*	6,7	26,3*	18,2	2,9	2,5
B. subtilis ВКПМ В-10641	85,2	39,4*	7,5*	24,9*	19,5*	3,2*	2,9*
B. licheniformis ВКПМ В-10562	88,4	40,5*	7,5*	24,6*	18,8*	3,6*	2,7*
Фитоп 8.67	87,2	38,1*	7,1	25,3*	19,1*	3,2*	2,6*
$НСР_{05}$	8,4	7,3	1,4	2,0	1,7	0,4	0,6

* - разность с контролем статистически достоверна

К концу вегетации под влиянием бактериальных штаммов биомасса растений достоверно увеличивалась на 41-52% во всех опытных вариантах. Биомасса корневой системы достоверно увеличивалась в вариантах с

применением *B. subtilis* и *B. licheniformis* – на 25-26%. Длина надземной части возрастала на 3,1-4,8 см под влиянием всех испытанных препаратов (в контроле – 21,5 см). Длина корневой системы достоверно возрастала на 13-17% в вариантах, где корни рассады замачивали в суспензиях *B. subtilis*, *B. licheniformis* и фитоп 8.67. Эти же штаммы стимулировали формирование новых листьев, прирост составил 0,7-1 лист/растение, а также столонов (усов) – прирост составил 0,8-1 столон/растение, при 1,9 столонов/растение в контрольном варианте.

Земляника в стрессовых условиях произрастания сильнее поражается белой пятнистостью, при этом возбудитель болезни мало требователен к влаге [Натальина, 1963]. Под влиянием предпосадочной обработки корневой системы бактериальными штаммами в опытах было доказано снижение пораженности белой пятнистостью в течение вегетации старых листьев в 1,5-1,7 раза и вновь отрастающих – в 1,7-2,9 раза.

Таблица 3.4

Влияние обработок корневой системы земляники бактериальными штаммами на параметры урожайности и поражение ягод серой гнилью (СХА «Сады Сибири», средние за 2 года: 2011-2012 гг., сорт Юния Смайдс, производственные опыты)

Варианты	Количество цветоносов на 1 растении, шт.	Всего ягод на 1 растении, шт.	Масса 1 ягоды, г	Распространенность серой гнили ягод, %	Продуктивность 1 растения, г	Урожайность	
						т/га	% к контролю
Контроль	1,20	8,8	5,4	9,7	47,9	4,66	-
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	1,18	9,9	5,1	7,4*	49,8	5,16	10,7
B. subtilis ВКПМ В-10641	1,38	9,7	6,2*	3,2*	57,6*	5,56*	19,3
B. licheniformis ВКПМ В-10562	1,34	9,7	5,7	3,9*	52,8	5,38*	15,4
Фитоп 8.67	1,12	9,2	6,5*	3,7*	59,8*	5,98*	28,2
$НСР_{05}$	0,22	$F_ф<F_{05}$	0,6	2,0	7,7	0,64	-

На следующий год после посадки оценка урожайности в опытах показала (табл. 3.4), что обработка препаратами практически не влияла на количество цветоносов, формируемых одним растением, и вызывала слабую тенденцию увеличения (на 5-13%) количества ягод на растении. Доказан эффект увеличения массы одной ягоды (на 15-20%) и продуктивности одного куста (на 20-25%) под влиянием обработки штаммами *B. subtilis* ВКПМ и смесью (фитоп 8.67. Урожайность земляники после применения *B. subtilis*, *B. licheniformis* и фитоп 8.67 возрастала, соответственно, на 19% (прибавка урожайности 0,90 т/га), 15% (0,72 т/га) и 28% (1,32 т/га) при урожайности 4,66 т/га в контроле.

Выявлено также снижение распространенности серой гнили ягод земляники (возбудитель *Botrytis cinerea* Pers.) в 2,5-3 раза (биологическая эффективность (БЭ) составляла 60-67%) под влиянием обработки корневой системы штаммами *B. subtilis*, *B. licheniformis* и фитопом 8.67.

Так как посадка земляники в производственном опыте проводилась по фону предшественника – сидерального пара с запашкой овса, объяснение эффекта снижения пораженности ягод серой гнилью вследствие фунгистазиса *B. cinerea* под влиянием антагонизма бактериальных штаммов выглядит недостаточным. По-видимому, снижение уровня поражения серой гнилью ягод, как и белой пятнистостью листьев, связано с антистрессовым действием препаратов на растения, стимулирующим влиянием на рост их корневой системы и стабилизацией физиологического состояния. Обработка корневой системы саженцев, а затем жизнедеятельность в корнеобитаемом слое почвы внесенных штаммов бактерий р. *Bacillus* не могли также препятствовать воздушно-капельному механизму передачи инокулюма фитопатогенов. Однако они способствовали формированию у молодых растений более высокого уровня неспецифической устойчивости, что явилось, на наш взгляд, основной причиной снижения пораженности насаждений болезнями.

Таким образом, испытание действия бактериальных штаммов, применяемых путем обработки корневой системы, показало наличие у них, особенно у *B. subtilis*, *B. licheniformis* и смеси 3 штаммов (фитоп 8.67), в различной степени антистрессовых, ростостимулирующих и иммунизирующих свойств [Беляев и др., 2012а]. В перспективе применение биопрепаратов на основе испытанных штаммов позволит расширить возможности экологически безопасных методов управления адаптацией, ростом, развитием и фитосанитарным состоянием растений с самых ранних этапов формирования товарных плантаций земляники.

Испытание влияния бактериальных штаммов на здоровье растений в маточных насаждениях земляники

Испытание действия предпосадочной обработки корневой системы земляники бактериальными штаммами было дополнительно оценено в полевых опытах в 2011-2014 гг. при посадке производственного маточника [Беляев и др., 2015]. Способ нанесения бактерий на растения был аналогичным тому, который применяли на плодоносящих посадках земляники, однако был расширен набор изучаемых показателей, по которым оценивали влияние биоагентов.

В среднем за 4 года приживаемость растений составила в контроле 79,4% (табл. 3.5). Обработка бактериальными штаммами достоверно повышала приживаемость на 5,5-9,1% в сравнении с контролем (эффект на уровне гуминового препарата феникс, 0,05%). В засушливые годы (2011 и 2014 г.), на фоне снижения приживаемости в контроле до 65,0-67,5%, в вариантах с применением *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и фитоп 8.67 отмечено 2-3-кратное усиление влияния штаммов, приживаемость возрастала на 15,2-18,7% относительно контроля, что указывает на выраженное антистрессовое действие данных штаммов.

Количество листьев, отросших после посадки, возрастало под влиянием *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, а также препарата феникс на 15,0-25,0%, при

Таблица 3.5.

Влияние предпосадочной обработки корневой системы бактериальными штаммами на приживаемость и ростовые параметры земляники в год посадки (средние за 4 года: 2011-2014 гг., итоговые учеты в 1-2 декадах сентября)

Вариант предпосадочной обработки	Приживаемость, %	Количество новых листьев на 1 растении	Длина надземной части, см	Количество усов на 1 растении	Длина усов, см
Контроль	79,4	4,0	20,3	2,7	46,4
Феникс, 0,05%	85,6*	4,6*	21,9*	2,9	50,9
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	84,1*	5,0*	22,0*	3,6*	58,0*
B. subtilis ВКПМ В-10641	83,8*	4,6*	22,9*	3,3*	58,3*
B. licheniformis ВКПМ В-10562	86,6*	4,3	23,2*	3,4*	59,8*
Фитоп 8.67	84,1*	4,0	22,2*	3,5*	65,0*
$НСР_{05}$	3,8	0,5	1,4	0,5	8,5

* - разность с контролем статистически достоверна (P<0,05)

4,0 лист/куст в контроле. Длина надземной части увеличивалась во всех вариантах с применением штаммов на 8-14%, количество усов (столонов) – на 22-33%, длина усов – на 25-40%. По комплексу признаков наиболее выраженное ростостимулирующее действие проявляли штаммы *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* на уровне гуминового препарата феникс, включенного в опыт в качестве эталона.

Количество дочерних розеток, формируемое 1 маточным кустом, в среднем за 4 года в вариантах с применением штаммов возрастало на 1,1-1,8 розеток/растение, при 3,1 розеток/растение в контроле. Наиболее выраженный эффект стимулирования вегетативного размножения, выше, чем у препарата феникс, получен в вариантах с *B. amyloliquefaciens* (увеличение к контролю на 52,9%) и фитоп 8.67 (на 59,3%).

Оценка действия бактериальных штаммов на поражение земляники белой пятнистостью показала (табл. 3.6), что под влиянием предпосадочной обработки происходило снижение пораженности во всех вариантах, примерно, в 1,2-1,8 раза относительно контроля, причем максимально в варианте с обработкой смесью штаммов (фитоп 8.67). Очевидно обработка корней перед посадкой

Таблица 3.6.

Степень поражения земляники белой пятнистостью под влиянием предпосадочной обработки бактериальными штаммами (учеты в конце вегетации)

Варианты	Степень поражения, %			Разность с контролем	Снижение относительно контроля, %
	2013 г.	2014 г.	средние за 2 года		
Контроль	46,7	33,3	40,0	-	-
Феникс, 0,05%	41,4*	25,0*	33,2*	6,8	16,9
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	42,0*	25,0*	33,5*	6,5	16,1
B. subtilis ВКПМ В-10641	45,0	23,3*	34,1*	5,9	14,7
B. licheniformis ВКПМ В-10562	42,3*	26,7*	34,5*	5,5	13,8
Фитоп 8.67	43,2*	18,3*	30,8*	9,2	23,0
$НСР_{05}$ по вариантам = 2,4%; $НСР_{05}$ по годам = 1,4					-

приводила к повышению устойчивости формирующихся растений земляники к белой пятнистости, что указывает на наличие у бактериальных штаммов иммунизирующего действия. Оно могло быть следствием как их антистрессового, так и общего ростостимулирующего влияния, которое ослабляло преждевременное старение тканей растения и снижало возрастно-физиологическую восприимчивость к фитопатогенному грибу.

В 2012-2014 гг. растения подвергались значительным стрессам в зимние периоды, что позволило оценить влияние биоагентов на зимостойкость земляники. Зимой 2012-2013 гг. основным стресс-фактором

явились сильные морозы в декабре (–35,5 °С во 2-й декаде). Зимний период 2013-2014 г., несмотря на среднюю температуру –14,4 °С, на 1,5° выше многолетней нормы, оказался ещё более суровым из-за плохой закалки растений в связи с переувлажненностью периода вегетации 2013 г. (превышение среднемноголетней нормы осадков в августе и сентябре в 1,8 раза).

Наблюдения за состоянием маточных растений (посаженных в 2012 г.), проведенные в июне 2013 г. показали, что в контроле в течение зимовки погибло 10,2% растений (табл. 3.7). Штаммы, за исключением *B. licheniformis*, уменьшали гибель растений в 3,3-3,8 раза. Хорошее состояние растений в контрольном варианте (4,4 балла) улучшалось до отличного состояния (4,8-4,9 балла). Весной 2014 г. наблюдение представляло особенный интерес в связи с массовым подмерзанием земляники в течение зимовки. В контроле гибель маточных кустов по данным наблюдения в мае 2014 г. достигла 51,7% В вариантах с обработкой *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и фитоп 8.67 гибель снижалась в 1,7-2,1 раза. В варианте с *B. licheniformis* эффект был слабее, гибель растений снизилась в 1,2 раза относительно контроля. Общее состояние растений после зимовки в контроле вследствие значительного подмерзания было слабым (2,5 балла), но на фоне обработки бактериальными штаммами сохранялось на удовлетворительном уровне (3,2 балла). Примерно на таком же уровне действовал эталонный гуминовый препарат феникс.

Таблица 3.7.

Влияние бактериальных штаммов на сохранность во время зимовки и общее состояние маточных растений земляники весной 2-го года жизни (учеты после перезимовки – 01.06.2013 г. и 08.05.2014 г.)

Варианты	Зимовка		Средние за 2 года	% отклонения +/- к контролю
	2012-2013 гг.	2013-2014 гг.		
Гибель маточных растений во время зимовки, %				
Контроль	10,2	51,7	30,9	-
Феникс, 0,05%	3,0*	23,3*	13,2*	-57,5
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	3,1*	25,0*	14,0*	-54,6
B. subtilis ВКПМ В-10641	2,7*	30,0*	16,4*	-47,1
B. licheniformis ВКПМ В-10562	10,9	42,5*	26,7	-13,7
Фитоп 8.67	2,9*	28,3*	15,6*	-49,4
$НСР_{05}$ по вариантам = 6,1%; $НСР_{05}$ по годам = 3,5				-
Общее состояние маточных растений после зимовки, балл				
Контроль	4,4	2,5	3,5	-
Феникс, 0,05%	4,8*	3,3*	4,1*	17,0
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	4,9*	3,2*	4,0*	15,0
B. subtilis ВКПМ В-10641	4,8*	3,2*	4,0*	14,2
B. licheniformis ВКПМ В-10562	4,5	2,9*	3,7*	4,9
Фитоп 8.67	4,8*	3,2*	4,0*	15,2
$НСР_{05}$ по вариантам = 0,2 балла; $НСР_{05}$ по годам = 0,1				-

Обобщение данных за 2 года выявило, что штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и фитоп 8.67, примененные для предпосадочной обработки, оказывая на землянику антистрессовое (адаптогенное) влияние, повышали её зимостойкость и снижали гибель опытных растений в 1,9-2,2 раза, улучшая их общее состояние.

Результаты полевых опытов при посадке производственного маточника показали, что штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и фитоп 8.67 имеют наиболее выраженное полифункциональное действие на растения земляники, проявляют антистрессовые, ростостимулирующие и иммунизирующие свойства.

Биологический контроль фузариоза ремонтантной малины, вызванного *Fusarium sambucinum* Fuck.

По данным ряда авторов бактерии рода *Bacillus* и их метаболиты наряду с ростостимулирующим эффектом могут индуцировать иммунитет растений [Compant et al., 2005; Perez-Garcia et al., 2011; Saraf et al., 2014]. Это означает, что защитное действие бактериальных штаммов на растениях одновременно может включать в себя антагонистический механизм действия на фитопатогена, а также иммунизацию растительных тканей. Выявление данных аспектов в свойствах биоагентов представляет значительный интерес. В связи с этим в 2013-2014 гг. в модельных экспериментах было проведено исследование влияния бактериальных штаммов на искусственную инфекцию однолетних побегов малины ремонтантной сорта Недосягаемая фитопатогенным грибом *Fusarium sambucinum* Fuck., ранее выделенным нами из больных побегов малины [Shternshis et al., 2015]. Одну группу опытных растений опрыскивали суспензиями бактериальных штаммов (в концентрации 1×10^5 КОЕ/мл) заранее, за 2,5 недели до внесения фитопатогена; другую группу обрабатывали штаммами непосредственно перед нанесением фитопатогенного гриба. Инокуляция проводилась с предварительным повреждением стеблей – через мелкие раны эпидермиса (при натирании ватой с толченым стеклом). Для этого на стебель накладывали агаровый блок диаметром 1 см с 3-недельной культурой гриба, инфекционная нагрузка составляла $2{,}18\times10^9$ конидий/см^2. Затем поверхность стебля малины закрывали на 6 суток целлофановой пленкой для создания влажности. В качестве эталона использовали хитозансодержащий препарат амулет, 0,1% в качестве индуктора устойчивости растений (производитель ООО «Биохимические технологии», г. Москва). В конце вегетации побеги срезали и оценивали параметры внешнего и внутреннего поражения фузариозом.

Влияние бактериальных штаммов на поражение побегов малины фузариозом в 2013 г.

В 2013 г. стебли малины инокулировали бациллами и одновременно обрабатывали препаратом амулет 8 июля. Предварительная обработка биоагентами опытной группы побегов проведена 22 июня, другая опытная группа побегов обработана в день инфицирования. Итоговый учет результатов опыта проведен 26 сентября.

Влияние обработок бактериальными штаммами на размер внешнего некроза. Площадь внешнего некротического пятна при повреждении эпидермиса в контроле при предварительной обработке (за 2,5 недели до внесения инокулюма возбудителя и одновременно с инокуляцией) статистически не отличаются (рис. 3.11). Под влиянием обработки хитозансодержащим препаратом в оба срока происходило похожее по эффекту уменьшение размеров внешнего некроза в 1,5-1,6 раза. Достоверно сильнее ($P<0,05$) снижали развитие грибной инфекции штаммы *B. amyloliquefaciens, B. subtilis* и *B. licheniformis*. В сравнении с контролем наблюдали снижение в 2,2-4,2 раза при предварительном внесении и в 2,0-3,5 раза при обработке одновременно с заражением. При предварительном внесении бактериальные штаммы эффективнее в 1,5-2,8 раза в сравнении с препаратом амулет, а при одновременной обработке с заражением в 1,3-4,2 раза.

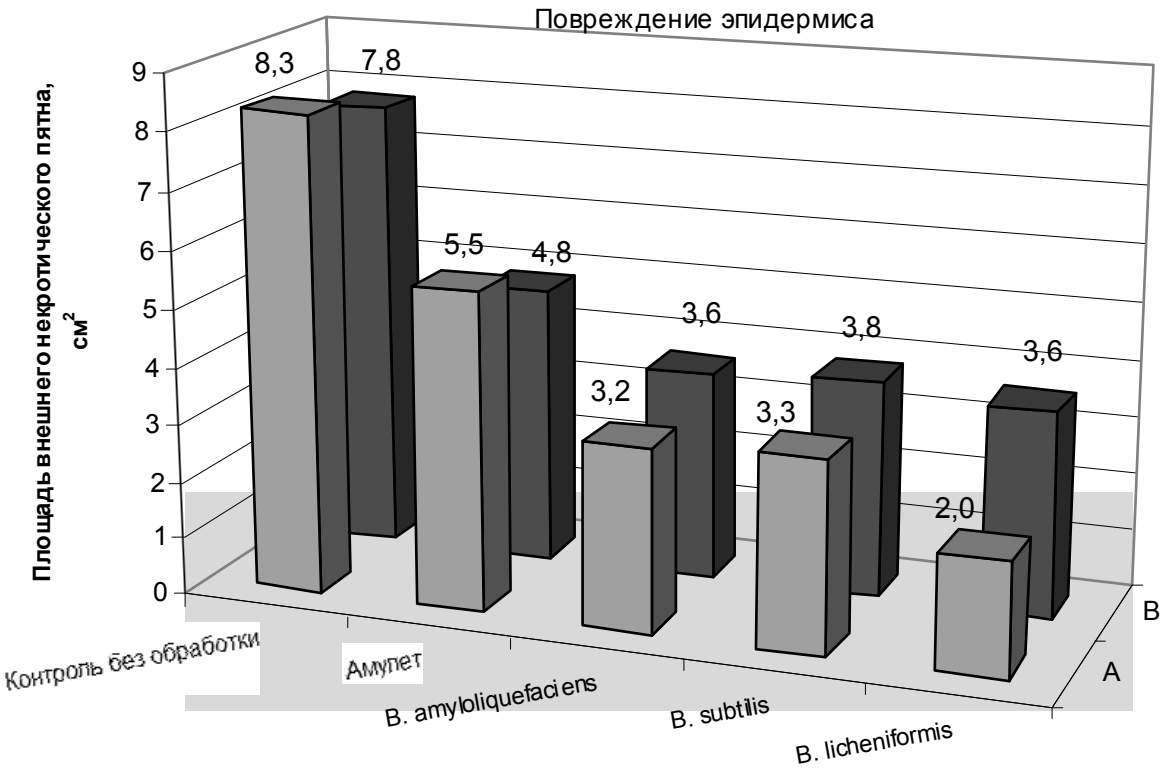

Рис. 3.11. Влияние биоагентов на размеры внешнего некротического пятна при искусственном заражении однолетних побегов малины грибом *F. sambucinum* через предварительные повреждения эпидермиса

$НСР_{05}$ по препаратам = 1,5 см^2; $НСР_{05}$ по срокам = 0,9

А – 1-й срок (предварительная обработка);

В – 2-й срок (одновременная обработка);

Влияние обработок бактериальными штаммами на размер внутреннего некроза. Для оценки внутреннего поражения стеблей их разрезали поперечно в том месте, где внешнее пятно имело наибольший диаметр. На поперечном сечении измеряли размер некроза в % от общей площади. Этот показатель отражает степень перекрытия сокодвижения в пораженном стебле и прямо связан с вредоносностью инфекции.

На фоне повреждения эпидермиса предварительная обработка хитозановым препаратом (за 2,5 недели до инокуляции грибом) сократила размеры внутреннего некроза в 1,3 раза в сравнении с контролем (рис. 3.12), вследствие его иммунизирующего действия. При одновременном внесении биоагентов и грибного инокулюма размер внутреннего некроза был снижен

по сравнению с контролем лишь на 3%. При обработке штаммом *B. amyloliquefaciens* не было выявлено достоверных различий с контролем в оба срока. Штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis* в 1-й срок применения, достоверно снизили размер внутреннего некроза относительно контроля, соответственно в 1,3 и 1,6 раза.

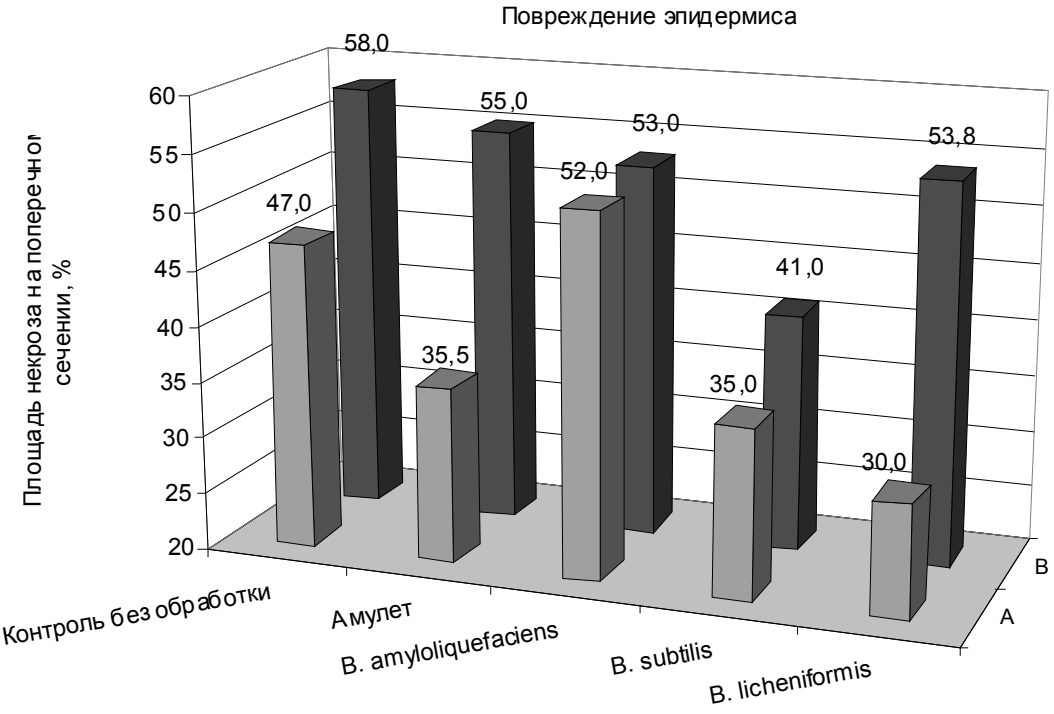

Рис. 3.12. Влияние биоагентов на размеры некроза на поперечном сечении стебля при искусственном заражении однолетних побегов малины грибом *F. sambucinum* через предварительные повреждения эпидермиса.

$НСР_{05}$ по препаратам = 9,5%; $НСР_{05}$ по срокам = 5,5

Во 2-й срок обработки достоверно сокращал размеры внутреннего некроза стебля только штамм *B. subtilis*– в 1,4 раза (при поражении 58,0% в контроле). Следует отметить, что предварительное повреждение эпидермиса стеблей перед внесением инокулюма фитопатогенного гриба моделирует максимально благоприятные условия для развития инфекции. Этим, в частности, объясняется относительно слабое действие штаммов при одновременном их внесении с возбудителем болезни (во 2-й срок) – тенденция снижения поражения на 5-12% в сравнении с контролем.

Полученные результаты показывают, что профилактическая обработка (в 1-й срок) позволяла более успешно ограничивать раневую инфекцию. В связи с тем, что гриб-возбудитель наносили на растения при контролируемой нагрузке, бактериальные препараты заранее не могли повлиять на него в течение 2,5 недель до инокуляции. По-видимому, в вариантах с применением препарата амулет, а также штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* проявился эффект иммунизации в результате воздействия предварительной обработки на растение, поражение ограничивалось возросшим уровнем устойчивости тканей растения.

Результаты испытаний показали, что обработка бактериальными штаммами за 2,5 недели до инокуляции оказалась более эффективной ($P<0,05$), чем обработка одновременно с нанесением инокулюма. Это можно объяснить формированием иммунизирующего фактора в заранее обработанных растениях, так как за срок, прошедший до нанесения инокулюма, возможно сокращение популяции бактерий рода *Bacillus* на поверхности побегов малины. Во 2-й срок инокуляции штаммы, по-видимому, действовали в большей степени как антагонистические агенты. Условия вегетации 2013 г. с холодной погодой в 1-й половине вегетации и избытком осадков стимулировали процессы вегетативного роста однолетних побегов малины и тормозили процессы суберинизации перидермы и одревеснения ксилемы, составляющих важнейшие анатомо-морфологические барьеры в защите побегов от инфицирования грибами. В связи с этим значительно возрастала возможность глубокого заражения побегов с проникновением фузариозной инфекции в слои ксилемы и сердцевинной паренхимы стеблей.

Влияние бактериальных штаммов на поражение побегов малины фузариозом в 2014 г.

В 2014 г. также проведены обработки растений препаратами в 2 срока: за 18 дней до инокуляции (2 июля) и непосредственно перед заражением (19 июля). Сдвинутые почти на 2 недели позже сроки обработки по сравнению с

2013 г. объясняются разным влиянием на растение факторов окружающей среды. В 2014 г. значительно меньшее количество осадков в июне замедлило отрастание побегов. Итоговый учет результатов опытов проведен 29 сентября 2014 г.

Влияние обработок бактериальными штаммами на размер внешнего некроза. Площадь внешнего некротического пятна при повреждении эпидермиса по срокам различалась (рис. 3.13). В контроле она была в 1,9 раза больше при предварительной обработке биоагентами, чем при обработке бактериальными штаммами одновременно с внесением инокулюма возбудителя, по-видимому, в связи с более быстрым созреванием инфицируемых тканей и повышением их устойчивости ко 2-му сроку. Препарат амулет при заблаговременной обработке вызывал сокращение площади некроза в 3,7 раза относительно контроля, во 2-й срок – в 1,8 раза.

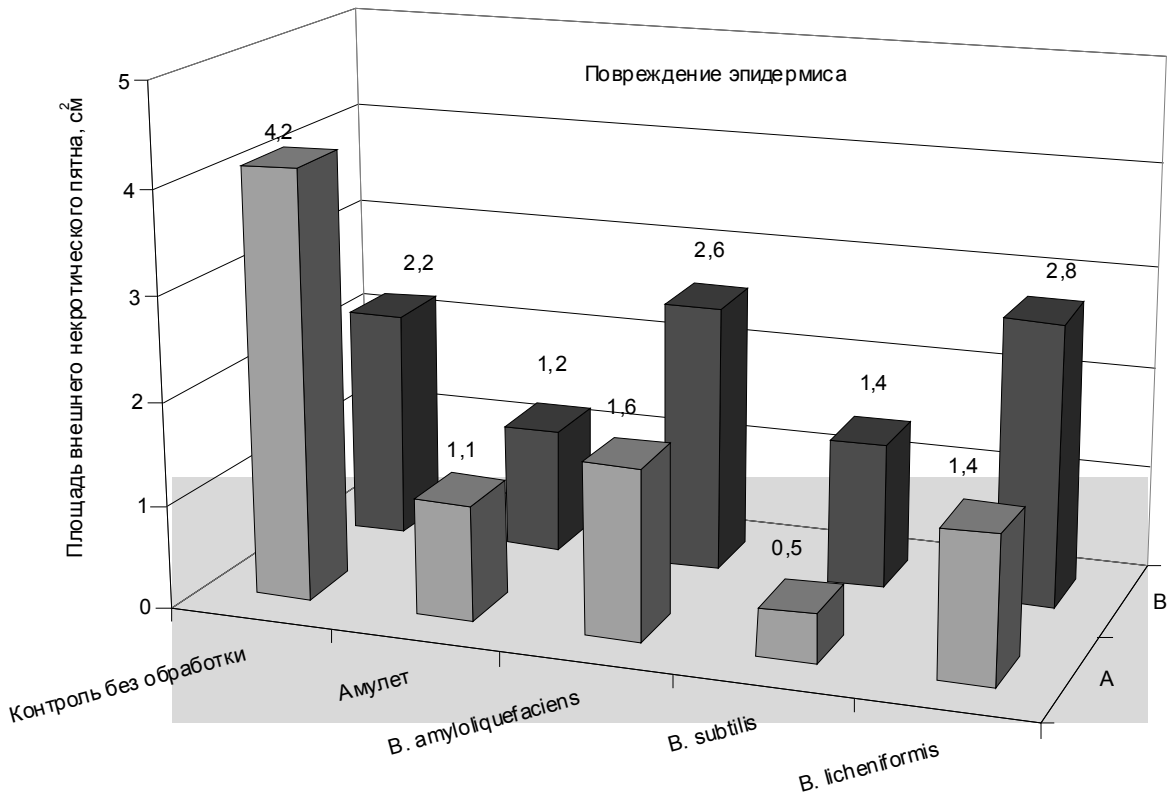

Рис. 3.13. Влияние биологических агентов на размеры внешнего некротического пятна при искусственном заражении однолетних побегов малины грибом *F. sambucinum* через предварительные повреждения эпидермиса в 2014 г.

$НСР_{05}$ по препаратам = 0,7 $см^2$; $НСР_{05}$ по срокам = 0,4

Все бактериальные штаммы достоверно ($P<0,05$) ограничивали развитие грибной инфекции в 1-й срок в 2,6-8,8 раз относительно контроля, их действие при этом достоверно не отличалось от эффекта в варианте с хитозановым препаратом. Во 2-й срок инокуляции достоверное снижение размера инфицированного участка тканей выявлено в вариантах с применением эталонного препарата амулет и штамма *B. subtilis*, соответственно, в 1,8 и 1,6 раза. Остальные штаммы при нанесении на растение одновременно с повреждением эпидермиса и инокуляцией фитопатогеном (во 2-й срок) не оказывали существенного влияния на инфекцию. Таким образом, препарат амулет и штамм *B. subtilis* оказались эффективны в оба срока обработки.

Влияние обработок бактериальными штаммами на размер внутреннего некроза. Хитозановый препарат оказал иммунизирующее действие в 1-й срок, в результате размеры внутреннего некроза сократились в 6,0 раз в сравнении с контролем (рис. 3.14). При одновременном заражении грибом и обработке амулетом размер внутреннего некроза снижался недостоверно. Штамм *B. subtilis* в 1-й срок применения, достоверно снижал размер внутреннего некроза относительно контроля в 6,0 раз, а в варианте с применением *B. amyloliquefaciens* инфицирование было полностью исключено. Во 2-й срок обработки штаммы *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* сокращали размеры внутреннего некроза стебля, соответственно в 2,6 и 9 раз, а штамм *B. subtilis* полностью исключал внутреннюю некротизацию.

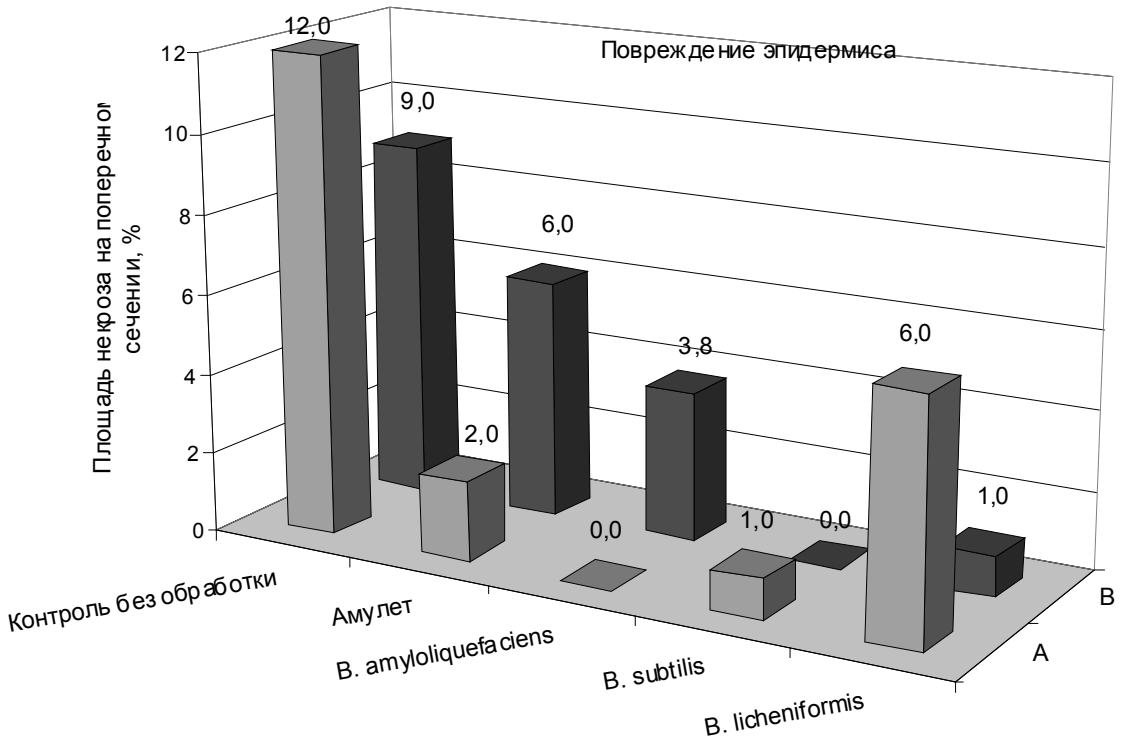

Рис. 3.14. Влияние биологических агентов на размеры некроза на поперечном сечении стебля при искусственном заражении однолетних побегов малины грибом *F. sambucinum* через предварительные повреждения эпидермиса в 2014 г.

$НСР_{05}$ по препаратам = 7,1%; $НСР_{05}$ по срокам = 4,1

Более высокая устойчивость тканей стеблей в сравнении с 2013 г., была обусловлена влиянием погодных факторов (меньшее количество осадков, способствующее созреванию перидермы и ксилемы как барьеров инфекции).

Результаты профилактической обработки (за 2,5 недели до нанесения инокулюма гриба) подтвердили данные, полученные в предыдущем году, свидетельствующие об индуцировании устойчивости малины препаратом амулет и штаммами *B. subtilis* и *B. licheniformis.*

Данные показали, что в большинстве вариантов развитие болезни малины снижалось сильнее в 2014 г. по сравнению с 2013 г., что можно объяснить влиянием факторов окружающей среды. Погодные условия 2013 г. характеризовались холодной весной и недостатком тепла в течение всей 1-й половины вегетации. Лишь в июне наблюдался небольшой дефицит осадков, в остальные месяцы осадков выпало избыточное количество, причем в мае –

в 2 раза больше нормы, в августе – в 2,5 раза. Эти условия способствовали вегетативному росту всех ягодных растений. Высокая влажность среды исключала появление или существенно смягчала у растений стрессы, связанные с дефицитом влаги. Погодные условия вегетации 2014 г. характеризовались прохладной погодой в мае - 1-й половине июня и достаточной обеспеченностью тепла в июле-августе. Резкий дефицит осадков наблюдался в июне и августе, и в 1-й половине июля, что не способствовало развитию фузариоза. Тот факт, что при заблаговременном нанесении хитозанового препарата и *B. subtilis* повреждения поверхности стебля отсутствовали, и даже при действии менее эффективного *B. licheniformis* были минимальны, свидетельствует о значительном вкладе бацилл в индукцию резистентности ремонтантной малины. Проведенное испытание показывает, что предварительная обработка оказалась более эффективной, чем обработка непосредственно перед нанесением инокулюма. При одновременной инокуляции грибом и обработке штаммами в большей степени проявлялся антагонизм.

Если формирование иммунного ответа растения было решающим при заблаговременной обработке штаммами, то за время, прошедшее после обработки штаммами до инокуляции возбудителем, должно было произойти сокращении численности бацилл на стебле. Для подтверждения этого в 2014 г. изучали плотность бацилл в смывах со стеблей в разные периоды времени (рис. 3.15). При посеве смывов со стеблей на следующий день после их опрыскивания в контрольном варианте плотность популяции составляла $0{,}84\times10^6$ КОЕ/см^2, несущественно от контроля отличалась плотность популяции бацилл при обработке хитозановым препаратом. В вариантах с обработкой штаммами произошло достоверное ($P<0{,}05$) 4-9-кратное возрастание плотности популяции бацилл в результате их дополнительного внесения при опрыскивании. В течение последующих 18 дней происходило постепенное сокращение численности популяции бацилл на поверхности

обработанных стеблей малины. Поэтому к моменту заражения фитопатогенным грибом плотность популяции на обработанных стеблях приблизилась к уровню контроля, достоверные различия по вариантам нивелировались.

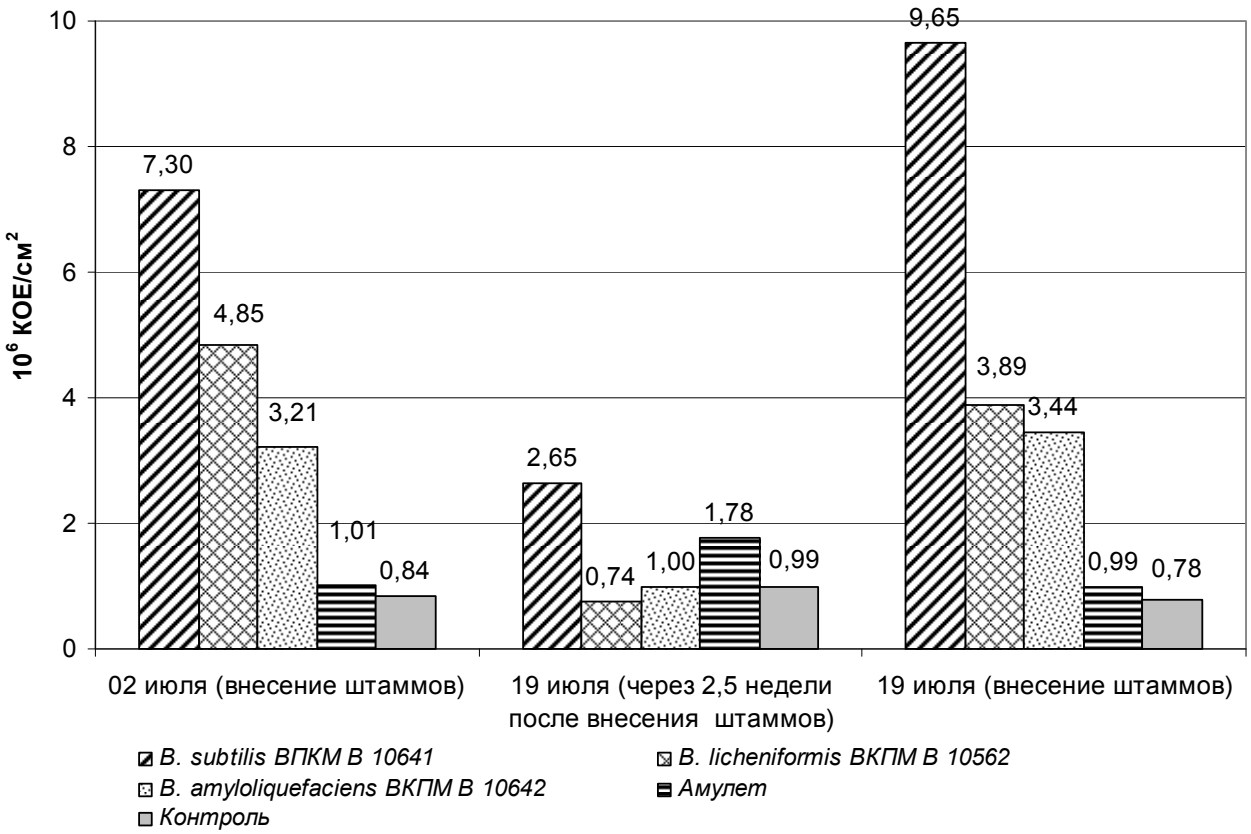

Рис. 3.15. Динамика плотности популяции бацилл на поверхности стеблей малины, обработанных бактериальными штаммами

$НСР_{05}$ по препаратам = $2{,}09\times10^6$ КОЕ/см^2

Обработка стеблей малины бактериальными штаммами одновременно с инокуляцией грибом *F. sambucinum* подтвердила предыдущий результат. На следующий день после обработки произошло 4-12-кратное возрастание плотности популяции бацилл. При этом на контрольных стеблях, а также обработанных препаратом амулет наблюдалось несущественное отклонение от фоновых показателей плотности заселения. Это доказывает отсутствие дополнительного антагонистического эффекта от внесенных штаммов.

Результаты показали, что антагонистические свойства тестируемых бацилл дополняются возможностью индукции резистентности растения, что подтверждается данными ряда авторов [Dodds, Raltjen 2010; Kloepper et al. 2004; Saraf et al. 2014]. Этот двойной эффект бацилл может изменяться под влиянием абиотических факторов окружающей среды, что объясняет не всегда удачное действие бактерий рода *Bacillus* на грибную инфекцию малины в поле [Recanovic et al., 2012].

Адаптация растений ремонтантной малины к факторам окружающей среды под влиянием бактерий рода *Bacillus*

В 2012-2015 гг. в полевом опыте проведено испытание действия бактериальных штаммов при предпосадочной обработке корневой системы саженцев малины сорта Недосягаемая путем её погружения в суспензии бактериальных штаммов в концентрации 1×10^5 КОЕ/мл с экспозицией 2 часа.

Посадка растений в полевом опыте проведена 26 мая 2012 г. Приживаемость растений в контроле составила 71,7%. Гибель растений была вызвана сильной воздушной засухой в июне и июле 2012 г. Во всех вариантах с предпосадочной обработкой бактериальными штаммами, а также гуминовым препаратом феникс, проявилась тенденция снижения гибели высаженных растений на 7-16% относительно контроля. Достоверный эффект доказан ($P<0,05$) в варианте с применением штамма *Bacillus subtilis*, где приживаемость достигла 83,3%. В год посадки растения в опыте сформировали по 1,2-1,8 побегов замещения, без существенных различий по вариантам.

На 2-й год после посадки (2013 г.) ростовым процессам у молодых растений малины способствовали погодные условия периода вегетации с температурой близкой к норме и значительным, почти в 2 раза превышением количества выпавших осадков. Это привело к формированию, в среднем, 4,9 побегов замещения в 1 кусте малины в контрольном варианте (рис. 3.16). В варианте с применением штаммов *B. amyloliquefaciens* проявилось

ингибирование количества побегов замещения на 20%. Достоверное (P<0,05) стимулирование количества побегов на 22-33% выявлено в вариантах с обработкой *B. subtilis* и гуминовым препаратом феникс, 0,1%.

На 3-й год после посадки (2014 г.) тенденция стимулирования количества побегов замещения в кусте малины относительно контроля проявилась во всех опытных вариантах и была достоверно доказана (P<0,05) в вариантах с применением штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* и в эталонном варианте с феникс, 0,1%, где отросло на 1,1-2,1 побегов (на 33-62%) больше, чем в контроле (3,4 побега/куст). Ослабление процесса формирования побегов замещения в 2014 г. практически во всех вариантах опыта обусловлено стрессовым состоянием растений после зимы 2013-2014 гг., которое было вызвано их плохой подготовкой к зимовке в период вегетации предшествующего 2013 г. из-за избытка осадков.

На 4-й год после посадке (2015 г.) тенденция стимулирования, в целом, ослабла, однако на достоверном уровне эффекты сохранились в вариантах с применением *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* – увеличение количества побегов замещения составило 1,3-2,1 побега/куст (30-48%) относительно контроля.

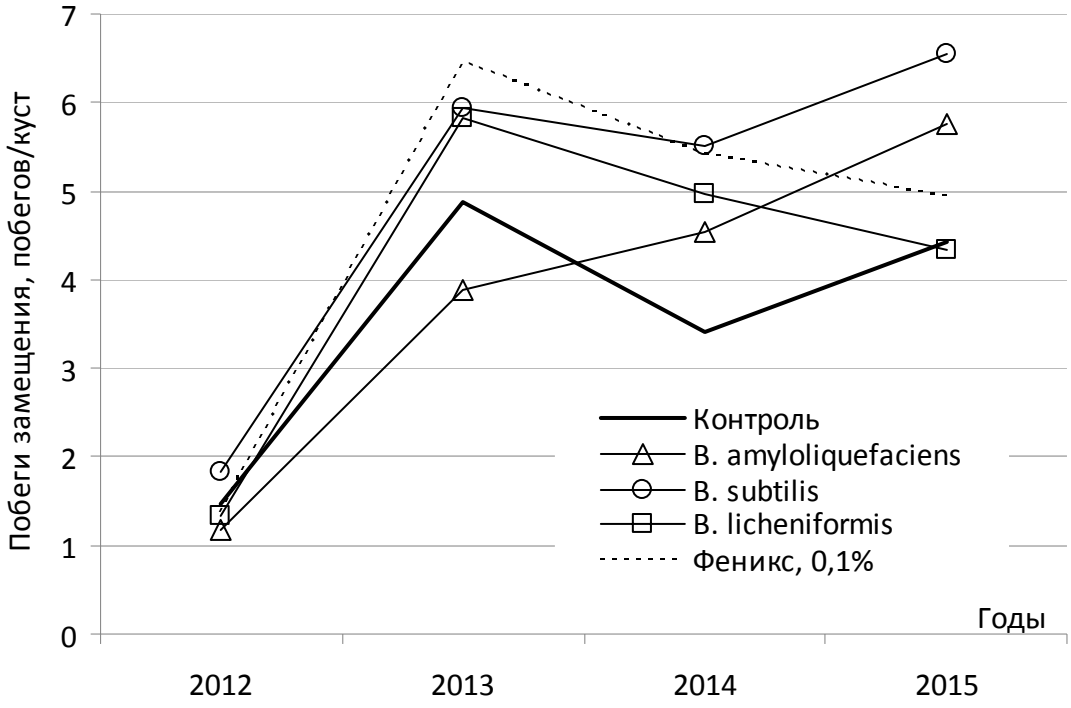

Рис. 3.16. Влияние бактериальных штаммов на формирование количества побегов замещения в 1 кусте ремонтантной малины в 1-4 годы жизни насаждений (побегов/куст, учеты в конце вегетации)

$НСР_{05}$ по вариантам = 1,0 побегов/куст; $НСР_{05}$ по годам = 0,8

В среднем, за 4 года наблюдений все испытанные штаммы проявляли влияние, в различной степени стимулирующее рост побегов замещения. Однако, наилучший и наиболее стабильный эффект выявлен в варианте с предпосадочной обработкой корневой системы малины штаммом *B. subtilis* – увеличение количества побегов составило 39,8% относительно контроля.

Влияние изучаемых штаммов на длину побегов замещения проявлялось в различных направлениях (рис. 3.17). Штамм *B. amyloliquefaciens* в первые 3 года жизни плантации преимущественно ингибировал рост побегов в длину до 4-17 см (на 8-22%). Лишь на 4-й год после посадки ингибирующий эффект нивелировался. Достоверный ($P<0,05$) стимулирующий эффект в среднем за 4 года доказан в варианте с применением *B. subtilis* – удлинение побегов достигало, в среднем, 4,4 см (5,2%) относительно контроля. В вариантах с применением *B. licheniformis* ростостимулирующее действие было менее

выражено и нестабильно по годам. Следует отметить, что проявление ингибирующего действия на длину

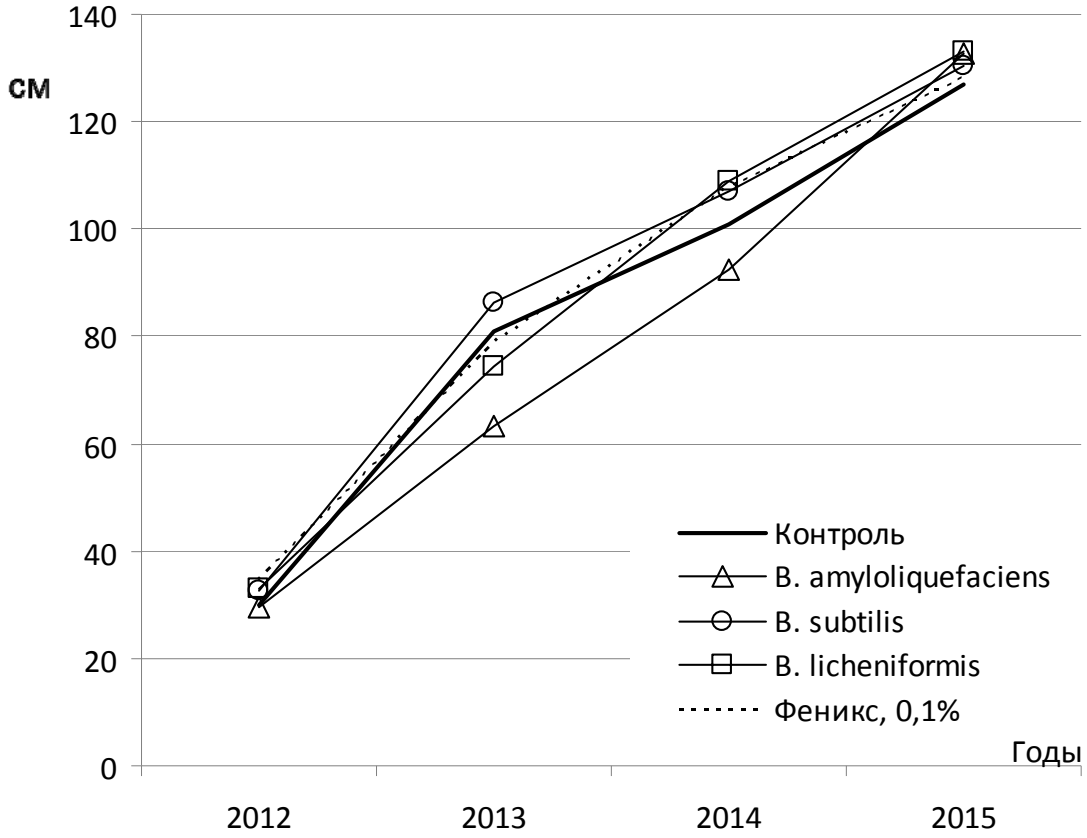

Рис. 3.17. Влияние бактериальных штаммов на длину побегов замещения ремонтантной малины в 1-4 годы жизни насаждений (см, учеты в конце вегетации)
$НСР_{05}$ по вариантам = 3,2 см; $НСР_{05}$ по годам = 2,1

и количество побегов замещения у некоторых испытываемых штаммов наблюдалось в 2013 г. в условиях избыточного выпадения осадков. Возможно, это было связано с преобладанием в почве анаэробных условий для жизнедеятельности сапротрофных бацилл.

В год посадки плантации (2012 г.) не было выявлено существенного влияния предпосадочной обработки корневой системы на количество междоузлий, формирующихся на побегах замещения в течение вегетации. Однако на 2-й год жизни растений (2013 г.) установлено стимулирующее

влияние штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, сопоставимое по уровню с влиянием гуминового препарата феникс, 0,1% – количество междоузлий увеличилось на 2,7-2,8 междоузлия/побег (на 12-13%) относительно контроля (рис. 3.18). На 3 и 4-й годы жизни растений количество междоузлий всех вариантах опыта достоверно не превышало уровня контроля, таким образом первоначальный стимулирующий эффект нивелировался.

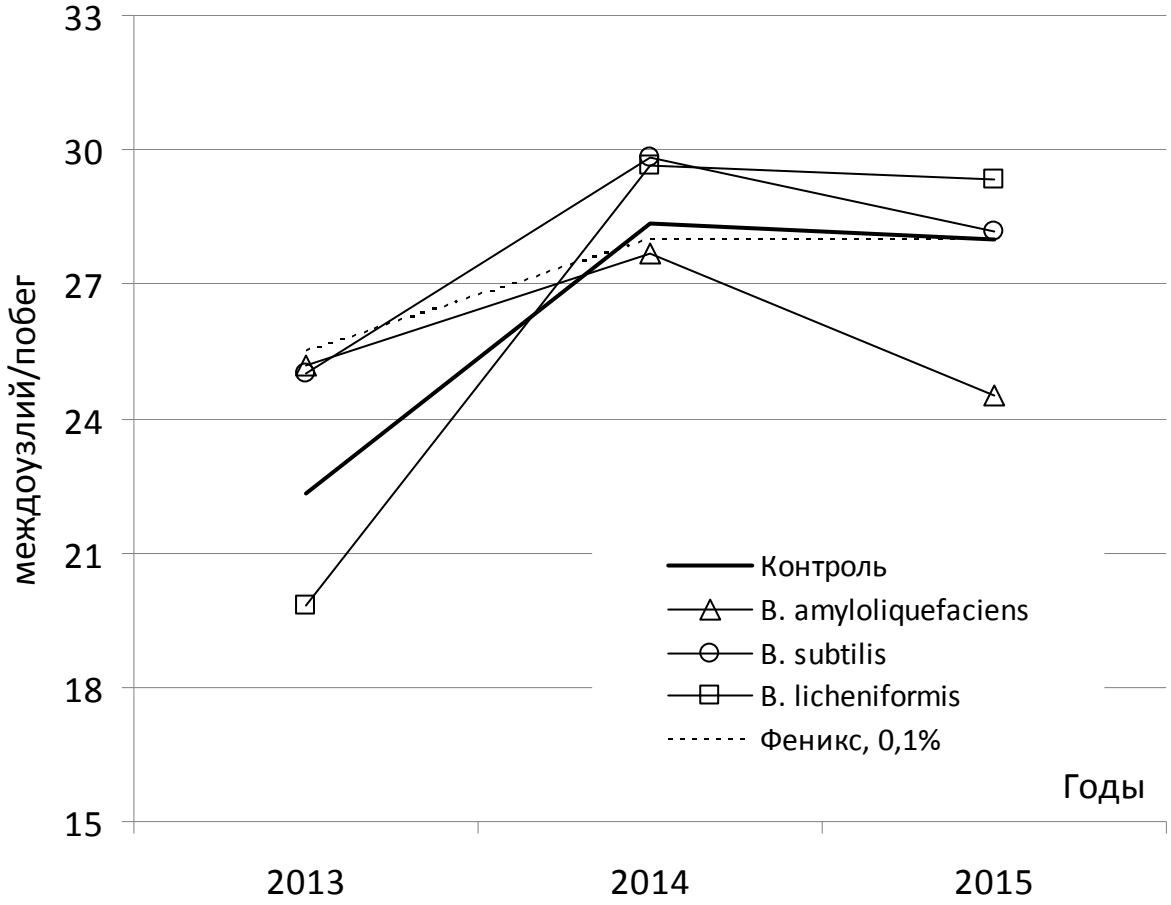

Рис. 3.18. Влияние бактериальных штаммов на формирование количества междоузлий у побегов замещения ремонтантной малины на 2-4 годы жизни насаждений (междоузлий/побег, учеты в конце вегетации)

$НСР_{05}$ по вариантам = 2,5 междоузлий/побег; $НСР_{05}$ по годам = 1,6

Ремонтантная малина сорта Недосягаемая, в связи с генетическими особенностями происхождения от теплолюбивых американских видов, несмотря на вполне успешную зимовку в условиях Западной Сибири, обладает более высокой чувствительностью к зимним повреждениям, чем обычные сорта малины сибирского происхождения.

Зимнее повреждение растений ремонтантной малины возникало вследствие подмерзания корневой системы в период с ноября по март. Симптомы повреждения растений в виде общего хлороза листьев, отчасти переходящего в некроз, проявлялись в мае при отрастании молодых побегов. Наиболее полно симптомы повреждения проявлялись к 3-й декаде июня, а в дальнейшем растения восстанавливались и до конца вегетации, вновь отросшие побеги и листья имели нормальную зеленую окраску.

На 2-й год после посадки (после 1-й зимовки) в контроле распространенность зимних повреждений составила 43,8% (рис. 3.19). В вариантах с применением бактериальных штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и *B. licheniformis* наблюдалось достоверное уменьшение поврежденности в 1,6-2,1 раза.

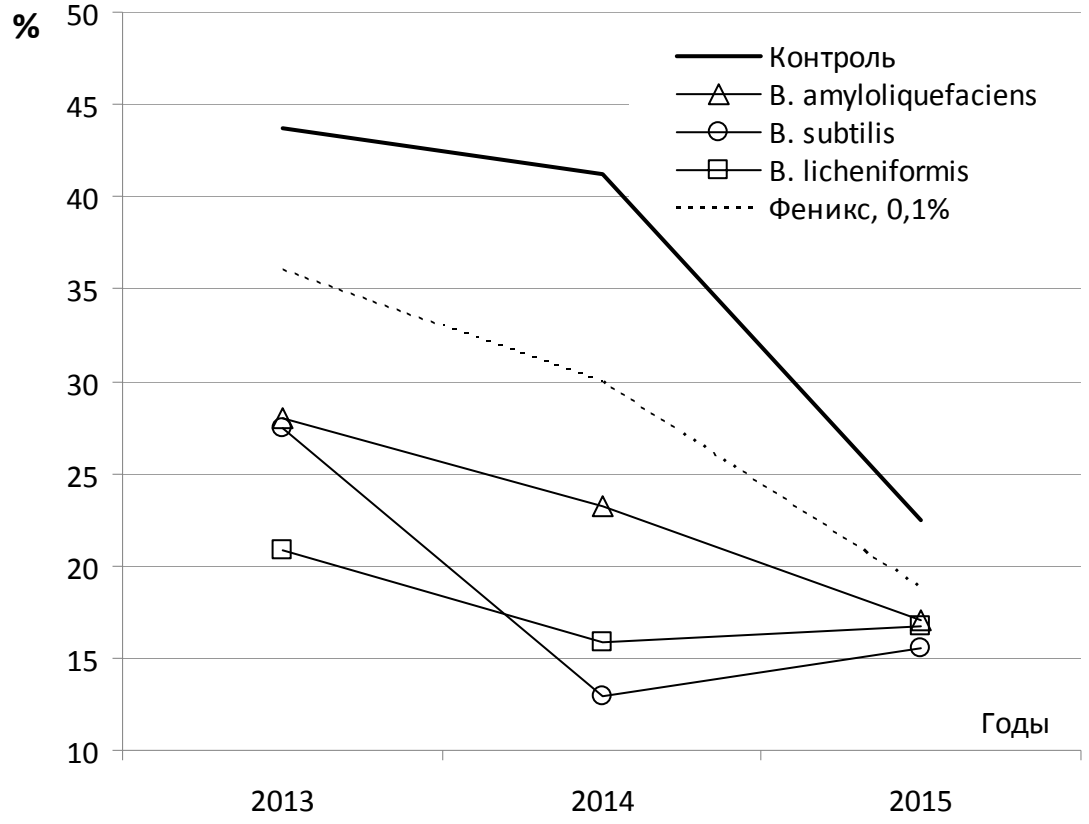

Рис. 3.19. Влияние предпосадочной обработки корневой системы саженцев бактериальными штаммами на распространенность зимних повреждений ремонтантной малины на 2-4 годы жизни насаждений (%, учеты в 3-й декаде июня)

$НСР_{05}$ по препаратам = 5,0%; $НСР_{05}$ по годам = 3,3

Аналогичная закономерность в действии штаммов еще более укрепилась в 2014 г. – снижение поврежденности составило 1,8-3,2 раза, и в 2015 г., защитный эффект в указанных вариантах (1,3-1,5-кратное снижение поврежденности) также остался на достоверном уровне. Таким образом, в среднем за 3 года наблюдений штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и *B. licheniformis* снижали зимнее повреждение малины в 1,6-2,0 раза (БЭ=36-50%), что можно объяснить адаптирующим влиянием предпосадочной обработки корневой системы саженцев биоагентами, повышающим зимостойкость растений. Следует отметить также общую закономерность снижения зимних повреждений растений на опытном участке в течение 3 лет вследствие их возрастной адаптации.

Стимулирование генеративного развития. Влияние предпосадочной обработки корневой системы бактериальными штаммами на формирование генеративных органов малины проявилось на 2-й год жизни растений (рис. 3.20). При этом на контрольных растениях 1 побег формировал, в среднем, по 59,7 органов (бутонов, цветков, завязей и зрелых ягод) в сумме за вегетацию. Во всех вариантах с применением бактериальных штаммов количество генеративных органов возрастало в 1,3-1,6 раза, максимальный эффект получен при обработке штаммами *B. amyloliquefaciens* (94,5 органов/побег) и *B. subtilis* (78,0). На 3-й год после посадки достоверные эффекты стимулирования образования

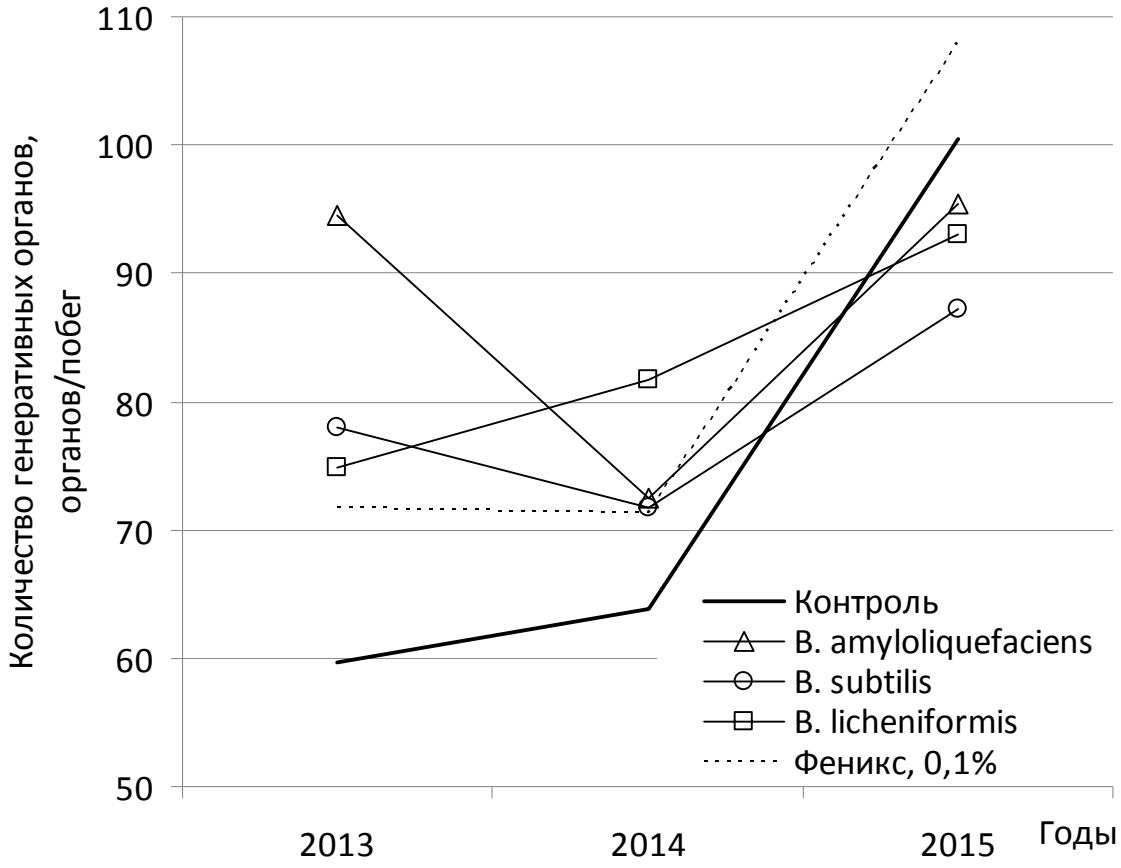

Рис. 3.20. Влияние предпосадочной обработки корневой системы саженцев бактериальными штаммами на формирование количества генеративных органов ремонтантной малины на 2-4 годы жизни насаждений (органов/побег)

$НСР_{05}$ по препаратам = 8,0 органов/побег; $НСР_{05}$ по годам = 5,2

генеративных органов сохранились в вариантах с обработкой *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*– увеличение в 1,1-1,3 раза. Общее ослабление процесса формирования генеративных органов у малины на опытном участке в 2014 г. также было обусловлено стрессовым состоянием растений после неблагоприятной зимовки 2013-2014 гг. К 4-му году жизни насаждений эффекты влияния бактериальных штаммов в опытных вариантах нивелировались. В совокупности за 3 года плодоношения плантации достоверные ($P<0,05$) стимулирующие эффекты в формировании генеративных органов малины в вариантах с применением штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* составили 11,3-17,1% относительно контроля.

Продуктивность одного куста малины на 2-й год после посадки (2013 г.), несмотря на разнонаправленные тенденции варьирования, достоверно не отличалась от контроля (рис. 3.21). На 3-й год жизни (2014 г.) контрольные растения сформировали урожай ягод в среднем по 1060,4 г/куст. В вариантах с обработкой *B. subtilis* и *B. licheniformis* продуктивность возросла в 1,3-1,4 раза. На 4-й год (2015 г.), когда растения малины достигли уровня полного плодоношения (в контроле – 2204,9 г/куст) бактериальные штаммы (за исключением *B. licheniformis*) достоверно увеличили продуктивность растений малины в 1,2-1,3 раза. В среднем за 3-летний период плодоношения максимальный эффект повышения продуктивности был достигнут при использовании *B. subtilis* – увеличение в 1,3 раза, относительно контроля, что несколько превышало эталонный вариант с применением гуминового препарата.

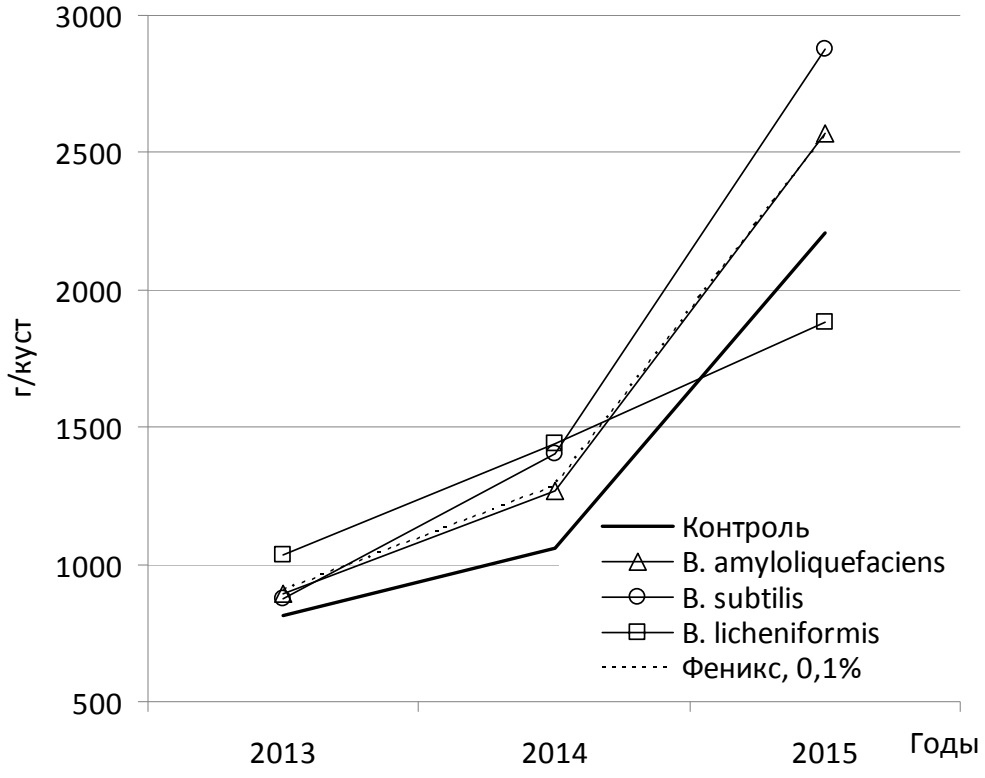

Рис. 3.21. Влияние предпосадочной обработки корневой системы саженцев бактериальными штаммами на продуктивность ягод с 1 куста ремонтантной малины на 2-4 годы жизни насаждений (г/куст)

$НСР_{05}$ по препаратам = 304,2 г/куст; $НСР_{05}$ по годам = 199,1

Оценка урожайности ремонтантной малины на основании экспериментальных данных во 2-4 годы после посадки растений показывает (табл. 3.8), что на необработанных (контрольных) насаждениях урожайность возросла с 2,67 т/га в 2013 г. до 7,28 т/га в 2015 г. Достоверные различия в

Таблица 3.8.

Влияние предпосадочной обработки корневой системы саженцев бактериальными штаммами на урожайность ремонтантной малины на 2-4 годы жизни насаждений (т/га)

Варианты предпосадочной обработки	2013 год	2014 год	2015 год
Контроль (без обработок)	2,67	3,50	7,28
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	2,95	4,19	8,48*
B. subtilis ВКПМ В-10641	2,88	4,63*	9,49*
B. licheniformis ВКПМ В-10562	3,42	4,76*	6,21
Феникс, 0,1%	2,99	4,25	8,46*
$НСР_{05}$ по препаратам = 1,00 т/га; $НСР_{05}$ по годам = 0,66			

урожайности под влиянием бактериальных штаммов проявились лишь на 3-й год после посадки растений при использовании штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis*, где увеличение урожайности составило 32% при 3,5 т/га в контроле. Максимальный эффект получен на 4-й год в вариантах с применением штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* – прибавка урожайности относительно контроля достигла, соответственно 2,2 и 1,2 т/га. В среднем за 3 года плодоношения в этих вариантах хозяйственная эффективность составила 26,3% и 16,1%.

Проведенное в 2012-2015 гг. исследование показало, что бактериальные штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и особенно *B. subtilis* обладают полифункциональными свойствами, выражающимися в антагонизме к грибной инфекции, стимулировании адаптации, роста, индукции устойчивости у растений и продукционного процесса ремонтантной малины.

Биологический контроль пятнистостей листьев черной смородины при обработке надземной системы растений

Производственные опыты на плодоносящих насаждениях черной смородины сорта Софья размещались ежегодно (2010-2012 гг.) на площади 4,0 га. Применялось однократное наземное механизированное опрыскивание надземной системы насаждений суспензиями бактериальных штаммов в концентрации 1×10^4 КОЕ/мл с расходом рабочей суспензии 500 л/га при появлении первых симптомов пятнистостей листьев (антракноз и септориоз).

В 2010 г. опрыскивание биоагентами было проведено 15 июля при появлении первых симптомов антракноза (возбудитель – *Gloeosporium ribis* (Lib.) Mont. et Desm.); септориоз (возбудитель – *Septoria ribis* Desm.) появился в начале августа, в 2011 году – 03 июля (симптомы заболеваний появились одновременно), в 2012 году – 10 июля (при появлении симптомов септориоза; антракноз выявлен в конце июля).

В составе пятнистостей листьев в 2010 и 2011 гг. по распространенности и степени поражения доминировал антракноз (превышение относительно септориоза в 1,5-2,5 раза), а в 2012 г. – септориоз, так как наблюдалась депрессия антракноза из-за сильной засухи (4 мм осадков в июле, 7% от нормы).

Первые симптомы пятнистостей листьев на смородине ежегодно проявлялись в фазу налива плодов, когда заболевания уже практически не могли повлиять на плодоношение текущего года. Поэтому оценивалось влияние штаммов в опыте по урожаю на следующий год после обработки, когда реализовался продуктивный и адаптивный потенциал обработанных растений.

В относительно благоприятных по влажности условиях для заражения возбудителем антракноза в июле (в частности, в 2010 и 2011 гг.) в течение 10-14 суток после появления первых симптомов в контроле происходило

быстрое нарастание степени поражения листьев до уровня 13,8-14,5%, что составляло основную часть прироста заболевания за сезон (табл. 3.9). При этом в обработанных бактериальными штаммами вариантах рост поражения антракнозом достоверно ($P<0,05$) тормозился в 1,7-3,8 раза. В августе условия увлажнения в 2010 и 2011 гг. оказывались ещё более засушливыми, чем в июле, поэтому достигнутые различия в пораженности опытных вариантов относительно контроля сохранялись при плавном возрастании общего фона пораженности болезнью на опытном участке до конца вегетации (в контроле – до уровня 23,3-24,0%).

В отношении антагонистического влияния штаммов на возбудителя септориоза черной смородины было проведено дополнительное исследование *in vitro* при проращивании в течение 12 часов пикноспор *S. ribis* в каплях воды с добавлением соответствующих штаммов (в концентрации 10^4 КОЕ/мл). Выявлена общая для штаммов тенденция подавления прорастания спор фитопатогена относительно контрольного варианта в 1,5-3,1 раза. Максимально антагонистическое действие проявлялось у штаммов *B. subtilis*, *B. licheniformis* и препарата фитоп 8.67, ингибирующая активность которых составила 63,2-67,9%.

Во влиянии штаммов на динамику поражения септориозом ситуация в 2010, 2011 г. и отчасти в 2012 г. была схожей с антракнозом. Обработка бактериальными штаммами примерно на 2 недели останавливала нарастание поражения болезнью. В дальнейшем, в условиях засухи 2011 г. различия в пораженности с контролем сохранялись до конца вегетации. В августе 2012 г. выпадали осадки в количестве среднемноголетней нормы, что привело к возрастанию пораженности в опытных вариантах и относительному нивелированию различий с контролем к началу сентября.

Таблица 3.9.

Влияние обработок бактериальными штаммами на степень поражения черной смородины пятнистостями листьев (%, СХА «Сады Сибири», сорт Софья, производственные опыты)

Варианты	Через 10-14 суток после обработки			В конце вегетации (3-я декада августа – 1-я декада сентября)		
	2010 г.	2011 г.	2012 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.
Антракноз						
B. amyloliquefaciens ВКПМ В 10642	4,6	6,0	3,2	6,0	8,0	12,4
B. subtilis ВКПМ В 10641	6,3	8,0	3,8	13,2	13,8	11,4
B. licheniformis ВКПМ В 10562	6,5	4,8	1,8	7,8	8,4	12,4
Фитоп 8.67	-	3,6	3,2	-	8,2	14,2
Контроль	14,5	13,8	4,2	23,3	24,0	17,2
$НСР_{05}$ по вариантам и по годам = 3,8 $НСР_{05}$ по срокам = 1,4						
Септориоз						
B. amyloliquefaciens ВКПМ В 10642	0,0	3,0	3,4	6,6	6,2	15,2
B. subtilis ВКПМ В 10641	0,0	3,8	7,0	9,2	5,4	20,2
B. licheniformis ВКПМ В 10562	0,0	3,4	6,2	10,0	6,6	23,4
Фитоп 8.67	-	3,4	4,2	-	6,2	21,4
Контроль	0,0	6,6	18,0	17,0	10,0	28,4
$НСР_{05}$ по вариантам и по годам = 3,0 $НСР_{05}$ по срокам = 1,1						

В целом, за 3 года наблюдений пораженность черной смородины совокупностью пятнистостей листьев в течение 2 недель после обработки бактериальными штаммами удавалось остановить в развитии и ограничить на уровне в 2,0-2,8 раза ниже контроля (табл. 3.10). Биологическая эффективность (БЭ) применения штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и препарата фитоп 8.67 составляла 60,2-64,6%. Достигнутый эффект сдерживания заболеваний к концу вегетации снижался до уровня БЭ=37,4-54,6% в связи с постепенным вытеснением популяций бацилл с поверхности растений, что подтверждается также при подробном изучении динамики поражения в 2012 г. (рис. 3.22).

Таблица 3.10.

Влияние обработок бактериальными штаммами на степень поражения черной смородины совокупностью пятнистостей листьев (антракноз и септориоз) (%, средние за 3 года, 2010-2012 гг. СХА «Сады Сибири», сорт Софья, производственные опыты)

Варианты	Через 14 суток после обработки	Разность с контролем	БЭ, %	В конце вегетации	Разность с контролем	БЭ, %
B. amyloliquefaciens ВКПМ В 10642	6,7	-12,3	64,6	18,1	-21,8	54,6
B. subtilis ВКПМ В 10641	9,6	-9,4	49,3	24,4	-15,6	38,9
B. licheniformis ВКПМ В 10562	7,6	-11,5	60,2	22,9	-17,1	42,8
Фитоп 8.67	7,2	-11,8	62,2	25,0	-15,0	37,4
Контроль	19,0	-	-	40,0	-	-
$НСР_{01}$ по вариантам = 7,5						
$НСР_{01}$ по срокам = 2,9						

Оценка влияния обработок на параметры продуктивности и урожайность черной смородины, проведенная в 2011 и 2012 гг. показала (табл. 3.11), что все бактериальные штаммы увеличивали количество соцветий и ягодных кистей на одну продуктивную ветвь, причем в вариантах со штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* доказано достоверное ($P<0,05$) увеличение данного показателя на 25-28%. Количество ягод на одной продуктивной ветви также достоверно возрастало в варианте со штаммом *B. amyloliquefaciens* на 26%. На массу одной ягоды влияние препаратов не проявилось. В результате продуктивность одного куста статистически достоверно возрастала в вариантах со штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, урожайность, соответственно, составила 4,03 и 4,05 т/га (на 19-20% выше контроля).

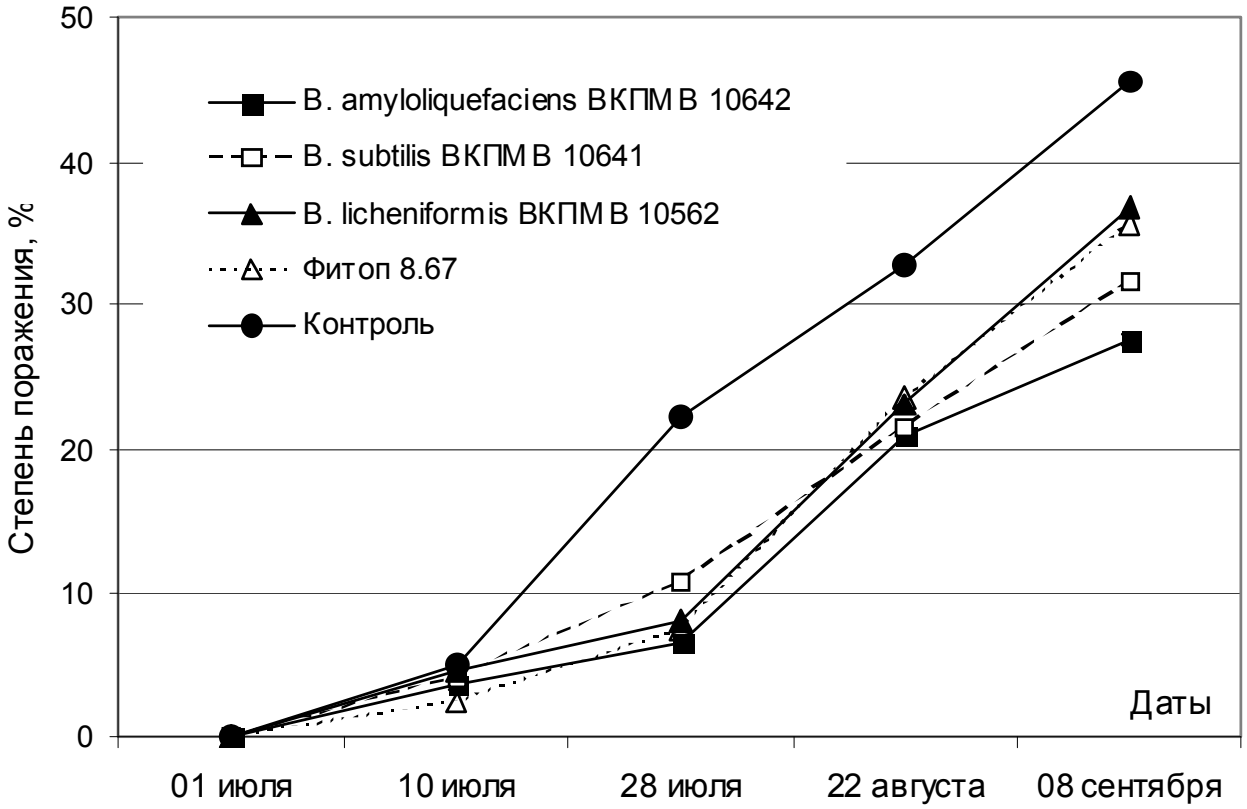

Рис. 3.22. Динамика степени поражения посадок черной смородины совокупностью пятнистостей листьев (антракноз и септориоз) в зависимости от обработки бактериальными штаммами (%, СХА «Сады Сибири», 2012 г., сорт Софья, производственный опыт)

$НСР_{01}$ по вариантам = 4,5%; $НСР_{01}$ по срокам = 4,0

Заметное повышение урожайности в варианте с обработкой штаммом *B. subtilis*, проявлявшим относительно низкую биологическую эффективность во влиянии на пятнистости листьев, вероятно, объясняется тем, что данный штамм (как и другие штаммы р. *Bacillus*) обладает не только антагонизмом к фитопатогенам, но и антистрессовым действием на само растение, что могло проявиться в условиях засухи.

Таблица 3.11.

Влияние обработок бактериальными штаммами на урожайность черной смородины (%, средние за 2 года: 2011-2012 гг. СХА «Сады Сибири», сорт Софья, производственный опыт)

Варианты	Количество соцветий (кистей) на 1 продуктивной ветви, шт.	Количество ягод на 1 продук-тивной ветви, шт.	Масса 1 ягоды, г	Масса ягод с 1 куста, г	Урожай-ность, т/га
B. amyloliquefaciens ВКПМ В 10642	37,9*	149,2*	0,79	1222,2*	4,03*
B. subtilis ВКПМ В 10641	37,1*	133,6	0,90	1228,3*	4,05*
B. licheniformis ВКПМ В 10562	33,3	122,0	0,82	1087,7	3,59
Фитоп 8.67	33,9	129,6	0,82	1131,4	3,73
Контроль	29,7	118,0	0,87	1024,3	3,38
$НСР_{05}$	6,6	25,0	$F_ф < F_{05}$	140,2	0,46

* - различия с контролем достоверны

Таким образом, проведенное производственное испытание показало достаточную эффективность штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* в защите плодоносящих насаждений черной смородины от пятнистостей листьев путем опрыскивания надземной части растений в фазу налива плодов [Беляев и др., 2012в]. Применение препаратов на основе данных штаммов может в перспективе не только повысить экологическую безопасность технологии возделывания, но и в целом улучшить здоровье растений черной смородины.

Влияние штаммов бактерий рода *Bacillus* на размножение черной смородины одревесневшими черенками

В 2010-2012 гг. проведено испытание действия штаммов бактерий рода *Bacillus* на вегетативное размножение растений черной смородины одревесневшими черенками в условиях производственного питомника [Беляев и др., 2014].

Опыты закладывали в 2010 г. на растениях сорта Ксюша, в 2011-2012 гг. – на сорте Лама, укореняемых из одревесневших черенков (фрагментов длиной 15 см из заготовленного с осени однолетнего прироста). Срок посадки черенков смородины – 1-я декада мая, срок внесения штаммов – 3-я декада мая (рост каллусных новообразований, температура почвы в слое 0-15 см выше +10 °С). Концентрация применяемых штаммов в опытных вариантах составляла 10^5 КОЕ/мл. Количество обрабатываемых растений – 700-900 штук на 1 вариант (плотность высадки – 100 растений/м^2). Штаммы вносили опрыскиванием поверхности почвы рабочей суспензией, содержащей биоагент, с последующим промачиванием почвы на глубину 10-15 см путем полива водой.

Повышенная транспирация в период образования каллуса и закладки корней, несмотря на условия орошения, ослабляла растения, в связи с этим окореняемость черенков смородины в вариантах опыта составляла 46-51 % и достоверного влияния изучаемых штаммов на данный показатель не выявлено.

В 2010 г. из-за холодных и засушливых условий первой половины вегетации процессы регенерации и роста у черенкованных растений сильно тормозились. К концу вегетации длина вегетативного прироста в контроле составляла лишь 14,4 см (табл. 3.12), формировался один побег. Под влиянием обработки штаммом *B. subtilis* прирост надземной части существенно ($P<0,05$) увеличивался на 4,5 см (в 1,4 раза), под влиянием обработки штаммами *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis* достоверные различия по данному параметру не доказаны.

Длина корневой системы у саженцев в контроле в среднем составляла 20,7 см, под влиянием обработок штаммами длина корней достоверно увеличивалась во всех вариантах. В частности, под действием штамма *B. amyloliquefaciens*– на 3,1 см (15 %), под действием штамма *B. subtilis* – на 4,2 см (21 %), под действием штамма *B. licheniformis*– на 2,8 см (14%).

Таблица 3.12.

Влияние обработки бактериальными штаммами на параметры роста и биомассу одревесневших черенков черной смородины (сорт Ксюша, питомник СХА «Сады Сибири», учет 25 сентября 2010 г.)

Вариант	Длина однолетнего прироста		Длина корневой системы		Биомасса одного растения	
	см	% к контролю	см	% к контролю	г	% к контролю
Контроль (без обработки)	14,4	-	20,7	-	12,1	-
B. amyloliquefaciens ВКПМ В-10642	14,5	0,7	23,8*	15,3	13,7	12,8
B. subtilis ВКПМ В-10641	19,9*	38,7	24,9*	20,6	18,8*	55,4
B. licheniformis ВКПМ В-10562	15,4	7,3	23,5*	13,8	14,1	16,1
$НСР_{05}$	2,1		1,8		3,4	

* - разность с контролем статистически достоверна

В контрольном варианте средняя биомасса одного растения составила 12,1 г. Тенденция увеличения биомассы наблюдалась во всех опытных вариантах, однако достоверно доказано возрастание биомассы под действием штамма *B. subtilis* – на 6,7 г (55,4 %).

Таким образом, в процессе укоренения одревесневших черенков наибольший эффект по всем параметрам в 2010 г. был достигнут при использовании штамма *B. subtilis*, однако стимулировали рост корневой системы все испытанные штаммы.

В 2011-2012 гг. опыты были заложены на растениях сорта Лама, преимущественно размножаемых в питомнике СХА «Сады Сибири».

Укореняемые из черенков растения формировали за вегетацию, в среднем, от 1,4 до 2,0 побегов, достоверные различия вариантов по этому показателю в опыте не были доказаны. Длина однолетнего прироста основного побега (лидера) составляла (табл. 3.13) в контроле 40,1 см (в 2011 г.) и 44,6 см (в 2012 г). Применение штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* в среднем за 2 года привело к достоверному увеличению длины прироста на

9,7-10,5 см (23-25 %) относительно контроля. При использовании штамма *B. licheniformis* и смесевого препарата фитоп 8.67 превышение длины прироста над контролем было также достоверным, но менее выраженным – на 4,8-7,6 см.

Таблица 3.13.

Длина однолетнего прироста основного побега и длина корневой системы при укоренении одревесневших черенков черной смородины, обработанных бактериальными штаммами (сорт Лама, питомник СХА «Сады Сибири», учеты 17-20 сентября 2011-2012 гг.)

Вариант	2011 год	2012 год	Средние за 2 года	% к контролю
Длина однолетнего прироста, см				
Контроль (без обработки)	40,1	44,6	42,3	-
B. amyloliquefaciens ВКПМ B-10642	50,8	53,3	52,0	22,9
B. subtilis ВКПМ B-10641	53,8	51,9	52,8	24,8
B. licheniformis ВКПМ B-10562	51,9	47,9	49,9	17,9
Фитоп 8.67	48,0	46,2	47,1	11,2
$НСР_{05}$ по вариантам	4,5			-
$НСР_{05}$ по годам	2,9			-
Длина корней, см				
Контроль (без обработки)	23,8	21,7	22,7	-
B. amyloliquefaciens ВКПМ B-10642	38,0	27,3	32,6	43,6
B. subtilis ВКПМ B-10641	40,0	29,9	34,9	53,8
B. licheniformis ВКПМ B-10562	35,8	28,9	32,4	42,5
Фитоп 8.67	36,8	30,3	33,5	47,6
$НСР_{05}$ по вариантам	3,4			-
$НСР_{05}$ по годам	2,1			-

Еще более значительным было влияние бактериальных штаммов на длину корневой системы, формировавшейся на обработанных растениях. В контроле растения имели в конце вегетации среднюю длину корней 23,8 см (в 2011 г.) или 21,7 см (в 2012 г.). Наибольший эффект от обработки в 2011 г. проявился в вариантах с применением штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B.*

subtilis – удлинение корневой системы на 14,2-16,2 см (в 1,6-1,7 раза). В 2012 г. максимальное влияние установлено в вариантах с *B. subtilis* и смесью 3-х штаммов (фитоп 8.67) – длина корневой системы увеличилась на 8,2-8,6 см (в 1,4 раза). В среднем за 2 года изучаемые штаммы достоверно увеличивали длину корневой системы на 43-54 %, что очень важно для формирования адаптивных свойств и товарного качества саженцев.

Наиболее выраженное влияние на биомассу формирующихся растений зафиксировано при использовании штамма *B. subtilis* ВКПМ B-10641 – увеличение средней массы 1 растения на 17 г и в варианте с препаратом фитоп 8.67 – на 13 г, при 35,0 г/растение в контроле в среднем за 2 года (табл. 3.14). Данные препараты увеличивали биомассу растений, соответственно, на 48,7 и 37,8 %.

Таблица 3.14

Биомасса растений и доля стандартных саженцев при укоренении одревесневших черенков черной смородины обработанных бактериальными штаммами (сорт Лама, питомник СХА «Сады Сибири», учеты 17-20 сентября 2011-2012 гг.)

Вариант	2011 г.	2012 г.	Средние за 2 года	% к контролю
Средняя биомасса 1 растения, г				
Контроль (без обработки)	23,9	46,0	35,0	-
B. amyloliquefaciens ВКПМ B-10642	32,8	61,0	46,9	34,1
B. subtilis ВКПМ B-10641	37,1	66,9	52,0	48,7
B. licheniformis ВКПМ B-10562	29,9	58,3	44,1	26,1
Фитоп 8.67	29,1	67,3	48,2	37,8
$НСР_{05}$ по вариантам	5,7			-
$НСР_{05}$ по годам	3,6			-

Полученные в производственных опытах в 2010-2012 гг. результаты демонстрируют возможности существенного повышения эффективности технологического процесса размножения черной смородины одревесневшими черенками при включении в него обработки штаммами

бактерий рода *Bacillus* вследствие стимулирования ростовых процессов, повышения качества и сокращения сроков получения продукции.

3.3. Полифункциональное действие *Bacillus thuringiensis*

Кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* являются наиболее широко используемыми микроорганизмами для контроля численности насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур и леса [Lacey et al., 2015], их применение против фитофагов обсуждалось в предыдущей главе. Разные подвиды *B. thuringiensis* хорошо известны в качестве основы энтомопатогенных биопрепаратов, вместе с тем одновременное проявление инсектицидных и антагонистических свойств *B. thuringiensis* значительно усиливает регулирующую роль этой бактерии в природных экосистемах, а также повышает эффективность биопрепаратов, ее содержащих.

Как отмечалось в разделе 3.1., проведен ряд исследований по полифункциональному влиянию дельта-эндотоксина *B. thuringiensis.* Одновременно с антибактериальным и антифунгальным влиянием дельта-эндотоксина на возбудителей болезней растений в лабораторных и полевых испытаниях показан ростостимулирующий эффект в отношении капусты белокочанной, огурца и других культур (Каменек и др., 2005, Климентова и др., 2010; Каменек и др., 2011]. Отметим, что при использовании дельта-эндотоксина против болезней на белокочанной капусте, его выделяли из штамма Z-52 подвида *kurstaki*, который является основой препарата лепидоцид, широко применяемого для защиты этой овощной культуры от насекомых отряда Lepidoptera. Использование этого же токсина в лабораторных условиях на растениях овса показало защитное действие метаболита по отношению к возбудителю бурой ржавчины, при этом авторы проводят аналогию с влиянием иммуноиндукторов [Каменек и др., 2006]. Помимо исследований, проведенных с дельта-эндотоксином штамма Z-52 подвида *kurstaki*, продемонстрирована антифунгальная активность токсина,

выделенного из штамма *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis*, в отношении некоторых фитопатогенов, причем выявлена зависимость от концентрации дельта-эндотоксина [Каменек и др., 2008].

Основная масса работ посвящено полифункциональному влиянию смеси спор и токсинов *B. thuringiensis* [Кузин и др., 2008; Zhou et al., 2008; Martinez-Absalon et al., 2014]. Антимикробное влияние споро-кристаллического комплекса пяти подвидов *B. thuringiensis:* subsp *aizawai,* subsp. *galleriae,* subsp. *kurstaki,* subsp. *morrisoni,* subsp. *sotto* обнаружено *in vitro* против *Botrytis cinerea*, а *in vivo* штаммы были активными против возбудителей фитофтороза томатов *Ph. infestans*, бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondite*, серой гнили томатов *B. cinerea* и мучнистой росы ячменя *Blumeria graminis f.sp. hordei* в опытах, проведенных в ростовых камерах и против мучнистой росы огурцов – в теплице [Choi et al., 2007]. Интересные данные получены при изучении изолятов трех подвидов *B. thuringiensis (kurstaki, dendrolimus, thuringiensis)* в сравнении с *B. subtilis*, выделенных авторами в условиях Молдавии [Николаев, Николаева, 2015]. *In vitro* самая высокая антифунгальная активность среди *B. thuringiensis* обнаружена у подвида *kurstaki,* по действию на *Sclerotinia sclerotiorum, F. oxysporum var. orthoceras* и *Alternaria alternata* он не уступал *B. subtilis*. Авторы отметили, что для всех изолятов *B. thuringiensis* в отношении медленнорастущих фитопатогенов зоны ингибирования были больше, чем в случае быстрорастущих патогенов. Показано, что *B. thuringiensis* ингибирует рост *B. cinerea in vitro* и уменьшает развитие некротической зоны растений, вызванной этим патогеном [Martinez-Absalon et al., 2014]. Штамм С-25 значительно подавлял *Sclerotinia minor*, возбудителя болезни растений салата [Shrestha et al., 2015]. Исходя из своих исследований, авторы полагают, что по крайней мере частично, это связано с деградацией клеточной стенки фитопатогена под действием ферментов (хитиназы и др.). Высказывается также мнение, что определенную роль в подавлении болезней растений

энтомопатогенной бациллой играет антибиотик цвиттермицин А [Zhou et al., 2008], хотя основополагающее значение имеют липопептиды (раздел 5.3.1).

В России сотрудниками ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии на протяжении нескольких лет изучалось полифункциональное действие экспериментального препарата бацикол на основе споро-кристаллического комплекса *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. Предложены такие препаративные формы как сухой порошок, паста и жидкий препарат. Авторами показано, что штамм N 25 бактерии *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (BtH_{10}) как основа бацикола обладал выраженными энтомоцидными свойствами, в том числе в отношении колорадского жука – основного фитофага картофеля [Гришечкина, Смирнов, 2010; Смирнов, Гришечкина, 2011]. В то же время штамм проявлял полифункциональное действие в способности подавлять некоторых возбудителей болезней растений и стимулировать рост растений. Так, полифункциональное действие бацикола на землянике в оздоровлении растений выражалось в снижении развития серой гнили (возбудитель *Botrytis cinerea)*, повреждения долгоносиком и стимулировании роста растений [Смирнов, 2000; Гришечкина, Смирнов, 2010]. В результате подробных лабораторных исследований трех биопрепаратов на основе разных подвидов *B. thuringiensis* (бацикола, битоксибациллина и бактокулицида) в отношении возбудителей болезней доказано полное подавление возбудителя серой гнили всеми препаратами, но в разных концентрациях [Смирнов, Гришечкина, 2010]. Кроме того, выявлен антифунгальный эффект и в отношении других грибных фитопатогенов. На растениях томата этот препарат уменьшал поражение фузариозной гнилью и проявлял ростостимулирующий эффект. Авторы полагают, что определяющим в механизме действия препаратов может быть синергический эффект от влияния как продуцируемых бациллой хитиназ, так и антибиотиков (липопептидов). Многолетние полевые и вегетационные опыты, проведенные в разных областях России против вредителей и

болезней зерновых, овощных, ягодных и других культур убедительно показали полифункциональое действие бацикола [Гришечкина, 2015].

В наших исследованиях продемонстрировано, что существует взаимная обусловленность функционирования трехкомпонентной системы: энтомопатогенная бактерия *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (BtH_{10}) – возбудитель ризоктониоза картофеля *R. solani* - растения *Solanum tuberosum* при обработке клубней перед посадкой бактериальной суспензией в условиях Западной Сибири [Бахвалов и др., 2015]. Известно, что внесение в агроценозы картофеля химических фунгицидов для снижения численности возбудителя ризоктониоза помимо положительного защитного действия на растения оказывает отрицательное влияние в целом на окружающую среду, нарушая экологические связи между организмами [Heydari, Pessarakli, 2010]. Поэтому в последние годы все большее внимание при возделывании картофеля уделяют замене химических пестицидов на биологические препараты. В первую очередь в лабораторных условиях нами выявлено, что штамм BtH_{10} подавлял рост фитопатогенного гриба *R. solani* местной популяции при использовании концентраций 10^6, $2x10^6$ и $5x10^6$ КОЕ/мл (табл. 3.16). Этот штамм в трех концентрациях достоверно ингибировал рост возбудителя ризоктониоза картофеля при взаимодействии с фитопатогенным грибом ($P < 0,05$). Самая высокая ингибирующая активность (до 89%) наблюдалась при наибольшей из использованных концентраций бактериальной суспензии ($5x10^6$ КОЕ/мл) (табл.3.16).

Таблица 3.16

Влияние бактериального штамма *BtH*$_{10}$ на рост фитопатогенного гриба *R. solani in vitro*

Вариант	Диаметр колоний, см, по суткам			Ингибирующая активность, %, по суткам		
	3	5	7	3	5	7
Контроль	4,2	9,0	9,0	-	-	-
BtH$_{10}$ 10^6 КОЕ/мл	1,3	1,7	3,3	69,0	81,0	63,3
BtH$_{10}$ 2x10^6 КОЕ/мл	1,3	1,5	1,5	69,0	83,3	83,3
BtH$_{10}$ 5x10^6 КОЕ/мл	1,2	1,0	1,0	71,4	88,9	88,9
НСР$_{05}$ по вариантам и срокам	0,2 ($F_ф$= 542,4 > F_{05} = 2,0; n=60)			-		

Антагонистический потенциал бактерии в отношении местного штамма фитопатогенного гриба оказался существенно выше, чем определенный ранее для другого штамма *R. solani* [Смирнов, Гришечкина, 2011]. Полученные в отношении сибирского штамма возбудителя ризоктониоза результаты согласуются с данными других авторов, показавших *in vitro* подавление роста этого фитопатогенного гриба при взаимодействии с бактериальными штаммами *Bt*, выделенными в других географических ареалах [Knaak et al., 2007; Mojica-Marin et al., 2008]. В 2013 - 2014 гг. в условиях фитоценоза картофеля в Западной Сибири исследуемый штамм *BtH*$_{10}$ значительно снизил пораженность стеблей и столонов картофеля возбудителем ризоктониоза на двух сортах картофеля разных групп спелости Любава и Луговской (табл.3.17).

В контрольном варианте на обоих сортах через 6 недель после посадки на стеблях преобладали обширные язвы, окольцовывавшие стебель, что по шкале Франка соответствовало 3-5 баллам поражений.

В то же время, после предварительной обработки клубней суспензией *BtH*$_{10,}$ в период вегетации стебли были или совершенно здоровыми, или с минимальным баллом поражения (штрихи и язвы не превышали 25 мм). В течение двух лет исследований под действием бактерии проявление болезни

на стеблях и столонах снижалось (P<0,05) по сравнению с контролем, хотя в разной степени в зависимости от сорта.

Таблица 3.17.

Влияние бактериального штамма *BtH10* на развитие и распространенность ризоктониоза на стеблях и столонах картофеля через 6 недель после посадки

Сорт	Вариант	Развитие болезни на стеблях, %		Распространенность болезни на столонах, %	
		2013	2014	2013	2014
Любава	контроль	33,3	14,3	40,0	12,5
	BtH10	2,7	1,9	16,2	7,1
Луговской	контроль	18,4	20,9	29,4	22,2
	BtH10	2,5	2,5	14,3	12,5
$НСР_{05}$ по штамму, сортам и годам		4,2 ($F_ф$=35,4 > F_{05} = 2,7; n=24)		3,6 ($F_ф$=29,7> F_{05} = 2,7; n=24)	

Так, в более влажном 2013 г. влияние энтомопатогенной бактерии на развитие ризоктониоза на стеблях было сильнее на сорте Любава (уменьшение уровня развития болезни в 12,5 раз) по сравнению с сортом Луговской, для которого это соотношение составило 7,4, а распространенность болезни на столонах снижалась примерно одинаково по сортам – более чем вдвое. В более сухом 2014 г. характер действия бактериального штамма на ризоктониоз сохранился, несмотря на значительное снижение фона пораженности на сорте Любава. Уровень развития болезни на стеблях уменьшился в 7,5 - 8,3 раза, а распространенность ризоктониоза на столонах обоих сортов картофеля – почти вдвое (табл. 3.17). Оценка пораженности ризоктониозом клубней, полученных в конце вегетации, также свидетельствует о проявлении энтомопатогенной бактерией антифунгальных свойств. В 2013 г. при предпосадочной обработке клубней бактериальным штаммом наблюдали

достоверное (P <0,05) снижение склероциального индекса на клубнях нового урожая в 3,8 раза (сорт Любава) и в 5,3 раза (сорт Луговской), в 2014 г. это соотношение составило 1,4 и 2,8 раза соответственно (рис.3.23).

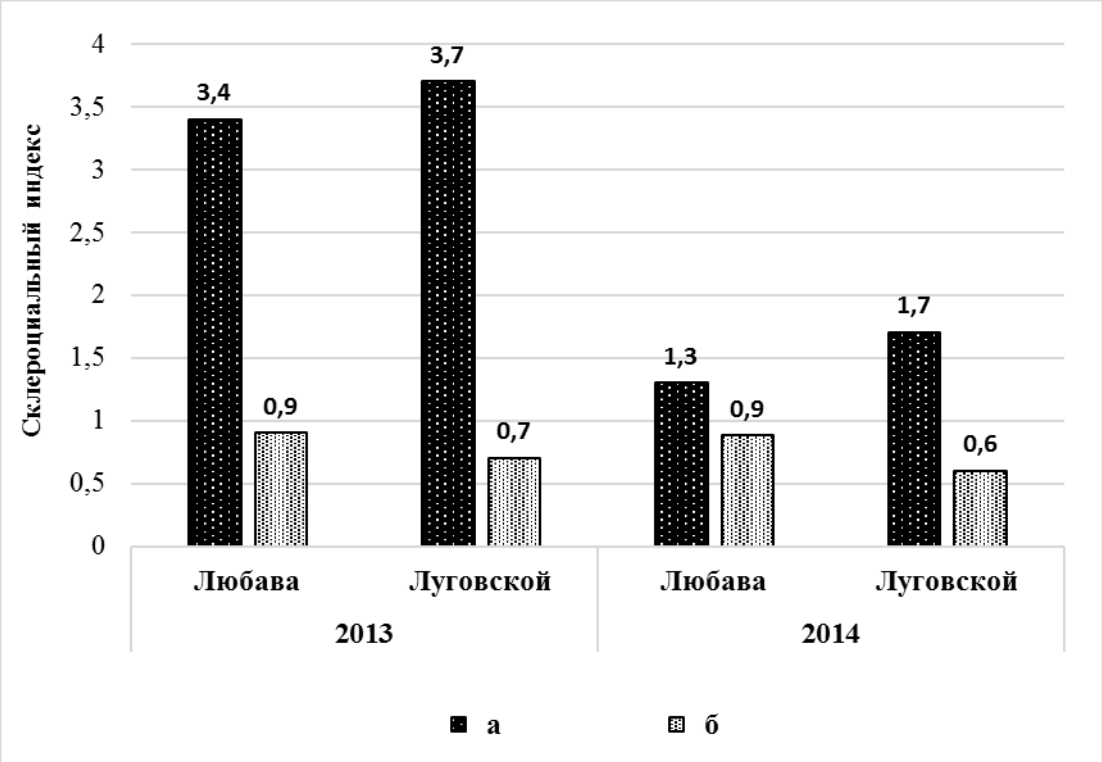

Рис. 3.23. Склероциальный индекс *(S.i.)* клубней картофеля сортов Любава и Луговской, полученных в конце вегетации: а) в контрольном варианте; б) при действии BtH_{10}. $НСР_{05}$ по штамму, сортам, годам =0,2 ($F_ф$= 11,0 > F_{05} = 2,7; n=24).

Влияние разных штаммов *B. thuringiensis* на фитопатогенный гриб *R. solani* изучалось другими авторами при обработке семян огурца с последующим проращиванием их в горшочках [Seo et al., 2012], а также при обработке семян перца чилийского с последующим наблюдением за проростками в чашках Петри [Mojica-Marin et al., 2008]. В обоих случаях действие штаммов *B. thuringiensis* выражалось в подавлении развития возбудителя ризоктониоза и стимулировании роста растений. Это подтверждается работами, посвященными влиянию штаммов *B. thuringiensis,* выделенных из растений, почвы и насекомых, на другие фитопатогенные грибы, как в лабораторных опытах, так и в условиях фитоценозов [Каменек и др., 2011; Reyes-Ramirez A. et al., 2004; Akram et al., 2013; Tao et al., 2014;].

Авторы объясняют антифунгальное действие *B. thuringiensis* продуцированием бактерией различных вторичных метаболитов, а также индуцированием системной устойчивости растений. Антагонистическое влияние *B. thuringiensis* может быть обусловлено продуцированием энтомопатогенной бактерией липопептидных биосурфактантов [Hathout et al., 2000; Kim et al., 2004]. Так, выделенный из *B. thuringiensis* CMB26 липопептид фенгицин проявил одновременно инсектицидную и антифунгальную активность [Kim et al., 2004]. Как отмечено выше, биосурфактанты продуцируют многие штаммы бактерий рода *Bacillus*, отобранные для биологического контроля болезней растений, в том числе ризоктониоза [Yu et al., 2002; Elkahoui et al., 2014; Cawoy et al., 2014]. Наблюдаемый рядом авторов наряду с антифунгальным одновременный ростостимулирующий эффект энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* подтвердился и в нашем исследовании. Предварительная обработка клубней картофеля суспензией тестируемого штамма BtH_{10} оказала стимулирующий эффект на растения картофеля, увеличив всхожесть, длину и количество стеблей. Так, в 2014 г. всхожесть растений картофеля сортов Любава и Луговской, клубни которых были обработаны суспензией $BtH_{10,}$ была выше контрольных в 2-3 раза. Ростостимулирующее действие бактериального штамма выразилось в увеличении высоты и количества стеблей растения (рис. 3.24).

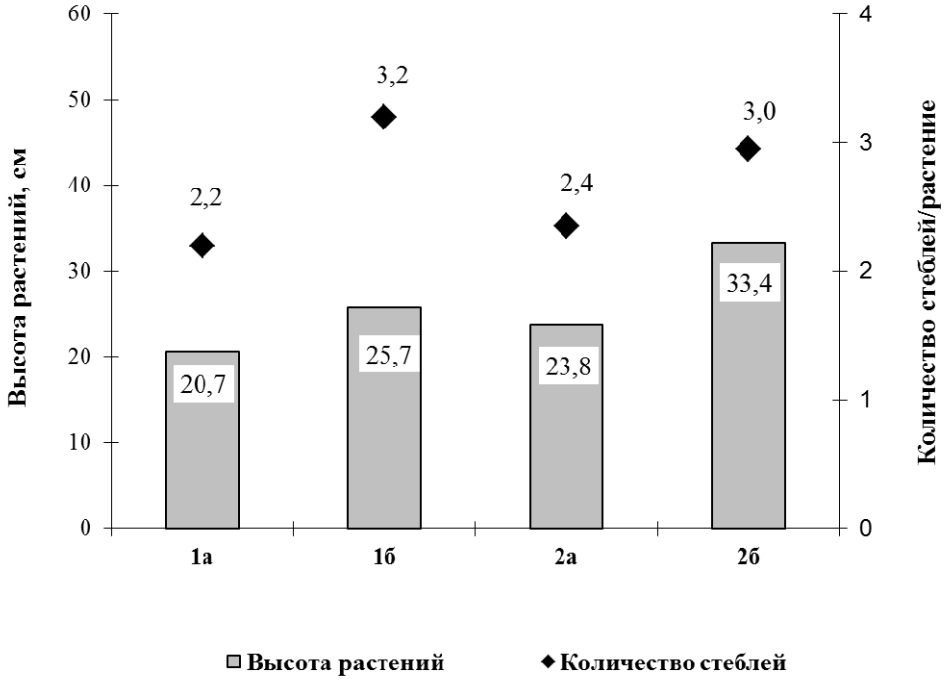

Рис. 3.24. Высота растений ($НСР_{05}$ по штамму и сорту =1,5) и количество стеблей на 1 растение картофеля ($НСР_{05}$ по штамму и сорту =0,25) в среднем за два года. 1– сорт Любава; 2– сорт Луговской: а) контрольный вариант; б) обработка клубней BtH_{10}.

Таблица 3.18.

Биомасса и фракционный состав полученных в конце вегетации клубней картофеля

Сорт	Вариант	Фракционный состав клубней (средние за 2 года), %			Биомасса клубней, г/растение		
		мелкая	средняя	крупная	2013 г.	2014 г.	средние за 2 года
Любава	Контроль	7,7	27,4	64,9	645,6	466,3	556,0
	BtH_{10}	2,4	12,7	84,9	1052,1	650,9	851,5
Луговской	Контроль	7,5	35,0	57,6	207,4	349,3	278,4
	BtH_{10}	1,1	12,5	86,4	538,5	932,0	735,3
$НСР_{05}$ по штамму, сортам и годам		-			64,6 ($F_ф$= 42,9 > F_{05} = 2,7; n=24)		

Таким образом, анализ функционирования трехкомпонентной системы: энтомопатогенная бактерия *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (BtH_{10}) – возбудитель ризоктониоза картофеля *R. solani* – растения *S. tuberosum* выявил определяющую роль полифункциональных свойств BtH_{10}.

Патогенный для колорадского жука бактериальный штамм *BtH*$_{10}$ N 25 проявил антифунгальную активность в отношении возбудителя ризоктониоза картофеля *R. solani* в лабораторных и полевых условиях Западно-Сибирского региона. Обработка клубней картофеля перед посадкой бактериальной суспензией приводила к уменьшению пораженности ризоктониозом стеблей и столонов растений, а также полученных в конце вегетации клубней нового урожая в 2013-2014 гг. Одновременно наблюдали ростостимулирующее влияние внесенной в фитоценоз картофеля бактерии *BtH*$_{10}$, выраженное в увеличении всхожести, высоты и количества стеблей на 1 растение. Общая положительная тенденция прослеживалась в разные по экологическим условиям годы и на растениях двух разных сортов, хотя наблюдалось некоторое влияние этих факторов на действие *BtH*$_{10}$. В целом действие тестируемой бактерии на растения картофеля и степень поражения их ризоктониозом выражалось в увеличении продуктивности культуры (табл. 3.18). С учетом изначально энтомопатогенной активности бактерии в отношении основного фитофага картофеля - колорадского жука, суммарная полифункциональная активность *BtH*$_{10}$ – основы экспериментального препарата бацикол (инсектицидная, антифунгальная и ростостимулирующая) является важным фактором биологического контроля организмов, повреждающих культуру, а также формирования продуктивного потенциала картофеля в Западной Сибири.

Представляло интерес выявить полифункциональный эффект этой бактерии одновременно против колорадского жука и ризоктониоза картофеля, дополнив обработку клубней перед посадкой опрыскиванием бактериальной суспензией в период вегетации. В связи с тем, что для Западной Сибири перспективен сорт раннеспелого картофеля Юна, на нем проведено изучение полифункциональных свойств данной энтомопатогенной бактерии [Tsvetkova et al., 2016].

В лабораторных условиях при использовании листьев этого сорта в качестве кормового субстрата гибель личинок 1-го и 2-го возрастов под

влиянием *BtH10* начиналась уже на первые сутки, а на 5-е достигала 100%, достоверно отличаясь от гибели в контрольном варианте ($p<0,05$). Личинки более старших возрастов более устойчивы к бактерии, гибель на 10-е сутки была меньше в 2,6 и 1,6 раза соответственно по сравнению с личинками младших возрастов ($p<0,05$) (табл. 3.19). Подобная зависимость обычна для популяций колорадского жука в разных географических регионах при действии *B. thuringiensis* разных подвидов [Alyokhin, 2009].

Таблица 3.19.

Биологическая эффективность *BtH10* в отношении личинок колорадского жука в лабораторном опыте.

Возраст, стадия	Биологическая эффективность по суткам, %					
	3	5	7	10	15	20
L_1	80,0	96,7	100,0	100,0	100,0	100,0
L_2	66,7	93,3	93,3	100,0	100,0	100,0
L_3	30,0	35,7	36,9	58,8	75,7	81,7
L_4	10,0	11,5	16,1	34,5	37,7	74,1
среднее	37,3	47,4	49,6	59,0	69,0	85,0
$НСР_{05}$ по сроку = 2,24; по фазе/возрасту = 1,9 экз.						

В полевых условиях в течение двух лет исследований гибель колорадского жука при использовании бактериальной суспензии была не менее 60% через 7 дней после опрыскивания и не менее 70% через 10 дней (рис. 3.25).

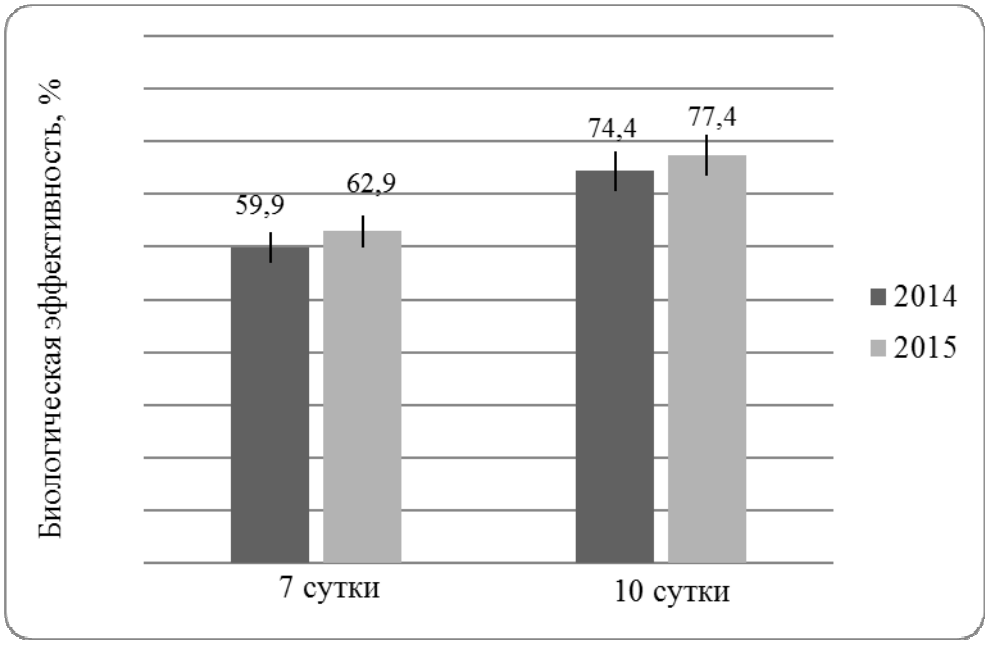

Рис.3.25 Биологическая эффективность *BtH*$_{10}$ в отношении личинок колорадского жука в полевых опытах (%)

В 2014 - 2015 гг. бактериальный штамм *BtH*$_{10}$ при первоначальной обработке посадочного материала и последующем опрыскивании растений в период вегетации вызвал значительное снижение пораженности стеблей и столонов картофеля возбудителем ризоктониоза (табл.3.20).

Таблица 3.20

Влияние бактериального штамма BtH$_{10}$ на развитие и распространенность ризоктониоза на стеблях и столонах картофеля, %

Срок учета, недели	Варианты опыта	Средний балл поражения стеблей		Развитие болезни на стеблях, %		Распространенность болезни на столонах, %	
		2014 г.	2015	2014 г.	2015	2014 г.	2015
4	Контроль	0,2	0	6,2	0	0	0
	BtH$_{10}$	0	0	0,8	0	0	0
6	Контроль	0,5	0,68	12,6	13,3	18,2	9,5
	BtH$_{10}$	0,1	0,08	1,9	1,5	9,1	0
10	Контроль	1,5	0,44	59,6	40,0	36,0	28,6
	BtH$_{10}$	0,1	0,16	2,5	3,5	13,8	2,3
НСР$_{05}$		0,25	0,30	4,0		3,3	

Так, в 2014 г. средний балл пораженности стеблей ризоктониозом (по сравнению с контролем) статистически достоверно ($p<0,05$) уменьшался в 5-15 раз через 6-10 недель, а в 2015 г. – в 8,7-2,7 раз. Развитие болезни на стеблях в среднем по двум годам, также снижалось в 9,4-16,6 раз в эти периоды. Сравнивая данные, полученные при обработке в 2014 г. этой бактериальной суспензией клубней картофеля раннеспелого сорта Любава без опрыскивания [Бахвалов и др., 2015], можно констатировать, что влияние на развитие ризоктониоза, полученное при дополнительном опрыскивании в период вегетации, значительно выше. Усиление защитных сил растений картофеля против ризоктониоза подтверждено измерением активности пероксидазы в листьях картофеля контрольных и обработанных растений (рис.3.26).

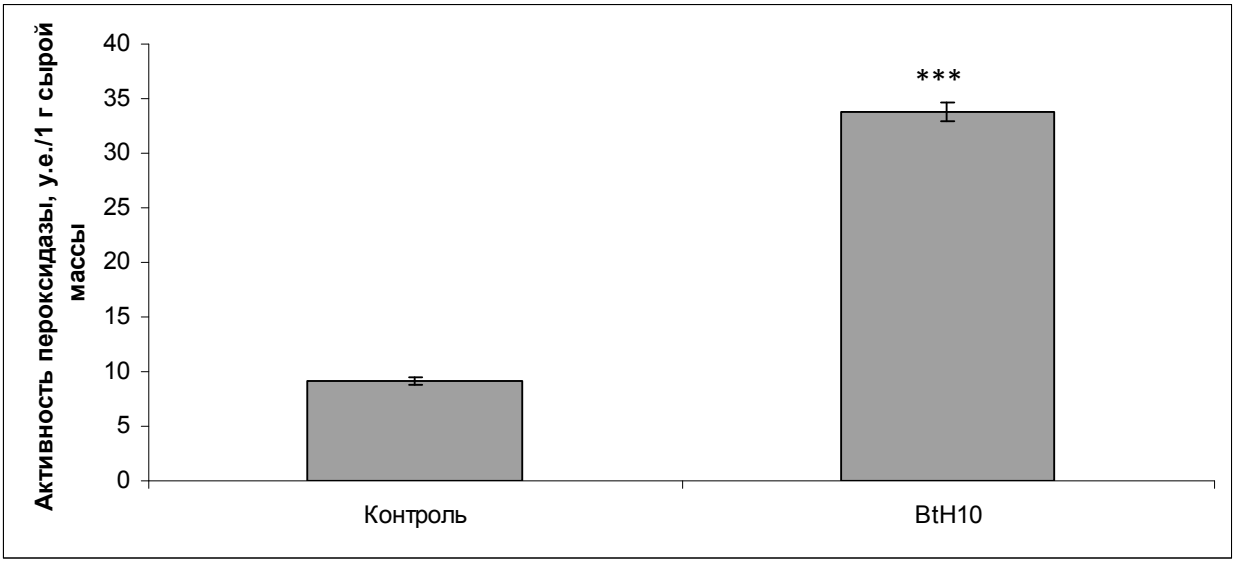

Рис.3.26. Активность пероксидазы в листьях картофеля сорта Юна при обработке бактериальной суспензией.

Примечание. *** - $p <0,001$, уровень достоверности отличий между опытом и контролем

Применение BtH_{10} этими двумя способами обеспечило также снижение распространенности болезни на клубнях нового урожая в 2,9 раза (рис. 3.27), а также значительное уменьшение заселенности их склероциями.

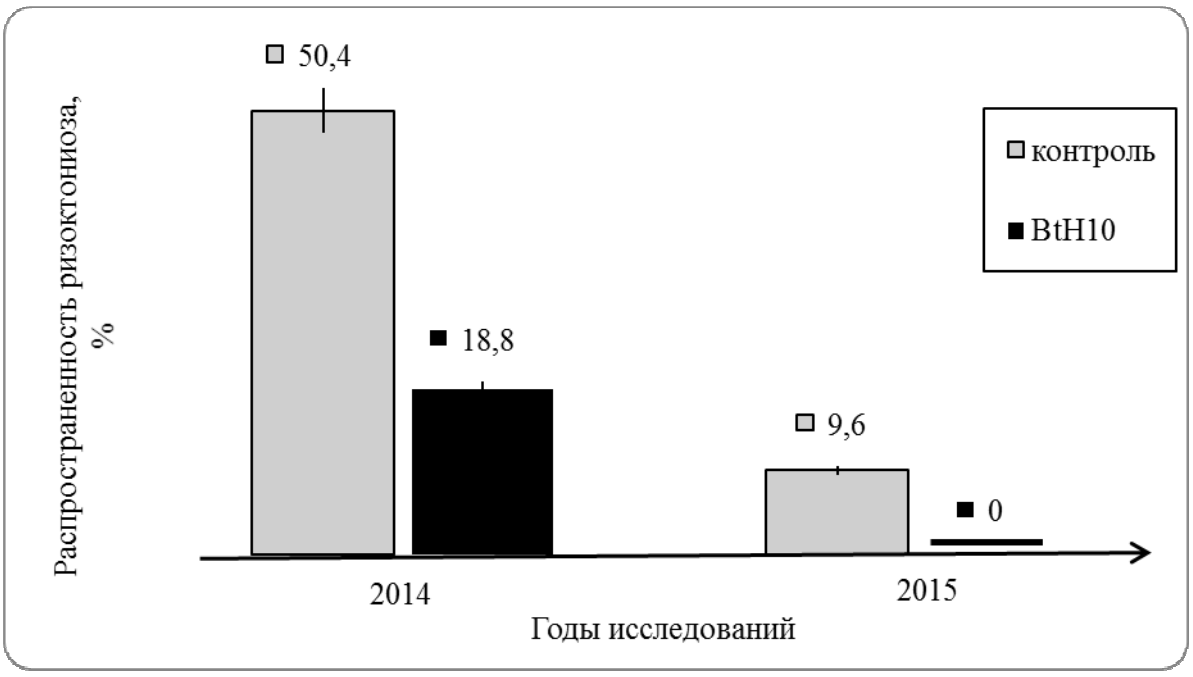

Рис. 3.27. Влияние бактерии на снижение распространенности ризоктониоза на клубнях нового урожая, %

Засушливый вегетационный период 2014 года, особенно в фазу бутонизации-цветения (в июне осадков выпало в 2,9 раза меньше нормы и составило всего 31% от нормы), когда начиналось формирование клубней, в большей степени повлиял на развитие сетчатой формы (сетчатый некроз) ризоктониоза, чем склероциальной. В дальнейшем, при увеличении поверхности клубней пятна растрескивались, образуя сетку, что наблюдали при анализе клубней после уборки урожая.

Клубни картофеля, собранные в 2014 г., были сильнее заражены склероциальной стадией ризоктониоза по сравнению с 2015 г. В 2015 г. распространенность болезни на клубнях была значительно ниже. В среднем по годам наблюдали снижение распространенности болезни на клубнях в 7,2 раза. В контрольном варианте клубни были поражены более тяжелой формой ризоктониоза – склероциальной, (склероции занимали ¼ и ½ поверхности), а также сетчатым некрозом и углубленной пятнистостью. Клубни, обработанные $BtH_{10,}$ были здоровыми или поаженными единичными склероциями и склероциями на 1/10 поверхности.

В дополнение к инсекицидной и антифунгальной активности бактерии выявлено ее ростостимулирующее действие при возделывании картофеля. В полевом опыте, под воздействием *BtH*$_{10}$, растения картофеля быстрее и лучше формировали куст. Статистически достоверно ($p<0,05$) увеличивалась высота растений по сравнению с контролем при учете на 6 неделю после посадки картофеля только в 2015 г. При учете через 6 недель после посадки – достоверное увеличение наблюдали в оба года исследований (в 1,2-1,3 раза). Доказано ($p <0,05$) увеличение количества стеблей на 1 куст, начиная с 4-й недели после посадки в оба исследуемых года – в 1,2-1,5 раза по сравнению с контрольным вариантом (табл. 3.21). Та же тенденция установлена по формированию столонов. Число образующихся столонов возрастало под воздействием бацилл, особенно в благоприятном по погодным условиям 2015 г. (в 2 раза). По годам существенные различия наблюдали, главным образом, начиная с 6 недель после посадки картофеля и далее. Количество образуемых столонов увеличивалось в среднем в 1,5 раза.

Таблица 3.21.

Ростостимулирующее действие штамма *BtH*$_{10}$

Вариант	Год	Высота растений (см)			Количество стеблей (шт.)			Количество столонов (шт.)		
		Недели после посадки								
		4	6	10	4	6	10	4	6	10
Контроль	2014	8,2	20,0	41,2	2,5	3,1	3,1	2	11	25
	2015	11,6	31,0	31,2	3,0	3,4	3,4	3	21	21
BtH$_{10}$	2014	11,3	22,7	48,3	3,1	3,9	4,2	3	16	29
	2015	13,9	37,1	40,8	4,2	5,0	5,2	4	40	42
НСР$_{05}$		2014 – 3,4 2015 – 4,2			2014 – 0,6 2015 – 0,9			2014 – 3,6 2015 – 4,9		

Ростостимулирующий, энтомопатогенный и антифунгальный эффекты бактерии выразились в улучшении качества клубней и выхода крупной фракции ($p<0,05$) (табл. 3.22).

Таблица 3.22.

Влияние *BtH*$_{10}$ на качество клубней нового урожая

Вариант опыта	Год	Фракционный состав клубней, %		
		мелкие	средние	крупные
Контроль	2014	4,8	34,9	60,3
	2015	13.1	63,7	23,2
BtH$_{10}$	2014	1,2	16,2	82,2
	2015	6,1	45,9	48,0

Наблюдалось увеличение биомассы клубней нового урожая (рис. 3.28). Под действием *BtH*$_{10}$, увеличение массы клубней происходило за счет образования более крупной фракции клубней (в 1,4-2,0 раза по сравнению с контролем) и снижения количества и массы мелких клубней (в 2-5 раз). Масса клубней с одного куста при обработке BtH$_{10}$ была в 1,4-1,6 раза выше, чем в контроле.

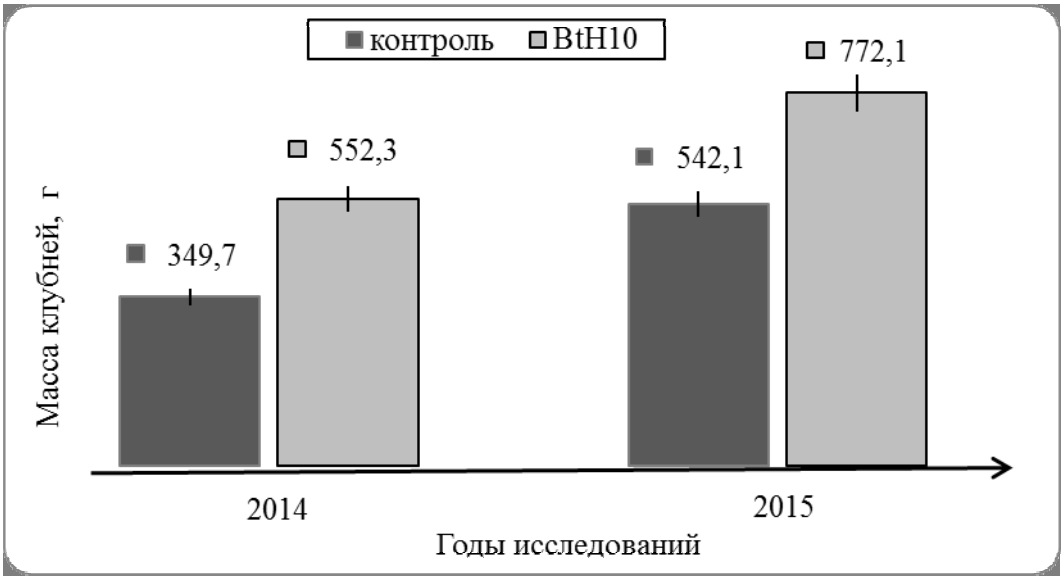

Рис. 3.28. Действие BtH$_{10}$ на биомассу клубней с одного куста, г

На основании имеющихся в отечественной и зарубежной литературе сведений, издлженных выше, можно полагать, что для проявления одновременно антагонистического, инсектицидного, ростостимулирующего эффектов с индукцией защитной реакции растений основополагающая роль принадлежит липопептидам, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, при

их использовании. Помимо этих метаболитов определенный вклад вносят ферменты, из которых доминирует хитиназа, а также другие метаболиты.

В плане полифункциональной активности *B. thuringiensis* в ризосфере растений следует отметить также имеющиеся в литературе данные по нематицидному действию этой бактерии. Первоначально эта активность в отношении фитопаразитических нематод связывалась с действием бета-экзотоксина [Devidas, Rehberger, 1992]. Исходя из этого, были успешно проведены испытания отечественного биопрепарата бикол, на основе *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis,* содержащего бета-экзотоксин. Биологическая эффективность бикола против галловой нематоды *Meloydogyne incognita* в теплицах составила 50% [Бухонова, 2004]. Затем появились работы, доказывающие нематицидное действие как в целом спорово-кристаллического комплекса, так и всех метаболитов, продуцируемых разными подвидами *B. thuringiensis* [Mohammed et al., 2008; Ashoub, Amara, 2010; Khan et al., 2010; Zhang et al, 2012].

Таким образом, исходя из материалов, изложенных в этом разделе, можно утверждать, что штаммы *B. thuringiensis* и препараты на их основе успешно выполняют функции управления здоровьем растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблемы экологической безопасности все острее стоят перед человеком во всех сферах его жизнедеятельности. В частности, в мировой практике для защиты сельскохозяйственных и лесных культур от болезней и растительноядных насекомых используют преимущественно синтетические пестициды, что приводит к возрастанию экологической напряженности лесных и аграрных экосистем. Химические пестициды накапливаются в почве, водоемах, грунтовых водах, загрязняя окружающую среду. Остаточные количества синтетических химикатов в продуктах питания наносят непосредственный ущерб здоровью людей. Экологически безопасной альтернативой возрастающему химическому прессу на экосистемы является микробиологический контроль численности фитофагов и фитопатогенов. Традиционно биологический контроль регуляции численности вредителей и болезней растений входит составной частью в интегрированную защиту растений. Однако в последнее время понятие «интегрированная защита растений» все более замещается более широким термином «управление здоровьем растений». В данном случае рассматривается не только прямое антагонистическое или энтомопатогенное влияние экологически безопасных микробных препаратов на возбудителей болезней растений или фитофагов, но и их многофункциональное действие на здоровье растений. Наряду с прямым действием на поражающий растение организм эти биопрепараты способны стимулировать рост и развитие растений, индуцировать их устойчивость к повреждающим факторам, оказывать благоприятное влияние на биологическую активность микробоценоза почвы, что ведет к улучшению здоровья растений, в итоге выражающемся в увеличении его продуктивности.

В монографии основное внимание уделено возможностям разработки и использования полифункциональных биопрепаратов на основе антагонистических и энтомопатогенных бактерий рода *Bacillus*, в максимальной степени отвечающим концепции управления здоровьем

растений. Используемое в зарубежной литературе название для большинства ризосферных бактерий, включая антагонистические бациллы, - ростостимулирующие (plant growth-promoting bacteria) уже указывает на их бифункциональный эффект на растение. Во многих странах, в том числе в России, возрастает интерес к исследованиям биопрепаратов на основе антагонистов, способных проявлять энтомоцидное действие и, с другой стороны, на основе энтомопатогенных бактерий с антимикробными свойствами. Ответственными за такое двойное действие микроорганизмов могут быть циклические липопептидные антибиотики, а также хитиназы, продуцируемые рядом микроорганизмов.

Нами обобщены результаты работ российских и зарубежных ученых, где выявлены основные механизмы действия антагонистических и энтомопатогенных бацилл, участвующих в управлении здоровьем растений. В свете этих данных рассмотрены собственные результаты авторов по многофункциональному влиянию бактерий рода *Bacillus* в рамках концепции управления здоровьем растений.

Изложены и обсуждены результаты исследований, проведенных в регионе Западной Сибири, климатические условия которого определяют достаточно сильное влияние абиотических факторов на взаимодействия в системе триотрофа (растение – повреждающий организм – полезная бактерия). Кроме того, в регионах с неблагоприятными климатическими условиями особенно важно обеспечить снижение токсикологического пресса на биоценозы за счет использования биопрепаратов. В качестве изучаемых растений выбраны ягодные культуры, плоды которых являются распространенным источником витаминов и других ценных для человека нутриентов, а также картофель в качестве одной из основных продовольственных культур. На ягодных культурах примерами консументов первого порядка служили фитопатогенные грибы, на картофеле – колорадский жук. Показано участие природных штаммов бактерий *Bacillus subtilis, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis* и *B. thuringiensis* в управлении

здоровьем растений с учетом влияния повреждающего организма, штамма бациллы, вида и сорта культуры, абиотических и биотических факторов окружающей среды. Так, на примере земляники садовой нами показано подавление возбудителя серой гнили *B. cinerea in vitro* и в полевых условиях бактериями *B. subtilis, B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens*. Фунгицидное и ростостимулирующее действие наиболее проявилось у *B. subtilis*. Кроме того, в отдельном эксперименте выявлена способность всех трех штаммов *Bacillus* повышать индуцированную устойчивость растений земляники к возбудителю серой гнили. Продемонстрирована адаптация растений ремонтантной малины к факторам окружающей среды под влиянием антагонистических бацилл. На примере растений картофеля показано, что с учетом влияния сорта культуры энтомопатогенная бактерия *B. thuringiensis* одновременно вызывает гибель основного фитофага-колорадского жука, подавляет опасное заболевание картофеля – ризоктониоз - на стеблях, столонах и клубнях нового урожая и усиливает рост и развитие растений. Во всех случаях использования штаммов бацилл и препаратов на их основе конечным итогом в аспекте управления здоровьем растений является увеличение продуктивности культур при сохранении экологической безопасности плодов и окружающей среды. Создание и использование микробных препаратов полифункционального действия может составить конкуренцию химическим пестицидам не только в плане экологической безопасности, но и по экономическим показателям, учитывая их разносторонний вклад в управление здоровьем растений.

ЛИТЕРАТУРА

А.с. 1050150. Инсектицидный бактериальный препарат. 1982.

А.с. 1338135. Способ количественного определения β-экзотоксина в бактериальных инсектицидных препаратах. 1987.

А.с. 1510813. Способ получения бактериального энтомопатогенного препарата. 1989.

Азизбекян Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений // Биотехнология. 2013. № 1. С. 69-76.

Азизбекян Р.Р., Шагов Е.М., Миненкова И.Б. Биопрепарат колорадо на картофеле // Защита и карантин растений. 1996. № 6. С.42-43.

Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И. Исследования миколитических свойств аэробных спорообразующих бактерий – продуцентов внеклеточных хитиназ // Микробиология. 2008. Т.77. № 6. С.788-797.

Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. и др. Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus* Cohn. - антагонистов фитопатогенных грибов // Микробиология. 2003. Т. 72(3). С. 356-360.

Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Хитиназы как один из факторов противогрибной активности бацилл-антагонистов // Ферменты и пищевые биотехнологии. 2008. С. 201-204.

Алексеева А.С., Потатуркина - Нестерова Н.И. Сравнительная характеристика микробиоценоза ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* MILL. // Современные проблемы науки и образования. 2014. №6.; URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id=16597

Алябьева Н.Н., Монастырский О.А., Кузнецова Е.В. Защитная эффективность биопрепаратов против поражения основными видами плесневых грибов зерна пшеницы при хранении // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2014. С. 207-209

Андреева И.В. Взаимодействие в системе кормовой ресурс–луговой мотылек *Pyrausta sticticalis* L.–энтомопатогенная бактерия // С.х. биология. 2009. № 5. С.103-107.

Андреева И.В. Обыкновенный паутинный клещ в системе триотрофа с использованием биопрепаратов // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 11. С. 65-69.

Андреева И.В., Шаталова Е.И., Штерншис М.В. и др. Роль кормового ресурса в численности фитофагов капусты и их биоконтроле // Сиб. Экол. Ж. 2013. № 3. С.439-446.

Андреева И.В., Штерншис М.В. Микробиологические препараты против паутинного клеща в теплицах // Защита растений. 1995. № 11. С.41-42.

Антонова Г.Н. Испытание фунгицидов для защиты перцев от болезней // Защита и карантин растений. 2015. № 8. С. 19-20.

Асатурова А. М., Козицын А. Е. Исследование активности штамма *Bacillus subtilis* BZR 336g –продуцента биопрепарата для защиты растений от возбудителей фузариоза, иммобилизованного на минеральном удобрении // Молодой ученый. 2015. №9.2. С. 3-4.

Асатурова А.М. Физиологические признаки перспективных штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* – продуцентов микробиопрепаратов // Масличные культуры. 2009. Вып. 2 (141). С. 15-21.

Асатурова А.М., Жевнова Н.А., Томашевич, Н.С., Хомяк А. И. и др. Эффективность применения новых биопрепаратов для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. 2014. Краснодар, С. 210-212

Астарханова Т.С., Астарханов И.Р., Савзиева Э.А., Балаханов А.К. Биометод в защите винограда // Защита и карантин растений. 2010. № 7. С. 30-31.

Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Б., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С. и др. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2013. 463 с.

Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.Л. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л.: ЛГУ. 1974. 76 с.

Байрамбеков Ш.Б., Корнева О.Г. Биопрепараты против альтернариоза картофеля // Защита и карантин растений. 2009. № 8. С. 30-31.

Барайщук Г.В., Покровская Л.А. Естественная изменчивость *Bacillus thuringiensis* var. *finitimus* в лабораторных условиях // Энтомопатогенные бактерии и грибы в защите растений (ред. Б. Н. Огарков). Иркутск, 1985. С.32-42.

Барайщук Г.В. Экологически безопасная защита лесов Омской области во время массового размножения непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. // Вестник КрасГАУ. 2008. № 6. С. 63-67.

Барайщук Г.В., Штерншис М.В. Оценка битоксибациллина против колорадского жука (*Leptinotarsa decamlineata* Say) в условиях Омской области // Современные средства, методы и технологии защиты растений. Новосибирск, 2008. С.17-19.

Баранчиков Ю.Н. Трофическая специализация чешуекрылых// Красноярск: ИЛиД СО АН СССР. 1987. 171с.

Батурин В.В., Батурина Л.И. Эффективность бактериальных препаратов // Биологические средства защиты и повышение продуктивности растениеводства. Иркутск. 1987. С. 7-8.

Баубекова Д.Г. Разработка полифункционального биопрепарата на основе микроорганизма рода *Bacillus* для защиты сельскохозяйственной

продукции// Естественные и математические науки в современном мире. 2014. Вып. 18. С. 1-8.

Бахвалов С.А. Биологическое подавление популяций шелкопряда-монашенки (*Lymantria monacha* L.) в Западной Сибири: опыт применения и анализ результатов // Сиб. Экол. Ж. 1995. № 5. С. 466-473.

Бахвалов С. А., Колтунов Е. В., Мартемьянов В. В. Факторы и экологические механизмы популяционной динамики лесных насекомых-филлофагов// Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2010. 299 с.

Бахвалов С. А., Цветкова В П., Шпатова Т. В., Штерншис М. В. и др. Экологические взаимоотношения в системе: энтомопатогенная бактерия *Bacillus thuringiensis* – фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani* – растение-хозяин *Solanum tuberosum* // Сиб. Экол. Ж. 2015. № 4. С. 643-650.

Бей-Биенко Г. Я. Общая энтомология. Учебник. Изд. стереотипное. СПб: «Проспект Науки». 2008. 486 с.

Белимов А.А. Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов. Palmarium Acad. Publ., 2012. 228 с.

Белицкая М.Н. Экологические аспекты управления фитосвнитарным состоянием лесоаграрных ландшафтов аридной зоны: Автореф. дис.…д-ра биол наук. Краснодар, 2004. 48 с.

Белых А.М. Бакланова Г.И., Беляев А.А. Малина красная в лесостепи Приобья. Новосибирск, 2004. 125 с.

Бельская С.И., Шабашова Т.Г., Новикова И.М. Изучение разнообразия и антагонистической активности эпифитных штаммов картофеля // Защита растений в условиях реформирования АПК. Тез. докл. СПб. 1995. С. 284.

Беляев А.А. Этиология микозов стеблей малины // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38. С. 90-94.

Беляев А.А., Белых А.М., Цветкова В.П. и др. Болезни и вредители садовых культур Новосибирской области: научно-практическое руководство

по диагностике, профилактике и защитным мероприятиям / СибНИИРС, НЗСС, НГАУ. Новосибирск, 2013. 128 с.

Беляев А.А., Шпатова Т.В., Штерншис М.В Феромониторинг малинной побеговой галлицы *Resseliella theobaldi* (Barnes) // С.-х. биология. 2010. № 3. С. 113-117.

Беляев А.А., Шпатова Т.В., Штерншис М.В. и др. Влияние штаммов рода *Bacillus* на адаптацию, рост и вегетативное размножение садовой земляники // Достижения науки и техники АПК. 2012а. № 3. С. 16-19.

Беляев А.А., Штерншис М.В., Шпатова Т.В. и др. Использование биопрепаратов для управления ростом, плодоношением и фитосанитарным состоянием садовой земляники // Достижения науки и техники АПК. 2012б. №12. С.44-47.

Беляев А.А., Штерншис М.В., Шпатова Т.В. и др. Возможности биологического контроля пятнистостей листьев черной смородины // Достижения науки и техники АПК. 2012в. №12. С.48-50.

Беляев А.А., Штерншис М.В., Шпатова Т.В. и др. Влияние штаммов бактерий рода *Bacillus* на размножение черной смородины одревесневшими черенками // Достижения науки и техники АПК. 2014. №1. С.38-40.

Беляев А.А., Штерншис М.В., Шпатова Т.В. и др. Полифункциональное действие штаммов бактерий рода *Bacillus* на садовую землянику // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т.29. №4. С. 31-34.

Бережная А.В., Молчан О.В., Купцов В.Н. и др. Факторы антагонистической активности штамма *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2014. Минск: Беларуска навука. Т. 6. С. 136-147.

Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. К.: Наукова думка, 1982. 552 с.

Бирман А.Л. Вредоносность колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и экологическая эффективность химических мероприятий

по защите картофеля от него в Черновицкой обл. УССР// Автореф. дис…. канд. с.-х. наук. Л., 1969. 20 с.

Бобрешова И.Ю., Рябчинская Т.А., Харченко Г.Л., Саранцева Н.А. Неспецифическое действие полифункциональных фитоактиваторов на фитофагов зерновых культур // Защита и карантин растений. 2013. № 1. С.25-26.

Богданов-Катьков Н.Н. Колорадский картофельный жук (Leptinotarsa decemlineata Sau.) и его карантинное значение// М.: Сельхозгиз, 1947. 198с.

Болдырев М.И., Каширская Н.Я Яблонная плодожорка: прогнозирование, сигнализация, меры борьбы // Защита и карантин растений. 2009. № 2. С.70-83 (Приложение).

Боровая В.П. Биологический метод защиты озимого ячменя от болезней // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. С.451-453.

Боровая В. П. Биопрепараты в защите озимого ячменя и бахчевых культур от болезней //Защита и карантин растений. 2009. №11. С .34-36.

Бубенщикова С.Н., Каграманова В.Г., Барабова Л.А. и др. Определение экзотоксина методом высокоэффективной хроматографии // Химия природ. Соед. 1982. Т.3. С. 389-392.

Бурцева Л.И., Штерншис М.В, Калмыкова Г.В. Бактериальные болезни насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты (ред. В. В. Глупов). М. Круглый год. 2001. С.189-245.

Бухонова Ю.В. Экологические аспекты развития агробиологических средств управления популяциями мелойдогин на примере защищенных грунтов // Автореф. дис…канд. биол. наук. М., 2004. 21 с.

Васькин М.А., Штерншис М.В. Биологическая защита черной смородины от вредителей // Биологическая защита растений как основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2004. С.251-252.

Васькин М.А., Штерншис М.В. Лепидоцид и фитоверм против фитофагов черной смородины // Сиб. вестн.с.-х. науки. 2006. № 3. С.48-53.

Васютин А.С., Сметник А.И., Мордкович Я.Б. Динамика распространения колорадского жука: состояние и перспективы борьбы с ним // Современные системы защиты и новые направления в повышении устойчивости картофеля к колорадскому жуку. М.: Наука. 2000. Сер. Генетическая инженерия и экология. Том 1. С. 41–44.

Вилкова Н.А. Научно обоснованные параметры конструирования устойчивых к вредителям сортов сельскохозяйственных культур // СПб.: РАСХН, ВИЗР, ИЦЗР, 2004. С. 45-60.

Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Фасулати С.Р. Устойчивые сорта и средства защиты растений как индукторы микроэволюционных процессов у насекомых-фитофагов // Информ. бюлл. ВПРС МОББ. 2002. Вып. 32. С. 194–204.

Вилкова Н.А., Фасулати С.Р., Кандыбин Н.В., Коваль А.Г. Биоэкологические факторы экспансии колорадского жука //Защита и карантин растений. 2001. № 2. С. 19–23.

Винничук Т.С., Болоховская В.А. Эффективность комплексных микробиологических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* и микромицета *Trichoderma* против семенной инфекции зерновых культур // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 169-171.

Воронкович Н.В. Бактерии рода *Bacillus* как агенты биологического контроля фитопатогенов картофеля // «Актуальные проблемы естественных наук»: материалы международной заочной научно-практической конференции. (26 октября 2011 г.). Новосибирск, 2011. С. 138.

Герасимова А.В., Гришечкина Л.Д., Долженко В.И., Киндрат М.В. и др. Биологические препараты для защиты картофеля от ризоктониоза и фитофтороза // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2010. С. 447-448.

Гербер О.Н., Цветкова В.П., Серебров В.В. Эффективность химических и биологических агентов борьбы с колорадским жуком. //

Современные технологии производства сельскохозяйственных культур в Сибири. Новосибирск: Агро-Сибирь. 2007. С. 82 – 88.

Гниненко Ю.И. Состояние и развитие биологических методов защиты леса // Инф. бюлл. ВПРС МОББ. № 38. 2007. С.80-85.

Гойман Э. Инфекционные болезни растений. М., 1954. 608 с.

Головин А.Г. Колорадский жук. Кишинев. 1956. 63с.

Голосова М.А. Насекомые-вредители леса. Биологическое регулирование популяций М.: Изд-во МГУЛ. 2004.188 с.

Горянин О.И., Шакуров И.Ш., Джангабаев Б.Ж. и др. Интегрированная защита яровой твердой пшеницы в среднем Заволжье // Защита и карантин растений. 2015. № 12. С. 24-26.

Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М. 2016. 701с.

Государственный Реестр селекционных достижений, допущенных к использования. Том 1. Сорта растений. М., 2015.460 с.

Гринько Н.Н., Стрелков Е.А. Перспективное средство защиты земляники // Защита и карантин растений. 2008. №7. С. 18-19.

Гришечкина Л.Д., Коренюк Е.Ф., Милютенькова Т.И., Силаев А.И. Микробиологические препараты на основе *Bacillus subtilis* для защиты сельскохозяйственных культур от болезней // Биологическая защита растений – основа стабилизции агроэкосистем. Краснодар, 2010. – С. 407-409

Гришечкина С.Д. Механизм действия и эффективность микробного препарата бацикол // С.-х. биол. 2015. Т.50 (5). С. 685-693.

Гришечкина С.Д., Лошакова Н.И. Эффективность микробиопрепарата на основе *BT* в борьбе с фузариозным увяданием льна // АГРО XXI. 2013. № 10-12. С. 18-19.

Гришечкина С.Д., Смирнов О.В. Вегетационная и полевая оценка антифунгального эффекта *Bacillus thuringiensis* // Вестник защиты растений. 2010. № 3. С. 44-50.

Гришечкина С.Д., Смирнов О.В., Кандыбин Н.В. Фунгистатическая

активность различных подвидов *Bacillus thuringiensis* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. Вып. 1. С. 58-62.

Гришечкина С.Д., Ермолова В.П. Эффективность бацикола на основе нового штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* № 25 против вредителей-фитофагов и фитопатогенов // С-х. биология. 2015. №3. С. 361-368.

Громовых Т. И. Энтомопатогенные грибы в защите леса. Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1982. 80 с.

Грошев В.С. Эффективность биологической защиты ячменя от болезней //Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2006. С. 311-313.

Гулий В.В, Иванов Г.М, Штерншис М.В. Микробиологическая борьба с вредными насекомыми. М.: Колос, 1982. 272 с.

Давидюк Д.С., Семяникина Н.Ф., Доброхотов С.А. Эффективность биопрепарата бацилон // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2004. С. 159-161

Давлетшин Ф.М., Сафин Х.М., Аюпов Д.С. Использование биопрепарата фитоспорин при возделывании яровой пшеницы в южной лесостепи республики башкортостан //Достижения науки и техники АПК. 2010. № 10. С. 12-14.

Данилова Э.Б., Барбашова Н.М. Спектрофотометрическое определение бета-экзотоксина в культуральной жидкости *Bacillus thuringiensis* // Тр. ВНИИ с.-х. микробиол. 1985. Т. 55. С. 115-118.

Делова Г. В., Кузнецова Т.Т. Микробные ценозы на листьях растений - Микрофлора растений и почв. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1973. **С**. 32-45.

Диденко О.А., Андросова В.М., Титаренко Л.Н. Защита подсолнечника от фомомпсиса и ложной мучнистой росы экологически безопасными препаратами //Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2010. С. 821-826.

Долженко Т.В. Битоксибациллин для эффективного контроля численности фитофагов. // Агро XX1. 2013. №7-9. С.20-22.

Дорожкин Н.А., Новикова Л.М., Бельская С.И., Викторчик И.В. Антагонистические бактерии перспективные для защиты картофеля от болезней // Докл. АН БССР. 1991. Т.35. № 11. С.1037-1038.

Дужак А.Б., Салганик Р.Р., Штерншис М.В. и др. Влияние ферментного препарата хитиназы на активность биопрепаратов // Сиб. Экол. Ж. 1995. № 5. С. 457-461.

Егоров Н.С. О корреляции между инсектицидной и антибиотической активностями параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 1990. Т.59. С.448-452.

Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.

Ермолова В.П. *Bacillus thuringiensis* из природных субстратов Ленинградской области: выделение и идентификация // С.-х. биол. 2016. Т. 51 (1). С. 128-131.

Жернова С.Ю., Жернов Г.О. Применение минеральных удобрений и препаратов на химической и биологической основе в борьбе с корневыми болезнями сои // Аграр. Вестник Урала. №4. 2008. С. 68-70.

Замотайлов А.С., Попов И.Б., Белый А.И. Экология насекомых. Краснодар, 2009. 184 с.

Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распределение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука. 1993. 272 с.

Захаренко В.А. Биотехнологии и защита растений // Защита и карантин растений. 2015. № 11. С. 3-6.

Захарова Л.М., Дьяконов Ю.В. Технология защиты льна от вредных организмов с использованием препаратов компании «Август». М.: Альфа-Дизайн. 2013. 52 с.

Захарова Н.Г., Сираева З.Ю., Демидова И.П., Гарусов А.В. и др. Эффективность биопрепарата бацизулин в защите яровой пшеницы от

болезней //Учен. записки Казан. Гос. Ун-та. Т. 148. Кн. 3. Естественные науки. 2006. С.89-99

Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Лысак Л.В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // Ж. общей биол., 1993. Т. 54. № 2. С. 183-199.

Зимоглядова Т.В., Жадан В.В., Наказной С.В. Эффективность биопрепаратов на разных сортах озимой пшеницы // Защита и карантин растений. 2009. №. 11. С. 24-27.

Зурабова Э.Р. Разработка и внедрение эффективного энтомопатогенного препарата лепидоцида // Инф.бюлл. ВПРС МОББ. 1986. № 16. С. 37-43.

Иванова И.Н. Биологическое обоснование технологии регулирования численности яблонной плодожорки (*Cydia pomonella* L.) в условиях Краснодарского края: Автореф. дис…. канд. с.-х. наук. Воронеж, 2009. 26 с.

Исаев А..С., Хлебопрос Р.Г., Недорезов Л.В. и др. Динамика численности лесных насекомых// Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1984. 224 с.

Ишкова Т.И., Гришечкина Л.Д., Долженко В.И., Милютенкова Т.И. Биологический препарат Фитоспорин – М для защиты картофеля от болезней / Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. С. 244-246.

Калинина К., Кожевин П., Звягинцев Д., Судницын И. Особенности микробных сукцессий в почве в зависимости от уровня влажности //Почвоведение. 1997. № 4. С. 518–525.

Калинина К.В. Биоэкологическое обоснование защиты картофеля от колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrisomelidae) в условиях южной части Северо-Западного региона России//Автореф. дис. …канд. биол. наук. Великие Луки, 2007. 20 с.

Калинина К.В., Николаева Э.В. Устойчивость некоторых сортов картофеля к колорадскому жуку//АгроXXI. 2007. № 1-3. С. 11-12.

Калмыкова Г.В., Бурцева Л. И., Штерншис М.В. Методы оценки штаммов *Bacillus thuringiensis* как агентов подавления численности насекомых //Сиб. вестн. с.-х. науки. 2009. № 3. С. 31-37.

Каменек Л.К. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis*: строение, свойства и использование в защите растений: Автореф. дис….д-ра биол. наук. - М., 1998. 40 с.

Каменек Л.К., Каменек Д.В., Тюльпинева А. А., Терпиловский М.А. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении фитопатогенных грибов родов *Phytophthora* и *Fusarium* // Биотехнология. 2008. № 5. С. 76-83.

Каменек Л.К., Климентова Е.Г., Тюльпинева А.А. Антимикробная активность *Bacillus thuringiensis* в отношении некоторых аэробных бактерий-фитопатогенов // Уч. Запис. УлГУ. Сер. Экология. 2000. Вып 1. С. 11- 15.

Каменек Л.К., Левина Т.А., Пантелеев С.В. Об устойчивости растений овса к бурому бактериозу под влиянием дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* // С.-х. биол. 2006. № 1. С. 98-106.

Каменек Л.К., Левина Т.А., Терехин Д.А., Миначева Л.Д Антибактериальное действие дельта-эндотоксина как потенциального агента защиты растений // Биотехнология. 2005. №1. С.59-70.

Каменек Л.К., Сатарова Т.А., Каменек Д.В., Терпиловский М.А. Антифунгальное действие эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении возбудителя фитофтороза картофеля // С.-х. биология. 2011. № 1. С.112-117.

Каменек Л.К., Терехина Л.Д., Каменек В.М. и др. Изучение ростостимулирующего действия дельта-эндотоксина на примере растений огурца // Вестник НГАУ. 2010. № 4. С.13– 17.

Каменек Л.К., Шроль О.Ю., Иванова Л.Н., Кублик В.А. Биологический препарат битиплекс для защиты лесов от рыжего соснового пилильщика // Лесное хоз-во. 2005. № 6. С. 44-45.

Кандыбин Н. В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. М.: Агропромиздат. 1989. 175 с.

Кандыбин Н.В. Ермолова В.П., Смирнов О.В. Спектр действия бактокулицида // Защита растений. 1995. № 9. С.32-33.

Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка Т.Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis.* СПб-Пушкин, 2009. 244 с.

Кипрушкина Е.И. Биотехнологический мониторинг популяций фитопатогенов при холодильном хранении картофеля с применением ассоциативных бактерий-антагонистов. Дис…д-ра техн. наук. СПб., 2015. 386 с.

Климентова Е.Г., Каменек Л.К., Каменек Д.В. и др. Перспективы использования дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как биорегулятора роста растений с фитозащитными свойствами // Агро XXI. 2010. № 4-6. С. 31– 33.

Кобзарь В.Ф., Ширяева Н.В., Чирков М.В. Применение лепидоцида и битоксибациллина против американской белой бабочки // Лесное хозяйство.1991. №1. С.54-55.

Коваленков В. Г., Глушко Д. А., Плотникова В. В. Курс - на биометод // Защита и карантин растений. 2007. №6. С. 20-22.

Коваленков В. Г., Тюрина Н. М., Казадаева С. В. Биологическая защита сои //Защита и карантин растений. №4. 2006. С. 36-39.

Коваленков В.Г., Тюрина Н.М., Казадаева С.В., Павлова Л.И. Биофунгициды в интегрированной защите пшеницы // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 184-187

Козлова Е.А. Комплекс болезней и вредителей на смородине черной и биологизированная защита насаждений // Вестник Брянской гос. с.-х. академии. 2013. № 1. С. 21-26.

Козлова Е.А. Эффективность применения биопрепаратов в защите смородины черной // Науч. труды Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства РАСХН. 2014. Т. 6. С. 205-210.

Козлова Е.А., Лысенко Н.Н. Система защиты смородины от американской мучнистой росы на основе биофунгицидов // Вестник ОрелГАУ. №3. 2008. С. 14-17

Козлова Е.А., Лысенко Н.Н. Биопрепараты для защиты смородины черной от американской мучнистой росы // Защита и карантин растений. 2009. № 5. С. 46-47.

Колесова Д.А. Применение биопрепаратов для защиты яблони от вредителей // Садоводство и виноградарство. 1994. № 2. С. 11-12.

Коломиец Э.И., Кильчевская О.С., Романовская Т.В. Разработка препаративной формы биопестицида бетапротектин для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. С. 250-252

Колорадский картофельный жук *Leptinotarsa decemlineata* Say. Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естественные враги /Под ред. Р.С. Ушатинской. М.: Наука. 1981. 377 с.

Кольбин Д.А., Волкова Г.В., Переяслова Л.Д. Эффективность биопрепаратов биологического происхождения против листовых болезней озимой пшеницы в условиях Краснодарского края (на примере бурой ржавчины - возбудитель *Puccini triticina*) // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 188-190.

Комков Н.Д., Корнева Л.Г., Мотовилин А.А. Эффективность биологического метода защиты озимой пшеницы от септориоза листьев и колоса // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2004. С. 198-200

Коптева, Т.С. Ерина Н.В. К вопросу становления некоторых аспектов микробно-растительных взаимоотношений в процессе эволюции (обзорная статья) // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского ГАУ (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. Краснодар: КубГАУ, 2015. №06 (110). С. 652 – 659

Коренюк Е.Ф. Эффективность биопрепаратов против фитопатогенных грибов на зерновых //Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2014. С. 452-454

Коробов В.А., Леляк А.И., Леляк А.А. Эффективность препарата на основе бактерий рода *Bacillus* в борьбе с корневыми гнилями яровой пшеницы // Защита и карантин растений. 2014. № 11. С. 31-32.

Коробов В.А., Леляк А.И., Леляк А.А. и др. Эффективность штаммов бацилл в отношении корневых гнилей яровой пшеницы // Вестник защиты растений. 2015. Т. 83. № 1. С. 42-44.

Коробов Я.А., Каменек Д.В., Каменек Л.К. Ростостимулирующий эффект дельта-эндотоксина в отношении ювенильных растений перца стручкового // Вестник Алтайского ГАУ. 2014. № 11(121). С.14-19.

Коробова Л.Н., Гаврилец Т.В. Агроэкологический аспект защиты яровой пшеницы от болезней с помощью биопрепаратов // Вестник Новосибирского ГАУ. № 3. 2005. С. 15-23

Коробова Л.Н., Гаврилец Т.В. Влияние биологического фунгицида бактофит на возбудителей корневой гнили и микробный ценоз яровой пшеницы // Вестник защиты растений. 2006. № 2. С. 64-66.

Король И.Т., Романовец З.А., Микульская Н.И., Канапацкая В.А. Новодор против колорадского жука // Защита растений. 1994. № 3. С.14-15.

Котляров В. В., Сединина Н. В. Использование бактерий *Bacillus subtilis* для протравливания пшеницы и защиты от фитопатогенов / «Achievement of highschool»: материалы 9-ой международной научно-практической конференции. – Сельское хозяйство. София. 2013. Т. 42. С. 34-36.

Кочкина З.М., Поспешный Г.А., Чирков С.Н. Ингибирование хитозаном фаголизиса культуры *Bacillus thuringiensis* // Прикл. Биохим. Микробиол. 1996. Т.32. С.247-250.

Кравченко Л.В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями. Автореф. дис… д-ра биол. наук. М., 2000. 38с.

Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. и др. Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология. 2002. N.71(4). С. 521-525.

Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Изв. Уфимского науч. Центра РАН. 2011. № 3-4. С. 5-15.

Кузин А.И., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Зубашева М.В. и др. Штамм *Bacillus thuringiensis* Т-281, обладающий бинарной пестицидной активностью // Биотехнология. 2008. № 4. С.39-48.

Кузнецов В.И., Юсупова З.Р., Гильманов Р.Г., Кузнецова Т.И. и др. Эффективность биофунгицида Фитоспорин – М, Ж в борьбе с болезнями // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 191-194

Кузьмина Л.Ю. Исследование взаимодействия бактерий-антагонистов с растениями и фитопатогенными грибами. Автореф дис…канд. биол. Наук. Казань, 1998. 20 с.

Кулагин В.С. Эпизоотологические проблемы применения *Bacillus thuringiensis* в лесных биоценозах // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений. Новосибирск, 1987. С. 92-107.

Купцов В.Н., Молчан О.В., Гирилович Н.И., Носонова Т.Л. и др. Подходы в создании биологических средств защиты сада и плодовой

продукции при хранении от болезней // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2014. С. 259-261

Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А. Влияние антагонистического штамма *Bacillus subtilis* 26Д на численность микроорганизмов почвы, прилегающей к семенам пшеницы // Почвоведение. 2014. № 9. С. 1102-1106.

Кутеев Ф.С. Применение лепидоцида СК против сибирского и непарного шелкопрядов // Биологическая и интегрированная защита леса. Пушкино-Москва, 1998. С.56-57.

Лазько В. Э., Шевченко Л. А., Кулиш Е. М. Биологическая защита бахчевых культур от основных болезней и вредителей // Рисоводство. 2014. № 2 (25). С. 47-51

Лапа С. В., Авдеева Л. В. Антагонистическое действие штамма *Bacillus subtilis* УКМ 5009 // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2010. С. 410-413

Леляк А. А., Штерншис М. В. Антагонистический потенциал сибирских штаммов *Bacillus* spp. в отношении возбудителей болезней животных и растений // Вестник ТГУ. Биология. 2014. № 1 (25). С. 42-55.

Лескова А.Я. Сохранность энтомопатогенных бактерий во внешней среде // Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений. Новосибирск. 1987. С. 107-118.

Лукьянцев М.А. Особенности биологической активности эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. с различной степенью антагонизма к фитопатогенным грибам. Автореф. дис…. канд. биол. наук. Саратов, 2010. 21 с.

Лысенко Н. Н., Жук Г. П., Козлова Е. А. Система защиты чёрной смородины от американской мучнистой росы на основе биофунгицидов // Вестник Орловского гос. Аграр. Ун-та. 2009. Вып. № 4. С. 17-20.

Максименко А.П., Титаренко Л.Н. Применение биофунгицидов в лесном питомнике // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2004. С. 252-254

Максимова Н.П., Комарова М.С., Маслак Д.В., и др. Использование биопрепарата бактоген для защиты овощных культур от болезней // Мат-лы науч – практ. конф. Защита растений на рубеже XXI века. 2001. С. 405-408

Малоквасова Т.С., Челышева Л.П. Микробиологический контроль численности непарного шелкопряда в лесах Дальнего Востока // Биологическая и интегрированная защита леса. Пушкино-Москва, 1998. С.65-67.

Малюга А.А., Омельченко Н.А., Похлёбин Ю.Н. Колорадский жук: по пути на восток // Защита и карантин растений. 2011. № 8. С. 20-23.

Маргалит Й, Бен-Дов Э. Биологические методы контроля численности двукрылых насекомых с помощью *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. //Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты (ред. В. В. Глупов). М.: Круглый год. 2001. С. 246 – 270.

Марданова А.М., Лутфуллин М.Т., Хадиева Г.Ф. и др. Биоконтроль фузариоза картофеля с помощью ризосферных и эпифитных бактерий // Материалы науч. Конф. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты (Минск, 7-11 сентября 2015 г.). С.100-101.

Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В. Выделение бактерий семейства Enterobacteriaceae из растительных тканей// Микробиология. 2005. Т. 74. № 5. С. 663-666.

Мартемьянов В.В., Бахвалов С.А. Экологические взаимосвязи в системе триотрофа и их влияние на развитие и популяционную динамику лесных филлофагов // Евразиат. Энтомол. Ж. 2007. Т. 2. № 6. С.205-221.

Мацишина Н.В. Особенности биологии и экологии колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera, Chrysomelidae) в Приморском крае// Автореф. дис.... канд. биол. наук. Владивосток, 2012. 19 с.

Мацишина, Н. В. Распространение и фенология колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) в Приморском крае // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. – Владивосток. 2011. Вып. XXII. С. 239-246.

Машанов А.И., Гукасян В.М., Чуликов А.И. Микроорганизмы в защите леса. Новосибирск: Наука. 1981.191 с.

Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. М., 2003. 86 с.

Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn* в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 120 с.

Мелентьев А.И. Бактерии-антагонисты фитопатогенных грибов // АГРО XXI. 2001. № 11. С. 10-11.

Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Циклические липопептиды – перспективный биотехнологический продукт // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: Мат-лы Междунар. Науч.-практ. Конф. 25-28 мая 2005 г. Минск-Нарочь: РИВШ. 2005. С.140-141.

Мелентьев А.И., Курченко В.П., Леонтьев В.Н. и др. Выделение и предварительная характеристика антигрибных соединений штамма *Bacillus subtilis* ИБ-54 – антагониста почвенных микромицетов // Труды БГУ. 2010. Т.5(1). С. 200-209.

Менликиев М.Я., Смирнов В.Д., Ваньянц Г.М, Недорезков В.Д. и др. Фитоспорин – биологический препарат для защиты растений от болезней. Рекомендации по применению. Уфа. 1991. 24с.

Методы оценки сельскохозяйственных культур на групповую устойчивость к вредителям. СПб, 2003. 112 с.

Мечников И.И. Хлебный жук. 1879. Одесса. С.3-13.

Михайлова Н.М, Блинкова Л.П., Гатауллин А.Г. Биологические свойства новых изолятов *Bacillus subtilis* // Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. 2007. №4. С. 41-46.

Надыкта В. Д,, Асатурова А.М.,, Томашевич Н.С., Павлова М.Д. и др. Эффективность применения новых бактериальных биопрепаратов для снижения вредоносности экономически значимых возбудителей болезней на озимой пшенице // Материалы науч. Конф. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты (Минск, 7-11 сентября 2015 г.). С.103-104.

Натальина О.Б. Болезни ягодников. Л., 1963. 272 с.

Немченко В.В., Кекало А.Ю., Заргарян Н.Ю., Цыпышева М.Ю. Протравливание семян - первая ступень получения защищенного и продуктивного агроценоза // Защита и карантин растений. 2014. № 3. С. 22-24.

Немченко В.В., Цыпышева М.Ю. Влияние биопрепаратов и регуляторов роста на структуру урожая и продуктивность яровой пшеницы // Вестник Алтай. ГАУ. 2014. № 8 (118). С. 5-8.

Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов. М. Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

Неудачина Э.И. Об использовании бактериальных препаратов против вредителей защищенного грунта // Энтомопатогенные бактерии и грибы в защите растений. Иркутск, 1985. С.43-47.

Николаев А.Н., Николаева С.И. Методологические аспекты разработки микробиологического метода борьбы с мучнисто-росяными болезнями растений. B: Studia Univ. Seria Ştiinţe ale naturii. 2007. No. 1. 157-161.

Николаев А.Н., Николаева С.И. Сравнительная антифунгальная активность изолятов *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis in vitro* // Studia Univ. Moldaviae. 2015. No. 1(81). P. 12-16.

Новикова И.И. Полифункциональные биопрепараты для защиты растений от болезней // Защита и карантин растений. 2005. № 2. С.22-26

Новикова И.И., Бойкова И.В., Павлюшин В.А. и др. Перспективы использования биопрепаратов на основе микробов – антагонистов для защиты картофеля от болезней при хранении // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 12-22

Новикова И.И., Литвиненко А.И., Бойкова И.В. и др. Биологическая эффективность новых микробиологических препаратов алиринов Б и С для защиты растений от болезней в разных природно-климатических условиях // Микология и фитопатология. 2003. Т. 37. Вып. 1. С. 92-97.

Овчинникова Л.А., Томилова О.Г., Штерншис М.В. Повышение эффективности энтомопатогенного биопрепарата в защите капусты в условиях Западной Сибири // Вестник НГАУ. 2009. №.2. С.10-18.

Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений биогенными элиситорами фитопатогенов (обзор) // Прикл. Биохим. Микробиол. 1994. Т.30. С.325-339.

Озерецковская О.Л. Проблемы специфического фитоиммунитета // Физиология растений. 2002. Т.49. №1. С.148-154.

Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. При использовании элиситоров для защиты сельскохозяйственных растений необходима осторожность // Прикл. Биохим. Микробиол. 2002. Т.38. №3. С.322-325.

Осинцева Л.А. Природоохранная защита капусты от вредителей // Аграрная наука. № 2. 1995. С.46 – 47.

Осташева Н.А., Игнатова Е.А., Янушевская Э.Б, Фогель В.А. Основы биологизированной системы защиты персика от вредных организмов в субтропиках России // Субтропическое и декоративное садоводство . 2007. Т. 40. С. 358-370.

Павлюшин В.А., Исси И.В., Воронина Э.Г., Митрофанов В.Б. и др. Микробиологическая защита растений как неотъемлемый элемент

фитосанитарной оптимизации агроэкосистем // Сб. науч. тр. к 70- летию ВИЗР. – СПб.: Изд-во ВИЗР. 1999. С. 146–162.

Павлюшин В.А., Сухорученко Г.И., Фасулати С.Р., Вилкова Н.А. Колорадский жук: распространение, экологическая пластичность, вредоносность, методы контроля. // Приложение к журналу «Защита и карантин растений». 2009. № 3. 32с.

Пайнтер Р. Современные проблемы энтомологии. М. 1961. Ч. 2. С. 10 – 32.

Патент РФ 1792281. Основа для приготовления инсектицидного препарата. 1993.

Патент РФ 2128915. Способ получения препарата фитоспорин. 1999.

Патент РФ 2295562. Штамм бактерий *Bacillus* spp. KR-083 в качестве средства для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов и стимуляции роста. 2007.

Патент РФ 2314691. Способ получения жидкого инсектицидного препарата. 2008.

Патент РФ 2295562. Штамм бактерий *Bacillus spp.* KR-083 в качестве средства для защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов и стимуляции их роста. 2007.

Патент РФ 2482174. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, обеспечивающие восстановление микробиоценозов почвы и желудочно-кишечного тракта животных, обладающие бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, и препарат на основе этих штаммов. 2013.

Патент РФ 2140138. Способ предпосевной обработки семян овощных культур и способ получения препарата для предпосевной обработки семян овощных культур. 1999.

Патент РФ 2270859. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* - продуцент эндонуклеазы рестрикции *bisi*. 2006.

Патент РФ 2528058. Штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens*, обладающий фунгицидным и бактерицидным действием, и биологический препарат на его основе для защиты зерновых растений от заболеваний, вызываемых фитопатогенными грибами. 2014.

Патент РФ 2289621. Штамм бактерий *Bacillus mucilaginosus*, обладающий широким спектром фунгицидного действия, и биопрепарат на его основе. 2006.

Патент РФ 2298032. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719-продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилолитических и липолитических ферментов. 2007.

Патент РФ 2314693. Ассоциация бактерий для получения биопрепарата, биопрепарат, повышающий плодородие почвы и оздоравливающий ее, обладающий противогрибковыми и стимулирующими рост растений свойствами, и способ его получения. 2008.

Патент РФ 2444366. Лечебно-профилактический биопрепарат против бактериальных и грибковых инфекций, обладающий антибиотико-устойчивостью. 2012**.**

Патент РФ 2478290. Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней, повышения урожайности и почвенного плодородия. 2013.

Патент РФ 2509149. Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ВКМ B-2711D, обладающий выраженным антагонизмом по отношению к *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и резистентностью к стрептомицину и тетрациклину. 2014.

Патент РФ 2514023. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* № 25 в качестве средства комплексного воздействия на вредных жесткокрылых насекомых и фитопатогенные грибы. 2014.

Пахтуев А.И., Франк Р.И, Штерншис М.В. Результаты оценки эффективности микробиопрепаратов // Агро XXI. 2002. № 7-12. С.65-67.

Пашкевич Е.Б. Биологическое обоснование создания и особенности применения биопрепаратов, содержащих *Bacillus subtilis*, для защиты растений от фитопатогенов // Проблемы агрохим. экол. 2009. №2. С.41-47.

Петров В.Н. Асланян Е.М., Исангалин Ф.С. Изучение инактивации спор и токсинов *Bacillus thuringiensis* под действием солнечной радиации и УФ-облучения // Проблемы создания и применения микробиологических средств защиты растений. М. 1989. С. 91.

Полтев В. И. Печерская Г.Л Влияние фитонцидов на энтомопатогены //Микроорганизмы и зеленое растение. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1967. С. 67-71.

Поляк М.С. Питательные среды для микробиологического исследования субстратов. Часть 1. СПб., 2005. 29 с.

Поляк М.С. Питательные среды для микробиологического исследования субстратов. Часть 2. СПб., 2006. 40 с.

Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. Спб.: ЭЛБИ-СПб. 2008. 352 с.

Полякова Е.В. Действие биопрепаратов на рассадном томате в условиях дельты Волги // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. С. 273-275

Помелов А.В., Дудин Г.П. Защитное и неспецифическое действие биофунгицидов на яровом ячмене. Агро XXI. 2009. №7-9. С. 35-36.

Попов Ф.А., Толопило А.Н. Эффективность биопрепаратов против фитопатогенной микрофлоры семян капусты // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. 2008. С. 277-279

Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения культур микроорганизмов и тенденции развития // Изв. Высших учеб. Заведений Поволжского региона. 2009. № 4(12). С. 99-121.

Прищепа И.А, Попов Ф.А., Колядко Н.Н. Защита моркови от вредителей и болезней с применением экологически безопасных препаратов

// Мат-лы науч – практ. конф. Защита растений на рубеже XXI века. Минск, 2007. С. 336-344

Пусенкова Л.И., Глез В.М., Зейрук В.Н., Деревягина М.К. и др. Биопрепараты для защиты картофеля от болезней // Защита и карантин растений. 2010. № 10. С. 26-28.

Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям // Агроэкологический журнал. 2005. № 1. С. 50–55.

Романовская Т.В., Коломиец Э.И., Молчан О.В. Подходы к повышению биологической эффективности и стабильности биологических препаратов на основе бактерий-антагонистов и энтомопатогенов // Инф. Бюлл. ВПРС/ МОББ. 2007. №38. С.197-199.

Романовская Т.В., Коломиец Э.И., Молчан О.В., Сверчкова Н.В. Подходы к повышению биологической эффективности и стабильности биологических препаратов на основе бактерий-антагонистов и энтомопатогенов // Инф. Бюлл. ВПРС МОББ. 2007. №.38. С. 197-199.

Рубель И.Э., Ананьева И.Н., Евсегнеева Н.В., Коломиец Э.И. Оптимизация состава питательной среды для совместного культивирования бактерий *Bacillus subtilis* БИМ В-712 и *Bacillus thuringiensis* БИМ В711 Д – основы биопестицида Ксантрел // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. Вып 7. С. 150–152.

Санин В.А. Колорадский жук. М.: Колос. 1976. 112 с.

Санин С.С. Защита пшеницы от болезней в современных интенсивных технологиях ее возделывания в центральном регионе России // Зернобобовые и крупяные культуры. 2013. №2(6) С. 34-40.

Свиридов А.В., Просвиренков В.В., Коломиец Э.И., Кильчевская О.С. Биопрепарат бетапротектин для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. – С. 281-283

Сергеева Ю.А. О влиянии бактериальной обработки на паразитоидов дубовой зеленой листовертки (*Tortix viridana* L) // Инф. Бюлл. ВПРС МОББ. 2007. №.37. С.191-197.

Сираева З.Ю. Биопрепараты для стимуляции роста и защиты растений от болезней на основе *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008// Автореф. Дис. …канд. биол. наук. Казань, 2012. 24 с.

Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Ильинская О.Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биоффунгицида бацизулин // Учен. Зап. Казан. ун-та. 2010. Т. 152(4). С. 169-178.

Сираева З.Ю., Захарова Н.Г. Влияние биопрепарата на основе *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ –В 11008 на пораженность семян яровой пшеницы // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 210-211.

Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии - продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова Думка, 1982. 285 с.

Смирнов О.В. Гришечкина С.Д. Полифункциональная активность *Bacillus thuringiensis* Berliner // С.-х. биология. 2011. № 3. С. 123-126.

Смирнов О.В. Направления совершенствования микробиологического метода защиты капусты // Биологическая защита растений-основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. Вып. 5. С.288-289.

Смирнов О.В. Патотипы *Bacillus thuringiensis* и экологические основы их использования в защите растений: Дис…д-ра биол. наук. СПб-Пушкин, 2000. 519 с.

Смирнов О.В., Гришечкина С.Д. Изучение действия биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis* на фитопатогенные грибы // Вестник защиты растений. 2010. № 1. С. 27-35.

Стадниченко, М.А. Перспективы биологического контроля возбудителя ботритиоза на пасленовых культурах / Вестник Белгородского ун-та. Сер.2. 2011. № 2. С. 49-55.

Суркова Т.А. Бактерии – антагонисты для защиты томата от бактериального рака стеблей // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2008. С. 298-300

Талалаев Е.В. Бактерийные препараты как средство защиты растений от вредных насекомых // Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в лесном хозяйстве. Иркутск, 1970. С.4-8.

Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты// С-х. биология. 2011. № 3. С. 3-9.

Ткаленко А.Н., Болоховская Б.А. Контроль развития корневых гнилей огурцов в закрытом грунте // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 212-214

Томилова О.Г., Коробейников А.С., Штершис М.В. Биопрепараты для защиты сои от болезней // Защита и карантин растений. 2009. № 11. С. 33.

Тютерев С.Л. Индуцированный иммунитет растений к болезням и перспективы его использования // Второй Всероссийский съезд по защите растений. СПб, 5-10 декабря 2005. Фитосанитарное оздоровление экосистем. Т.1. СПб., 2005. С.565-567.

Тютерев С.Л. Экологически безопасные индукторы устойчивости растений к болезням и физиологическим стрессам // Вестник защиты растений. 2015. Т.1(83). С. 3-13.

Фасулати С.Р., Иванова О.В. Устойчивые сорта как основа интегрированной защиты картофеля от колорадского жука и их отбор в полевых условиях // Защита картофеля. №2. 2015. С.32-35.

Фирсов В.Ф., Чухланцев А.Ю., Маслиенко Л.В., Мустафин И.И. Испытание биопрепаратов на подсолнечнике в тамбовской области масличные культуры // Масличные культуры. Науч.-техн. Бюлл. Всероссийского НИИ масличных культур. 2009. Вып. 2 (141). С. 1-5.

Франк Р.И., Кищенко В.И. Биопрепараты в современном земледелии //Защита и карантин растений. 2008. №4. С.30-32.

Фрейман В.Б., Глушкова А.И., Соломатина П.С. и др. Прогрессивные методы производства энтомопатогенных препаратов М.,1981. 44 с.

Фундаментальная фитопатология / Под ред. Ю.Т. Дьякова. – М., 2012. – 512 с.

Фут Ф. Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. Биологические следствия // Свободные радикалы в биологии. М.: Мир. 1979. С. 96-150.

Хекли Р. Свободные радикалы в высушенных биологических препаратах //Свободные радикалы в биологии. М. 1979. Т. 2 .С.151-177.

Холод Н.А. Оптимизация применения микробиологических препаратов для управления патосистемами в агроценозе земляники // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2014. № 29(05). С. 126-137.

Холод Н.А Болезни земляники на юге России // Защита и карантин растений. 2013. № 10. С. 28-30.

Холод Н.А. Современная структура патоценоза земляники и пути ее оптимизации // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010. № 4. С. 15-23

Холодная Ж.В. Разработка технологии получения протеолитического ферментного комплекса из бактерий рода *Bacillus*. Дис... канд. биол. наук. Уфа, 1999. 139 с.

Цветкова В.П. Особенности развития колорадского жука в Сибири и контроль его численности/ Биологическая Защита Растений: Успехи, Проблемы, Перспективы// Познань, Польша, 2013 г. С. 108- 110.

Цветкова В.П. Чуликова Н.С. Влияние гидротермических условий на развитие колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) в лесостепной зоне Новосибирской области // Продуктивность культурных растений в зависимости от погодных условий. Новосибирск, 2012. С. 229-234.

Цветкова В.П., Гербер О.Н., Серебров В.В. Особенности популяции колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) в Новосибирской области //Достижения энтомологии на службе агропромышленного комплекса, лесного хозяйства и медицины. Краснодар, 2007. С. 213-214.

Цветкова В.П., Поддубная Е.Н., Исмаилов В.Я., Журавлев С.В. Феромониторинг яблонной плодожорки – основа защитных мероприятий в садах Западной Сибири // Вестник НГАУ. 2008. № 7. С. 12-22.

Цветкова В.П., Штерншис М.В. Сортоустойчивость картофеля к колорадскому жуку / Инф. Бюлл. ВПРС МОББ. № 39. 2009. С. 232-236.

Цветкова, В.П., Чуликова Н.С. Повреждаемость сортов картофеля колорадским жуком в лесостепи Приобья // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Вып. 7. Краснодар, 2012. С. 434-436.

Чеботарь В.К., Петров В.Б., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бацилл, используемых при создании микробиологических препаратов // С-х. биология. 2011. № 3. С. 119-122.

Чернышев В.Б. Экология насекомых. М.: Изд-во МГУ. 1996. 304с.

Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: СПбГУ, 2002. 244 с.

Чиликин В.М., Рудиков С.Н., Алибеков К.Б., Румянцев В.А. Интенсификация технологии получения энтомопатогенных препаратов //

Проблемы создания и применения микробиологических средств защиты растений. М., 1989. С.63.

Чуликова Н.С. Малюга А.А., Цветкова В.П. Влияние температуры и влажности окружающей среды на весенний выход колорадского жука из почвы в условиях Новосибирской области // Вестник НГАУ. №4. 2012. С. 35-39.

Шапиро И. Д. Иммуногенетические барьеры и источники устойчивости картофеля к колорадскому жуку// Науч.-тех. бюлл. ВИР. 1991. Вып. 214 «Клубнеплоды». С. 51-56.

Шапиро И.Д. Иммунитет полевых культур к насекомым и клещам. Л.: Изд-во АНСССР. 1985. 321 с.

Шапиро И.Д., Вилкова Н.А. Современные теоретические представления об иммунитете растений как вредителя // Труды ВИЗР. Л., 1979. Вып. 61. С. 41-45.

Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Новожилов К.В. и др. Эколого-физиологические основы триотрофа и стратегия защиты растений // Вопросы экологической физиологии насекомых и проблемы защиты растений. Л., 1979. С. 5-17.

Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Слепян Е.И. Иммунитет растений к вредителям и болезням. СПб: Агропромиздат. 1986. 192 с.

Широков А. В. Миколитические ферменты бактерий *Bacillus* Cohn и их роль в антагонизме к почвенным микромицетам. Автореф. дис….канд. биол. наук. Уфа, 2004. 22 с.

Шкаликов В.А., Дьяков Ю.Т., Смирнов А.Н., Джалилов Ф.С.-У. и др. Иммунитет растений / Под ред. В.А. Шкаликова. М., 2005. 190 с.

Шпаар Д., Бартельс Г., Бурт У. и др. Защита растений в устойчивых системах землепользования (в 4-х книгах) / Под ред. Д. Шпаара. Кн. 1. Берлин, 2004. 392 с.

Шпатова Т.В, Штерншис М.В., Леляк А.А., Леляк А.И. Тестирование бактерий рода *Bacillus* против септориоза черной смородины в Западной Сибири // Вестник ОмГАУ. 2011. №2. С. 13-16.

Шпатова Т.В., Штерншис М.В. Испытание биопрепаратов для защиты малины от пурпуровой пятнистости в Западной Сибири // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2012. С. 214-216.

Штейнхауз Э. Патология насекомых. М. 1952. 840 с.

Штерншис М.В. Ермакова Н.И., Зурабова Э.Р., Исангалин Ф.С. Определение биологической активности препарата ЛЕСТ на луговом мотыльке. М., 1990. 14 с.

Штерншис М.В. Микробиологическая борьба с вредителями сельскохозяйственных культур Сибири и Дальнего Востока. М. Агропромиздат, 1988. 128 с.

Штерншис М.В. О методах оценки физических показателей бактериальных инсектицидов // С.-х. биология. 1985. № 9. С.120-123.

Штерншис М.В. Повышение эффективности микробиологической борьбы с вредными насекомыми. Новосибирск. 1995. 194 с.

Штерншис М.В., Каменек Л.К. Усиление действия дельта-эндотоксина // Интегрированная защита с.-х. культур от вредителей и болезней в Сибири. Новосибирск, 1986. С. 15-19.

Штерншис М.В., Томилова О.Г., Андреева И.В. Биотехнология в защите растений. Новосибирск, 2006. 200 с.

Штерншис М.В., Цветкова В.П., Томилова О.Г. Защита капусты от вредителей в Западной Сибири // Производство экологически безопасной продукции растениеводства (ред. М.С. Соколов, Е.П. Угрюмов). Пущино: 1995. С.195-197.

Штерншис М.В., Челяев С.Д., Чулкина В.А. и др. Система защиты капусты от вредителей и болезней в Сибири и на Дальнем Востоке. Новосибирск, 1987. 52 с.

Штерншис М.В., Шпатова Т.В., Леляк А.А., Леляк А.И. Действие бактерий рода *Bacillus* на возбудителей болезней малины // Вестник НГАУ. 2010. №3. С. 48-53.

Шульгина О.А., Штерншис М.В. Биопрепарат лепидоцид СК против вредителей капусты в Кемеровской области // Сиб. вестн.с.-х. науки. 2004. № 1. С. 39-43.

Эдельман Н.М. Влияние биохимического состава корма на возрастные изменения физиологического состояния насекомых // Вопросы экологии М., 1962. Т.1. С.211-213.

Юдина Т.Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий – представителей родов *Bacillus, Xenorhabdus, Photorhabdus*: дис…д-ра биол. наук в форме научного доклада. М., 2006. 81 с.

Юрченко Е.Г., Грачева Н.П., Нечипоренко В.Н. Биологизированная защита винограда от оидиума // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2010. С. 810-812

Яковлева И.Н., Мешков Ю.И., Салобукина Н.Н., Горбань Т.Н. Битоксибациллин в системе защиты растений от паутинного клеща // Гавриш. 2013. №4 С.23-29.

Якуба Г. В. Особенности тактики применения биологических препаратов и их эффективность при защите яблони в Краснодарском крае // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2004. С. 246-248

Якуба Г.В. Экологизация защиты яблони от мучнистой росы в Краснодарском крае // Субтропическое и декоративное садоводство. 2007. С. 405-409.

Якуба Г.В., Гусин Д.Н. Разработка элементов технологии применения перспективных микробиологических препаратов при защите яблони от парши и мучнистой росы // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2010. С. 342-345

Якуба Г.В., Гусин Д.Н. Перспективы применения биопрепаратов против альтернариоза в садах интенсивного типа //Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. Краснодар, 2006. С. 336-338.

Ярошенко В.А., Сторчевая Е.М., Якуба Г.В., Подгорная М.Е. Эффективность микробиологических средств защиты яблони от болезней и вредителей // Агро XXI. 2002. № 7-12. С. 67-69.

Яхонтов В.В. Экология насекомых. М.: Высшая школа, 1969. 488с.

Abbott W.S., A method of computing the effectiveness of an insecticide // J. Econ. Entomol. 1925.Vol. 18. P. 265-267.

Abd El-Salam A.M.E., Nemat A.M., Magdy A. Potency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* against the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae // Arch. Phytopathol. Plant Prot. 2011. Vol. 44(3). P. 204-215.

Abdelkefi-Mesrati L., Boukedi H., Chakroun M. et al. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin // J. Invert. Pathol. 2011. Vol.7 (3). P. 198-201.

Abderrahmani A., Tapi A., Nateche F. et al. Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis //* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 92 (3). P. 571-81.

Abushady H.M., Bashandy A.S., Ibrahim H.M.M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production // Int. J. Agricult. Biol. 2005. Vol. 7(3.) P. 337-344.

Agrawal A.A. Induced plant defense: evolution of induction and adaptive phenotypic plasticity. // Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture. // APS, Minnesota. 1999. P. 251-268.

Akram W., Mahboot A., Javed A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt // Eur. J. Microbiol. Immunol. 2013. Vol. 3. P. 275-280.

Ali A., Ikramuliah M., Asif S. et al. Evaluation of lipopeptide (surfactin) production by *Bacillus subtilis* // Biomedica. 2010. Vol. 26 (1). P. 34-38.

Ali B., Sabri AN, Ljung K., Hasnain S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. // Lett. Appl. Microbiol. 2009. Vol. 48. P.542-547.

Alvarez F., Castro M., Principe A. et al. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease // J. Appl. Microbiol. 2012. Vol. 112(1). P. 159-174.

Alyokhin A. Colorado beetle management on potatoes: current challenges and future prospects // Fruit, Vegetables and Cereal Science and Biotechnology. Global Science Book (special issue 1). 2009. P. 10-19.

Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P. et al. The influence of vermicompost application to strawberry: Part 1. Effect on growth and yield. Bioresource Technology. 2004. Vol. 93(2). P.145-153.

Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // Plant Soil. 2005. Vol. 272 (5). P.201-209.

Aroca R., Ruiz-Lozanni J. M. Induction of plant tolerance to semi-arid environments by beneficial soil microorganisms – a review // Sustainable Agriculture Reviews. Springer, 2009. Vol. 2. P. 121-135.

Arreleda E., Jacobs R., Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens // J. Apl. Microbiol. 2010. Vol. 108 (2). P.386-395.

Ashoub A. H., Amara M. T. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* // J. Amer. Sci. 2010. Vol. 6(10). P. 321-328.

Athukorala S.N.P., Fernando W.G.D., Rashid K.Y. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats

using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry // Can. J. Microbiol. 2009. Vol. 55. P.1021-1032.

Avis T. J. Antifungal compounds that target fungal membrane: application in plant disease control // Can J. Plant. Pathol. 2007. Vol. 29(4). P. 323-329.

Awmack, C.S., Leather S.R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects // Ann. Rev. Ent. 2002. Vol.47. P. 817-844.

Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. Vol. 57. P. 233-266.

Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas* // Plant Physiol. 2004. Vol. 134. P. 307-319.

Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food // Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances / Ed. A. Mendez-Vilas. 2011. Formatex. P. 1101-1111.

Bashan Y., De Bashan L.E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae pv. tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilensen* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol.68 (6). P. 2637-2643.

Bechet M., Caradec T., Hussein W.M. et al. Structure, biosynthesis and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 95(3). P. 593-600.

Belyaev A.A., Pospelova N.P., Lelyak A.A. et al. The use of *Bacillus* spp. strains for biocontrol of *Ramularia* leaf spot on strawberry and improving plant health in western siberia // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 2016. Vol. 7(1). P.1594-1606.

Ben Abdallak D., Frikha-Gargouri O., Tounsi S. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of

Agrobacterium tumefaciens strains // J. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 119(1). P.196-207.

Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins // Toxins. 2014. Vol. 6 P.1222-1243.

Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 84 (1). P.11-18.

Bergamasco B., Mendes D.R.P., Fernandes O.A. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in Spodoptera spp. (Lepidoptera) // J. Invert. Pathol. 2013. Vol.112(2). P.152-158.

Berliner E. Die "Schlaffsucht" der Mehlmottenraupe // Z. Gesamte Getreidewes. 1911. H.3. S. 63-70.

Bernays E.A., Chapman R.F. Plant secondary compounds and grasshoppers: beyond plant defenses / / J. Chem. Ecol. 2000. Vol. 26. P. 1773-1794.

Biria D., Maghsondi E., Roostaazad R. et al. Purification and characterization of a novel biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* MS3// World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 26(5). P. 871-878.

Bouizgarne B. Bacteria for plant growth promotion and disease management. Bacteria in agrobiology (ed. D.K. Maheswari. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2013. 870 p.

Bravo A., Gill S., Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control // Toxicon. 2007. Vol. 49. P. 423-435.

Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H. et.al. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 4965-4972.

Bravo A., **Gomez I., Porta H. et al**. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity // Microbial Biotechnol. 2013. Vol. 6. P. 17-26.

Bryant J.P., Chapin S., Klein D.R. Carbon/nutrient balance in boreal plants in relation to vertebrate herbivory // Oikos. 1983. Vol. 40. P.357-368.

Buensanteai N., Yuen G.Y., Prathuangwong S. The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant // Thai J. Agricult. Sci. 2008. Vol. 41(3-4). P. 101-116.

Burges H.D., Jones K.A. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects // Formulations of microbial pesticides (ed. H.D. Burges). Kluwer Acad. Publisher. The Netherlands. 1998. P. 34-127.

Burkchard F., Folker L., Fugmann B. et al. Antibiotics for plant protection // Chem. Unserer. Zeit. 1991. Vol. 25. P. 317-330.

Butko P. Cytolytic toxin Cyt 1A and its mechanism of membrane damage: date and hypothesis // Appl. Environ.Microbiol. 2003. Vol.69. P.2415-2422.

Calvo P., Nelson L., Kloepper J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. Plant& Soil. 2014. Vol. 383(1). P. 3-41.

Catello V.P., Campanile D., Zaccardelli F. M. Novel strains of Bacillus, isolated from compost and compost-amended soils, as biological control agents against soil-borne phytopathogenic fungi // Biocontr. Sci. Technol. 2012. Vol. 22. (12). P. 1373-1388

Cawoy H., Debols D., Franzill de P.E. et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* // Microbial Biotechnol. 2015. Vol. 8 (2). P. 281-295.

Cawoy H., Mariutto M., Henry G. et al. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production // Mol. Plant-Microbe Interaction. 2014. Vol.27 (2). P. 87-100.

Chan Y-K., Savard M.E., Reid L.M. et al. Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control to *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat // BioControl. 2009. Vol. 54 (4). P. 567-574.

Chandrasekaran R., Revathi K., Nisha S. et al. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. // Pesticide Biochem. Physiol. 2012. Vol. 104(1). P.65-71.

Chandrasekaran R., Revathi K., Thanigaivel A. et al. *Bacillus subtilis* chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization/time of flight mass-spectrometry has insecticidal activity against *Spodoptera littoralis* Fab. // Pesticide Biochem Physiol. 2014. Vol. 116. P.1-12.

Chebotar V.K, Makarova N.M, Shaposhnikov A.I. Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. №.4. P.419-423.

Chen Y., Olson D.M., Ruberson J.R. Effects of nitrogen fertilization on tritrophic interections // Arthropod-Plant Interections. 2010. Vol. 4. P.81-94.

Cholodny J. The amount of food consumed and production output of larvae of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // Ecol. Pol. 1967. Vol.15. S. 531-541.

Cho S-J., Lee S., Cha B.J. et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03// FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 223. P. 47-51.

Choi G.J., Kim J-C., Jang K.S., Lee D-H. Antifungal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates on barley and cucumber powdery mildew // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 17 (12). P. 2071-2075.

Chowdhury S.P., Hartmann A., Geo X.W., Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review // Front. Microbiol. 2015. Vol.6 Article 780.

Colins D., Stevens K., Kchan V., Nightengale S. Commercial biopreparations of *Bacillus subtilis* // Phytophatology. 1994. Vol.4(10). P. 1114-1119.

Compant S., Duffy B., Nowak J. et al. Use of plant-growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ .Microbiol. 2005. Vol. 71(9). P. 4951-4959.

Cook R.J. Advances in plant health management in the twentieth century // Annu. Rev. Phytopathol. 2000. Vol. 38. P. 95-116.

Cory J.S., Hoover K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions // Trends Ecol. Evol. 2006. Vol. 21(5). P.278-286.

Couch T. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria //Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application (ed. J. Charles). Kluwer Academic Publishers, 2000. P.297-316.

Coviella C., Trumble J. Effect of elevated atmospheric carbon dioxide on the use of foliar application of *Bacillus thuringiensis* // BioControl. 2000. Vol. 2. P. 325-336.

Crickmore N.,. Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E. et al. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. P.807-813.

Crickmore N. The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins // Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application (ed. J-f. Charles). Kluwer Acad. Publ. The Netherlands, 2000. P. 65-79.

Crickmore N., Baum, J., Bravo A. et al. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature.: http://www.btnomenclature.info/

Crop Science United States: [Электронный ресурс]. URL: https://www.cropscience.bayer.us/. (Last update: 20.04.2016).

Debois D., Fernandez O., Franzil L. et al. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin // Env. Microb. Rep. 2015. Vol. 7 (3). P. 570-582.

Devidas R., Rehberger L.A. The effects of exotoxin (Thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans* // Plant Soil. 1992. Vol.145(1). P. 115-120.

Dicke M., Baldwin I.T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'// Trends Plant Sci. 2010. Vol.15. P. 167-175.

Dimkic I., Beric T., Stevic T. et al. Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds // Biol. Control. 2015. Vol. 87. P. 6-13.

Dodds P.N., Rathjen J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. Nat. Rev. Genet. 2010. Vol. 11(8). P.539–548.

Donmez M. F., Uysal B.D., Erkol E.F., Sezai,C. R. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn on potato and bean using antagonist bacteria //Acta scientiarum polonorum-hortorum cultus. 2015. Vol.14(5). P. 29-40.

Donovan W.P., Donovan J. C., Engleman J. T. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua* // J. Invertebr. Pathol. 2001. Vol.78. P. 45–51.

Dordas, C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review // Agron. Sustainable Develop. 2008. Vol. 28(10). P. 33-46.

Du C., Knowles B., Li J., Ellar D. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolitic toxins in association with a phospholipid bilayer // Biochem. J. 1999. Vol. 338. P. 185-193.

Dua S, Sindhu SS Effectiveness of rhizosphere bacteria for control of root rot disease and improving plant growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). // J. Microbial Res. 2012. Vol. 2 (2). P. 26-35.

Eilenberg J. Hajec A., Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control // BioControl. 2001. Vol. 46. P.387-400.

Elkahoui S., Djebalin N., Karkouch I. et al. Mass spectrometry identification of antifungal lipopeptides from *Bacillus sp.* BCLRB2 against

Rhizoctonia solani and *Sclerotinia sclerotiorum* // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. Vol. 50 (2). P.161-165.

El-Mougy N.S., Abdel-Kader M.M., Alhabeb R.S. *In vitro* antifungal activity of chitinolitic enzymes produced by bioagents against root rot pathogenic fungi // Arch. Phytopathol. Plant Prot. 2011.Vol. 44 (7). P. 613-622.

Emmert B.A.E., Klimowicz K.A., Thomas G., Handelsman J. Genetic of zwittermycin A production by *Bacillus cereus* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol.70. P.104-113.

Escudero I.R., Banyuls N., Bel I. et al. A screening of five Bacillus thuringiensis Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests // J. Invert. Pathol. 2014. Vol.117 (3). P. 51-55.

Etchegaray A., Bueno C.C., de Melo I.S. et al. Effect of highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells // Arch. Microbiol. 2008. Vol. 190 (6). P. 611-622.

Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens // J. Chem. Ecol. 2013. Vol. 39 (7.) P. 869-878.

Farkas J., Sebesta K., Horska K. et al. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis* // Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 1976. Vol.42. P. 909-929.

Feeny P. Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth *Operophtera brumata* // J. Insect Physiol. 1968. Vol. 14. P. 805-817.

Felton G.W., Gatehouse J.F. Antinutritive plant defence mechanisms // Biology Insect Midgut. 1996. P. 373-416.

Finney D.J. Probit Analyses. 3rd Edition, 1971. Cambridge Univ Press. 333p.

Furuya S, Mochizuki M, Aoki Y et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases// Biocontr. Sci. Techno.l 2011. Vol. 21(6). P. 705-720.

Garczynski S.F., Siegel J.P. Bacteria // Field manual of techniques in invertebrate pathology (eds L. Lacey, H. Kaya). Springer, 2007. P. 175-197.

Gatehous J.A. Plant resistanse towards insect herbivores: a dynamic interaction // New Phytologist. 2002.Vol.156. P. 145-169.

Gelender W. The rise and fall of *Bacillus thuringiensis tenebrionis* // Phytoparasitica. 2004. Vol. 32. P.321-325.

Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., et al. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2014. Vol. 21(7). P.4847-60.

Ghribi D., Abdelkefi-Mesrati L., Boukrdi H. et al. The impact of the *Bacillus subtilis* SPBI biosurfactant on the midgut histology of *Spodoptera littoralis* // (Lepidoptera: Noctuidae) and determination of its putative receptor // J. Invert. Pathol. 2012a. Vol. 109 (2). P. 183-186.

Ghribi D., Elleuch M., Abdelkefi-Mesrati L., Ellouse-Chaabouni S. Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPBI biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity // J. Stored Prod. Res. 2012b. Vol. 48(1). P. 68-72.

Gindin G., Navon A., Saphir N., Protasov A., Mendel Z. Environmental persistance of *Bacillus thuringiensis* products tested under natural conditions against *Thaumetopoea wilkinsoni* // Phytoparasitica. 2007. Vol. 35. P. 255-263.

Gong A.P., Li H.P., Yuan O.S., Song X.S. et al. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium* // Plos One. 2015. Vol. 10 (2) e 0116871.

Gopalakrishnan S., Rao G.V.R., Humayun P., Pao V.R., et al. Efficacy of botanical extracts and entomopathogens on control of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* // Afr. J. Biotechnol. 2011. Vol. 10(73). P. 16667-16673.

Grangemard I., Bonmatin J-M., Bernilon J. et al. Lichenysins G, a novel family lipopeptide biosurfactants from *Bacilus licheniformis* IM 1307: production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry // The J. Antibiotics. 1999. Vol. 52(4). P. 363-373.

Grochulski P., Masson L., Borisova S. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insect toxin: crystal structure and channel formation // J. Mol Biol. 1995. Vol. 254. P.447-464.

Grove M., Kimble W., McCarthy W. Effects of individual *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins on adult *Heliothis virescens* F. and *Spodoptera exigua* Hubn. // BioControl. 2001. V.46. P. 321-335.

Guo Q., Dong W., Li S. et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease // Microbiol. Res. 2014. Vol.169 (7-8). P. 533-540.

Haidar R., Deschamps A., Roudet J. et al. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine // Biol. Control. 2016. Vol. 92. P.55-65.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaftee W.F. Endophytic bacteria in agricultural crops // Can. J. Microbiol. 1997. Vol. 43. P. 895-914.

Hamadou-Charfi D.B., Boukedi H., Abdelkefi-Mesrati et al. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin // J. Invert. Pathol. 2013. Vol. 114 (2). P. 139-143.

Hang NTT, Oh S-O, Kim GH, Hur J-S, Koh YJ. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries// Plant Pathol. J. 2005. Vol. 21. 1. P. 59-63.

Hathout Y., Ho Y.P., Ryzhov V. et al. Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis* / // J. Natur. Products. 2000. Vol. 63 (11). P. 1492-1496.

Haukioja E. Putting the insect into the birch – insect interaction //Oecologia. 2003. Vol. 136. P. 161-168.

Haukioja E. Plant defenses and population fluctuations of forest defoliators: mechanism –based scenarios //Ann. Zool. Fennici. 2005. Vol. 42. P. 313-325.

Haukioja E., Bent E., Tuzun S. Tree defenses against insects // Multigenic and induced systemic resistance in plants. Boston: Kluver Academic Publishers. 2005. P.279-296.

Heil M. Indirect defence via tritrophic interactions // New Phytologist. 2008. Vol. 178. P.41-61.

Heimpel A. A critical revew of *Bacillus thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria // Ann. Rev. Entomol. 1967. Vol. 12. P. 287-320.

Helbig J., Bochow H. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry // Zeitschrift Pflanzenkranrheiten Pflanzenschutz. 2001. Vol. 108 (6). P. 545-549.

Hernandez-Martinez P., Hernandez-Rodriguez C.S., Van Rie J. et al. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. // J. Invert. Pathol. 2013. Vol. 113 (1). P. 78-81.

Hernandez-Rodriguez C.S., Boets A., Van Rie J., Ferre J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains // J. Appl. Microbiol. 2009. Vol.107. P. 219-225.

Heydari A., Pessarakli M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists // J. Biol. Sci. 2010. Vol.10 (4). P. 273-290.

Hilbeck A., Eckel C., Kennedy G. Impact of *Bacillus thuringiensis* insecticides on population dynamics and egg predation of the Colorado beetle in North Carolina potato planting // BioControl. 1998. Vol.43. P.65-75.

Hofte H., Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // Microbiol. Rev. 1989. Vol.53. P. 242-255.

Hua G., Jurat-Fuentes J., Adang M. *Bt*-R extracellular cadherin mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 28051-28056.

Hussain A., Hasnain S. Cytokinin production by some bacteria: its impact in cell division in cucumber cotyledons // Afr. J. Microbio.l Res. 2009. Vol. 3 (11). P. 704-712.

Idris E.E., Iglesias E.J., Talon M. et al. Triptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. Vol. 20. P. 619-626.

Ignoffo C. Environmental factors affecting persistance of entomopathogens // Fla. Entomol. 1992. Vol. 75. P. 516-525.

Ignoffo C., Garcia C. V-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation // Environ. Entomol. 1978. Vol. 7. P. 270-272.

Islam S., Akanda A.M., Prova A. et al. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease control // Front. Microbiol. 2016. Vol. 6. Aricle 1360.

Jafary M., Karimzadeh J., Farazmand H., Rezapanah M. Plant-mediated vulnerability of an insect herbivore to *Bacillus thuringiensis* in a plant – herbivore – pathogen system // Biocontr. Sci. Technol. 2016. Vol. 26 (1). P. 104-115.

Jamalizadeh M, Etebarian Hr, Alizadeh A, Aminian H. Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN741) // Phytoparasitica. 2008. Vol. 36 (1). P. 23-29.

Janisiewicz W.J., Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits // Annu. Rev. Phytopathol. 2002. Vol. 40. P. 411-441.

Janmaat A.F., Myers J.H. The cost of resistance to *Bacillus thuringienis* varies with the host plant to *Trichoplusia ni* // Proc. Biol. Sci. 2005. Vol.272. P. 1031-1038.

Ji S.H., Paul N.C., Deng J.X. et al. Biocontrol activity of *Bacllus amiloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant disease// Microbiology. 2013. Vol. 41(4). P. 234-242.

Jourdan E., Henry G., Duby F. et al. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis* // Mol. Plant Microbe Interact. 2009. Vol. 22 (4). P. 456-468.

Kabaluk J.T., Svircev A.M., Goettel M., Woo S.G. The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdiction worldwide. 2010. IOBC Global. 99p.

Kai E.T, Berg M., U., Birgit G. P., Volatiles of bacterial //antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani* //Arch. Microbiol. 2007. Vol. 187(5). P. 351-360

Kaitaniemi P., Ruohomaki K., Ossipov V. et al. Delayed induced changes in the biochemical composition of host plant leaves during an insect outbreak // Oecologia. 1998. Vol. 116 (1-2). P. 182-190.

Kamenek L.K, Kamenek D.V, Terpilowski M.A., Gouli V.V. Antifungal action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin against pathogenic fungi related to *Phytophthora* and *Fusarium* // J. Agricult. Technol. 2012. Vol.8(1). P. 191-203.

Karban R., Baldwin I.T. Induced responses to herbivory // University of Chicago Press, Chicago 1997. 319 p.

Karunya S., Reetha D., Sarannraj P., Milton D.J. Optimization and purification of chitinase produced by *Bacillus subtilis* and its antifungal activity gainst plant pathogens // Int. J. Pharm. Biol. Arch. 2011. Vol. 2 (6). P. 1680-1685.

Khan M.M., Mohammed F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants // Biol. Medicine. 2011. Vol. 3. P.232-249.

Khan M.Q., Abbasi M.V., Zaki M.J., Khan S.A. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against root-knot nematodes following seed applications in okra and mungbean // Pak. J. Bot. 2010. Vol. 42(4). P. 2903-2910.

Kim H. S., Sneller C. H., Diers B. W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia* stem rot in field environments // Crop Sci. 1999. Vol. 39. P. 64–68.

Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H. et al. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26 // J. Appl. Microbiol. 2004. Vol. 97. P. 942-949.

Kim P.I., Chung K.-C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 234. P. 177-183.

Kim P.I., Ryu J., Kim Y.H., Chi Y-T. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides* // J. Microbial Biotechnol. 2010. Vol. 20(1). P.138-145.

Kinsella K., Schulthess C., Morris T. et al. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere // Soil. Biol. Biochem. 2009. Vol.41 (2). P. 374-379.

Kloepper J.W., Ryu C.M., Znan S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. // Phytopathology. 2004. Vol. 94(11). P.1259-1266.

Knaak N., Rohr A., Fiuza L. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry-proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice – field // Brazil. J. Microbiol. 2007. Vol.38 (3). 10 pp.

Kouassi K.C., Lorenzetti F., Guertin C. et al. Variation in the susceptibility of the Forest Tent Caterpillar (*Lepidopera: Lasiocampidae*) to *Bacillus thuringiensis* variety kurstaki HD-1: Effect of the host plant. // J. Econ. Entomol. 2001. Vol. 94(5). P 1135-1141.

Koumoutsi A., Chen X-H, Vater J., Boriss R. et al. Positively regulate the synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 // Appl. Env. Microbiol. 2007. Vol. 73(21). P. 6953-6964.

Krieg A., Huger A., Langenbruch G., Schnetter W. *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis:* Ein neuer, gegenuber larven von Coleopteran wirksamer Pathotip // Z. angew. Entomol. 1983. H. 96. S.500-508.

Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V, e.a Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction // Mol. Plant-Microbe Interact. 2004. Vol. 17(1). P. 6-15.

Lacey L.A., Grywacz D., Shapiro-Ilan D. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future // J. Invert. Pathol. 2015. Vol. 132. P. 1-41.

Leclere V., Bechet M., Adam A. et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities // Appl. Env. Microbiol. 2005. Vol. 71(8). P 4577-84.

Lee K.Y., Heo K.R., Choi K.H. et al. Characterization of a chitinase gene exhibiting antifungal activity from a biocontrol bacterium *Bacillus licheniformis* N1 // J. Plant Pathol. 2009. Vol. 25 (4). P. 344-351.

Lee M., Walters F., Hart H., Palekar N., Chen J. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab endotoxin // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. P. 4648-4657.

Lee S-C., Kim S-H., Park I-H. et al. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity // Arch. Microbiol. 2007. Vol. 188. P. 307-312.

Lereclus D., Delecluse A., Lecade M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes // *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Wiley and Sons, 1993. P. 37-69.

Li H., Chougule N.P., Bonning B.C. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins Cry 1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) // J. Invertebr. Pathol. 2011. Vol. 107 (1). P. 69-78.

Li Y-M., Haddad N.I.A., Yang S-Z., Mu B.-Z. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS// Int. J. Peptide Res. Theurapeut. 2008. Vol. 14(3). P. 229-235.

Liu H., Tan Z.Q., Zhang R.Y. Identification of a strain of antagonistic bacterium against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and control experiment of bagged seedlings in vitro// China Southern Fruit .2011. Vol.40(3).P.36–39.

Liu J., Hagberg I., Novitsky L. et al. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effects on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens // Fungal Biology. 2014. Vol. 118(11). P. 855-861.

Liu X., **Ruan L., Sun M., Yu Z.** Thuringiensin: a thermostable secondary metabolite from Bacillus thuringiensis with insecticidal activity against wide range of insects // Toxins. 2014. Vol. 6. P.2229-2238.

Liu Y., Chen L., Zhang N. et al. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 // Mol. Plant-Microbe Intract. 2016. Vol. 29(4). P. 324-330.

Lopez P., Ceron S. Three dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: a review // Acta boil. Colomb. 2007. Vol.12. P.19-32.

Lord J. From Metchnikoff to Monsanto and beyond // J. Invertebr. Pathol. 2005. Vol .89. P.19-29

Luo C. Zhou H., Zou J. et al. Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani* // Appl. Microbio.l Biotechnol. 2015. Vol. 99(4). P. 1897-1910.

Luthy P., Wolfersberger M. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins / P. Luthy, //Entomopathogenic bacteria: from labor to field application. Kluwer Academic Publisher, 2000. P. 167-180.

Lynch J. M. The rhizosphere. Chichester, England, J. Willey Ltd., 1990. 367 p.

Ma X., Wang X., Cheng J. et al. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato // Biol. Control. 2015. Vol. 90. P. 34-41.

Manonmani A.M., Geetha I., Bhuvaneswari S. Enhanced production of mosquitocidal cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* // Ind. J. Med. Res. 2011. Vol. 134. P. 476-482.

Marquis R.J. Plant architecture, sectoriality and plant tolerance to herbivores // Vegetatio 1996. Vol.127. P.85-97.

Martinez-Absalon S., Rojas-Solis D., Hernandez-Leon R., Prieto-Barajas C. et al. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea* // Biocontrol Sci. Technol. 2014. Vol. 24 (12). P. 1349-1362.

McGuere M. L. Galan-Wong, P. Tamez-Guerra. Bacteria. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against Lepidopteran larvae // Manual of techniques in insect pathology (ed. L. Lacey). Acad. Press San Diego. Toronto, 1997. P.91-99.

Meade T., Hare J. Effects of differential host plant consumption by *Spodoptera exogua* on *Bacillus thuringiensis* efficacy // Environ. Entomol. 1993. Vol. 23 (2). P. 432-437.

Meade T., Hare J. Integration of host plant resistance and *Bacillus thuringiensis* insecticides in the management of Lepidopterous pests on celery // J. Econ. Entomol. 1995. Vol 88 (6). P. 1787-1794.

Mizumoto S., Hirai M., Shoda M. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 75(6). P. 1267-1274.

Mnif I., Ellench M., Chaabouni SE, Ghirbi D. *Bacillus subtilis* SPBI biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carob *Ectomyelois ceretoniae* // Crop Prot. 2013. Vol. 50. P. 66-72.

Mnif I., Ghribi D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management // Crop Prot. 2015. Vol.77. P. 52-64.

Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-Lion J. et al. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani* // Env. Sci. Poll. Res. 2016. Vol. 23(7). P. 6690-6699.

Mnif I., Hammami I., Triki M.A. et al. Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived *from Bacillus subtilis* SPB1 versus the

phytopathogenic fungus *Fusarium solani* // Env. Sci. Poll Res. 2015. Vol. 22(22). P. 18137-18147.

Mohammad A. M., El-Fatin M. M, Helmy K.G. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* strains and their efficacy against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* // Arch.Phytopathol. Plant Prot. 2013. Vol. 46 (20). P.2420-2427.

Mohammed S. H., El- Saedy M. A., Enan M. R. et al. Biocontrol efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* // J. Cell Mol. Biol. 2008. Vol. 7 (1). P. 57-66.

Mojica-Marin V., Luna-Olvera H., Sandoval-Coronado C., Pereyra-Abferer B et al. Antagonistic activity of selected strains of *Bacillus thuringiensis* against *Rhizoctonia solani* of chili pepper // Afr. J. Biotechnol. 2008. Vol.7(9). P.1271-1276.

Nicot P.C., Bardin, M., Debruyne, F., Duffand, M. et al. Effect of nitrogen fertilization of strawberry plants on the efficacy of defence-stimulating biocontrol products against *Botrytis cinerea*. // IOBC-WPRS Bull. 2013. Vol. 88. P. 39-42.

Nihorimbere V., Cawoy H., Seyer A. et al. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from plant beneficial strains *Bacillus amyloliquefaciens* S499 // FEMS Microbiol Ecol. 2012. Vol. 79. P. 176-181.

Nihorimbere V., Fickers P., Thonart P., Ongena M. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere // Env. Microbiol. Rep. 2009. Vol. 1(2). P. 124-130.

Ongena M., Jacques P., Toure Y. et al. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* // App.l Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 69(1). P 29-38.

Ongena M., Jourdan E., Adam A. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance of plants // Env. Microbiol. 2007. Vol. 9. P. 1084-1090.

Palma L., Escudero I.R., Maeztu M. et al. Screening of vip genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests // Biol. Control. Vol. 66 (3), 2013. P. 141-149.

Paramasiva I., Krishnayya P., War A.R., Sharma H.C. Crop hosts and genotypic resistance influence the biological activity of *Bacillus thuringiensis* towards *Helicoverpa armigera* // Crop Prot. 2014. Vol. 64 (10). P.38-46.

Pardo-Lopez L., Soberon M., Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry-toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection // FEMS Microbiol. Rev. 2013. Vol. 37. P. 3-22.

Paulitz T.C., Belanger R.R. Biological control in green house systems // Annu. Rev. Phytopatol. 2001. Vol. 39. P. 103-133.

Peighami-Ashnaei S, Sharifi-Tehran A., Ahmadzadeh M, Behboudi K. Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mold apple // J. Plant Pathol. 2009. Vol. 91. P. 65-70

Perez-Garsia A., Romero D., Vicentedei A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms. Curr. Opinion Biotechnol. // 2011. Vol. 22(2). P. 187-193.

Pertot I., Puopolo G., Hosni T. et al. Limited impact of abiotic stress on surfactin production on planta and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean // FEMS Microbiol Ecol. 2013.Vol. 86. P. 505-512.

Petras S., Casida L. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil // Appl.Environ. Microbiol. 1985. Vol. 50. P. 1496-1501.

Pirttil A.M., Podolich O., Koskimki J.J., Hohtola E., Hohtola A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2008. Vol. 95. P. 47-55.

Polyanskaya L.M., Vedina O.T., Lysak L.V. et al. The growth-promotion effect of *Beijerinckia mobilis* and *Clostridium sp*. cultures on some agricultural crops // Microbiology. 2002. 71(1). P. 109-115.

Pozsgay M., Fast P., Kaplan H., Carey P. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstak*i: a Raman spectroscopy // J. Invertebr. Pathol. 1987. Vol. 50. P. 246-253.

Price N., Rooney A.P., Swezey J.L. et al. Mass-spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations // FEMS Microbiol Lett. 2007. Vol. 271. P. 83-89.

Price P.W. Isect Ecology; 3th edition// John Wiley & Sons. 1997. 874 p.

Pusztai M., Fast P., Gringorten I. et al. The mechanism of sunlight mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals // Biochem. J. 1991. Vol .273. P. 43-47.

Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. 2010. Vol. 34. P.1037-1062.

Ramarathnam R., Fernando W., Kievit T. The role of antibiosis and induced systemic resistance, mediated by strains of *Pseudomonas chlororaphis, Bacillus cereus* and *Bacillus amyloliquefaciens* in controlling blackleg disease of canola// BioControl. 2011. Vol .56(2). P. 225-235.

Recanovic E., Stepanović M., Potočnik I. et al. Field efficacy of fungicides and biofungicides in the control of spur blight of raspberries in Serbia. Acta Hort (ISHS). 2012. Vol. 946. P. 289-292.

Regev A., Keller M., Strizhov N. et al. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* endotoxin and a bacterial endochitinase *against Spodoptera littoralis* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V.62. P. 3581-3586.

Revathi K., Chandrasekaran R., Thanigaivel A. et al. Biocontrol efficacy of protoplast fusants between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* against *Spodoptera litura* Fabr. // Arch. Phytopathol. Plant Prot. 2014. Vol. 47(11). P.1365-1375.

Revathi K., Chandrasekaran R., Thanigaivel A. et al. Effect of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. // Pesticide Biochem. Physiol. 2013. Vol. 107. P. 369-376.

Reyes-Ramirez A., Escudero-Abarca B.I. et al. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds // J. Food Sci. 2004. Vol. 69. N 5. P. 131-134.

Rios R.S., Cardenas M., Conzalez K. et al. Effects of host plant maternal feeding experience on population vital rales of a spcialized leaf beetle // Arthropod-Plant Interections. 2013. Vol.7. P.109-118.

Romero D., de Vicente A., Rakotoaly R. et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podoshaera fusca* // Mol. Plant-Microbe Inter. 2007. Vol. 20 (4). P. 430-440.

Romero D.A., Perez-Garcia M.E., Rivera F.M. et al. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* // Appl. Microbiol.Biotechnol. 2004.Vol. 64. P. 263-269.

Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites // Academic Press, San Diego. 1992. Vol.1. 308 p.

Roy A., Meheta D., Paul D. et al. Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1 //Front. Microbiol. 2013. Vol. 4: 332.

Saber W.I.A., Ghoneem K.M., Al-Askar A.A. et al. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato // Acta Biol. Hungarica. 2015. Vol. 66 (4). P. 436-448.

Sadfi N., Cherif M., Hajlaoui M.R., Boudabbous A. Biological control of the potato tubers dry rot caused by *Fusarium roseum* var. *sambucinum* under greenhouse, field and storage conditions using *Bacillus spp*. Isolates // J. Phytopathology. 2002. Vol. 150 (11-12). P. 640-648.

Salama H., Aboul-Fla R., Abdel-Rosec A. Enhancers for biological insect control // J. Appl. Entomol. 1996. Vol.120. P. 249-254.

Saraf M., Pandya U., Thakkar A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens // Microbiol. Res. 2014. Vol. 169. P. 18-29.

Sattar S., Biswas P., Hossain M. et al. Search for vegetative insecticidal proteins from local isolates of *Bacillus thuringiensis* effective against lepidopteran and homopteran insect pests // J. Biopesticides. 2008. Vol. 1. P.216-222.

Schisler A. T., Slininger D. A., Sloan P. J. et al. Selection of biocontrol agents of pink rot based on efficacy and growth kinetics index rankings //Plant Disease. 2012. Vol. 95 (1). P. 24-30.

Schisler D.A., Slininger P.J., Miller J.S. et al. Bacterial antagonists, zoospore inoculum retention time and potato cultivar influence pink rot disease development // Am. J. Potato Res. 2009.Vol. 86(2). P. 102-111.

Schmiedeknecht G., Bochow H., Junge H. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases // J. Plant Dis. Protect. 1998. Vol.105 (4). P. 376-386.

Schoonhoven L.M. Loon J.J.A., Dicke M. Insect-plant biology // Oxford, UK: Oxford University Press. 2005. 421 p.

Schoonhoven L.M., Jermy T., van Loon J.J.A. 1998. Insect-Plant Biology. London: Chapman & Hall. 409 p.

Schwenke W. Neue Hinweise auf eine Abhangigkeit der Vermehrung blatt- und nadelfressender Forstinsekten vom Zuckergehalt ihrer Hahrung // Zeitschr. Angew. Entomol. 1968. Vol.61. P.365-369.

Scriber J.M., Feeny P. Growth of herbivorous caterpillars in relation to feeding specialization and to the growth from of their food plants // Ecology. 1979. Vol. 60. P.829-850.

Scriber J.M., Slansky F. The nutritional ecology of immature insects // Annu. Rev. Entomol. 1981. Vol. 26. P. 183-211.

Seo D.J., Nguen D.M., Song Y.S., Jung W.J. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plant by endophytic bacterium

Bacillus thuringiensis GS1 // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 22 (3). P. 407-415.

Shao J., Li S., Zhang N. et al. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacilus amyloliquefaciens* SQR9 // Microb. Cell Factories. 2015. Vol. 14:130.

Sharma N., Singh H. Biotechnology: plant health management // Intern. Book Sist. 2007. 778 p.

Shrestha A., Sultana R., Chae J-C. et al. *Bacillus thuringiensis* C-25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* // Eur. J. Plant Pathol. 2015. Vol. 142 (3). P. 577-589.

Shternshis M., Beljaev A., Shpatova T., Bokova J., Duzhak A Field testing of Bacticide, Phytoverm and Chitinase for control of raspberry midge blight in Siberia // BioControl. 2002. Vol. 47. P.697-706.

Shternshis M., Shpatova T., Belyaev A. Effect of two biological formulations based on *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on control of *Didymella applanata*, the causal agent of red raspberry cane spur blight // Int. J. Agron. 2016. Vol. 2016. 6 p.

Shternshis M.V. Ecologically safe control of insect pests: the past, the present and the future // Emerging aspects of plant health management (eds. R. Lartney & B. Caesar). Research Sign.: Kerala. 2004. P. 187-212.

Siddiqui Z.A. PGPR: Biocontrol and biofertilization. V. XIII (ed.). Springer, Berlin Heidelberg, N.Y. 2005. 318p.

Silva K.F., Spencer T.A., Gill C.C. et al. Impact of *Spodoptera frugiperda* neonate pretreatment conditions on Vip3Aa19 insecticidal activity and laboratory boassay variation // Pest Manag. Sci. 2016. Vol. 72. P. 837-844.

Smirnoff W.A. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis* // Can. Entomol. 1971. V.10. P.1829-1831.

Solanki M.K., Robert A.S., Singh R.K. et. Al. Characterization of mycolitic enzymes of *Bacillus* strains and their bioprotection role against *Rhizoctonia solani* in tomato // Curr Microbiol. 2012. Vol. 65(3). P. 330-336.

Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions // 2005. Mol. Microbiol. Vol. 56(4). P. 845-57.

Shternshis M.V., Belyaev A.A., Matchenko N.S., Shpatova T.V. et al. Possibility of biological control of primocane fruiting raspberry disease caused by *Fusarium sambucinum* // Env. Sci. Pollut. Res. 2015. Vol. 22 (20). 2015. P.15656-15662.

Subramanian S., Smith D.L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – from an agricultural perspective // Front. Plant Sci. 2015. Vol. 6(10). Article 909.

Sultana R., Kim K. *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraiana* in mulberry (*Moris australis* L.) // Biocontr. Sci. Technol. 2016. Vol. 26(2). P. 145-162.

Tanada Y. *Bacillus thuringiensis:* integrated control – past, present and future // Comparative pathobiology (ed. T. Cheng). 1984. Vol.7. P. 59-90.

Tao A., Pang F., Huang S. et al. Characterisation of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut // Biocontrol Sci. Tecnol. 2014. Vol. 24. N 8. P. 901-924.

Tenow O., Holmgren B. Low winter temperatures and an outbreak of *Epirrita autumnata* along a valley of Finnmarksvidda, the “Cold Pole” of northern Fennoscandia / Alexandersson H., Holmgren B. (eds.): Climatological extremes in the mountains. Physical background, geomorphological and ecological consequences. Uppsala University, Sweden: UNGI Rapport. 1987. Vol. 65. P. 203-216.

Thomashow L.S. Biological control of plant root pathogens // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. Vol 7. P. 343-347.

Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple // J. Appl. Microbiol. 2004. Vol. 96 (5). P. 1151-1160.

Tsvetkova V. P., Shternshis M. V., Shatalova E. I., Bakhvalov S.A. et al. Polyfunctional properties of enomopathogenic bacterium in protecting potato in Western Siberia // Biosci. Biotech. Res. Asia. 2016. Vol. 13(1). P. 9-15.

Van Loon L.C. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria //Eur. J. Plant Pathol. 2007. Vol. 119(3). P. 243-254.

Verma J.P., Yadov J., Tiwari K.N. et al. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production // Int. J. Agricult. Res. 2010. Vol. 5(1). P. 954-983.

Virtanen T., Neuvonen S., Nikula A. Modelling topoclimatic patterns of egg mortality of *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae) with Geographical Information System: predictions for current climate and warmer climate scenarios // J. Appl. Ecol. 1998. Vol. 35. P. 311-322.

Vitullo D., Di Pietro A., Romno A. et al. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum* // Plant Pathol. 2012. Vol. 61. P 689-99.

Walling L.L. The myriad plant responses to herbivores // J. Plant. Growth Regul. 2000. Vol. 19. P. 195-216.

Weller D.M., Raaijmak J.M., McSpadden et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. 2002. Vol.40. P. 309-348.

West A., **Burges H.** Persistance of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil supplemented with grass or manure // Plant and Soil. 1985. Vol.83. P. 389-398.

Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52. P. 487-511.

Wu L., Wu H-J., Qiao J. et al. Novel routs for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants // Frontiers Microbiol. 2015. Vol. 6. Aricle 1395.

Xu Z., Shao J., Li B. et al. Contribution of Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation //Appl. Env. Microbiol. 2013. Vol. 79(3). P. 808-815.

Xu C., **Wang B-C., Yu Z., Sun M**. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins // Noxins. 2014. Vol. 6. P. 2732-2770.

Yamamoto S., Shiraishi S., Suzuki S. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Collectotrichum gloeosporiodes*? // Lett. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 60(4). P. 379-381.

Yanez-Mendizabal V., Zeriouh H., Vinas I. et al. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides// Europ. J. Plant Pathol. 2012. Vol. 132. P. 609-619.

Yang J., Kloepper J.W., Ryu C-M. Rizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress // Trends Plant Sci. 2009. Vol. 14 (1). P. 1-4.

Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* // Soil Biol. Biochem. 2002. Vol.34. N 7. P.955-963.

Yuan J., Raza W., Huang Q., Shen Q. The ultrasound-assisted and identification of antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens*/strain NJ N-6 suppressing *Fusarium oxysporum* // J. Basic Microbiol. 2012. Vol. 52(6). P. 721-730.

Zeriouh H., de Vicente A., Perez-Garcia A. et al. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity // Environ. Microbiol. 2014. Vol. 16 (7). P. 2196-2211.

Zeriouh H., Romero D., Garcia-Guttierez L. et al. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial disease of curcubits // Mol. Plant-Microbe Interaction. 2011. Vol. 24 (12). P.1540-52.

Zhang F., Peng D., Ye X. et al. *In vitro* uptake of 140 kDa *Bacillus thuringiensis* nematicidal crystal proteins by the second stage juvenile of *Meloidogyne hapla* // PloS ONE. 2012. Vol. 7(6). e38534.

Zhong W-F., Fang J-L., Cai P.Z. et al. Cloning of the *Bacillus thuringiensis* ser. *sotto* chitinase (Schi) gene and characterization of its protein // Genetics Mol. Biol. 2005. Vol. 28(4). P. 821-826.

Zhou Y., Choi Y., Sun M., Yu Z. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80 (4). P. 563-572.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Глава 1. **ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ, ФИТОПАТОГЕНАМИ, ФИТОФАГАМИ И ПОЛЕЗНЫМИ БАЦИЛЛАМИ**

1.1. Влияние фитопатогенных микроорганизмов на растения

1.2. Взаимодействие насекомых- фитофагов с растениями

1.3. Действие антагонистов на фитопатогенные микроорганизмы

1.4. Взаимодействие *Bacillus thuringiensis* с фитофагами

Глава 2. **СОЗДАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЗДОРОВЬЕ РАСТЕНИЙ**

2.1. Общие принципы разработки биопрепаратов на основе бацилл

2.2. Создание биопрепаратов для подавления болезней растений

2.3. Разработка энтомопатогенных бактериальных препаратов

2.4. Использование биопрепаратов на основе антагонистов фитопатогенов

2.5. Применение энтомопатогенных бактериальных препаратов

Глава 3. **ОПТИМИЗАЦИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ЗДОРОВЬЕМ РАСТЕНИЙ**

3.1. Основы полифункционального действия агентов биоконтроля организмов, повреждающих растения

3.2. Многоцелевое влияние бацилл-антагонистов фитопатогенов

3.3. Полифункциональное действие *Bacillus thuringiensis*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛИТЕРАТУРА