

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”  
(ФГБНУ ВИЗР)

ISSN 1727-1320 (Print),  
ISSN 2308-6459 (Online)

**В Е С Т Н И К**  
**ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**

---

**PLANT PROTECTION NEWS**

**3(93) – 2017**

Санкт-Петербург – Пушкин  
2017

# ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

УДК 632

Научно-теоретический рецензируемый журнал

Основан в 1939 г.

Издание возобновлено в 1999 г.

Включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК  
как журнал, входящий в международную базу данных AGRIS

Учредитель Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР)  
Зарегистрирован в ГК РФ по печати № 017839 от 03 июля 1998 г.

Главный редактор В.А.Павлюшин

Зам. гл. редактора В.И.Долженко

Отв. секретарь В.Г.Иващенко

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Н.Власенко, академик РАН, СибНИИЗХим

Патрик Гроотаерт, доктор наук, Бельгия

Дзянь Синьфу, профессор, КНР

В.И.Долженко, академик РАН, ВИЗР

Ю.Т.Дьяков, дбн, профессор, МГУ

В.А.Захаренко, академик РАН, МНИИСХ

С.Д.Каракотов, академик РАН,

    ЗАО Щелково Агрохим

В.Н.Мороховец, кбн, ДВНИИЗР

В.Д.Надыкта, академик РАН, ВНИИБЗР

В.А.Павлюшин, академик РАН, ВИЗР

С.Прушински, дбн, профессор, Польша

Т.Ули-Маттила, профессор, Финляндия

Е.Е.Радченко, дбн, ВИР

И.В.Савченко, академик РАН, ВИЛАР

С.С.Санин, академик РАН, ВНИИФ

С.Ю.Синев, дбн, ЗИН

К.Г.Скрябин, академик РАН, “Биоинженерия”

М.С.Соколов, академик РАН, ВНИИФ

С.В.Сорока, ксxn, Белоруссия

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

О.С.Афанасенко,

    академик РАН

И.А.Белоусов, кбн

Н.А.Белякова, кбн

Н.А.Вилкова, дсxn, проф.

Н.Р.Гончаров, ксxn

И.Я.Гричанов, дбн

В.Г.Иващенко, дбн, проф.

М.М.Левитин, академик РАН

Н.Н.Лунева, кбн

А.К.Лысов, ктн

Г.А.Наседкина, кбн

В.К.Моисеева (секр.), кбн

Н.Н.Семенова, дбн

Г.И.Сухорученко, дсxn, проф.

С.Л.Тютюрев, дбн, проф.

А.Н.Фролов, дбн, проф.

И.В.Шамшев, кбн

## Редакция

И.Я.Гричанов (зав. редакцией), С.Г.Удалов, В.К.Моисеева

Россия, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ВИЗР

Email: [vestnik@vizr.spb.ru](mailto:vestnik@vizr.spb.ru)

<http://vizr.spb.ru/>

© Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР)

## СОДЕРЖАНИЕ

Интенсификация растениеводства и эколого-продукционный баланс агроэкосистем: снижение плодородия почв и фитосанитарная дестабилизация В.Г. Иващенко, В.А. Павлюшин . . . . .	5
Биологическое обоснование оптимизации препаративных форм биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для контроля популяций фитопатогенных грибов и бактерий – возбудителей болезней растений И.И. Новикова, Ю.А. Титова, И.В. Бойкова, В.Н. Зейрук, И.Л. Краснобаева, Т.А. Серова . . . . .	16
Селективное влияние сортов пшеницы с геном Tsn1 на формирование популяции возбудителя желтой пятнистости <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Н.В. Мироненко, О.А. Баранова, Н.М. Коваленко, О.С. Афанасенко, Л.А. Михайлова . . . . .	23
Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой Э.В. Попова, Н.С. Домнина, Н.М. Коваленко, Е.А. Борисова, Л.Е. Колесников, С.Л. Тютюрев . . . . .	28
Антибиотическая активность <i>Xenorhabdus sp.</i> (Enterobacteriaceae) симбионтов энтомопатогенных нематод (Rhabditida: Steinernematidae) Л.Г. Данилов, Е.А. Зорина, Т.Ю. Нащекина . . . . .	33
Фузариозная инфекция и контаминация микотоксинами зерна сортов ярового ячменя Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова . . . . .	39
Методические подходы к экономической оценке эффективности мероприятий по защите растений в условиях отдельного эксперимента Н.Р. Гончаров . . . . .	44
Рост корней трансгенных растений <i>Nicotiana tabacum</i> L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтазы рапса <i>BnGSH</i> при действии стрессовых факторов З.А. Бережнева, А.Р. Кашафутдинова, Б.Р. Кулуев . . . . .	55
<u>Краткие сообщения</u>	
Жуки-щелкуны в агроценозах юго-запада европейской части России В.Н. Орлов, О.М. Зеленская . . . . .	60
Издано в ВИЗР . . . . .	63

## CONTENT

Crop production intensification and ecological production balance of agricultural ecosystems: the decline in soil fertility and phytosanitary destabilization V.G. Ivashchenko, V.A. Pavlyushin . . . . .	5
Biological background for optimization of biological products based on microbe antagonists for control of phytopathogenic micromycetes and bacteria populations – causative agents of plants diseases I.I. Novikova, Yu.A. Titova, I.V. Boikova, V.N. Zeiruk, I.L. Krasnobaeva, T.A. Serova . . . . .	16
Selective influence of wheat cultivars with Tsn1 gene on the formation of tan spot causative agent <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> population N.V. Mironenko, O.A. Baranova, N.M. Kovalenko, O.S. Afanasenko, L.A. Mikhailova . . . . .	23
Biological activity of chitosan with various molecular weights E.V. Popova, N.S. Domnina, N.M. Kovalenko, E.A. Borisova, L.E. Kolesnikov, S.L. Tyuterev . . . . .	28
Antibiotic activity of <i>Xenorhabdus sp.</i> (Enterobacteriaceae) symbiont of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) L.G. Danilov, E.A. Zorina, T.Yu. Nashchekina . . . . .	33
<i>Fusarium</i> infection and mycotoxins contamination in grain of spring barley cultivars T.Yu. Gagkaeva, O.P. Gavrilova . . . . .	39
Economic evaluation of effectiveness of plant protection activities in conditions of separate experiment: methodological approach N.R. Goncharov . . . . .	44
Root growth in <i>Nicotiana tabacum</i> transgenic plants with overexpression of BnGSH gene of oilseed rape glutathione synthetase under stress factors Z.A. Berezheva, A.R. Kashafutdinova, B.R. Kuluev . . . . .	55
<u>Brief Reports</u>	
Click beetles in agrocenoses of South-Western European Russia V.N. Orlov, O.M. Zelenskaya . . . . .	60
Published in VIZR . . . . .	63

УДК 633/635:633.11+631.524.84

## ИНТЕНСИФИКАЦИЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА И ЭКОЛОГО-ПРОДУКЦИОННЫЙ БАЛАНС АГРОЭКОСИСТЕМ: СНИЖЕНИЕ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ И ФИТОСАНИТАРНАЯ ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ

В.Г. Иващенко, В.А. Павлюшин

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург*

Проведен ретроспективный анализ роста продуктивности пшеницы в процессе интенсификации методов отбора создаваемых короткостебельных сортов и её перспектив в селекционных учреждениях России и зарубежных стран. Используются изложенные в открытой печати экспериментальные материалы исследователей, обзорные материалы, статистические данные и материалы собственных исследований. При переводе различного исходного материала на генетическую основу Rht 1 и Rht 2 в большинстве стран достигнуто сходное увеличение уборочного индекса (УИ), и обсуждены причины замедления его роста, определен физиологический предел, и пути возможного увеличения интенсивности фотосинтеза. Описаны последствия преимущественно химико-техногенной интенсификации растениеводства и эколого-продукционный дисбаланс агроэкосистем, обусловленный: уменьшением доли стебля в биомассе растений и прогрессирующим уменьшением возможности пополнения запасов гумуса при ежегодном выведении из участия в циклических процессах трансформации 10–15% соломы. Дефицит элементов питания лишь частично восполняется внесением минеральных удобрений (от 15 до 38% от выносимых с урожаем), которые служат для удовлетворения лишь текущих потребностей роста и развития растений. Значительная часть из них – азотные, не участвующие в процессах трансформации органического вещества (= образования гумуса), и даже усиливающие использование растениями гуминовых веществ. Ослабление основной функциональной роли гумуса – регуляции устойчивости агроэкосистем к абио- и биотическим факторам, одним из механизмов которой является отторжение – возврат части органического вещества в пределах круговорота, обусловило снижение супрессивности почв. Первичным, как бы средоистощающим фактором в интенсивной технологии стал сорт, с генетически закрепленной способностью на высокий репродуктивный потенциал, вторичным – технологическое сопровождение, рассчитанное на максимальный урожай и рентабельность, без учета цены снижения плодородия почв, состояния их здоровья и восполнимости как природного ресурса. Изменение технологии, сортов и законодательно закрепленной структура расчета рентабельности ограничат возможности безвозмездного использования пахотных земель РФ.

**Ключевые слова:** селекция пшеницы, короткостебельные сорта, уборочный индекс, продуктивность фотосинтеза, гумус и дегумификация почв, перспективы повышения урожайности.

Пшеница – одна из самых многозначных сельскохозяйственных культур мира, роль пшеничных продуктов в потребительской корзине населения мира возрастает. Урожайность хлебных зерновых культур сильно колеблется (в ц/га): например, урожай риса в Индии – 17–20, Японии – более 50, Испании – 58–62. А урожайность пшеницы в Индии – 11–12, Германии – 35–37, США – 20–21. В Российской Федерации урожайность зерновых культур с 1985 по 2010 г. изменялась в следующих пределах: озимая пшеница от 11.6 до 19.2 ц/га; яровая – 16.1–33.7 ц/га. Средняя урожайность озимой пшеницы в России 2.9 т/га, а возделываемой по интенсивной технологии – 6 т/га. [<https://www.agroxxi.ru/ovoschnye/ovoschnye-tehnologija-vozdelyvaniya/urozhain>].

За последнее десятилетие все страны мира пережили несколько продовольственных кризисов. В период 2005–2009 г. пшеница и кукуруза подорожали втрое, а рис – в пять раз. В 2008 г. цены на продукты питания вновь резко увеличились и вызвали голодные бунты от Гаити до Бангладеш. На тот момент число голодающих в мире уже превысило 1 млрд. человек. Несмотря на высокий урожай 2009 г. в 2010 году общемировые цены на зерно выросли почти на 80%. В 2012 г. цены на зерновые продукты стремительно выросли и превысили уровень 2010 г. [Файзуллоев, [scienceforum.ru/2015/pdfscience/17489.pdf](http://scienceforum.ru/2015/pdfscience/17489.pdf)].

В июле 2002 г., состоялся очередной саммит Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО). На нем было признано, что мировое сообщество проигрывает битву с голодом. На фоне сокращения посевных площадей в мире под зерновыми (с 0.3 до 0.11 га/чел.)

и производства зерна на душу населения (с 0.34 до 0.27 т) Россия получает шанс стать крупным экспортером продовольственного зерна. Проблема увеличения экспорта зерна требует серьезного государственного участия. При выходе на мировой рынок необходим комплексный подход к проблемам повышения качества зерна путем улучшения семенного материала (в настоящее время примерно 30% – это семена массовых репродукций), усиления борьбы с болезнями зерновых (фузариозом и микотоксикозами), принятия мер, не приводящих к потере конкурентоспособности на мировом рынке зерна с низким содержанием белка [Ларионов, 2015].

В публикациях последнего времени, посвященных отечественной сельскохозяйственной науке, экономическому состоянию сельхозпроизводства и другим его аспектам, высказывается мнение, что “отечественная сельхознаука в её нынешнем состоянии не способна предложить решение проблемы продовольственной безопасности”. В то же время, “согласно долгосрочной стратегии МСХ о развитии зернового комплекса России до 2030-го года, наша страна должна довести сбор зерна до 130 млн тонн. Для достижения поставленных целей, как считает министр сельского хозяйства РФ А.Н. Ткачев, “необходимо активнее использовать в сельском хозяйстве удобрения. Мы должны увеличить применение удобрений в три раза” [<http://vlasti.net/news/255603>].

Данный обзор – попытка анализа возможностей значительного увеличения в ближайшие 2 десятилетия продуктивности сортов пшеницы в условиях глобального изменения климата, неопределенности адаптивного по-

тенциала сортов, нестабильности валовых сборов зерна и его надлежащего качества.

Прошедшие 60–70 лет отмечены интенсивными исследованиями проблемы увеличения урожайности пшеницы. Во многих регионах мира как в развитых, так и в развивающихся странах произошёл резкий прирост урожая. Один из самых значительных прорывов в этом направлении произошел благодаря внедрению в 1960-х годах Н.Д. Борлоугом и его коллегами генов карликовости Rht 1 и Rht 2. Это привело к «Зеленой революции», особенно на Индийском полуострове [Раджарам, Браун, 2006].

Как отмечают в обзорной статье В.В. Пыльнев и Е.В. Пыльнева [2001] «Зеленая революция» не обошла и страны СНГ, в чем большая заслуга принадлежит академику П.П. Лукьяненко. В результате селекционной работы на Северном Кавказе к началу 70-х годов урожайность озимой пшеницы увеличилась на 34.3 ц/га по сравнению с местными сортами, а за столетний период (1901–1930 и 2002–2003 гг. в условиях Кубани средняя урожайность озимой пшеницы с 37.8 ц/га (сорта Седоуска и Кособрюховка) возросла до 82.1 ц/га (Красота, Селянка, Батько и др), то есть более чем в два раза, с ежегодным приростом урожайности – 0.61 ц/га. При этом 50% прироста обеспечило совершенствование технологий выращивания озимой пшеницы. В 2 раза возросла в послевоенные годы урожайность озимой пшеницы на Дону, в 1.6 раза – в причерноморской степи Украины за 75-летний период. Созданные низкорослые полукарликовые сорта, были устойчивы к полеганию, способны использовать большие дозы удобрений и эффективнее расходовать элементы питания на образование тонны зерна.

Важнейшим показателем, связанным с увеличением урожайности зерновых культур в 20 веке [Sinclair, 1998], стал уборочный индекс (УИ), как отношение массы зерна к надземной биомассе растения в пересчете на абсолютно сухое вещество (=Кхоз, %), и относительный вынос азота с урожаем зерна – отношение выноса азота зерном к выносу азота надземной биомассой – важных показателей оценки эффективности продукционного процесса у сельскохозяйственных культур. Согласно экспертным оценкам, УИ увеличился: у пшеницы с 0.35 до 0.50 (за период 1908–1980 гг.); у ячменя – с 0.36 до 0.48 (1930–1989 гг.); у риса он резко возрос в связи с переводом сортов на генетическую основу короткостебельности, с 0.30 до 0.50; у кукурузы меньше – с 0.45 до 0.50 (1930–1989 гг.). Повышение УИ привело к тому, что на формирование хозяйственно полезных органов у озимой и яровой пшеницы расходуется свыше 30% ассимилятов, ячменя – 51, сахарной свеклы – 63, картофеля – 81% [Жученко, 1988].

Анализ истории сортосмен более, чем за полвека свидетельствует о достижении роста урожая озимой пшеницы исключительно путем перераспределения ассимилятов без изменения генетического сдвига по урожаю биомассы – показателя, находящегося под давлением отбора. При этом наблюдается увеличение УИ и снижение высоты растений, а в неблагоприятных условиях – более сильное уменьшение биомассы у сортов с высоким уборочным индексом [Лэмб, 1980].

Оценки значения сорта в повышении урожайности значительно различаются: от 15% до 59% (у новых сортов), при этом отмечается, что старые сорта имели более высо-

кий уровень взаимодействия генотип-среда, а современные более отзывчивы на лучшие предшественники и высокий агрофон. Большинство исследователей считают, что основным источником повышения урожайности новых сортов является увеличение УИ от 35 до 50%.

Значительное увеличение УИ в XX веке, стало возможным после установления взаимодействия процессов накопления азота и ростом УИ, то есть вклада азота в УИ (отношение азота накопленного в зерне к азоту в целом растении). Показано, что простая добавка азота в питание современным сортам приводила в целом к снижению УИ вследствие увеличения вегетативной массы неадаптированных растений. Переориентация на отбор сортов, способных накапливать и более эффективно перемещать азот в зерновку и привела к постепенному увеличению УИ [Sinclair, 1998]. То есть высокий потенциал продуктивности сортов интенсивного типа обеспечивался сбалансированным питанием, прежде всего по азоту.

Укорочение стебля решило проблему полегания растений, но обострило проблему борьбы с сорными растениями и приблизило колос к источникам почвенной и напочвенной инфекции, а изменение соотношения зерно – солома потребовало более длительного периода накопления ассимилятов в зерновках. Возросла отзывчивость сортов на факторы интенсификации вследствие селекционного отбора по отзывчивости на азот. Удовлетворение потребности в повышенных дозах азотных удобрений, особенно нитратов, способствовало удлинению периода вегетации растений, в том числе и периода восприимчивости к возбудителям фузариоза колоса [Иващенко, Шипилова, 2004] и болезней листьев.

С учетом опыта европейских стран (дифференцированный подход применения гербицидов, удобрений, пестицидов) в 1985 г. в СССР началось широкомасштабное внедрение интенсивных и высокоинтенсивных технологий возделывания пшеницы, ячменя и овса и других культур, что потребовало значительного увеличения внесения органических и минеральных удобрений и химических средств защиты растений. Если первоначально (1986–1990 гг.) их вносилось 3.7 т/га и 99 кг/га, то за 1995–1997 гг. 0.7 т и 12 кг/га, соответственно, то есть в почву возвращалось лишь 18% элементов минерального питания от суммы выноса с урожаем [Рудай, 1999].

Утверждается, что сорта становятся средством производства, к которым резко возрастают требования, особенно к их рентабельности, необходимости в защите от стрессовых явлений, болезней и вредителей. Удовлетворить предъявляемые сортами требования можно только при переходе селекции на интенсивный путь развития и преобразование ее в хорошо налаженное, ритмично работающее производство [<http://agro-portal.su/pshenica/2025-sort-i-ego-znachenie-v-povyshenii-urozhaynosti.html>].

По мере перехода на генетическую основу короткостебельности, при создании новых сортов интенсивного типа изучалась проблема интенсификации продукционных процессов. Для достижения самых высоких урожаев потребовалось изменить функции роста всех органов, достичь основательной ломки сложившихся ростовых корреляций [Тооминг, 1977; Кумаков, 1980]. Обоснование и разработка физиологической модели сорта мягкой яровой пшеницы для засушливой черноземной степи По-

волжья показало, что короткостебельные сорта (КС) интенсивного типа отличаются от высокорослых большей продолжительностью функционирования фотосинтетического аппарата (ФСА), иной динамикой распределения биомассы, большим вкладом листьев и элементов колоса в формирование урожая зерна, более эффективным оттоком ассимилятов в колос из верхнего и в особенности второго сверху листа; то есть КС вступают в репродуктивную фазу развития с более напряженными донорно-акцепторными отношениями в системе «лист-колос», чем высокорослые сорта. В засушливых условиях сорта интенсивного типа теряют свое преимущество перед экстенсивными сортами в фотосинтетическом потенциале (ФП), а в случае меньшей засухоустойчивости снижают еще и в чистой продуктивности фотосинтеза. Таким образом, в условиях засухи на первое место по урожайности выходят высокорослые засухоустойчивые сорта [Игошин, 1984].

Рассмотрение истории развития теории фотосинтетической продуктивности и поиска путей увеличения её активности показало, что при форсировании продуктивности (на генетическом или фенотипическом уровнях) растение обычно выбирает путь экстенсивный, то есть наращивает дополнительно листовую поверхность с большим содержанием хлорофилла, эффективность которого при этом падает [Чиков, 1987].

И.А. Тарчевским [1964] была высказана идея, что в неблагоприятных условиях происходит прямое замыкание фотосинтеза на дыхание. Причем продукты фотосинтеза окисляются (сжигаются) в дыхании до аминокислот, снижая продуктивность.

Согласно модели А.Т. Мокроносова [1983], «у сортов мягкой яровой пшеницы фотосинтез как энергетический процесс выполняет в растении исполнительную функцию. Он отслеживает запрос на ассимилянты со стороны потребляющих органов. И только. Растение существует не ради фотосинтеза, а использует его для своих целей. А это означает, что все попытки каким-то образом улучшить структуру ФСА растения без изменения емкости и активности потребляющих ассимилянты органов, скорее всего, не будут успешными»

Между фотосинтезом, и различными потребляющими органами существует масса прямых и обратных связей. Многие из них еще мало изучены, а некоторые, вероятно, неизвестны. Форсирование продуктивности растения возможно только путем дальнейшей оптимизации всех многочисленных связей. В целом поиск путей увеличения активности фотосинтетического аппарата растений на уровне хлоропласта оказался неудачным [Чиков, 1987].

Ранее было показано, что хлоропласт как структурная единица фотосинтеза остался практически неизменным на протяжении почти 500-летней селекции картофеля, пшеницы и других культур [Мокроносов 1983]. В.Г. Конарев [2001], отметив эволюционный консерватизм молекулярных механизмов фотосинтезирующих систем хлоропласта, подчеркнул отсутствие сколь-либо существенного эффекта от попыток воздействовать на них с целью селекционного улучшения. Обсудив возможные пути модернизации молекулы рибулезобифосфаткарбоксилазы (поиск субъединиц с высокой карбоксилазной и низкой оксигеназной активностью) и перспективы переключения растений  $C_3$  – типа фотосинтеза на  $C_4$  – тип, он пришел к

заключению, что «реален и наиболее актуален в решении проблемы углеродного обмена поиск путей реализации больших, по сути неограниченных возможностей фотосинтеза в формообразовательных процессах, направленных на улучшение УИ и получение максимального выхода продукции».

Исследованиями В.А. Кумакова с соавторами [1982; 2000] установлено, что селекция на повышение потенциала продуктивности колоса, при одновременном увеличении функции его роста к моменту цветения и акцепторной нагрузки на фотосинтетический аппарат в период налива зерна, не приводит к отрицательным последствиям для его реализации, если сопровождается ростом общей адаптивности и засухоустойчивости в частности. Ранги сортов по соотношению колос / соломина в цветение, почти не меняются в восковую спелость зерна.

Ретроспективный анализ результатов краснодарской селекции пшеницы мягкой озимой показал, что урожайность полукарликовых сортов восьмой сортосмены составила 218.8% в отношении к первой, причем размах ее варьирования у сортов второй – четвертой сортосмен несколько увеличился, а затем с пятой сортосмены постоянно снижался, что свидетельствует о повышении их приспособленности и многообразии современных сортов по генетическим и биологическим признакам. Подтверждена основополагающая роль уборочного индекса ( $rg = 0.94$ ,  $re = 0.24$ ) и емкости ценоза ( $rg = 0.88$ ,  $re = 0.23$ ) в увеличении урожайности пшеницы в филогенезе [Новиков, 2012]. Сходные закономерности выявлены при переводе сортов пшеницы на генетическую основу короткостебельности в Украине [Пыльнев, Паламарчук, 1981], в Поволжье [Игошин, 1984].

Группа исследователей из международного центра улучшения пшеницы и кукурузы (СИММИТ), США, Австралии пришли к заключению, что улучшение баланса между донором и акцептором в процессе селекции – эффективный подход в повышении урожая надземной биомассы и КПД ФАР [Reyndolds, Pietragalla et al., 2008]. Задача состоит в том, чтобы определить, чем ограничивается накопление сухого вещества на каждом конкретном этапе развития – донором или акцептором (акцепторами). Результаты 20-летней селекции яровой пшеницы в СИММИТ (с 1990 по 2009 гг.) по дальнейшему повышению УИ свидетельствуют о небольшом прогрессе на пути достижения физиологического предела ( $УИ = 0.65$ ) [Остин 1982; Фоулкс и соавт., 2011]. Достигнуто повышение его значений до 0.45–0.50 у яровой пшеницы и 0.50–0.55 – у озимой [Фоулкс и соавт. 2011; Рейнольдс и соавт, 2012]. Со сдержанным оптимизмом рассматривая перспективы ускоренного роста урожайности зерновых культур, включая и возможности использования молекулярных методов исследований, (Tony) Fischer, R.A., Edmeades, G.O. [2009] пришли к выводу, что прогресс более вероятно связан с отбором на увеличение биомассы растений и исследованиями в области физиологии продуктивности. Для повышения рентабельности предстоит повысить эффективность использования питательных веществ, устойчивость к болезням и вредителям, конкурентоспособность к сорным растениям и приемам адаптации к противозероизонной обработке почвы. По мнению А.В. Новикова [2012], почти прямолинейная отрицательная генотипическая кор-

реляция между Кхоз (=УИ) ценоза и высотой растений ( $rg = -0.94$ ) позволяет вести дальнейшую селекцию на урожайность путём снижения высоты растений.

**Адаптивность, устойчивость, стабильность.** По определению Л.Т. Эванса и Р.А.Фишера [Evans, Fischer, 1999] – «Потенциал урожая рассматривается как урожайность сорта, адаптированного к условиям выращивания, на фоне обеспеченности влагой и удобрениями, при условии контроля вредителей, возбудителей болезней и сорных растений, ломкости и других стрессовых факторов». В полевых условиях это недостижимо, что ставит проблему отбора по потенциалу урожайности на реальный фон обеспеченности агресурсами, а не на создание комфортных условий для достижения «рекордных» точечных показателей урожайности, но ценой неоправданных затрат. Рассматривая проблему адаптивности и урожайности А.А. Жученко [1980] приводит важнейшее заключение Н.В.Симмонса [Simmonds, 1962] о том, что несмотря на очевидные успехи многолетнего отбора по урожайности, экологическая цена такого роста заранее, вероятно, не прогнозировалась, поскольку анализ результатов 100-летнего периода селекции не даёт повода для чрезмерного оптимизма: за это время урожайность значительно повышена, но и «ликвидирована популяционная адаптация как фактор продуктивности и оказано вредное влияние на приспособляемость.»

Обладая самым большим в мире фондом земель сельхозназначения, но только 5% с благоприятными условиями для сельского хозяйства, Россия располагает не безграничными возможностями для его успешного развития, поскольку почти вся территория страны находится в зоне рискованного земледелия. Растениеводство в России характеризуется низким уровнем стабильности агроценозов и плохим фитосанитарным состоянием почв (Жученко, 1997; Сусидко, 1997). Это подтверждается периодически вспышками эпифитотий и широким распространением сорной растительности. Несмотря на государственную поддержку, объемы производства сельскохозяйственной продукции и урожайность подвержены значительным колебаниям вследствие неблагоприятных климатических условий. По данным специалистов Национального союза агростраховщиков (НСА) эти колебания доходят до 70%, в сравнении с 5% в других странах. По расчетам НСА за период с 1992 по 2001 годы потери сельскохозяйственных товаропроизводителей от недобора урожая (связанные с неблагоприятными погодными условиями) по 29 основным культурам превысили 300 млрд. рублей [<http://www.strahovkainfo.ru/SmartSystem/>].

Согласно перспективным оценкам, климатические условия будут способствовать аграрному производству до середины XXI века, но к концу столетия эти условия начнут ухудшаться, причем негативное влияние некоторых вредителей и болезней сельскохозяйственных культур будет увеличиваться. Отмечается, что повышение среднегодовой температуры на 3–4 °С приведет к снижению урожайности яровых зерновых практически на всей территории европейской части страны.

Мероприятия, прямо или косвенно направленные на адаптацию сельского хозяйства к изменениям климата, предусмотрены Государственной программой развития сельского хозяйства и регулирования рынка сельскохозяй-

ственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы [<http://docs.cntd.ru/document/902361843>]. В ней предлагается учитывать, «что современные сорта эффективно могут реализовывать свой биологический потенциал лишь при высокой культуре земледелия и оптимальной погоде. В условиях глобального изменения климата эта проблема становится наиболее острой, и для ее решения необходимо, прежде всего, увеличить адаптивные возможности возделываемых сортов. Вместе с тем, многовековое развитие селекции вносит некоторые сомнения в данный вопрос. Изменить эту ситуацию, по-видимому, будет весьма сложно, так как энергетический потенциал растений, по экспериментальным данным, в результате селекции фактически не меняется, что и приводит к невозможности формировать одновременно и высокий, и стабильный, и качественный урожай.»

Например, урожайность озимой пшеницы в условиях Черноземья (Белгородская обл.) с нестабильными природно-климатическими условиями до 1988 г. колебалась в пределах от 30 до 53 ц/га, то начиная с 1989 года, вариация урожайности составила от 18.6 до 69 ц/га. Следует заметить, что и после 2000 года, несмотря даже на качественную агротехнику и применяемые технологии, урожайность колебалась в пределах от 19 до 66 ц/га.

Российскими научными учреждениями определены последствия ожидаемых изменений климата, связанные с ними риски для сельского хозяйства и адаптационные меры. Однако в открытом доступе нет информации о разработанных рекомендациях и технологиях по сохранению, повышению и воспроизводству плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения и других адаптационных мерах.

Состояние сельскохозяйственных угодий РФ далеко не удовлетворительное. Из 132.2 млн га пашни 82.5 млн га подвержено эрозии и дефляции (выдуванию), 26 – переувлажнено и заболочено, 73 – закислено, 40 – засолено и осолонцовано, 62 – техногенно загрязнено, в т.ч. 5 млн – загрязнено радиационно. [[http://referatwork.ru/lectionbase/ekologiya/view/375945\\_zemel\\_nye\\_resursy\\_rossii\\_i\\_ih\\_sostoyanie](http://referatwork.ru/lectionbase/ekologiya/view/375945_zemel_nye_resursy_rossii_i_ih_sostoyanie)].

Как отмечает А. Керженцев [2017] мировые потери почвенных ресурсов за счет отчуждения, загрязнения и деградации достигли 20 млн га/год. За 50 лет мир потеряет 1 млрд га из 1.5 млрд га наличия. Компенсировать такие потери ростом урожайности невозможно.

Анализ реализации потенциала урожайности у сортов различных периодов селекции показывает, что с увеличением уровня максимальной урожайности ее реализация в конкретных условиях возделывания имеет тенденцию к снижению, а в целом реализация потенциала урожайности колеблется по сортам от 63 до 83%. Высокие коэффициенты вариации урожайности по годам и сравнительно низкий процент реализации потенциала урожайности, где технология возделывания озимой пшеницы близка к оптимальной, позволяют судить, что речь должна идти в первую очередь не о дальнейшем повышении потенциала урожайности (превысившей 10 т/га), а о надежности биологических систем, обеспечивающих стабильность урожая по годам [Самофалов, 2004].

Согласно обзорной информации, приводимой А.А. Жученко [1988] высокая экологическая пластичность ди-



ких видов растений сопряжена с их низкой продуктивностью [Kuiper, 1984], то есть стратегия их приспособления определяется низкой скоростью ростовых процессов [Stuart, 1980] – генетически обусловленной и достаточно постоянной величиной [Батыгин, 1986]. Это затрудняет интеграцию в генотипе создаваемых сортов признаков продуктивности и адаптивности.

Определяющим фактором успешности селекционной работы в большинстве случаев становится адаптивность, в том числе устойчивость к патогенам и фитофагам. Описывая особенности адаптивной селекции зерновых культур в Среднем Поволжье В.В. Глуховцев [2012] отмечает проявление всех трёх видов, пяти типов засух и массовое распространение корневых гнилей и скрытостебельных вредителей, которые ещё в большей степени оказывают пагубное влияние на формирование урожая зерна. Наибольший ущерб приносят длительные (устойчивые) засухи, по цикличности не прогнозируемые, возникающие в 50% случаев за 100-летие, когда валовые сборы зерна снижаются в 2–3 раза. Автор показал, что одним сортом решить вопрос стабилизации урожая по годам невозможно, необходимо возделывать несколько типов сортов: интенсивный (Кутулукская), полуинтенсивный (Кинельская 59, Кинельская нива, Кинельская отрада, Кинельская 61) и экстенсивный (Белянка).

Характеризуя вновь созданные в условиях Ставрополя КС озимой пшеницы интенсивного типа (Ермак, Дон 105, Дон 107 и др. с УИ достигающим 0.49, В.И. Ковтун [2011] предполагает, что урожайность у новых универсальных сортов будет повышаться в основном за счет увеличения числа и массы зерна колоса, УИ, при незначительном увеличении числа колосков в колосе, массы 1000 зерен, продуктивной кустистости, устойчивости к болезням, качества зерна. Сорты этого типа практически в такой же мере, как и полуинтенсивные, должны отвечать требованиям в отношении качества продукции, зимостойкости, засухоустойчивости, продолжительности жизни листьев, особенно флагового листа, толерантности к загущению посевов, иметь большую емкость запасующих органов в ценозе, отличаться продолжительным периодом «колошение – полная спелость», то есть длительным и плавным наливом зерна.

Анализ причин отрицательных связей между продуктивностью и устойчивостью привел к заключению, что устойчивые формы тратят часть энергии и пластических веществ на поддержание «дремлющего» резерва [Майснер, 1981]. А.А. Жученко [1988], разделяя точку зрения ряда авторов на проблему адаптации [Пианка, 1981; Майснер, 1981] отмечает: «чем больше продуктов фотосинтеза расходуется на формирование хозяйственно полезных органов, тем меньше их остается на формирование защитных структур и компенсаторных реакций и наоборот». Устойчивость такого типа ранее описана у ряда сортов пшеницы к стеблевой ржавчине [Simons, 1972] и у кукурузы к стеблевым гнилям [Иващенко, 1992].

Согласно данным многолетних исследований [Новиков, 2012], УИ ценоза вырос у пшеницы озимой мягкой почти вдвое: с 22.8% у местных сортов до 41.2% у сортов восьмой сортосмены. Выход зерна с побега увеличивался параллельно увеличению Кхоз ценоза. В целом, за всю историю селекции он вырос на 15% в абсолютном выра-

жении. Это подтверждает приведенные выше результаты отбора на повышение урожайности озимой и яровой пшеницы, полученные в б.СССР, современной России и зарубежных селекционных учреждениях, достигших повышения УИ с 0.35 до 0.5. Надо полагать, что предложенный ранее физиологический предел (УИ = 0.65) [Остин 1982; Фоулкс и др., 2011] может быть реализован в искусственных условиях, а в полевых условиях он недостижим.

Даже при весьма ограниченной информации, о биоэнергетической «цене» формирования защитных морфоанатомических структур и биохимических реакций можно судить по нижеприведенным примерам [<http://agro-archive.ru/adaptivnoe-rastenievodstvo/2386-bioenergeticheskie-osnovy-selekcii-rasteniy-na-vysokuyu-potencialnuyu-produktivnost-kachestvo-urozhaya-i-ekologicheskuyu-ustoychivost.html>]. Так, синтез госсипола в устойчивых линиях хлопчатника оценивается в среднем в 1.7% (34 кг/га); если у устойчивых сортов картофеля на синтез ришитина в 100 г сухой ткани расходуется 412 мг глюкозы, то у чувствительных – лишь 1.3; устойчивым к стеблевым гнилям линиям кукурузы присуще более значительное запасание ассимилятов (на 36%) в стебле, ножке, стержне и обертках початка, в ущерб продуктивности, достигаемой восприимчивыми линиями [Иващенко, 1992]. На наш взгляд, более доступен, информативен и ёмок приводимой в научной литературе анализ энергетических затрат устойчивости, рассчитанных по разнице величин продуктивности здоровых и пораженных растений конкретного сорта или гибрида (в млн ккал).

**Гумус почв и её дегумификация.** В гумусе сосредоточено 98% запасов почвенного азота, 60% фосфора, 80% калия и содержатся все другие минеральные элементы питания растений в сбалансированном состоянии по природной технологии. По данным РосНИИЗемПроект, черноземы ЦЧО за последние сто лет потеряли около трети общих запасов гумуса, при ежегодном отрицательном балансе гумуса – 0.66 т/га в год. Особенно сильно это сказывается на продуктивности при уменьшении содержания гумуса ниже 1–2%.

Растительные остатки с помощью макро- и микробиоты превращаются в гумусные кислоты и фульвокислоты, которые взаимодействуя с металлами образуют соли – гуматы и фульваты. Гуматы лития, калия, натрия растворимы, легко вымываются водой. Они же представляют наиболее ценную часть гумуса, легко доступную растениям. Гуматы кальция, магния, кремния и тяжелых металлов нерастворимы и составляют ту часть гумуса, которую можно назвать консервами почвенного плодородия. Эти гуматы способны растворяться под влиянием ферментов корневой системы растений, но в количествах, удовлетворяющих только их потребность. Они не подвержены гидролизу, но оказывают большое влияние на создание агрономически ценной, связной, водопрочной и пористой структуры, не подверженной влиянию эрозийных воздействий. Особо подчеркивается, что гуматы тяжелых металлов еще более устойчивы к гидролизу ферментами корневой системы растений и практически не усваиваются ими. Это есть главное экологическое свойство гумуса – связывание тяжелых металлов в почве и предохранение всего живого на Земле от их токсического воздействия, в том числе от тяжелых радионуклидов [Щербаков, Васенев, 1997].

В литературе накоплен огромный экспериментальный материал, показывающий тесную зависимость урожая от уровня гумусированности почв. Коэффициент корреляции содержания гумуса в почве и урожая составляет 0.7...0.8 [данные ВНИПТИОУ, 1989]. Так, в исследованиях Белорусского НИИ почвоведения и агрохимии (БелНИИПА), увеличение количества гумуса в дерново-подзолистых почвах на 1% (в пределах его изменения от 1.5 до 2.5...3%) повышает урожайность зерна озимой ржи и ячменя на 10...15 ц/га. В колхозах и совхозах Владимирской области при содержании гумуса в почве до 1% урожай зерновых в период 1976–1980 гг. не превышал 10 ц/га, при 1.6...2% составлял 15 ц/га, 3.5...4% – 35 ц/га. В Кировской области прирост гумуса на 1% окупается получением дополнительно 3...6 ц зерна, в Воронежской – 2 ц, в Краснодарском крае – 3...4 ц/га.

Еще более существенна роль гумуса в увеличении отдачи при рациональном применении минеральных удобрений, эффективность его при этом увеличивается в 1.5...2 раза. Однако необходимо помнить, что химические удобрения вызывают усиленное разложение гумуса, что приводит к снижению его содержания. Практика современного сельскохозяйственного производства показывает, что повышение содержания гумуса в почвах является одним из основных показателей их окультуривания. При низком уровне гумусовых запасов внесение одних минеральных удобрений не приводит к стабильному повышению плодородия почв. Более того, применение высоких доз минеральных удобрений на бедных органическим веществом почвах часто сопровождается неблагоприятным действием их на почвенную микро- и макрофлору, накоплением в растениях нитратов и других вредных соединений, а во многих случаях и снижением урожая сельскохозяйственных культур [https://fermer.ru/content/gumus-pochv-i-ego-svoystva].

Первые маршрутные обследования, проведенные в начале и середине XX века В.В. Докучаевым, Е.С. Блажним, Н.Е. Редькиным, З.С. Марченко, показали, что черноземы Прикубанской и Закубанской равнин содержали на целинных участках и в пахотном слое от 4.5 до 7.0 процентов гумуса. А в настоящее время за счет активно протекающей деградации черноземов потеряно до 40–42 процентов гумуса. В результате площадь сверхмощных черноземов в степной зоне края за 35-летний период уменьшилось более чем на 260 тыс. га, а содержание гумуса в пахотном слое уменьшилось на 1.98 процентов [Штомпель, Середин, Ачканов и др., 1997].

В СССР 70–80 годы характеризуются как период интенсивной химизации сельского хозяйства, когда баланс азота, фосфора и калия в целом по России складывался положительно, и, практически повсеместно, наблюдалось постепенное накопление питательных веществ в пахотных почвах. По данным 2001 г. в среднем по стране на 1 га пашни было внесено 12 кг минеральных удобрений (азота, фосфора и калия), а вместе с органическими удобрениями – 21.4 кг. Оценка баланса питательных веществ по его интенсивности показала, что в целом по Российской Федерации возмещение выноса азота с урожаем составило 32%, фосфора – 38% и калия – 15%. Согласно основателю агрохимии в России Д.Н. Прянишникову, для поддержания плодородия почв и наращивания урожая необходимо

возвращать полям не менее 80% потребленного урожаем азота, 100% – фосфора и 70–80% – калия в виде органических и минеральных удобрений. [https://geographyofrussia.com/balans-pitatelnykh-veshhestv-v-zemledelii].

Сравнительный анализ плодородия почв в Каменной Степи, проведенный учеными ФГБНУ НИИСХ ЦЧП им. В.В. Докучаева показал: если в конце прошлого века площадь пашни с содержанием 7–10% гумуса составляла 7 млн 836 тыс. га, то в наши дни их сохранилось только чуть более 3 млн га; с содержанием гумуса от 4 до 6% раньше более 4 млн га, а в настоящее время более 11 млн га. Площадь черноземных почв с содержанием гумуса в 2–4% возросла за этот период на 35%, а с содержанием гумуса 1–2% – почти в 4.5 раза. Как свидетельствуют результаты многолетних стационарных опытов, бездефицитный и положительный баланс гумуса, в зернопаровом севообороте достигается путем внесения в паровое поле навоза в дозе 40 т/га или возделывания в них донника как сидерата, так и на кормовые цели, а также под влиянием длительного применения (42 года) систем органических удобрений в паровом поле [Уланов, Будажапов, 2016].

По мнению Е.Н. Мишустина [1980] внесенная в почву солома существенно влияет на улучшение азотного режима почв. Углеводы, входящие в состав соломы, используются в метаболизме бактерий, способных фиксировать атмосферный азот. Заметно смещается соотношение микробиологических процессов мобилизации и иммобилизации азота в сторону преобладания последнего, в результате чего большая часть внесенного азота закрепляется в почве в органической форме, кроме того повышается содержание подвижных форм фосфора и калия.

Использование соломы на удобрение составляет в США более 68%, и её доля в общем количестве органических удобрений превышает 53%. В Германии сжигается только 5% соломы, а 45% заделывается в почву. Во Франции сжигается 12%, остальная солома используется в животноводстве или запахивается на удобрение [http://geotec.com.ua/agronomiya/vynos-elementov-pitaniya-iz-pochvy-urozhaem-selskokhozyajstvennykh-kultur-puti-ikh-vozvrashcheniya-v-pochvu.html].

Фитосанитарная дестабилизация земледелия, возникшая в 90-е годы XX века, имевшая многолетний системный характер из-за резкое падения годовых объемов защитных мероприятий (с 75 млн га до 10–15 млн га в 1996–1998 гг.) сопровождалась значительными потерями урожая (1996–1998 гг.) вследствие снятия сдерживающего фитопатогенов, сорных растений и фитофагов фона [Павлюшин, Танский, 2006]. Происходящая в настоящее время антропогенная деградация почв включает химическую (ухудшение химических свойств почв: истощение или избыток запасов питательных элементов, потеря гумуса, вторичное засоление и осолонцевание, загрязнение токсикантами) и её следствие – биологическую деградацию почв (сокращение численности, видового разнообразия и оптимального соотношения различных видов микроорганизмов, загрязнение почвы патогенными микроорганизмами, ухудшение санитарно-эпидемиологических показателей). Она характеризуется потерей плодородия почв (истощение, деградация), обусловленные хроническим невозвратом в почву выносимых с урожаем органических веществ, и заменой их минеральными удобрениями, не участвующими

в накоплении гумуса. Возникают вторичные изменения, обусловленные именно деятельностью человека, которые сопровождаются частичной или полной утратой плодородия почвенного покрова или оказываются причиной его уничтожения.

Проблемы патологии почв и охрана биосферы планеты, их оздоровление и рациональное использование отражены в отечественной литературе советского периода и современной России [Ковда, 1989; Семёнов, Когут, 2016; Кудяров и др., 2017], их актуальность в последние десятилетия значительно возросла. Результаты антропогенных воздействий на степные экосистемы, как и агроэкосистемы проявились в деградации почв и ветровой эрозии, привели к вспышкам численности саранчовых и других

насекомых-вредителей, спровоцировали применение химических веществ для борьбы с ними [Жерихин, 1994].

Из возобновимого ресурса, который при эксплуатации не убавляется, а сохраняется и улучшается (в антропоцентрическом понимании), а при частичной утрате плодородия он может быть восстановлен, сейчас регистрируется полное исчезновение почв как необратимое явление, приводящее, в конечном итоге, к утрате устойчивости или к гибели или глубокой деградации ландшафта, то есть превращение в невозобновимый «ресурс».

Дегумификация как ключевая характеристика количественных и качественных отклонений от нормы (здоровая почва) определяет возможности развития растений, их отношения с почвенной и аэрогенной биотой, характер формирующейся фитосанитарной ситуации (рис.)

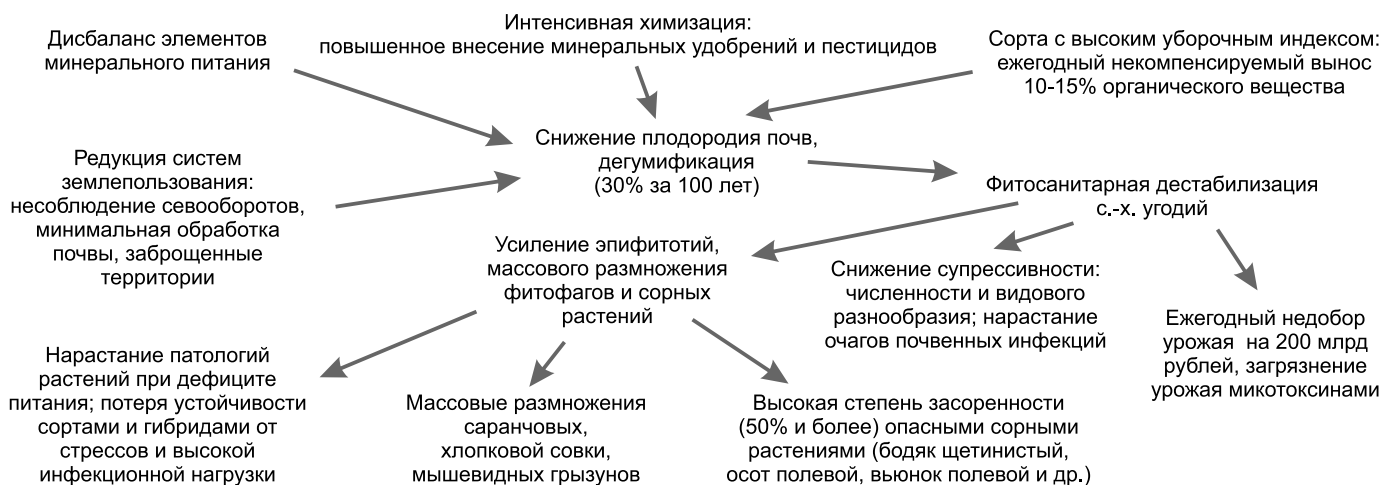


Рисунок. Эколого-продукционный дисбаланс агробиоценозов и фитосанитарные проблемы в растениеводстве

В своей книге «Семена разрушения: тайная подоплека генетических манипуляций» американский экономист Уильям Энгдал [2007] описывая последствия Зеленой революции указывает на несколько обстоятельств: данная модель оказалась агротехнологией, эффективной в мире только на 20% почв. На остальных начали происходить активные процессы деградации; возникла тревожная зависимость сельского хозяйства многих стран от производителей химических средств защиты растений, которые объединены в транснациональные корпорации; производство семян высокопродуктивных сортов и гибридов также оказалось сосредоточено в руках транснациональных семеноводческих корпораций, которые имеют в последнее время тенденцию слияния с химическими. В этом контексте идёт создание ГМ-сортов сельхозкультур, биобезопасность которых до сих пор не доказана; в мире наблюдается тревожная тенденция блокирования на национальных уровнях развития иных, альтернативных технологий.

В настоящее время в аграрном секторе реализуется долгосрочная целевая программа биологизированной системы земледелия, где повышение плодородия осуществляется за счет повсеместного применения биологических удобрений из отходов животноводства и птицеводства, растительных остатков, сидеральных культур и многолетних трав, технологий минимальной и поверхностной обработки, надёжность которой апробирована результатами 4-летней работы аграриев Белгородской области. При этом рост урожайности полевых культур и повышение качества продукции становится возможным только при оптималь-

ной, экономически обоснованной интегрированной защите растений, мониторинге и прогнозе вредоносных объектов, устойчивых сортов, ассортименте безопасных средств защиты растений, включающих расширенное применение биологических препаратов в полевых условиях и защищенном грунте [Павлюшин и др., 2016]. Ряд научно-технических проектов ВИЗР в Белгородской области уже реализован, новые проекты по фитосанитарной оптимизации – в стадии реализации научных идей.

Несмотря на улучшение ситуации в сельском хозяйстве России, растениеводство по-прежнему находится под влиянием глобальных вызовов – изменения климата, редуцирования систем землепользования, продолжающейся дегумификации почв и снижении плодородия, что приводит к фитосанитарной дестабилизации, а в конечном счёте значительным потерям урожая и его качества.

ВИЗР предлагает новую парадигму защиты растений, направленную на долговременную стабилизацию фитосанитарного состояния агроэкосистем, основанную на биоценологическом подходе к построению защитных мероприятий, разработке программ управления численностью вредных видов, фитосанитарным проектированием максимального насыщения сортами с комплексной устойчивостью к фитофагам и патогенам, формировании биорационального ассортимента СЗР, многопольных севооборотов. Крайне важно сдерживать процессы дегумификации почв и повышение их супрессивности, что в конечном счёте улучшает функционирование паразитоценозов и растительно-микробных сообществ. Именно такой под-

ход позволит достичь гарантированной защиты урожая и его качества, достаточной экологической безопасности, способствовать улучшению плодородия сельскохозяйственных угодий, особенно в условиях интенсивного растениеводства.

**Заключение.** Селекционные преобразования растения в XX – начале XXI века, привели главным образом к увеличению доли зерна в общей биомассе растения, практически не затронув его вещественно-энергетический потенциал, причем перераспределение вещества и энергии в пользу репродуктивного органа, резко возросшее с переводом сортов на короткостебельность, привело (в период «Зеленой революции») к существенно большей зависимости роста и развития растений от факторов экзогенной регуляции; это обусловило выбор в использовании преимущественно химико-техногенных факторов для поддержания и повышения роста продуктивности сортов при существенном «убывании» их устойчивости к вредным организмам, что подтверждает, ранее установленную закономерность [Simmonds, 1962] по результатам 100-летнего периода селекции: «за это время действительно урожайность значительно повышена, но и ликвидирована популяционная адаптация как фактор продуктивности и оказано вредное влияние на приспособляемость»

Уменьшение доли стебля обусловило резкое уменьшение возможности пополнения запасов гумуса, вследствие дополнительного ежегодного выведения из участия в циклических процессах трансформации 10–15% соломы; дефицит элементов питания восполнялся внесением минеральных удобрений для удовлетворения лишь текущих потребностей роста и развития растений, причем удобрений не участвующих в циклических процессах трансформации органического вещества (= образования гумуса), но усиливающих использование растениями гуминовых веществ. Надо полагать, что именно по мере снижения запасов гумуса, эффективность расчетных норм минеральных удобрений на планируемый урожай снижалась, а нормы внесения увеличивались, усиливая один из основных факторов антропогенного влияния.

Многолетние исследования динамических процессов, протекающих в агробиогеоценозах, свидетельствуют о глубокой трансформации их структурно-функциональной организации, происходящей под влиянием усиливающегося антропогенного воздействия. Результатом его влияния являются изменения, происходящие в педосфере, – одной из главных фаз биосферного круговорота, выполняющего в отношении углерода функции резервуара для стока и трансформации атмосферного углерода, ассимилированного при фотосинтезе наземной растительностью. Выявление функций педосферы в ландшафтных и биосферных биогеохимических циклах углерода имеет большое значение для прогнозирования изменения запасов углерода в почвах в результате возможных планетарных изменений климата, а также различных антропогенно-техногенных воздействий [Мартынова, 2011].

Размеры накопления гумуса дают право говорить о необходимости выделения области распространения гуминовых веществ в особую оболочку Земли – «гумосферу» [Вернадский, 1926]. Продолжающаяся дегумификация почв – проблема мировой значимости, что подтверждается данными международной группы исследователей [Liu

et. al., 2012] о падении содержания гумуса, повышении кислотности и снижении содержания кальция в черноземных почвах Северной и Южной Америки, Канады, Мексики, Аргентины и Уругвая, России, Украины, где широко используются интенсивные технологии возделывания растений. В этих условиях усиленный экспорт запасенной энергии (зерна и другой с.-х. продукции) постоянно преобладает, значительно меньшая её часть возвращается в агроэкосистему, характеризуя прогрессирующее снижение запасов энергии в экосистеме, что подтверждается данными о системной дегумификации почв во всех (кроме северного) регионах России [Москва, МСХ РФ, 2011]. Ослабление основной функциональной роли гумуса – регуляции устойчивости агроэкосистем, одним из механизмов которой является отторжение – возврат части органического вещества в пределах круговорота, обусловило снижение супрессивности почв, связывание и вывод за пределы зоны питания растений токсичных и неустойчивых соединений.

Защита растений вынуждена решать задачи сохранения здоровья растений при продолжающихся широкомаштабных процессах дегумификации почв, и снижении их супрессивности при возделывании сортов преимущественно интенсивного типа, генетически запрограммированных на высокий вынос элементов питания из почвы, а также на возросший запрос колоса в элементах питания при более длительном периоде их перераспределения из корней, стеблей и листьев, то есть при удлинившемся периоде восприимчивости. Это способствовало росту предрасположенности растений к поражению листовыми патогенами и обусловило необходимость дополнительного применения пестицидов, и дальнейшему росту резистентности к ним у патогенов, фитофагов и сорных растений.

С учетом эволюционно стабильной интенсивности фотосинтеза, отрицательных зависимостей роста урожайности короткостебельных сортов и качества зерна, зимостойкости и адаптивности к стрессам (абио- и биотическим), а также приближения показателей уборочного индекса к его физиологическому пределу, дальнейшее использование химико-техногенных технологий истощающего земледелия антиэкологично, противозаконно (Федеральный закон от 16.07.1998 N 101-ФЗ; ред. от 05.04.2016) и небезопасно в условиях необходимости гарантированного обеспечения продовольственной безопасности РФ, вследствие дополнительного ежегодного выведения из участия в циклических процессах трансформации 10–15% органического вещества; из-за превращения сорта из средообразующего фактора в средоистощающий, равно как и ГМО, используемых для максимизации уровня продуктивности.

Усиленный экспорт запасенной энергии (зерна и продуктов его переработки) в процессе дальнейшей урбанизации постоянно преобладает, значительно меньшая её часть (при оставшейся в РФ численности животноводства) возвращается в агроэкосистему, характеризуя возросший сток тепла из экосистемы. Рассмотрение приведенных зависимостей на примере модели функциональной схемы экосистемы (по Одуму, 1986) позволяет судить о существенном ослаблении энергетической управляющей петли обратной связи и запасах энергии в агроэкосистеме, постоянно снижающихся в процессе дегумификации [Иващенко, 2008].

В сложившихся условиях, чем интенсивнее технология, тем больше вынос запасенной энергии, поскольку подавляется и та часть органического вещества растений сорных видов, которая ранее возвращалась в почву в процессе механизированных обработок.

Направленность селекционных программ на дальнейшее повышение УИ будет обострять проблему адаптации сортов и гибридов, поскольку прогностически допустимый, но экспериментально не доказанный рост фотосинтетического потенциала продуктивности, к тому же не обеспеченный в должной мере условиями для её реализации, создает условия для развития стрессов. Вероятно, есть смысл поступиться долей потенциально возможного роста урожайности, сохранив при этом достаточный уровень устойчивости и адаптивности, тем более что потенциал этот на фоне недостаточного питания не может реализовываться, а восстановление плодородия почв, их биологической активности потребует десятилетий. Иными словами,

дегумификация – это надолго! Это уже реальность, подрывающая базис продовольственной безопасности РФ.

Теория интенсивного растениеводства требует более высокого уровня биологизированных агротехнологий с тем, чтобы снизить удельный вес химических средств. Однако, сейчас экономический эффект определяется именно химическими средствами.

Надо полагать, что удельный вес факторов и степень интенсификации технологий будет определяться прежде всего структурой севооборота и плодородием почв. При этом функциональные системы поддержания и повышения плодородия от возврата органического вещества через животноводство и структуру севооборотов, сбалансированных по круговороту и объемам органического вещества, в наибольшей мере соответствуют долговременным задачам построения интенсивных экологически устойчивых зональных агроэкосистем, а полученная в них продукция – показателям качества.

### Библиографический список (References)

- Астафьева В. Уплотнение почв против органического земледелия. Аграрный сектор, N1 (27), март 2016 (<http://agrosetor.kz/>):
- Батоев Б.Б., Пьинев В.В., Нефедов А.В. Изменение урожайности и элементов структуры урожая озимой мягкой пшеницы в процессе длительной селекции на юге Украины. / Изв. ТСХА, 1991. 23 с.
- Батыгин Н.Ф. Онтогенез высших растений. /М., Агропромиздат, 1986, С. 82–83.
- Благодатская Е.В., Семенов М.В., Якушев А.В. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. Товарищество научных изданий. КМК. М.: 2016. 243 с.
- Вернадский В.И. Биосфера: I-II / В. И. Вернадский, 1926. 157 с. /Научное химико-техническое издательство-Научно технический отдел ВСНХ/ Выпуск N 3–1. том 3. 2004 С.41–42.
- Глуховцев В.В. Особенности адаптивной селекции зерновых культур в Среднем Поволжье в свете учения Н.И. ВАВИЛОВА // Развитие научного наследия Н.И. ВАВИЛОВА в современных селекционных исследованиях. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова 13–14 марта 2012 год. Казань, Центр инновационных технологий. 2012, С.29–37.
- Евдокимова В.А. Кумаков О.Л. Распределение ассимилятов как фактор продуктивности и засухоустойчивости сортов яровой пшеницы. Итоги исследования / Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета, 2002. Вып 1. С. 146–150.
- Жерихин В.В. Генезис травяных биомов // Экосистемные перестройки и эволюция биосферы. М.: «Недра». 1994. С. 132–137.
- Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений. Кишинев, АН МССР, 1988. 323 с.
- Жученко А.А. Генетическая природа адаптивного потенциала возделываемых растений. /Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб, ВИР, 2005, С. 36–101.
- Жученко А.А. Стратегия адаптивной интенсификации сельского хозяйства (концепция). Пушино: ОНТИ, ПНЦ, РАН, 1994. 148 с.
- Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиогенез). Кишинев, 1980, 347 с.
- Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений как самостоятельная научная дисциплина. Теория и практика. Издательство ООО «Просвещение- ЮГ», Краснодар. 2010. 486 с.
- Иващенко В.Г. Способ отбора селекционного материала по признаку выносливости к фузариозной стеблевой гнили. Авторское св-во N 1507263, Б.И. N 34. 1989.
- Иващенко В.Г. Способ создания исходного материала кукурузы в селекции на скороспелость. Авт. св-во N 1729336 Бюлл. изобр., 16, 1992.
- Иващенко В.Г. Устойчивость к стеблевым гнилям кукурузы в аспекте продуктивности и прогрессирующего старения растений. /Вестник с.-х. науки, 1, 1992. С.119–125.
- Иващенко В.Г. Шпилова Н.П. Грибы рода *Fusarium* на семенах хлебных злаков в основных зерновых регионах России (ареалы, частота встречаемости, соотношение). Снкт-Петербург. 2004. 20 с.
- Иващенко В.Г., Шпилова Н.П., Назаровская Л.А. Фузариоз колоса хлебных злаков. СПб, 2004. 164 с.
- Иващенко В.Г. К вопросу о фитосанитарной стабилизации агроэкосистем. 2008. 3. С. 27–46.
- Игошин, А.П. Формирование колоса и зерновая продуктивность сортов яровой пшеницы в связи с морфологической структурой и фотосинтетической деятельностью растений. /Автореф ... канд. дис.. Саратов, 1984. 17 с.
- Ионова Е. В. Устойчивость сортов и линий пшеницы, ячменя и сорго к региональному типу засухи / Автореф ... докт. дис. Краснодар. 2011. 47 с.
- Иржи П. и др. Формирование урожая сельскохозяйственных культур. М.: Колос, 1984. 367 с.
- Керженцев А О стратегии выхода из российского почвенного кризиса или почему почвоведение перестало влиять на успехи сельского хозяйства. 2017. <https://regnum.ru/news/economy/2284962.html> (дата обращения 23.07.2017).
- Ковда В.А. Патология почв и охрана биосферы планеты (препринт). Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1989, 35 с.
- Ковтун. В.И. Селекция и насінництво. 2011. Випуск 100. С. 8–23.
- Круглов Ю. В. Микробиологические аспекты экологической безопасности применения пестицидов. //Сб. Проблемы оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства. 1997. С-Петербург. С.45–53.
- Кудеяров В.Н., Соколов М.С., Глинушкин А.П. Современное состояние почв агроценозов России, меры их оздоровления и рационального использования //Агрохимия, 2017, N 6, С. 3–11.
- Кудряшов И.Н., Беспалова Л.А. Гусев В.А. Сорт как основополагающий фактор интенсификации производства зерна озимой пшеницы. / Пшеница и тритикале. Материалы научно-практической конференции «Зеленая революция П.П.Лукашенко». Краснодар, 2001, С. 464–469.
- Кумаков В.А., Игошин А.П., Сияк В.М. и др. Методические указания по определению некоторых физиологических показателей растений пшеницы при сортоизучении. М.: Колос, 1982. 28 с.
- Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976. 646 с.
- Ларионов, В.Г. (2015). Продовольственная безопасность России. Продовольственная политика и безопасность, 2(1), 47–58. doi: 10.18334/rpib.2.1.456.
- Лэмб М. Биология старения. М.: Мир, 1980. 13 с.
- Материалы доклада «О состоянии и использовании земель сельскохозяйственного назначения» (Москва, МСХ РФ, 2011).
- Майснер А.Д. Жизнь растений в неблагоприятных условиях. Минск, 1981. 96 с.
- Мелешкина Е.П. Нужно ли нам качество зерна. // Хлебпродукты. 2011. N 6.- С. 12–16; оконч. N7. С. 10–13.
- Мок Д. Фотосинтез, урожайность зерна и качество стебля у раннеспелой кукурузы. / Тез. докл. X заседания ЭУКАРПИЯ. Варна, 1979, С.13–14.
- Мокронос А.Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма: 42-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1983. 64 с.
- Моргун В.В., Швартау В.В., Ламан Н.А., Прохоров В.Н. / Создание высокоурожайных сортов хлебных злаков и физиологические процессы их продукционного процесса. / Сборник тезисов: «Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы VII -й Международной научной конференции». Минск и эконом: Право и экономика, 2011. 271 с.

- Никитин В.В. Теоретические основы ресурсосберегающей системы удобрения в севооборотах юго-западной части Центрального Черноземья. / Белгородский агромир, 4(6), 2, 2006. С.351–352.
- Ничипорович А.А. Теория фотосинтетической продуктивности растений // Физиология растений. Т. 3. Теоретические основы повышения продуктивности растений. М.: Наука, 1977. С. 11–54.
- Ничипорович А.А. Фотосинтетическая деятельность растений и пути повышения их продуктивности // Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М.: Наука, 1972. С. 511.
- Новиков А.В. Изменение уборочного индекса в процессе селекции и его влияние на урожайность пшеницы мягкой озимой / Автореф. ... канд. дис. Краснодар. 2012. 24 с.
- Одум Ю. Экология. М.: Мир, 1, 1986, 328 с.
- Павлова О. В. Ретроспективный анализ сортов яровой пшеницы, рекомендованных для возделывания в Центральном районе Нечерноземной зоны РФ в 1930–2000 гг./ Автореф. ... канд. дисс. М.: 2005. 22 с.
- Павлюшин В.А., В.И. Якуткин, Н.П. Таволжанский. Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем Белгородской области. // Вестник защиты растений. 2016, 1(87). С. 14–22.
- Павлюшин В.А., Танский В.И. Дестабилизация фитосанитарного состояния земледелия и пути ее преодоления. / Вестник защиты растений, 1, 2006, С.8–15.
- Пахненко, Е. П.. Роль почвы и удобрений в устойчивости растений к патогенным грибам в агроценозах / Автореф. докт. дисс. Москва. 2001. 49 с.
- Пути совершенствования систем земледелия Краснодарского края / Под ред. П.П.Васюкова. Краснодар, 1997. 196 с.
- Пыльнев В.М., Паламарчук А.И. Селекция озимого тритикале на кормовые цели. /Одесса, ВСГИ. 1981.С. 199–200.
- Романенко А.А., Беспалова Л.А., Кудряшов И.Н., Аблова И.Б. Новая сортовая политика и сортовая агротехника озимой пшеницы. Краснодар, 2005, 224 с.
- Рудай И.Д. Государственная Дума РФ. Законодательное обеспечение проблемы плодородия земель сельскохозяйственного назначения в Российской Федерации //Аграрная наука. 1999. N 2. С. 3–4.
- Рыбалкин А.Н. Повышение эффективности производства зерна / А.Н. Рыбалкин. М.: Агропромиздат, 1990. 224 с.
- Рыбалкин и др. Пути совершенствования систем земледелия Краснодарского края. Краснодар, 1997, 195 с.
- Самофалов А. П. Изменение показателей стабильности урожайности сортов озимой пшеницы в результате селекции // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, выпуск N 3–1. том 3. 2004. С.41–42.
- Тарчевский И.А. Фотосинтез и засуха. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1964. 182 с.
- Теория минерального питания: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 36.01.06 «Сельское хозяйство» / Сост.: В.П. Белоголовцев, Е.А. Нарушева // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». Саратов, 2014. 121 с.
- Тооминг Х.Г. Солнечная радиация и формирование урожая. Л.: Гидрометеоздат, 1977. 200 с.
- Трапезников В.К., Иванов И.И., Тальвинская Н.Г. Питание растений. Уфа: Гилем, 1999 258 с.
- Уланов А.К., Будажапов Л.В. Изменение гумусного состояния каштановой почвы в результате длительного антропогенного воздействия в сухой степи Бурятии /Агрохимический вестник Бурятского НИИСХ, 2016, 3. С. 2–7.
- Хокесфорд М.Дж. Сортовые различия в эффективности использования азота растениями пшеницы и существующий потенциал улучшения сортов. / Вестник Международного института питания растений. 2014. N 3. Оригинал: <http://eesa-ru.ipni.net/article/EECARU-2244> (дата обращения 18.05.2017).
- Харченко А. 2017: Метания Минсельхоза в поисках путей повышения урожайности. (<https://regnum.ru/news/economy/2303925.html>)
- Чиков В.И. Фотосинтез и транспорт ассимилятов. М.: Наука, 1987. 188 с.
- Щербаков А.П., Васенев И.И. (ред.) Агроэкологическое состояние черноземов ЦЧО. Научно-практическое издание. Курск.: изд-во ВНИИ Земледелия и защиты почв от эрозии. 1997. 327 с.
- Яшутин Н. В. Факторы успешного земледелия: монография; М-во сельского хоз-ва Российской Федерации, Гл. упр. сельского хоз-ва Администрации Алтайского края, Федеральное гос... Барнаул Изд-во АГАУ 2007. 523 с.
- (Aisawi, K.A.B., M.P. Reynolds, R.P. Singh, M.J. Foulkes. 2015. The physiological bases of the genetic progress in yield potential of CIMMYT spring wheat from 1966 to 2009 (in press) doi:10.2135/cropsci2014.09.0601
- Austin, R.B. 1982. Crop characteristics and the potential yield of wheat./ J. Agric. Sci. Camb. 98, P. 447–453.
- Foulkes J., Rivera C., Trujillo E., Sylvester-Bradley R., Reynolds M. Achieving a Step-Change in Harvest Index in High Biomass Wheat Cultivars // Proceedings of the International TRIGO (Wheat) Yield Potential WORKSHOP 2015 CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico (24–26th March, 2015).
- Foulkes, M.J., G.A. Slafer, W.J. Davies, P.M. Berry, R. Sylvester-Bradley, P. Martre, D.F. Calderini, M.P. Reynolds. 2011. Raising yield potential in wheat: Optimizing partitioning. / J. Exp. Bot. 60, P.1899–1918.
- Liu, X., Burras, C. L., Kravchenko, Y. S., Duran, A., Huffman, T., Morras, H., Studdert, G., Zhang, X., Cruse, R. M. and Xiaohui Yuan, X. . Overview of Mollisols in the world: Distribution, land use and management./ Can. J. Soil Sci. 2012. 92: P.383–402. doi:10.4141/CJSS2010–058.
- Reynolds M.P., M.J. Foulkes, R.T. Furbank, S. Griffiths, J. King, E.H. Murchie, M.A. Parry, G.A. Slafer. 2012. Achieving yield gains in wheat./ Plant Cell Environ. 35, P. 1799–1823.
- Saint Pierre, C., R. Trethowan, M.P. Reynolds. 2010. Stem solidness and its relationship to water-soluble carbohydrates: association with wheat yield under water deficit. Funct. Plant Biol. 37, 166–174.
- Simmonds N.W. Biol. Rev., 37, 1962, p.422 (цит. по Жучено, 1980, 347).
- Tony) Fischer R.A., Edmeades G.O. Breeding and cereal yield progress // Workshop 4. Beyond the yield curve – exerting the power of genetics, genomics, and synthetic biology. Science Forum 2009. Wageningen 16–17 June 2009 / [www.sap.uchile.cl/](http://www.sap.uchile.cl/).
- <http://agro-portal.su/pshenica/2025-sort-i-ego-znachenie-v-povyshenii-urozhaynosti.html> (Дата обращения: 11.03.2017).
- <https://www.agroxxi.ru/ovoschnye/ovoschnye-tehnologija-vozdelyvanija/urozhain>. (Дата обращения: 26.07.2017).
- <http://vlasti.net/news/255603>. (Дата обращения: 24.08.2017).
- <http://agro-portal.su/pshenica/2025-sort-i-ego-znachenie-v-povyshenii-urozhaynosti.html> (Дата обращения: 11.03.2017).
- <http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/447.html>. (Дата обращения: 10.11.2016).
- <http://www.strahovkainfo.ru/SmartSystem> (Дата обращения: 25.04.2017).
- [http://referatwork.ru/lectionbase/ekologiya/view/375945\\_zemel\\_nye\\_resursy\\_rossii\\_i\\_ih\\_sostoyanie](http://referatwork.ru/lectionbase/ekologiya/view/375945_zemel_nye_resursy_rossii_i_ih_sostoyanie) (Дата обращения: 28.07.2017).
- [https://regnum.ru/analytics/author/anatolij\\_kerzhencev.html](https://regnum.ru/analytics/author/anatolij_kerzhencev.html) (Дата обращения: 1 7.08.2017).
- <http://agro-archiv.ru/adaptivnoe-rastenievodstvo/2386-bioenergeticheskie-osnovy-selekcii-rasteniy-na-vysokuyu-potencialnuyu-produktivnost-kachestvo-urozhaya-i-ekologicheskuyu-ustoychivost.html> (Дата обращения: 27.09. 2017)
- <https://fermer.ru/content/gumus-pochv-i-ego-svoystva> (Дата обращения: 15.08.2017)
- <https://geographyofrussia.com/balans-pitatelnyx-veshhestv-v-zemledelii/> (Дата обращения: от 29.08.2017)
- <http://geotec.com.ua/agronomiya/vynos-elementov-pitaniya-iz-pochvy-urozhaem-selskokhozyajstvennykh-kultur-puti-ikh-vozvrashcheniya-v-pochvu.html> (Дата обращения: 06.07.2013). | [scienceforum.ru/2015/pdfcienc/17489.pdf](http://scienceforum.ru/2015/pdfcienc/17489.pdf). (Дата обращения: 17.03.2015).

#### Translation of Russian References

- Astafieva V. Compaction of soils vs organic farming. Agrarnyi sektor, N1 (27), 2016 (<http://agrosektor.kz/>). (In Russian).
- Batoev B.B., Pylnev V.V., Nefedov A.V. Changes of yield and elements of yield structure of winter wheat in a long process of selection in the South of Ukraine. Izv. TSKhA, 1991. 23 p. (In Russian).
- Batygin N.F. Ontogenesis of higher plants. Moscow: Agropromizdat, 1986, p. 82–83. (In Russian).
- Belogolovtsev V.P., Nerushev E.A. Theory of mineral nutrition: a brief course of lectures for graduate students in direction of training 36.01.06 Agriculture. Saratov: Saratovskii GAU. 2014. 121 p. (In Russian).
- Blagodatskaya E.V., Semenov M.V., Yakushev A.V. Activity and biomass of soil microorganisms in a changing environment. Moscow: KMK, 2016. 243 p. (In Russian).
- Chikov V.I. Photosynthesis and transport of assimilates. Moscow: Nauka, 1987. 188 p. (In Russian).
- Evdokimov V.A., Kumakov O.L. Distribution of assimilates as a factor of productivity and drought resistance of spring wheat varieties. Results of the study. Byulleten Botanicheskogo sada Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta, 2002. Vyp 1. P. 146–150. (In Russian).

- Glukhovtsev V.V. Features of adaptive breeding of grain crops in the middle Volga region in the light of the doctrine of N.I. Vavilov. In: Development of the scientific heritage of N.I. Vavilov in modern breeding research. Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 125-letiyu so dnya rozhdeniya N.I. Vavilova, 13-14 marta 2012 god. Kazan: Tsentr innovatsionnykh tekhnologii, 2012, p. 29-37. (In Russian).
- Hawkesford M.J. Varietal differences in efficiency of use by the wheat plants and existing potential of improved varieties. Vestnik Mezhdunarodnogo instituta pitaniya rastenii. 2014. N 3 (<http://eeca-ru.ipni.net/article/EECARU-2244>) (In Russian).
- Igoshin A.P. Development of ear and grain productivity of spring wheat varieties in connection with the morphological structure and photosynthetic activity of plants. PhD Thesis. Saratov, 1984. 17 p. (In Russian).
- Ionova E.V. Resistance of varieties and lines of wheat, barley and sorghum to the regional type of drought. DSc Thesis. Krasnodar. 2011. 47 p. (In Russian).
- Irzhi P. et al. Yield formation of crops. Moscow: Kolos, 1984, 367 p. (In Russian).
- Ivaschenko V.G. Method of creating the initial material of maize in breeding for earliness. Patent RF N 1729336. Byull. izobr. N 16. 1992. (In Russian).
- Ivaschenko V.G. Method of selection of breeding material on the basis of resistance to Fusarium stem rot. Patent RF N 1507263, Byull. izobr. N 34. 1989. (In Russian).
- Ivaschenko V.G. Resistance to stem rots of maize in terms of productivity and progressive senescence. Vestnik s.-kh. nauki, N 1, 1992, p.119–125. (In Russian).
- Ivaschenko V.G., Shipilova N.P. Fungi of the genus *Fusarium* on seeds of cereals in the main grain regions of Russia (ranges, frequency of occurrence ratio). St. Petersburg. 2004. 20 p. (In Russian).
- Ivaschenko V.G., Shipilova N.P., Nazarovskaya L.A. *Fusarium* head blight of cereals. St. Petersburg, 2004, 164 p. (In Russian).
- Ivashchenko V.G. To the question on phytosanitary stabilization of agroecosystems. Vestnik zashchity rastenii, 2008. N 3. P. 27–46. (In Russian).
- Kerzhentsev A. About strategy exit from the Russian soil crisis, or why the soil science ceases to affect the success of agriculture. 2017. (<https://regnum.ru/news/economy/2284962.html>) (In Russian).
- Kharchenko A. 2017. Throwings of the Ministry of Agriculture in search of ways of productivity increase (<https://regnum.ru/news/economy/2303925.html>) (In Russian).
- Kovtun V.I. Methods and trends of selection of soft winter wheat in the South of Russia. Seleksiya i semenovodstvo, 2011. Vyp. 100. P. 8–23. (In Russian).
- Kruglov Y.V. Microbiological aspects of environmentally safe application of pesticides. In: Sb. Problemy optimizats. fitosanitar. sostoyan. rasteniev. 1997. St. Petersburg. P. 45–53. (In Russian).
- Kudryarov V.N., Sokolov M.S., Glin'skiy A.P. Current status of soils of agricultural lands of Russia, measures of improvement and rational use. Agrokhimiya, 2017, N 6, P. 3–11. (In Russian).
- Kudryashov I.N., Bespalova L.A., Gusev V.A. Grade as a fundamental factor in the intensification of grain production of winter wheat. In: Pshenitsa i tritikale. Materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii "Zelenaya revolyutsiya P.P.Lukyayenko". Krasnodar, 2001, p. 464–469. (In Russian).
- Kumakov V.A., Igoshin A.P., Sinyak V.M. et al. Methodical instructions on determination of some physiological parameters of wheat plants during the study. Moscow: Kolos, 1982. 28 p. (In Russian).
- Kursanov A.L., Transport of assimilates in the plant. Moscow: Nauka, 1976. 646 p. (In Russian).
- Lamb M. Biology of aging. Moscow: Mir, 1980. 13 p. (In Russian).
- Larionov V.G. Food safety of Russia. Prodovol'stvennaya politika i bezopasnost, 2015. Vol. 2(1), p. 47-58. Doi: 10.18334/ppib.2.1.456. (In Russian).
- Meisner A.D. Plant life in adverse conditions. Minsk, 1981. 96 p. (In Russian).
- Meleshkina E.P. Do we need the quality of the grain. Khleboproduktiy. 2011. N 6. P. 12–16. N 7. P. 10–13. (In Russian).
- Ministry of Agriculture of the Russian Federation. Materials of report "On the status and use of lands of agricultural purpose". Moscow: MSKh RF, 2011 ([mcx.ru/documents/file\\_document/v7\\_show/19761.133.htm](http://mcx.ru/documents/file_document/v7_show/19761.133.htm)) (In Russian).
- Mok D. Photosynthesis, grain yield and quality of stem early maturing corn. In: Tez. dokl. 10 zasedaniya EUKARPIA. Varna, 1979, p.13–14. (In Russian).
- Mokronosov A.T. Photosynthetic function and integrity of plant organism. In: 42-e Timiryazevskoe chtenie. Moscow: Nauka, 1983. 64 p. (In Russian).
- Morgun V.V., Schwartau V.V., Laman N., Prokhorov V.N. Creation of high-yielding varieties of cereals and physiological processes of their production process. In: Sbornik tezisov: Regul'yatsiya rosta, razvitiya i produktivnosti rastenii: materialy 7-i Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii. Minsk i ekonom: Pravo i ekonomika, 2011. 271 p. (In Russian).
- Nichiporovich A., Theory of photosynthetic productivity of plants. In: Plant Physiology. Vol. 3. Theoretical bases of increase of efficiency of plants. Moscow: Nauka, 1977. P. 11–54. (In Russian).
- Nichiporovich A.A. Photosynthetic activity of plants and ways of increasing their productivity. In: Theoretical foundations of the photosynthetic productivity. Moscow: Nauka, 1972. P. 511. (In Russian).
- Nikitin V.V. Theoretical foundations of resource-saving systems of fertilizers in crop rotations in the South-Western part of the Central Chernozem region. Belgorodskii agromir, vol. 4(6), 2. 2006. P. 351–352. (In Russian).
- Novikov A.V. Changes in the harvest index in the process of selection and its effect on the yield of soft winter wheat. PhD Thesis. Krasnodar. 2012. 24 p. (In Russian).
- Odum Yu. Ecology. Moscow: Mir, 1986. Vol. 1. 328 p. (In Russian).
- Pavlova O.V. Retrospective analysis of spring wheat varieties recommended for cultivation in the Central-Chernozem zone of the Russian Federation in 1930-2000. PhD Thesis. Moscow. 2005. 22 p. (In Russian).
- Pavlyushin V.A., Tansky V.I. Destabilization of the phytosanitary state of agriculture and ways of its overcoming. Vestnik zashchity rastenii, N 1, 2006, P. 8–15. (In Russian).
- Pavlyushin V.A., Yakutkin V.I., Tavolzhanskiy N.P. Phytosanitary optimization of agroecosystems in Belgorod region. Vestnik zashchity rastenii. 2016, N 1(87). P. 14–22. (In Russian).
- Pylnev V.M., Palamarchuk A.I. Breeding of winter triticale for feed purposes. Odessa: VSGI, 1981, p. 199–200. (In Russian).
- Rakhnenko E.P. Role of soil and fertilizer in plant resistance to pathogenic fungi in agroecosystems. PhD Thesis. Moscow. 2001. 49 p. (In Russian).
- Romanenko A.A., Bespalova L.A., Kudryashov I.N., Ablova I.B. New policy of varietal and cultivar agrotechnics of winter wheat. Krasnodar, 2005. 224 p. (In Russian).
- Rudai I.D. State Duma of the Russian Federation. Legislative support for issues of fertility of agricultural land in the Russian Federation. Agrarnaya nauka. 1999. N 2. P. 3–4. (In Russian).
- Rybalkin A.N. et al. Ways of improving cropping systems in the Krasnodar region. Krasnodar, 1997, 195 p. (In Russian).
- Rybalkin A.N. Improving the efficiency of grain production. Moscow: Agropromizdat, 1990. 224 p. (In Russian).
- Samofalov A.P. Changes of stability of productivity of winter wheat varieties as a result of selection. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, N 3-1. Vol. 3. 2004. P. 4–142. (In Russian).
- Shcherbakov A.P., Vasenev I. (Eds.). Agroecological state of chernozems, Central black earth region. Scientific-practical publication. Kursk: VNII Zemledeliya i zashchity pochv ot erozii. 1997. 327 p. (In Russian).
- Tarchevskiy I.A. Photosynthesis and drought. Kazan: Izd-vo Kazanskogo unta, 1964. 182 p. (In Russian).
- Tooming H.G. Solar radiation and yield formation. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1977. 200 p. (In Russian).
- Trapeznikov V.K., Ivanov I.I., Tallinskaya N.G. Nutrition of plants. Ufa: Gilem, 1999. 258 p. (In Russian).
- Ulanov A.K., Budazhapov L.V. Change in the humus state of the chestnut soil as a result of prolonged anthropogenic impact in dry steppe of Buryatia. Agrokhimicheskii vestnik Buryatskogo NIISKh, 2016, 3. P. 2-7. (In Russian).
- Vasyukov P.P. (Ed.). Ways of perfection of systems of agriculture in Krasnodar Krai. Krasnodar, 1997. 196 p. (In Russian).
- Vernadsky V.I. Biosphere. Vols. I-II. 1926. 157 p. ([http://m605/dsweb/Get/Resource-8256/Vernadskiy\\_V.I.\\_Biosfera\(1\).pdf](http://m605/dsweb/Get/Resource-8256/Vernadskiy_V.I._Biosfera(1).pdf)) (In Russian).
- Yashutin N.V. Factors of successful agriculture: monograph. Barnaul: AGAU. 2007. 523 p. (In Russian).
- Zherikhin V.V. Genesis of grassy biomes. In: Ecosystem restructuring and evolution of the biosphere. Moscow: Nedra. 1994. P. 132–137. (In Russian).
- Zhuchenko A.A. Adaptive potential of cultivated plants. Kishinev: AN MSSR, 1988. 323 p. (In Russian).
- Zhuchenko A.A. Ecological genetics of cultivated plants (adaptation, recombination, agrobiocenosis). Kishinev, 1980, 347 s. (In Russian).
- Zhuchenko A.A. Ecological genetics of cultivated plants as an independent scientific discipline. Theory and practice. Krasnodar: Prosveshchenie-YuG. 2010. 486 p. (In Russian).
- Zhuchenko A.A. Genetic nature of the adaptive potential of cultivated plants. In: Identifitsirovannyi genofond rastenii i seleksiya. St. Petersburg: VIR, 2005, p. 36–101. (In Russian).
- Zhuchenko A.A. Strategy of adaptive intensification of agriculture (a concept). Pushchino: ONTI, PNTs, RAN, 1994, 148 p. (In Russian).

## CROP PRODUCTION INTENSIFICATION AND ECOLOGICAL PRODUCTION BALANCE OF AGRICULTURAL ECOSYSTEMS: THE DECLINE IN SOIL FERTILITY AND PHYTOSANITARY DESTABILIZATION

V.G. Ivashchenko, V.A. Pavlyushin

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

A retrospective analysis of productivity growth of wheat in the process of intensification of selection methods generated short-stalk varieties in breeding institutions of Russia and foreign countries is carried out. Published experimental materials, technical papers, statistics and materials of authors' researches are used. A similar increase of the harvest index is achieved in various countries. The reasons for the harvest index deceleration is discussed, its physiological limits and ways to increase the intensity of photosynthesis in wheat varieties are defined. The effects of predominantly chemical-technological intensification of crop production and ecological imbalance of production and agroecosystems are described. The weakening of the main functional role of humus, i.e. regulating sustainability of agroecosystems to abiotic and biotic factors, has led to a decline of soil suppressiveness. The primary factor of environment exhaustion at intensive technology has become a variety with a genetically fixed ability for high reproductive capacity; the secondary factor is a technological support, designed to maximize yield and profitability, but not counting the price of soil fertility reduction. The change of technology, varieties and calculation of profitability will limit the use of arable lands of the Russian Federation as a testing ground for foreign plant protection means.

**Keywords:** wheat breeding; short-stem variety; harvest index; productivity; photosynthesis; humus; dehumidification; yield.

### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608  
Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\*Иващенко Владимир Гаврилович. Ведущий эксперт, доктор  
биологических наук, профессор, e-mail: ya.v-ivaschenko2013@yandex.ru  
Павлюшин Владимир Алексеевич. Директор института, академик РАН

\* Ответственный за переписку

### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,  
St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\*Ivashchenko Vladimir Gavrilovich. Leading expert, DSc in Biology,  
Professor, e-mail: ya.v-ivaschenko2013@yandex.ru  
Pavlyushin Vladimir Alekseevich. Director of VIZR. Academician

\* Responsible for correspondence

УДК 632.937.21

## БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМИЗАЦИИ ПРЕПАРАТИВНЫХ ФОРМ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МИКРОБОВ- АНТАГОНИСТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОПУЛЯЦИЙ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

И.И. Новикова<sup>1</sup>, Ю.А. Титова<sup>1</sup>, И.В. Бойкова<sup>1</sup>, В.Н. Зейрук<sup>2</sup>,  
И.Л. Краснобаева<sup>1</sup>, Т.А. Серова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Московская область

Проведена технологическая оптимизация рецептур препаратов на основе отобраных штаммов *Bacillus subtilis* и *Trichoderma asperellum*, обеспечивающая жизнеспособность клеток и высокую целевую биологическую активность в течение длительного срока хранения. Оптимизацию жидких и концентрированных препаративных форм проводили с использованием консервантов. Твердофазную ферментацию микробов-антагонистов оптимизировали подбором субстратов по питательности (наличие легко усваиваемых водорастворимых компонентов) и оценкой их технологичности. Проведенные исследования показали возможность и целесообразность получения твердофазной ферментацией как торфяных, так и гранулированных мультиконверсионных препаративных форм, наиболее удобных для внесения в почву с целью регуляции численности популяций почвообитающих фитопатогенных грибов.

**Ключевые слова:** оптимизация препаративных форм, биопрепараты для защиты растений, микробы-антагонисты, мультиконверсионные биопрепараты.

Создание эффективной технологии контроля численности популяций фитопатогенов основано, прежде всего, на формировании набора высоко активных штаммов-продуцентов биопрепаратов, обладающих хорошими

технологическими характеристиками: способных утилизировать дешевые и доступные источники питания, выдерживать разные режимы концентрирования и высушивания, длительно сохранять жизнеспособность и целевую



активность в разных препаративных формах (ПФ) [Новикова, 2013].

К наиболее активным микроорганизмам-супрессорам относятся представители бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Streptomyces*, а также грибов рода *Trichoderma* [Benítez et al., 2004; Коломбет и др., 2001; Kubicek et al., 2001; Новикова, 2005; Алимова и др., 2006; Lengler et al., 2006; Логинов и др., 2007; Чеботарь и др., 2009]. Микроорганизмы-антагонисты не только выделяют антибиотики для подавления конкурирующих за среду обитания фитопатогенов, но также стимулируют рост и развитие растений за счет продуцирования веществ-иммунизаторов, усиливают фиксацию растениями атмосферного азота, растворяют труднодоступные для растений минеральные соединения почвы (в первую очередь, фосфаты) [Четвериков и др., 2009; Соколова и др., 2011].

Особенная перспективность бактерий рода *Bacillus* определяется технологичностью, широкой распространенностью и конкурентоспособностью, устойчивостью к воздействию различных неблагоприятных факторов вследствие образования ими термостабильных эндогенных спор. Грибы рода *Trichoderma* также считают ответственными за биологический контроль плотности популяций фитопатогенных микромицетов в супрессивных почвах [Benítez et al., 2004; Kubicek et al., 2001; Алимова и др., 2006; Cotxarrera et al., 2002; Емцев, 2005]. Эти грибы образуют целый комплекс антибиотиков и ферментов, способных гидролизовать клеточную стенку фитопатогенов [Великанов и др., 1994; Маркович и др., 2003; Limón et al., 2004]. Кроме этого, встречается явление и прямого паразитирования грибов-антагонистов [Великанов и др., 1994; Орлова, 1999].

Разработка технологии производства биопрепаратов на основе микробов-антагонистов состоит из ряда этапов, включающих подбор и оптимизацию питательных субстратов и физико-химических условий культивирования, а также разработку методов получения конечной ПФ, качество которой в значительной степени определяет длительность хранения и целевую биологическую активность биопрепарата [Коломбет и др., 2001; Новикова, 2005а,б; Логинов и др., 2007].

Поскольку технологии производства биопрепаратов основаны как на жидкофазной, так и твердофазной ферментациях, оптимизация всех этапов этих процессов наиболее актуальна в получении качественных, конкурентоспособных и востребованных биотехнологических продуктов. Путем жидкофазной ферментации получают биомассу, служащую основой для производства жидких и сухих биопрепаратов через ряд технологических операций отделения путем сепарирования, осаждения, флотации, сгущения на вакуум-выпарных установках или с использованием мембранной технологии [Войнова и др., 2009; Логинов и др., 2011; Сатарова и др., 2009]. Смачивающиеся порошки (СП) получают при дальнейшей сушке полученного концентрата культуральной жидкости (КЖ) различными способами, получение жидких форм предусматривает концентрирование и консервирование пасты с последующей стандартизацией готовой товарной формы в виде пастообразных продуктов, самоэмульгирующихся паст, дустов, гранулированных, таблетированных и микрокапсулированных препаратов на основе использования

медицинских полимеров. Во все виды препаратов вводят вещества, обеспечивающие определенные физико-химические свойства, такие как смачиваемость, прилипаемость, устойчивость активного начала, и к УФ-облучению, пролонгированность его действия и т.п. [Коломбет и др., 2001; Нугманова, 1992; Коломбет, 2005; Титова, 1998; Свиридова и др., 2001; Титова и др., 2002].

В последнее время широко используется иммобилизация клеток штамма-продуцента на носителях различного состава. Так получают гранулированные и порошкообразные биопрепараты на основе природных сорбентов твердофазным культивированием и/или иммобилизацией. Торфяные формы ряда известных почвоудобрительных биопрепаратов (Экстрасола, Ризоторфина, Агрофила и т.п.) давно и широко применяются в сельском хозяйстве. Технология их получения достаточно проста и не требует больших энергетических затрат, а питательный субстрат позволяет микроорганизмам активно размножаться, не теряя жизнеспособности и активности в течение длительного времени [Чеботарь и др., 2009; Четвериков и др., 2009; Соколова и др., 2011; Cotxarrera et al., 2002].

Наиболее целесообразно использовать твердофазную ферментацию микромицетов-продуцентов в производстве гранулированных биопрепаратов, поскольку при их глубинном культивировании трудно получить вегетативную биомассу с элементами спороношения (споры, фиалоконидии) и структурами для перенесения неблагоприятных условий (хламидоспоры) [Коломбет и др., 2001; Коломбет, 2005]. Практически все микромицеты-продуценты – целлюлозолитики, что обуславливает оптимизацию их культивирования путем расширения сырьевой базы за счет использования растительных отходов техногенной сферы [Limón et al., 2004; Титова, 1998; Свиридова и др., 2001]. Кроме того, такой подход определяет их технологичность вследствие решения проблемы утилизации отходов и разработки биотехнологии получения биопестицидов на основе ресурсов дешевого и доступного сырья [Титова и др., 2005]. Растительные отходы техногенной сферы (лесо-, деревоперерабатывающей промышленности, коммунального, лесного и сельского хозяйств) представляют особую проблему утилизации. Содержащийся в них лигноцеллюлозный комплекс – наиболее труднодоступная для разрушения часть растительных отходов [Синица и др., 2005; Соловьев и др., 1980]. Ксилотрофные базидиомицеты – единственная известная группа организмов, способная к активному разложению лигнина древесины до полной минерализации [Бабица и др., 1994; Решетникова, 1997; Змитрович и др., 2007]. Поэтому целлюлозо-лигнинсодержащие отходы сельского хозяйства и промышленности используются для интенсивного культивирования съедобных макромицетов *Pleurotus ostreatus* (вешенка), *Lentinula edodes* (шии-таке), *Flammulina velutipes* (зимний опенок) [Низовская и др., 1984; Stamets, 1993; Титова и др., 2002; Бисько и др., 1987]. В процессе культивирования макромицеты утилизируют из субстрата 60–70% содержащейся там целлюлозы и 80% лигнина. Все полисахаридные комплексы переводятся в усвояемую (водорастворимую) другими организмами форму [Бисько и др., 1987]. Содержание общего азота в субстрате, обросшем мицелием, выше, чем в исходном на 28–47%. Конвертируемый субстрат обогащается витаминами, минеральными элементами (Са,

Na, Mg) и биологически активными веществами [Бисько и др., 1987; Билай и др., 1991; Титова и др., 2002а,б]. Кроме того, субстрат полностью пронизывается мицелием макромицетов и обогащается термофильной микробиотой, которые служат трофической базой для развития, например, штаммов *Trichoderma*, вследствие проявления последними свойств факультативной некротрофии [Бисько и др., 1995; Terlikova et al., 1984; Trutmann et al., 1990]. Поэтому в последнее время одним из перспективных направлений становится разработка многостадийных технологий биоконверсии отходов техногенной сферы с использованием высших базидиальных макромицетов [Титова, 1998; Свиридова и др., 2001; Титова и др., 2002]. В ряде работ исследованы возможности мультибиоконверсии отходов съедобными грибами в промышленном производстве плодовых тел для пищевых целей и 14-ю штаммами-продуцентами биопрепаратов различного спектра действия [Титова и др., 2002а,б; Новикова и др., 2010; Титова, 2013; Титова и др., 2014].

#### Условия эксперимента

В работе использовали культуры макромицетов, а также отобраные активные штаммы микробов-антагонистов из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» ФГБНУ

В последние годы в «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории РФ» включен целый ряд новых биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от болезней разной этиологии (Алирин-Б, Гамаир, Витаплан, Трихоцин, Стернифаг, Глиокладин), разработанных специалистами ФГБНУ ВИЗР и ЗАО «Агробиотехнология» [Новикова, 2005; Новикова и др., 2011]. Недостаточны сведения о получении и эффективности препаративных форм, разрабатываемых на основе мультибиоконверсии отходов техногенной сферы и сельского хозяйства.

Цель настоящей работы – технологическая оптимизация рецептур препаратов на основе отобраных штаммов *Bacillus subtilis* и *Trichoderma asperellum*, обеспечивающих жизнеспособность клеток и высокую целевую биологическую активность в течение длительного срока хранения.

ВИЗР ФАНО, сайт <http://www.vizrspsb.chat.ru> (Постановление правительства РФ № 725-47 от 24 июня 1996 г., приказ по МСХ и правительству РФ от 15 августа 1996 г., зарегистрирована в WFCC WDCM 760 (Япония) 28.01.98 г.): *Bacillus subtilis* В-10 и М-22, *Streptomyces felleus* S-8, *Trichoderma asperellum* Т-32, Т-36 (таблица 1).

Таблица 1. Сорты макромицетов, штаммы микромицетов и бактерий, использованные в работе

№ штамма	Вид микроорганизма	Характеристика	Происхождение
НК-35	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Производственный, бесшоковый гибрид	Венгрия, селекционный
–	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Производственный, летний гибрид	Венгрия, селекционный
Т-32	<i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckf. et Nirenberg	Производственный, депонирован, паспортизован	Россия, Ленинградская область. Естественные условия
Т-36	<i>T. asperellum</i>	Производственный, депонирован, паспортизован	Россия, Ленинградская область. Естественные условия
В-10	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenb.) Cohn	Производственный, депонирован, паспортизован	Россия, Ленинградская область. Естественные условия
М-22	<i>B. subtilis</i>	Производственный, депонирован, паспортизован	Украина, Киев. Естественные условия
И-5 12/23	<i>B. subtilis</i>	Экспериментальный, депонирован, паспортизован	Индия, естественные условия
S-8	<i>Streptomyces felleus</i> Lindenbein	Экспериментальный, депонирован, паспортизован	Россия, Ленинградская область. Естественные условия

Культуры макромицетов поддерживали на зерновом агаре и зерне злаков [Lemke, 1972] и использовали для инокуляции отходов сельского хозяйства и промышленности. Культуры штаммов-продуцентов биопрепаратов поддерживали на агаризованных средах на основе экстрактов конверсионных субстратов, Чапека, картофельно-глюкозной (КГА), картофельно-сахарозной (КСА), полной с пептоном, овсяно-глюкозной, МПА и СПА.

Для приготовления жидких ПФ использовали следующие консерванты и их смеси: бензоат натрия и сорбат калия (0.1, 0.2, 0.3%), натрий сернистокислый (0.01, 0.02, 0.05%), уксуснокислые кальций и натрий (0.02, 0.1, 0.2%).

#### Методы создания инокулюма

Для получения инокулюма культуры бактерий выращивали на лабораторной качалке 220 об./мин., при 28 °С, в колбах объемом 750 мл с объемом среды 100 мл в течение

72 часов на искусственной питательной среде следующего состава: кукурузный экстракт (30 г/л), меласса (15 г/л), рН = 7.2. Глубинное культивирование штамма *S. felleus* S-8 проводили в течение 5 суток на среде, содержащей 1% соевой муки, 1% глюкозы, 0.3% NaCl, 0.1% CaCO<sub>3</sub>, рН = 7.2–7.5 до стерилизации. Штаммы *T. asperellum* Т-32 и Т-36 культивировали на жидкой среде Чапека. Ежедневно проводили отбор проб и оценивали развитие культур микроскопически. Биологическую активность КЖ штаммов микроорганизмов в отношении тест-культур фитопатогенов *Alternaria solani* и *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum*, выделенных из растений картофеля, определяли с помощью метода лунок.

#### Методы получения препаративных форм

Для получения сухой ПФ сепарацию биомассы проводили мембранным методом, высушивание – распылитель-

ным. Перед сушкой в концентрат КЖ добавляли 8% сульфата аммония, 3% лигносульфоната натрия ( $C_{18}H_{21}NaO_3S$ ), 0.5% аэросил  $SiO_2 \times nH_2O$ . Температура на входе – 140 °С, на выходе – 80 °С.

Для получения торфяной ПФ на основе штаммов-антагонистов *B. subtilis* В-10 и *S. felleus* S-8 инокуляцию  $\gamma$ -стерильного торфа, расфасованного в полиэтиленовые пакеты, осуществляли путем инъекции КЖ штаммов-продуцентов биопрепаратов в асептических условиях. Использовали 24-, 48- и 72-часовой инокулом штамма *B. subtilis* В-10 и 48- и 72-часовой инокулом штамма *S. felleus* S-8, а также различные посевные дозы (3, 10 и 15%). Инокулированные пакеты помещали на 15 суток в термостат (28 °С). В дальнейшем полученные образцы торфяных биопрепаратов хранили при комнатной температуре в течение года, периодически определяя титр жизнеспособных клеток методом серийных разведений.

Для получения гранулированных мультиконверсионных биопрепаратов (МБП, Г) использовали культуры микроорганизмов и макромицетов, а также конвертиро-

ванные последними отходы техногенной сферы (таблицы 1, 2). Субстраты готовили по Бисько и др., 1983 [Бисько и др., 1983]. Компоненты интактных и конверсионных субстратов измельчали до 0.5–2.5 см и замачивали в воде до 20–24 часов для полного насыщения субстрата влагой. Доводили влажность субстратной смеси до 70–80%, после чего расфасовывали в полипропиленовые пакеты объемом 1 л. Субстратные смеси стерилизовали при 133 °С в течение 1 часа с охлаждением до 25–28 °С для инокуляции. Инокуляцию проводили чистыми культурами сортов макромицетов и штаммов-продуцентов биопрепаратов смывами с поверхности агаризованных питательных сред или глубинными культурами штаммов с соблюдением условий стерильности. Инкубирование вели при 24–26 °С до полного обрастания субстрата. В процессе твердофазного культивирования оценивали морфогенез для определения времени снятия урожая макромицетов. Интенсивность конидиогенеза микромицетов определяли по титру в камере Горяева, титр бактерий – методом серийных разведений.

Таблица 2. Состав интактных (для инокуляции макромицетами) и конверсионных субстратов

Вид съедобного макромицета	Субстрат для инокуляции	Отработанный (конверсионный) субстрат
<i>L. edodes</i> (шии-таке)	опилки дубовые, отруби пшеничные – 10%, $CaCO_3$ – 0.1%, $CaSO_4 \times 7H_2O$ – 1% по весу 70%-ной влажности субстрата.	ферментированные мицелием шии-таке компоненты субстрата, грибной белок.
<i>P. ostreatus</i> (вешенка) НК-35	лузга гречихи и подсолнечника (1:1), опилки смешанные – 7%, $CaCO_3$ – 0.1%, $CaSO_4 \times 7H_2O$ – 1% по весу 70%-ной влажности субстрата.	ферментированные мицелием вешенки компоненты субстрата, грибной белок.

### Результаты и обсуждение

Для оптимизации состава суспензионного концентрата (СК) на основе перспективного штамма-продуцента *B. subtilis* И-5 12/23 были использованы различные стабилизаторы и консерванты (таблица 3). Анализ результатов оценки жизнеспособности клеток в образцах жидких ПФ при хранении в разных условиях позволил выбрать оптимальную рецептуру, в состав которой входит сорбат калия в концентрации 0.2%. Данная ПФ обеспечивает

жизнеспособность клеток штамма-продуцента и высокую антагонистическую активность в течение длительного времени. Диаметры зоны лизиса тест-культур *A. solani* и *S. michiganensis* subsp. *sepedonicum* к концу периода хранения составляли 30–35 мм, а в ряде случаев наблюдалось полное подавление роста фитопатогенов. Остальные испытанные консерванты не обеспечили сохранность качества ПФ в течение длительного времени (таблица 3).

Таблица 3. Жизнеспособность клеток (КОЕ/мл) в образцах жидких препаративных форм с консервантами на основе штамма *B. subtilis* И-5 12/23 при хранении

Консервант, концентрация, %	Исходный титр, КОЕ/мл	Хранение, мес; 20 °С			Хранение, мес; 5 °С		
		2	6	13	2	6	13
бензоат Na, 0.2%	$10^{11}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$
бензоат Na, 0.3%	$10^{11}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$
сорбат К, 0.2%	$10^{11}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$
бензоат Na+сорбат К, 0.2%	$10^{11}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$	$10^{11}$	$10^{10}$	$10^{10}$

На основании анализа результатов определения жизнеспособности клеток, в образцах СК на основе штамма *T. asperellum* Т-36, был подобран оптимальный состав ПФ, содержащий биомассу микромицета с добавлением сорбата калия в концентрации 0.1% (таблица 4). Данная ПФ обеспечила длительную жизнеспособность клеток продуцента и высокую антагонистическую активность: рост тест-культуры фитопатогенного гриба *A. solani* был полностью подавлен антагонистом. Бензоат натрия в концентрации 0.2%, а также смесь бензоата натрия и сорбата калия в концентрации 0.4% обеспечивали длительную жизнеспособность клеток микромицета только при низкотемпературном хранении.

Изучение динамики численности микроорганизмов после инокуляции КЖ ряда перспективных штаммов-продуцентов в стерильный торф показало, что все образцы препаратов на 10–15-е сутки культивирования при 28 °С обладали высоким титром: *B. subtilis* В-10 (штамм-продуцент биопрепарата Алирин-Б) –  $1.3–7.1 \times 10^{10}$  КОЕ/г, *S. felleus* S-8 (штамм-продуцент биопрепарата Алирин-С) –  $1.0 \times 10^{10}$  КОЕ/г. Эти значения соответствовали принятым техническим условиям на традиционные сухие ПФ Алирина-Б и Алирина-С. В процессе хранения при 20–22 °С титры жизнеспособных клеток в торфяных формах Алирина-Б и Алирина-С увеличились и достигли к четвертому месяцу хранения при комнатной температуре  $5.0–5.6 \times 10^{12}$

Таблица 4. Жизнеспособность клеток (КОЕ/мл) в образцах жидких препаративных форм с консервантами на основе штамма *T. asperellum* T-36 при хранении

Консервант, концентрация, %	Исходный титр, КОЕ/мл	Хранение, мес; 20 °С			Хранение, мес; 5 °С		
		1	4	6	1	4	6
бензоат Na, 0.2%	10 <sup>9</sup>	—	—	—	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>
бензоат Na+сорбат К, 0.2%	10 <sup>9</sup>	—	—	—	10 <sup>9</sup>	—	—
бензоат Na+сорбат К, 0.4%	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	—	—	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
сорбат К, 0.1%	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>

и 1.0–1.7×10<sup>11</sup> КОЕ/г, соответственно (таблица 5). После хранения образцов биопрепаратов в течение 12-и месяцев титры снизились на 3–5 порядков. В образцах Алирина-Б титр составил 10<sup>8</sup> КОЕ/г, а в образцах Алирина-С – 10<sup>6</sup> КОЕ/г. Анализ результатов показал, что доза и воз-

раст инокулюма *B. subtilis* В-10 не оказали существенного влияния на динамику титра жизнеспособных клеток продуцента в опытных образцах биопрепаратов. Для штамма *S. felleus* S-8 минимальный возраст инокулюма составил 48 часов, а минимальная доза посева – 10% (таблица 5).

Таблица 5. Динамика титра жизнеспособных клеток штамма *B. subtilis* В-10 (КОЕ/г) в опытных образцах торфяной препаративной формы Алирина-Б

Посевная доза инокулюма, %	Длительность хранения образцов препарата					
	5 суток	10 суток	15 суток	75 суток	120 суток	12 месяцев
Время культивирования посевного материала – 24 часа						
3%	6.9×10 <sup>8</sup>	2.3×10 <sup>10</sup>	3.9×10 <sup>10</sup>	2.5×10 <sup>10</sup>	5.6×10 <sup>12</sup>	6.0×10 <sup>8</sup>
10%	6.1×10 <sup>8</sup>	1.3×10 <sup>10</sup>	1.5×10 <sup>10</sup>	1.0×10 <sup>11</sup>	4.6×10 <sup>12</sup>	5.1×10 <sup>8</sup>
15%	4.6×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>10</sup>	5.3×10 <sup>10</sup>	5.6×10 <sup>10</sup>	4.9×10 <sup>12</sup>	4.0×10 <sup>8</sup>
Время культивирования посевного материала – 72 часа						
3%	5.9×10 <sup>8</sup>	4.7×10 <sup>10</sup>	2.3×10 <sup>10</sup>	1.1×10 <sup>11</sup>	5.0×10 <sup>12</sup>	4.7×10 <sup>8</sup>
15%	6.0×10 <sup>8</sup>	2.7×10 <sup>10</sup>	7.1×10 <sup>10</sup>	2.1×10 <sup>10</sup>	5.1×10 <sup>12</sup>	7.7×10 <sup>8</sup>

Из данных таблицы 6 следует, что ЛО МБП, Г могут достаточно длительно храниться, особенно при пониженной температуре. При этом наиболее вероятная причина снижения титра жизнеспособных клеток – возникновение градиента влажности в субстрате и дальнейшие ее потери

при хранении. Для сохранения влажности в гранулированных ПФ необходимо использовать соответствующую упаковку (интактную, нужной плотности, запечатываемую и т.п.) и хранить их при пониженной температуре (4–8 °С) и повышенной влажности воздуха (70–75%).

Таблица 6. Динамика титра жизнеспособных клеток штаммов *T. asperellum* T-32 и T-36 (КОЕ/г) в лабораторных образцах гранулированных мультиконверсионных биопрепаратов (МБП, Г)

Тип лабораторного образца (ЛО)	Титр при производстве, КОЕ/г	Титр, КОЕ/г при хранении, температура °С							
		3 мес.		6 мес.		12 мес.		18 мес.	
		4–8	22–24	4–8	22–24	4–8	22–24	4–8	22–24
ЛО T-32, Г вешеночный	0.9×10 <sup>10</sup>	2.8×10 <sup>8</sup>	2.1×10 <sup>8</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	0.9×10 <sup>8</sup>	4.9×10 <sup>7</sup>	2.3×10 <sup>7</sup>	1.9×10 <sup>7</sup>	0.8×10 <sup>7</sup>
ЛО T-36, Г вешеночный	1.7×10 <sup>10</sup>	4.1×10 <sup>9</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>	1.8×10 <sup>9</sup>	2.1×10 <sup>8</sup>	3.2×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>	0.9×10 <sup>7</sup>
ЛО T-32, Г шиитачный	6.0×10 <sup>9</sup>	3.2×10 <sup>8</sup>	3.1×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	0.8×10 <sup>8</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>	0.9×10 <sup>7</sup>
ЛО T-36, Г шиитачный	2.0×10 <sup>10</sup>	2.3×10 <sup>9</sup>	2.0×10 <sup>8</sup>	4.7×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>8</sup>	2.1×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>7</sup>	2.0×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>

Примечание: ЛО T-32 – лабораторный образец МБП, Г на основе *T. asperellum* T-32; ЛО T-36 – на основе *T. asperellum* T-36.

Проведенные исследования показали возможность и целесообразность получения твердофазной ферментацией как торфяных, так и гранулированных мультиконверсионных ПФ, наиболее удобных для внесения в почву с целью регуляции численности популяций почвообитающих фитопатогенных грибов.

Таким образом, проведенная технологическая оптимизация рецептов препаратов на основе отобраных штаммов микромицетов и бактерий обеспечила жизнеспособность клеток продуцентов и их высокую целевую биологическую активность в течение длительного срока хранения.

#### Библиографический список (References)

- Алимова Ф. К. Взаимоотношения *Trichoderma*, распространенной на территории республики Татарстан, с микроорганизмами и растениями / Ф. К. Алимова, Р. И. Тухбатова, Д. И. Тазетдинова, Ф. Х. А. Кабре-ра, Л. Ю. Каримова // Грибы и водоросли в биоценозах: Материалы междунар. конф., посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января – 3 февраля 2006 г. М.: МАКС Пресс, 2006. С. 12–13.
- Бабицкая В. Г. Особенности деградации лигнина природных полимеров ксилотрофами и почвенными сапротрофами / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба // Микробиология. 1994. N 1. С. 65–72.
- Билай В. Т. Разработка научных основ поверхностного культивирования грибов рода вешенка / В. Т. Билай, Н. А. Бисько, Е. П. Володина, И. А. Дудка // Проблемы культивирования съедобных грибов в СССР. М., Пушкино. 1991. С. 34–35.
- Бисько Н. А. Разрушение древесины грибом *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. / Н. А. Бисько, В. И. Фомина, В. Т. Билай // Микол. и фитопатол. 1983. Т. 17. N 3. С. 199–202.
- Бисько Н. А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. / Н. А. Бисько, И. А. Дудка // Киев: Наук. Думка. 1987. 148 с.
- Бисько Н. А. Влияние бактерий рода *Bacillus* на жизнедеятельность вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* в частично замкнутой искус-

- ственной экосистеме / Н. А. Бисько, В. Т. Билай // Микол. и фитопатол. 1995. Т. 29. N 5–6. С. 1–7.
- Великанов Л. Л. Сравнение гиперпаразитической и антибиотической активности изолятов рода *Trichoderma* и *Gliocladium virens* / Л. Л. Великанов, Е. Ю. Сухоносенко, С. И. Николаева, И. Н. Завелишко // Микол. и фитопатол. 1994. Т. 28. N 6. С. 52–56.
- Войнова О. Н. Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / О. Н. Войнова, Г. С. Калачёва, И. Д. Гродницкая, Т. Г. Волова // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45 (N 4) С. 427–431.
- Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология: учебник для вузов – 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2005. 445 с.
- Змитрович И. В. Эволюционно-таксономические аспекты поиска и изучения лигнинразрушающих грибов – активных продуцентов окислительных ферментов / И. В. Змитрович, Н. В. Псурцева, Н. В. Белова // Микол. и фитопатол. 2007. Т. 41. N1. С. 57–78.
- Коломбет Л. В. Микофунгицид – препарат на основе *Trichoderma viride* для борьбы с болезнями растений / Л. В. Коломбет, С. К. Жиглецова, В. В. Дербышев, Д. В. Ежов, Н. И. Косарева, Е. В. Быстрова // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. N 1. С. 110–114.
- Коломбет Л. В. Научное обоснование и практическая реализация технологии создания грибных препаратов для защиты растений от болезней. Дисс... д.б.н. М.: МГУ. 2005. 353 с.
- Логинов О. Н. Получение сухой препаративной формы биопрепарата сельскохозяйственного назначения «Елена» У / О. Н. Логинов, Н. С. Васильева, Н. Н. Силищев // Башкирский химический журнал. 2007. Т. 12. N 2. С. 45–47.
- Логинов Я. О. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гиалуроновой кислоты / Я. О. Логинов, Г. Г. Худайгулов, С. П. Четвериков, А. И. Мелентьев, О. Н. Логинов // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. N 3. С. 302–310.
- Маркович Н. А. Литические ферменты *Trichoderma* и их роль при защите растений от грибных болезней (обзор) / Н. А. Маркович, Г. Л. Кононова // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. N 4. С. 389–400.
- Низовская О. П. Окисление лигнина пшеничной соломы базидиомицетами / О. П. Низовская, И. М. Панькова, Г. И. Кочеткова, Н. С. Мануковский // Микол. и фитопатол. 1984. Т. 18. N2. С. 133–135.
- Новикова И. И. Биологическое обоснование использования полифункциональных препаратов на основе микробов-антагонистов в защите растений от болезней / И. И. Новикова // Защита и карантин растений. 2005. N 2 – С. 23 – 26.
- Новикова И. И. Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем – Дисс. ... д. б. н. СПб. 2005. 753 с.
- Новикова И. И. Особенности развития штамма *Dendryphon penicillatum* 1.39 на питательных субстратах различного состава / И. И. Новикова, Ю. А. Титова, И. Л. Краснобаева, А. В. Рыжанкова, В. С. Титов, А. С. Семенович // Микол. и фитопатол. 2010. Т. 44. N1. С. 71–87.
- Новикова И. И. Биологическая эффективность биопрепаратов на основе микробов-антагонистов, применяемых против корневых гнилей огурца и вилта земляники, и их влияние на видовой состав микромицетов почвы / И. И. Новикова, А. И. Литвиненко // Вестник защиты растений. 2011. N2. С. 5–12.
- Новикова И. И. Биологическое разнообразие микроорганизмов – основа для создания новых полифункциональных биопрепаратов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем / И. И. Новикова // Материалы 3-го Всероссийского съезда по защите растений. СПб. 2013. Т. 2. С. 372–378.
- Новикова И. И. Эффективность препаративных форм на основе микробов-антагонистов в системах защиты растений от болезней / И. И. Новикова // Материалы 3-го Всероссийского съезда по защите растений. СПб.: 2013. Т. 2. С. 378 – 384.
- Нугманова Т. А. Унифицированная технология биологических токсинов как основа промышленного производства эффективных бактериальных инсектицидов. Дисс... д.т.н. М. 1992. 1 т. 388 с.
- Орлова Е. Ю. Биотические связи возбудителей фузариозной корневой гнили гороха с микробиотой почв и возможности их использования в биологической защите – Автореф. дисс. канд. биол. наук. М., 1999. 24 с.
- Решетникова И. А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М.: СП Новинтех-Пресс. 1997. 202 с.
- Сатарова Т. Г. Препарат для защиты клубней картофеля во время хранения / Т. Г. Сатарова, Л. К. Каменёк // Защита и карантин растений. 2009. N 2. С. 50–52.
- Свиридова О. В. Разложение коры хвойных деревьев грибами и бактериями / О. В. Свиридова, Л. В. Михалева, Н. И. Воробьев, В. В. Кочетков // Микол. и фитопатол. 2001. Т. 35. N 1. С. 38–47.
- Синица А. П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: учеб. пособие [под ред. А. П. Синицы] / А. П. Синица, А. В. Гусаков, В. М. Черноглазов // М.: Изд-во МГУ. 1995. 224 с.
- Соколова М. Г. Влияние на растения фитогормонов, синтезируемых ризосферными бактериями / М. Г. Соколова, Г. П. Акимова, О. Б. Вайшла // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. N 3. С. 373–385.
- Соловьев В. А. Количественная характеристика микогенного ксилониза: Превращение древесины при микробиологическом и энзиматическом воздействиях. / В. А. Соловьев, О. Н. Малышева // М., 1980. С. 35–38.
- Титова Ю. А. Утилизация отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности съедобными грибами – путь к ресурсосберегающей технологии / Ю. А. Титова // Тезисы Междунар. науч.-тех. конф. “Ресурсосберегающие технологии в пищевой промышленности” 12–14 апреля 1998 г. Россия, СПб. 1998. С. 146.
- Титова Ю. А. Двухэтапная биоконверсия отходов с помощью *Pleurotus ostreatus* и *Trichoderma harzianum* / Ю. А. Титова, Л. Б. Хлопунова, Д. В. Коршунов // Микол. и фитопатол. 2002. Т. 36. N5. С. 64–70.
- Титова Ю. А. Триходермин на основе вторичной биоконверсии отходов и его эффективность против болезней огурца / Ю. А. Титова, И. И. Новикова, Л. Б. Хлопунова, Д. В. Коршунов // Микол. и фитопатол. 2002. Т. 36. N 4. С. 76–80.
- Титова Ю. А. Биоконверсия отходов съедобными грибами с получением биопрепаратов / Ю. А. Титова, Е. Л. Гасич, И. И. Новикова, Л. Б. Хлопунова, Д. В. Коршунов, А. В. Губарева, М. С. Полетаева, А. С. Семенович // Науч.-практич. конф. “Грибоводство и смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций”. М. 2005. С. 19–21.
- Титова Ю. А. Методология получения мультиконверсионных биопрепаратов для защиты растений / Ю. А. Титова // Сб. науч. тр. III Всероссийского съезда по защите растений «Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем». СПб: ГНУ ВИЗР. 2013. Т. 2. С. 396–400.
- Титова Ю. А. Биологическая эффективность мультиконверсионных биопрепаратов на основе штаммов *Trichoderma harzianum* против корневых гнилей свеклы / Ю. А. Титова, А. И. Богданов // Сб. науч. тр. Междунар. науч.-прак. конф. проф.-препод. сост. СПбГАУ «Научное обеспечение инновационного развития АПК» СПб 2014. С. 104–107.
- Чеботарь В. К. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 – продуцента биопрепаратов / В. К. Чеботарь, Н. М. Макарова, А. И. Шапошников, Л. В. Кравченко // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. N 4. С. 465–471.
- Четвериков С. П. Комплексообразование триглицеридпептидов псевдомонад с корневыми экссудатами растений как механизм воздействия на фитопатогены / С. П. Четвериков, Л. Р. Сулейманова, О. Н. Логинов // Прикл. биохимия и микробиология 2009. Т. 45. N 5. С. 565–572.
- Benítez T. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains / T. Benítez, F. M. Rincon, M. C. Limon, A. C. Codon // Int. Microbiol. 2004. V. 7. N 4. P. 249–260.
- Cotxarrera L. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato / L. Cotxarrera, M. I. Trillas, M. Gay, C. Steinberg, C. Alabouvette // Soil Biology and Biochemistry. 2002. V. 34. P. 467–476.
- Kubicek C. P. *Trichoderma*: from genes to biocontrol / C. R. Kubicek, R. L. Mach, C. K. Peterbauer, M. Lorito // J. Plant Pathology. 2001. V. 83 P. 11–23.
- Lemke G. Mezelwachstumsteste mit vier Champignonstammen / G. Lemke // Champignon. 1972. V. 12. N128. P. 1–5.
- Lengler J. Modern microbiology. Prokaryotes / J. Lengler, G. Drevesa, U. Schlegel // “Mir” Publishing. 2006. 1152 p.
- Limón M. C. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding – domain / M. C. Limón, M. R. Chacón, R. Mejías, J. Jarana, A. M. Rincón, A. C. Codón, T. Benítez // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. N 64. P. 675–685.
- Stamets P. Growing gourmet and medical mushroom. Hong Kong. 1993. 550 p.
- Teplikova J. Vyskyt mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* v kulturách hlívy ustricé – *Pleurotus ostreatus* / J. Teplikova, M. Dobra, M. Stanek, P. Vesely // Vestn. pest. 1984. V. 19. N 1. P. 114–116.
- Trutmann P. *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia / P. Trutmann, P. J. Keane // Soil Biol. Biochem. 1990. V. 22. N 1. P. 43 – 50.

## Translation of Russian References

- Alimova F.K., Tukhbatova R. I., Tazetdinova D.I., Cabrera F.Kh.A., Karimova L.Yu. Relationships of *Trichoderma* distributed on territory of the Republic of Tatarstan with microorganisms and plants. In: Griby i vodorosli v biotsenozakh: Materialy mezhdunar. konf., posviashchennoi 75-letiyu Biologicheskogo fakulteta MGU im. M.V. Lomonosova: Moscow, 31 yanvaria –3 fevralya 2006 g. Moscow: MAKS Press. 2006. P. 12–13. (In Russian).
- Babitskaya V.G., Shcherba V.V. Features of degradation of lignin of natural polymers by xylophages and soil saprotrophs. *Mikrobiologiya*. 1994. N 1. P. 65–72. (In Russian).
- Bilal V.T., Bisko N.A., Volodina E.P., Dudka I.A. Development of scientific bases of surface cultivation of mushrooms of the genus *Pleurotus*. In: Problemy kultivirovaniya syedobnykh gribov v SSSR. Moscow, Pushchino. 1991. P. 34–35. (In Russian).
- Bisko N.A., Bilal V.T. Influence of bacteria of the genus *Bacillus* on activity of *Pleurotus ostreatus* in partially closed artificial ecosystem. *Mikol. i fitopatol.* 1995. V. 29. N 5–6. P. 1–7. (In Russian).
- Bisko N.A., Dudka I.A. Biology and cultivation of mushrooms of the genus *Pleurotus*. Kiev: Nauk. Dumka. 1987. 148 p. (In Russian).
- Bisko N.A., Fomina V.I., Bilal V.T. Destruction of wood by *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. *Mikol. i fitopatol.* 1983. V. 17. N 3. P.199–202. (In Russian).
- Chebota V.K., Makarov N.M., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. Antifungal and phytostimulating properties rhizosphere strain *Bacillus subtilis* Ch-13 – a producer of biological products. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2009. V. 45. N 4. P. 465–471. (In Russian).
- Chetverikov S.P., Suleimanova L.R., Loginov O.N. Complex formation of triglyceride-peptides of pseudomonads with root exudates of plants as the mechanism of impact on phytopathogenes. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2009. V. 45. N 5. P. 565–572. (In Russian).
- Emtsev V.T., Mishustin E.N. Microbiology: textbook for higher education institutions. 5th ed. Moscow: Drofa. 2005. 445 p. (In Russian).
- Kolombet L.V. Scientific grounds and implementation of technology of creation of fungal preparations for plant protection against diseases. DSc Thesis. Moscow: MGU. 2006. 47 p. (In Russian).
- Kolombet L.V., Zhigletsova S.K., Derbyshev V.V., Ezhov D.V., Kosareva N.I., Bystrova E. V. Mycofungicide – preparation on the basis of *Trichoderma viride* for control of plant diseases. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2001. V. 37. N 1. P. 110–114. (In Russian).
- Loginov O.N., Vasilyeva N.S., Silishchev N.N. Production of dry preparative form of biological preparation of agricultural purpose Elena U. Bashkirskii khimicheskii zhurnal. 2007. V. 12. N 2. P. 45–47. (In Russian).
- Loginov Ya.O., Khudaigulov G.G., Chetverikov S.P., Melentyev A.I., Loginov O.N. Biopolymer of the alginate nature with prevalence of L-hyaluronic acid. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2011. V. 47. N 3. P. 302–310. (In Russian).
- Markovich N.A., Kononova G.L. Lytic *Trichoderma* enzymes and their role in plant protection against fungal diseases (review). *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2003. V. 39. N 4. P. 389–400. (In Russian).
- Nizovskaya O.P., Pankova I.M., Kochetkova G.I., Manukovskii N.S. Oxidation of lignin of wheat straw by basidiomycetes. *Mikol. i fitopatol.* 1984. V. 18. N 2. P. 133–135. (In Russian).
- Novikova I.I. Biological grounds of use of multifunctional preparations on the basis of microbe antagonists in plant protection against diseases. *Zashchita i karantin rastenii*. 2005a. N 2. P. 23–26. (In Russian).
- Novikova I.I. Biological grounds of creation and application of multifunctional biological preparations on the basis of microbe antagonists for phytosanitary optimization of agroecosystems. DSc Thesis. St. Petersburg. 2005b. 753 P. (In Russian).
- Novikova I.I. Biological diversity of microorganisms is the basis for creation of new multifunctional microbial preparations for phytosanitary optimization of agroecosystems. In: Materialy 3-go Vserossiiskogo syezda po zashchite rastenii. St. Petersburg. 2013. V. 2. P. 372–378. (In Russian).
- Novikova I.I. Effectiveness of formulations on the basis of microbe-antagonists in systems of plant protection from diseases. In: Materialy 3-go Vserossiiskogo syezda po zashchite rastenii. St. Petersburg. 2013. V. 2. P. 378–384. (In Russian).
- Novikova I.I., Litvinenko A.I. Biological efficiency of biological preparations on the basis of the microbe antagonists applied against root rot of cucumber and wilt of wild strawberry and their influence on specific structure of soil micromycetes. *Vestnik zashchity rastenii*. 2011. N 2. P. 5–12. (In Russian).
- Novikova I.I., Titova Yu.A., Krasnobaeva I.L., Ryzhankova A.V., Titov V.S., Semenovich A.S. Features of development of *Dendryphion penicillatum* 1.39 strain on nutritious substrata of various structure. *Mikol. i fitopatol.* 2010. V. 44. N 1. P. 71–87. (In Russian).
- Nugmanova T.A. Unified technology of biological toxins as the basis for efficient industrial production of bacterial insecticides. DSc Thesis. Moscow. 1992. 45 p. (In Russian).
- Orlova E.Yu. Biotic relations of activators of *Fusarium* root rot of peas with soils microbiota and possibility of their use in biological protection. PhD Thesis. Moscow. 1999. 24 p. (In Russian).
- Reshetnikova I.A. Lignin destruction by xylophage macromycetes. Accumulation of selenium and fractionation of its isotopes by microorganisms. Moscow: SP Novintekh-Press. 1997. 202 p. (In Russian).
- Satarova T.G., Kamenyok L. K. Preparation for protection of potato tubers at storage. *Zashchita i karantin rastenii*. 2009. N 2. P. 50–52. (In Russian).
- Sinita A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulosic materials: textbook. Moscow: MGU. 1995. 224 p. (In Russian).
- Sokolova M.G., Akimova G. P., Vaishlya O. B. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2011. V.47. N 3. P. 373–385. (In Russian).
- Solovyev V.A., Malysheva O.N. Quantitative characteristics of mycogenic xylolite: turning wood in microbiological and enzymatic effects. Moscow. 1980. P. 35–38. (In Russian).
- Sviridova O.V., Mikhaleva L.V., Vorobev N.I., Kochetkov V.V. Decomposition of bark of coniferous trees by fungi and. *Mikol. i fitopatol.* 2001. V. 35. N 1. P. 38–47. (In Russian).
- Titova Yu.A. Waste management agriculture and food industries edible mushrooms – the path to resource-saving technologies. In: Tezisy Mezhdunar. nauch.-tekh. konf. “Resursosberegaiushchie tekhnologii v pishchevoi promyshlennosti”, 12–14 aprelya 1998 g. St. Petersburg. 1998. P. 146. (In Russian).
- Titova Yu.A. Methodology for obtaining multiconfessionnel biological preparations for plant protection. In: Materialy 3-go Vserossiiskogo syezda po zashchite rastenii. St. Petersburg. 2013. Vol. 2. P. 396–400. (In Russian).
- Titova Yu.A., Bogdanov A.I. Multiconversion biological efficiency of biological preparations based on strains of *Trichoderma harzianum* against black leg of sugar beet. In: Sb. nauch. tr. Mezhdunar. nauch.-prak. konf. prof.-prepod. sost. SPbGAU “Nauchnoe obespechenie innovatsionnogo razvitiya APK”. St. Petersburg. 2014. P. 104–107. (In Russian).
- Titova Yu.A., Gasich E.L., Novikova I.I., Khlopunova L.B., Korshunov D.V., Gubareva A.V., Poletaeva M.S., Semenovich A.S. Bioconversion of waste edible mushrooms with obtaining biologic preparations. In: Nauch.-praktich. konf. “Gribovodstvo i smezhnye biotekhnologii. Innovatsii dlya investitsii”. Moscow. 2005. P. 19–21. (In Russian).
- Titova Yu.A., Khlopunova L.B., Korshunov D.V. A two-step bioconversion of wastes by using *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum*. *Mikol. i fitopatol.* 2002a. V.36. N 5. P. 64–70. (In Russian).
- Titova Yu.A., Novikova I. I., Khlopunova L. B., Korshunov D. V. *Trichoderma*-based secondary bioconversion of waste and its effectiveness against diseases of cucumber. *Mikol. i fitopatol.* 2002b. V. 36. N 4. P. 76–80. (In Russian).
- Velikanov L.L., Sukhonosenko E.Yu., Nikolaeva S.I., Zavelishko I.N. Comparison of hyperparasitic and antibiotic activity of isolates of the genus *Trichoderma*, and *Gliocladium virens*. *Mikol. i fitopatol.* 1994. V. 28. N 6. P. 52–56. (In Russian).
- Voinova O.N., Kalacheva G.S., Grodnitskaya I.D., Volova V.G. Microbial polymers as destroyable basis for delivery of pesticides. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2009. V. 45. N 4. P. 427–431. (In Russian).
- Zmitrovich I.V., Psurtseva N.V., Belova N.V. Evolutionary and taxonomic aspects of research and study lignin-destroying mushrooms – active producers of oxidative enzymes. *Mikol. i fitopatol.* 2007. V. 41. N 1. P. 57–78. (In Russian).

## BIOLOGICAL BACKGROUND FOR OPTIMIZATION OF BIOLOGICAL PRODUCTS BASED ON MICROBE ANTAGONISTS FOR CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC MICROMYCETES AND BACTERIA POPULATIONS – CAUSATIVE AGENTS OF PLANTS DISEASES

I.I. Novikova<sup>1</sup>, Yu.A. Titova<sup>1</sup>, I.V. Boikova<sup>1</sup>, V.N. Zeiruk<sup>2</sup>, I.L. Krasnobaeva<sup>1</sup>, T.A. Serova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>A.G. Lorkh All-Russian Institute of Potato Farming, Moscow Region, Russia

The technological formula optimization for biological products based on the selected *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* strains providing cell viability and high target biological activity during long storage period was performed. Liquid and concentrated preparative form optimization was carried out with use of preservatives. Microbe antagonists' solid-phase fermentation was optimized by nutrient value selection of substrata (easily acquired water-soluble components availability) and their processability index assessment. The conducted researches have shown the opportunity and expediency to obtain both the peat, and granulated multi-recycled preparative forms by solid-phase fermentation, the most convenient ones for application into the soil with the purpose of terricolous phytopathogenic micromycetes population control.

**Keywords:** preparative form; optimization; biological product; plant protection; microbe antagonist; multi-recycling.

### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\*Новикова Ирина Игоревна. Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, e-mail: irina\_novikova@inbox.ru

Титова Юлия Анатольевна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: juli1958@yandex.ru

Бойкова Ирина Васильевна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: irina\_boikova@mail.ru

Краснобаева Ирина Леонтьевна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: krasnobaeva08@mail.ru

Серова Татьяна Александровна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: rareavist@mail.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ФГБНУ ВНИИКХ), 140051, Московская область, Люберецкий район, п. Красково-1, ул. Лорха, 23

Зейрук Владимир Николаевич. Заведующий отделом защиты картофеля, доктор сельскохозяйственных наук, e-mail: vzeiruk@mail.ru

### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\*Novikova Irina Igorevna. Leading Researcher, DSc in Biology, e-mail: irina\_novikova@inbox.ru

Titova Julia Anatolyevna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: juli1958@yandex.ru

Boykova Irina Vasilyevna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: irina\_boikova@mail.ru

Krasnobayeva Irina Leontyevna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: krasnobaeva08@mail.ru

Serova Tatyana Aleksandrovna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: rareavist@mail.ru

All-Russia Research Institute of Potato Farming by A. G. Lorkh (FSBSE VNIKHX), 140051, Moscow Region, Luberetskiy District, Kraskovo-1, Lorkha street, 23

Zeyruk Vladimir Nikolaevich. Head of Potato Protection Department, DSc in Agriculture, e-mail: zeruk@mail.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence

УДК 575+633.11:632.488

## СЕЛЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ С ГЕНОМ TSN1 НА ФОРМИРОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЖЕЛТОЙ ПЯТНИСТОСТИ *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS*

Н.В. Мироненко, О.А. Баранова, Н.М. Коваленко, О.С. Афанасенко, Л.А. Михайлова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Популяции возбудителя эпидемиологически опасной болезни пшеницы – желтой пятнистости или пиренофороза – *Pyrenophora tritici-repentis* расширяют свой ареал, продвигаясь на север. Вирулентность популяции определяют взаимоотношения между продуктами генов (авирулентности или эффекторов и генов устойчивости/восприимчивости хозяина. Гриб *P. tritici-repentis* продуцирует белковые хозяин-специфичные токсины, индуцирующие некроз и хлороз на листьях восприимчивых сортов. Из них токсин Ptg ToxA, детерминируемый геном *ToxA*, считается основным фактором патогенности, который индуцирует некроз у сортов с геном восприимчивости *Tsn1*. Изучена роль гена *Tsn1* в распространении изолятов, несущих ген *ToxA*, в популяции патогена. Провели диагностику функциональной аллели гена *Tsn1* у 68 сортов пшеницы, включенных в Госреестр (2017), из 3-х регионов России. Для этого использовали метод ПЦР с праймерами на маркер Xfcr623. Аллель *Tsn1* обнаружена у 48.4% испытуемых сортов по Северо-Кавказскому региону, 16.7% – по Северо-Западному и 5.3 – по Западно-Сибирскому региону, что коррелирует с типом развития (озимый/яровой) сортов в данном регионе и встречаемостью в географических популяциях *P. tritici-repentis* изолятов с геном *ToxA*.



Эти результаты доказывают влияние гена восприимчивости *Tsn1* в возделываемых сортах пшеницы, на встречаемость в популяциях *P. tritici-repentis*, обитающих на этих сортах, изолятов с геном *ToxA*. Вместе с тем, северо-западная и западно-сибирская популяции патогена отличаются высокой вирулентностью. Несмотря на низкую встречаемость в этих популяциях изолятов с геном *ToxA*, поражение районированных сортов пшеницы как с геном *Tsn1*, так и без него обеспечивают иные некротиндуцирующие токсины, отличные от Ptr ToxA. Мы считаем нецелесообразным проведение MAS на ген *Tsn1* в селекционном процессе для создания сортов пшеницы устойчивых к желтой пятнистости.

**Ключевые слова:** *Pyrenophora tritici-repentis*, желтая пятнистость, пшеница, токсин Ptr ToxA, ген восприимчивости, *Tsn1*, маркер Xfcp623, *ToxA*, популяции, MAS.

Относительно недавно возникшая болезнь пшеницы – желтая пятнистость листьев, быстро расширяет свой ареал на север и северо-запад РФ [Михайлова и др., 2007; 2014]. Возбудитель болезни аскомицетный гомоталличный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* [(Died.) Drechs., анаморфа *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker]. Основными факторами патогенности *P. tritici-repentis* считаются белковые токсины Ptr ToxA и Ptr ToxB, индуцирующие некроз и хлороз листьев у восприимчивых сортов. Синтез Ptr ToxA и Ptr ToxB контролируется генами *ToxA* и *ToxB*, соответственно [Lamari, Bernier, 1989; Ciuffetti et al., 1997]. Эти гены клонированы и на них разработаны геноспецифичные праймеры [Andrie et al., 2007], что позволяет методом ПЦР определять их наличие в изолятах патогена. Чувствительность пшеницы к Ptr ToxA детерминирована геном *Tsn1*. Взаимоотношения в патосистеме «пшеница – *P. tritici-repentis*» осуществляются по типу «ген-на-ген», и выражаются в том, что продукты генов вирулентности патогена (=хозяйин-специфичные токсины) при взаимодействии с продуктами генов восприимчивости растения-хозяина вызывают совместимость, т.е. развитие болезни [Strelkov, Lamari, 2003; Ciuffetti et al., 2010]. Это положение справедливо также для ряда других токсинообразующих грибов: например, *Stagonospora nodorum* [Phan et al., 2016], *Cochliobolus carbonum* [Scott-Craig et al., 1992], *C. victoriae*, *C. heterostrophus* [Markham, Hille, 2001; Walton, Panaccione, 1993].

На ген восприимчивости *Tsn1* разработаны молекулярные маркеры [Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010]. Это SSR-маркеры на дистальные области гена *Tsn 1*: Xfcp1, Xfcp620, Xfcp394 [Zhang et al., 2009]. После того, как ген *Tsn1* был клонирован и секвенирован, был разработан до-

минантный SSR маркер Xfcp623 на внутреннюю область гена [Faris et al., 2010].

Ранее на территории России нами были идентифицированы три географические популяции *P. tritici-repentis*, различающиеся по вирулентности [Михайлова и др., 2014, 2015] и SSR маркерам [Мироненко и др., 2016]. Это северокавказская, северо-западная и западно-сибирская (представлена омской) популяции, которые также различаются по встречаемости в них изолятов с геном *ToxA* (*ToxA*<sup>+</sup>). Максимальная встречаемость изолятов *ToxA*<sup>+</sup> (80%) в северо-кавказской популяции, в северо-западной популяции *ToxA*<sup>+</sup> изолятов в 2 раза меньше (42%) [Мироненко и др., 2015]. В западно-сибирской популяции отмечена минимальная встречаемость *ToxA*<sup>+</sup> изолятов (27%) [Мироненко и др., 2017]. Очевидно, что при расширении ареала патогена на север какие-то механизмы препятствуют распространению гена *ToxA* в популяции. Одним из таких механизмов может быть селективный отбор изолятов *ToxA*<sup>+</sup> на сортах с доминантной аллелью *Tsn1*.

Цель нашего исследования – выявить влияние сортов пшеницы с геном восприимчивости *Tsn1* на распространенность изолятов, несущих ген *ToxA*, в популяциях *P. tritici-repentis*. Для этого мы проанализировали выборку сортов мягкой пшеницы, районированных в регионах происхождения изученных нами популяций патогена – Северо-Кавказском, Северо-Западном и Западно-Сибирском – на предмет наличия в них доминантной аллели *Tsn1*. Полученные результаты сравнили с ранее опубликованными данными по встречаемости изолятов *ToxA*<sup>+</sup> в популяциях *P. tritici-repentis* [Мироненко и др., 2015; Мироненко и др., 2017].

## Материалы и методы

Материалом исследования служили 68 сортов пшеницы, районированных и возделываемых в Северо-Кавказском, Северо-Западном и Западно-Сибирском регионах России (табл.1). Характеристика типа развития (озимый/яровой) каждого сорта взята из Государственного реестра селекционных достижений за 2017 год (<http://reestr.gossort.com/>).

Из проростков пшеницы выделяли ДНК известным методом [Murray, Thompson, 1980]. Доминантную аллель гена *Tsn1* идентифицировали в сортах методом ПЦР с праймерами на маркер Xfcp623 (*Tsn1*). Состав праймеров (5'→3'): F – СТАТТСТГААТСТГТГСТТСТССТ; R – ССТТСТТСТССТГСТАТСТСАТС [Faris et al., 2010]. Размер диагностического фрагмента – продукта амплификации маркера Xfcp623 составляет 380 п.н. Наличие продукта амплификации свидетельствует о существовании доминантной аллели гена *Tsn1*, отсутствие – о нулевой (рецессивной) аллели *tsn1*.

Состав реакционной смеси [Roder et al., 1998]: (×1) буфер (без магния), 0.20 mM каждого из 4-х dNTP, по 250 nM каждого праймера, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. Таq-ДНК-полимеразы (Helicon), 50–100 нг ДНК в объеме 25 мкл.

ПЦР выполняли на термоциклере C1000™ (BioRad). Режим амплификации: преденатурация при 94 °С 3 мин. Затем в течение 45 циклов: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; конечный синтез в течение 10 минут.

Продукты амплификации разделяли в 1.7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при напряжении 100 В в течение 3 часов и фотографировали. В качестве маркеров молекулярных масс использовали GeneRuler™ 50 b.p. DNA Ladder фирмы Fermentas.

Коэффициент корреляции считали с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

## Результаты

Демонстрация результатов ПЦР идентификации аллели *Tsn1* представлена на рис.1. Доминантная аллель *Tsn1*

была выявлена в 15 сортах из 31, выращиваемых в Северо-Кавказском регионе, в 3 сортах из 18, районированных



на северо-западе, и одним из 19 западно-сибирских сортов, что составляет 48,4, 16,7 и 5,3% соответственно (табл.1). Оказалось, что доля сортов пшеницы с геном *Tsn1* в каждом из трех регионов коррелирует с долей *ToxA*<sup>+</sup> изолятов *P. tritici-repentis* в популяциях патогена, обитающих в этих регионах, – 80, 42 и 27% соответственно [Мироненко и др., 2015, 2016а]. Коэффициент корреляции составил 0,99. Причем, северо-кавказские сорта все оказались

озимыми, западно-сибирские – яровыми (кроме одного), а северо-западные были представлены яровыми и озимыми примерно в равных долях. В подавляющем большинстве сорта с геном *Tsn1* имеют озимый тип развития. Коэффициент корреляции составил 0,94. Изменчивость сортов по типу развития и аллельному составу гена *Tsn1*, а также изменчивость популяций патогена по гену *ToxA* в трех регионах РФ отражена графически на рис. 2.

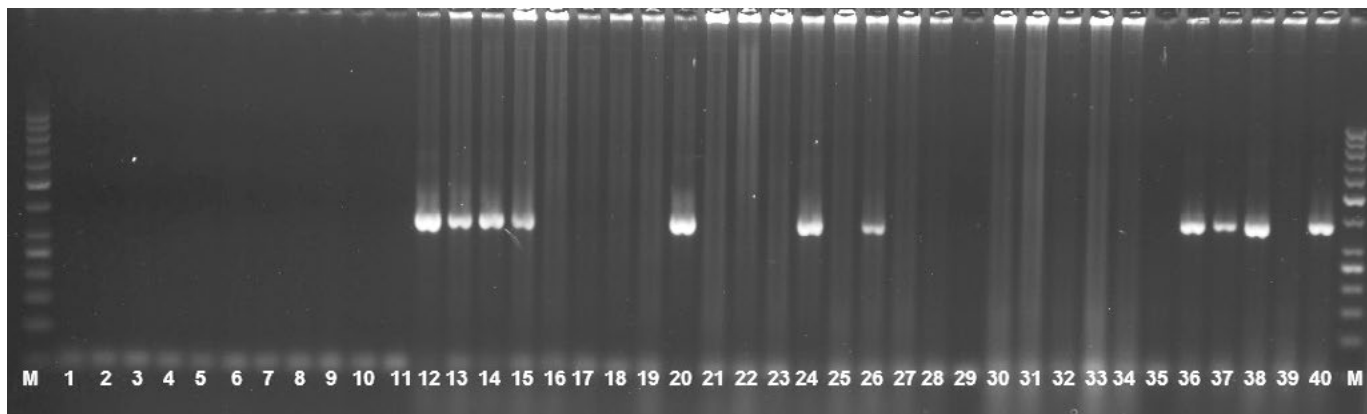


Рисунок 1. Идентификация доминантной аллели гена *Tsn1*. Размер диагностического фрагмента 380 п. н. М – маркеры молекулярных масс 50 п.о. (Fermentas)

Таблица 1. Идентификация аллелей гена *Tsn1* в сортах пшеницы методом ПЦР

Тип развития/ аллель <i>Tsn1</i>	Сорта районированные и возделываемые в регионе		
	Северо-Кавказском	Северо-Западном	Западно-Сибирском
Озимый / <i>Tsn1</i>	Афина, Безостая 1, Ермак, Есаул, Крошка, Лауреат, Паллада, Палпич, Памяти Калининко, Сила, Старшина, Таня, Фишт, Фортуна, Юбилейная 100	—	—
Озимый/ <i>tsn1</i>	Адель, Айвина, Батько, Верта, Виза, Восторг, Дея, Доля, Зерноградская 10, Зерноградская 11, Золотко, Красота, Ласточка, Ольхон, Утриш, Юнона	Аристос, Бриллиант, Галина, Завет, Инна, Корунд, Мера, Немчиновская 24, Поэма, Русское поле, Цобель	Новосибирская 3
Яровой / <i>Tsn1</i>	—	Софья, Дарья Красноуфимовская 100	Алтайская жница
Яровой / <i>tsn1</i>	—	Рассвет Ленинградская 8 Ленинградская 6 Ленинградская 97	Зауралочка, Мелодия, Обская 2, Омская 28, Омская 29, Омская 33, Омская 35, Омская 36, Омская 37, Омская 38, Омская 41, Омская краса, Памяти Азиева, Тобольская, Уралосибирская, Челябинка 75, Экада 113

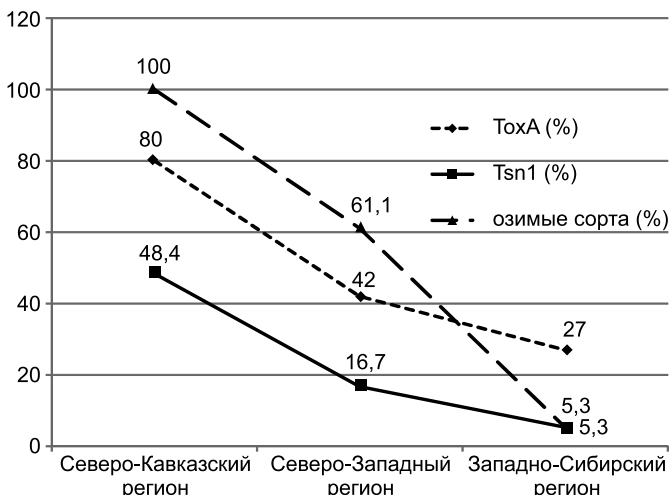


Рисунок 2. Процентное содержание в популяциях *P. tritici-repentis* изолятов *ToxA*<sup>+</sup>, доли *Tsn1*<sup>+</sup> и озимых в анализируемой выборке районированных сортов пшеницы в трех регионах России

По данным Госреестра 2017 года (325 сортов) мы подсчитали распределение озимых и яровых сортов в трех регионах РФ: по Северо-Кавказскому региону 2% яровых и 98% озимых сортов, по Западно-Сибирскому – 82% яровых и 18% озимых и по Северо-Западному – 47,5% яровых и 52,5% озимых. Эти данные практически совпадают с полученными на взятой нами в анализ выборке сортов, что свидетельствует о ее репрезентативности.

Изучению роли взаимодействия токсина Ptr *ToxA* и гена восприимчивости пшеницы *Tsn1* в развитии болезни посвящены многие работы. Отмечено, что часто встречаются изоляты гриба, имеющие *ToxA*, но не вызывающие некроз на растениях с геном *Tsn1* [Andrie et al., 2007; Faris et al., 2012]. Секвенирование гена *ToxA* у этих изолятов не выявило нуклеотидной изменчивости в гене [Aboukhaddour et al., 2013; Friesen et al., 2006; Ali et al., 2010; Leisova-Svobodova et al., 2010]. Таким образом, изменчивость аллелей гена *ToxA* не ответственна за раз-

личия в эффектах взаимодействия *Tsn1*-Ptr ToxA. Выдвинуты гипотезы, что эффект взаимодействия *Tsn1*-Ptr ToxA уменьшается или маскируется благодаря эпистатическим эффектам других генных взаимодействий [Friesen et al., 2008]. Показано, что у различных изолятов гриба одни и те же эффекторы могут иметь разные уровни экспрессии *in planta*. Такие факты были описаны для двух изолятов *S. nodorum*, имеющих ген *ToxA* [Faris et al., 2011]. В работе Manning & Ciuffetti [2015] показано, что симптомы, вызываемые Ptr ToxA, маскируют симптомы, индуцируемые другими хозяин-специфичными токсинами

В некоторых работах молекулярные маркеры на доминантную аллель *Tsn1* предлагается использовать для маркер-вспомогательной селекции (MAS – marker assisted selection), – отбора и последующего удаления из селекционного процесса восприимчивых к желтой пятнистости растений [Faris et al., 2010; 2012; Kokhmetova et al., 2017]. В связи с полученными в данной работе результатами и

анализом данных, полученных нами ранее, мы считаем целесообразным проведение скрининга образцов пшеницы на наличие доминантной аллели *Tsn1* помощью молекулярных маркеров (MAS) с целью удаления этих образцов из селекционного процесса. Можно ожидать, что на сортах с генотипом *tsn1tsn1* проявятся некроз индуцирующие токсины ToxA<sup>+</sup> изолятов, отличные от Ptr ToxA, супрессированные ранее при взаимодействии *Tsn1*-*ToxA*, не говоря уже о ToxA<sup>-</sup> изолятах, также продуцирующих иные некроз индуцирующие токсины. Сделанный вывод подтверждается данными других авторов (Manning, Ciuffetti, 2015; Phan et al., 2016). Например, из 56 сортов пшеницы, в которых с помощью маркера Xfcp 394 была определена рецессивная аллель *tsn1*, 43 сорта, в том числе сорта Зерноградская 10, Зерноградская 11 и Виза, использованные в нашей работе, оказались восприимчивы хотя бы к одному изоляту при инокуляции сортов тремя различными изолятами *P. tritici-repentis* [Kokhmetova et al., 2017].

### Выводы:

1. Охарактеризованы сорта пшеницы, районированные в трех регионах РФ по наличию гена восприимчивости *Tsn1*: доля сортов с этим геном составила 48.4% в Северо-Кавказском, 16.7% – в Северо-Западном и 5.3% в Западно-Сибирском регионе.
2. Показано селективное значение гена восприимчивости *Tsn1*: доля сортов пшеницы с этим геном в каждом

из трех регионов коррелирует с долей ToxA<sup>+</sup> изолятов *P. tritici-repentis* в популяциях патогена, обитающих в этих регионах.

3. Сделано заключение о нецелесообразности проведения MAS на ген *Tsn1* в селекционном процессе получения сортов пшеницы устойчивых к желтой пятнистости.

### Библиографический список (References)

- Мироненко Н. В., Баранова О. А., Коваленко Н. М., Михайлова Л. А. Частота гена Toxa в популяциях *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе и северо-западе России // Микол. и фитопатол. 2015. Т. 49. N. 5. С. 325–329.
- Мироненко Н. В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Михайлова Л.А., Россеева Л.П. Генетическая структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis*, существующих на территории России, по микросателлитным маркерам // Генетика. 2016. Т. 52. N 8. С. 885–894.
- Мироненко Н. В., Коваленко Н. М., Баранова О. А., Михайлова Л. А. Роль некроз-индуцирующих токсинов в расширении ареалов популяций *Pyrenophora tritici-repentis* // Современная микология в России. 2017. Т. 7. С. 7–879. Материалы 4 съезда микологов России/ Москва, 2017. Под Ред. Дьякова Ю.Т., Сергеева Л.Ю.
- Михайлова Л. А., Тернюк И. Г., Мироненко Н. В. Структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis* из европейской части России по признаку вирулентности // Микол. и фитопатол. 2007. Т. 41. N 3. С. 269–275.
- Михайлова Л. А., Тернюк И.Г., Мироненко Н.В. Характеристика популяций *Pyrenophora tritici-repentis* по признаку вирулентности // Микол. и фитопатол. 2010. Т.44. N 3. С. 263–272.
- Михайлова Л. А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на северном кавказе и северо-западе России: расовый состав и динамика вирулентности // Микол. и фитопатол. 2014. Т. 48. N 6. С. 393–400.
- Михайлова Л. А., Коваленко Н. М., Мироненко Н. В., Россеева Л. П. Популяции *Pyrenophora tritici-repentis* на территории России // Микол. и фитопатол. 2015. Т.49. N 4. С. 257–261.
- Abdullah S., Sehgal S. K., Ali S., Liatukas Z., Ittu M., Kaur N. Characterization of *Pyrenophora tritici-repentis* (Tan Spot of Wheat) Races in Baltic States and Romania // Plant Pathol. J. 2017. V. 33. N 2. P. 133–139.
- Aboukhaddour R., Turkington T.K., Strelkov S. E. Race structure of *Pyrenophora tritici-repentis* (tan spot of wheat) in Alberta, Canada // Can. J. Plant Pathol. 2013. V. 35. N. 2. P. 256–268.
- Ali, S., Gurung, S. and Adhikari, T. B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. Plant Dis. 2010. V. 94. P. 229–235.
- Andrie R. M., Pandelova I., Ciuffetti L. M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // Phytopathology. 2007. V. 97. P. 694–701.
- Ciuffetti L. M., Tuori R. P., Gaventa J. M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 135–144.
- Ciuffetti L.M., Manning V.A., Pandelova I., Betts M.F., Martinez J.P. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis* – wheat interaction // New Phytol. 2010. V. 187. P. 911–919.
- Faris J. D., Zhang Z., Lu H. J., Lu S. W., Reddy L. et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 13544–13549.
- Faris J. D., Abeyssekara N. S., McClean P. E., Xu S.S., Friesen T.L. Tan spot susceptibility governed by the *Tsn1* locus and race nonspecific resistance quantitative trait loci in a population derived from the wheat lines Salamouni and Katepwa // Mol. Breeding. 2012. V. 30. P. 1669–1678.
- Friesen T. L., Stukenbrock E. H., Liu Z., Meinhardt S., Ling H., Faris J. D., Rasmussen J.B., Solomon P. S., McDonald B.A., Oliver R. P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nature Genet. 2006. V. 38. P. 953–956.
- Friesen T. L., Zhang Z., Solomon P. S., Oliver R. P., Faris J. D. Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 682–693.
- Kokhmetova A., Kremneva J., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot // Journal of Plant Pathology. 2017. Vol. 99. N. 1. P. 161–167.
- Lamari L., Bernier C. C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host-reaction // Phytopathology. 1989. V. 79. P. 740–744.
- Leisova-Svobodova L., Hanzalova A., Kucera L. The variability of a *Pyrenophora tritici-repentis* population as revealed by inter-retrotransposon amplified polymorphism with regard to the Ptr ToxA gene // Czech mycol. 2010. V. 61. N. 2. P. 125–138.
- Manning V. A., Ciuffetti L. M. Necrotrophic Effector Epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-Wheat Interaction. PLoS ONE 2015. V. 10. N. 4. e0123548. doi:10.1371/journal.pone.0123548
- Markham J. E., Hille J. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions // Mol. Plant Pathol. 2001. V. 2. N 4. P. 229–239.
- Murray H. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325.

Phan H. T. T., Rybak K., Furuhi E. et al. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease // *The Plant Journal*. 2016. V. 87. P. 343–354.

Roder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy Ph., Ganal M. W. A Microsatellite Map of Wheat // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 2007–2023.

Scott-Craig J. S., Panaccione D. G., Pocard J.-A., Walton J. D. The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. N. 36. P. 26044–49.

Strelkov S, Lamari L. Host parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat // *Can J Plant Pathol*. 2003. V. 25. P. 339–349.

Walton J. D., Panaccione D. G. Host-selective toxins and disease specificity: perspectives and progress // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1993. V. 31. P. 275–303.

Zhang, Z., Friesen T. L., Simons K. J., Xu S. S., Faris J. D. Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat // *Mol. Breed.* 2009. V. 23. P. 35–49.

#### Translation of Russian References

Mikhailova L.A., Kovalenko N.M., Mironenko N.V., Rosseeva L.P. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* on the territory of Russia. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2015. V. 49, N. 4. P. 257–261. (In Russian).

Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in the North Caucasus and North-West Russia: racial composition and dynamics of virulence. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2014. V. 48, N. 6. P. 393–400. (In Russian).

Mikhailova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Population structure of *Pyrenophora tritici-repentis* from the European part of Russia by its virulence. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2007. V. 41, N. 3. P. 269–275. (In Russian).

Mikhailova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Characteristic of *Pyrenophora tritici-repentis* populations by their virulence. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2010. V. 44, N. 3. P. 263–272. (In Russian).

Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Mikhailova L.A. Frequency of *ToxA* gene in north Caucasian and North-West Russian populations of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2015. V. 49. N. 5. P. 325–329. (In Russian).

Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Mikhailova L.A., Rosseeva L.P. Genetic structure of Russian populations of *Pyrenophora tritici-repentis* determined by using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*. 2016. Vol. 52. No. 8. P. 771–779.

Mironenko N.V., Kovalenko N.M., Baranova O.A., Mikhailova L.A. Role of necrosis-inducing toxins in expansion of ranges of *Pyrenophora tritici-repentis* populations. In: Dyakov Yu.T., Sergeev L.Yu. (Eds.). *Sovremennaya mikologiya v Rossii*. Moscow. 2017. V. 7. P. 78–79. (In Russian).

*Plant Protection News*, 2017, 3(93), p. 23–27

## SELECTIVE INFLUENCE OF WHEAT CULTIVARS WITH TSN1 GENE ON THE FORMATION OF TAN SPOT CAUSATIVE AGENT *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* POPULATION

N.V. Mironenko, O.A. Baranova, N.M. Kovalenko, O.S. Afanasenko, L.A. Mikhailova

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

Populations of *Pyrenophora tritici-repentis*, the causative agent of an epidemiologically dangerous disease of wheat tan spot, expand their range, moving northward. The relationships between the products of (a)virulence genes or effectors and resistance/susceptibility host genes determine of population virulence. *P. tritici-repentis* produces protein host-specific toxins which induce necrosis and chlorosis on leaves of susceptible cultivars. Of those, the toxin Ptr ToxA determined by the *ToxA* gene is considered the main pathogenicity factor that induces necrosis in varieties with the susceptibility gene *Tsn1*. The role of *Tsn1* gene in the distribution of isolates carrying the *ToxA* gene in the pathogen population was studied. A functional allele of the *Tsn1* gene was diagnosed in 68 wheat cultivars from 3 regions of Russia. For this purpose, a PCR method with primers for the dominant Xfcp623 marker has been used. *Tsn1* allele is found in 48.4% of the “North Caucasian” wheat cultivars, 16.7% of “Northwestern” and 5.3% of “West Siberian” cultivars, which correlates with the type of cultivar development in a region and the occurrence of *P. tritici-repentis* isolates with the *ToxA* in geographical populations. These results prove the influence of the *Tsn1* in cultivated wheat cultivars on the occurrence of isolates with the *ToxA* in the populations of *P. tritici-repentis* inhabited those cultivars. At the same time, “Northwestern” and “West Siberian” populations of the pathogen are highly virulent. Despite the low occurrence of *ToxA*<sup>+</sup> isolates in those populations, the defeat of wheat cultivars with both the *Tsn1* and without it is provided by other necrosis-inducing toxins different from Ptr ToxA. We consider it inappropriate to conduct MAS against the *Tsn1* gene in the breeding process for producing wheat varieties resistant to the tan spot.

**Keywords:** *Pyrenophora tritici-repentis*; tan spot; wheat; toxin Ptr ToxA; susceptibility gene; *Tsn1*; marker Xfcp623; *ToxA*; population; MAS.

#### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\*Мироненко Нина Васильевна. Руководитель сектора, доктор биологических наук, e-mail: nina2601mir@mail.ru  
 Баранова Ольга Александровна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: baranova\_oa@mail.ru  
 Ковалено Надежда Михайловна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: nadyakov@mail.ru  
 Афанасенко Ольга Сильвестровна. Руководитель лаборатории, доктор биологических наук, академик РАН, e-mail: olga.s.afan@gmail.com  
 Михайлова Людмила Александровна. Эксперт, доктор биологических наук, e-mail: mikhailovalva@mail.ru

#### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\*Nina Mironenko. Sector Manager, DSc in biology, e-mail: nina2601mir@mail.ru  
 Olga Baranova. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: baranova\_oa@mail.ru  
 Kovaleno Nadezhda Mikhailovna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: nadyakov@mail.ru  
 Afanasenko Olga Silvestrovna. Laboratory Head, DSc in Biology, Academician of RAS, e-mail: olga.s.afan@gmail.com  
 Mikhailova Lyudmila Aleksandrovna. Expert, DSc in Biology, e-mail: mikhailovalva@mail.ru

УДК 632.932:579.23

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ****Э.В. Попова<sup>1</sup>, Н.С. Домнина<sup>2</sup>, Н.М. Коваленко<sup>1</sup>, Е.А. Борисова<sup>3</sup>,  
Л.Е. Колесников<sup>3</sup>, С.Л. Тютюрев<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург;*<sup>2</sup>*Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург;*<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург;*

Для природного полисахарида хитозана характерна структурная неоднородность, что влияет на его биоцидные и иммуномодулирующие свойства. В работе проведена сравнительная оценка бактерицидной, антигрибной и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой (ММ) от 3 до 150 кДа и постоянной степенью деацетилирования (85%). Образцы хитозана с ММ от 5 до 50 кДа показали более высокую антибактериальную активность против грамотрицательных (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*) и грамположительной (*Bacillus polymyxa*) бактерий по сравнению с образцами с низкой (3 кДа) и высокой (150 кДа) ММ. Все хитозановые образцы в течение 10 суток культивирования сдерживают рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелий гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% по сравнению с контролем. Уменьшение ММ полимера до 3 кДа снижало ингибирующее действие хитозана на рост гриба *F. oxysporum*. Полученные результаты подтверждают положение о зависимости биоцидной активности хитозана от ММ. Установлено, что образцы хитозана с ММ от 6.5 до 150 кДа обладают иммуностимулирующими свойствами и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине, что выразилось в ингибировании развития выживших пустил на листьях от 79.5 до 89.0%.

**Ключевые слова:** хитозан, молекулярная масса, антибактериальная активность, антигрибная активность, индуцированная устойчивость.

Широко распространенный в природе аминополисахарид хитозан привлекает внимание исследователей благодаря уникальным физико-химическим свойствам, разнообразной биологической активности (биоцидной, элиситорной) и полной безопасности для окружающей среды (биосовместимость, биodeградируемость) [Тютюрев, 2014; El Hardrami et al. 2010].

Хитозан представляет собой полимер, в котором имеются звенья глюкозамина и ацетилглюкозамина. При этом в виду специфичности получения хитозана из разнообразных природных источников для него характерна структурная неоднородность по многим параметрам [Хитин и хитозан, 2002]. Результаты, полученные разными авторами, свидетельствуют о том, что биоцидная (антибактериальная, антигрибная) и элиситорная активности хитозана определяются его структурными и молекулярными параметрами. К ним следует отнести молекулярную массу (ММ), количественное соотношение ацетилированных и деацетилированных звеньев, а также характер их расположения вдоль полимерной цепи. Именно эти особенности хитозана обуславливают многообразие его биологических свойств [Куликов и др., 2013].

Несмотря на то, что изучению биоцидной активности хитозана посвящено множество работ, механизмы антибактериального и антигрибного действия этого биополимера на клеточном и на молекулярном уровне раскрыты не полностью. Большинство исследований свидетельствуют о том, что причиной биоцидной активности хитозана является поликатионная природа и его способность связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [Куликов и др., 2013]. Такое взаимодействие нарушает нормальное функционирование обменных процессов клетки с внешней средой, изменяет проницаемость цитоплазматической мембраны, в результате чего усиливается отток веществ из клетки. Таким образом, для достижения максимальной антимикробной активности хитозану необходимо иметь максимальное количество свободных аминогрупп.

Первой мишенью действия хитозанового полимера в случае грамотрицательных бактерий становится липополисахарид, который заряжен отрицательно и входит в состав внешней мембраны. У грамположительных бактерий главной мишенью для хитозана могут быть тейхоевые кислоты, отрицательный заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты.

Некоторые авторы выявили различия в чувствительности к хитозану грамотрицательных и грамположительных бактерий, тогда как в ряде работ показано, что различия в типе клеточной стенки обеих бактерий не является определяющим [Kong et al., 2010].

В работе Ильиной А.В. [Ильина и др., 2003] проведено исследование антибактериальной активности хитозана от двух параметров – от молекулярной массы и степени деацетилирования (СД). Оценка биологической активности хитозанов в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов показала, что для полимеров с ММ 5–27 кДа разница действия на оба типа бактерий практически отсутствует. При тестировании хитозанов с одной ММ (4 кДа) и с изменяющейся СД (55, 73, 78 и 86%) установлена тенденция к увеличению уровня гибели клеток по мере роста СД полимера. По мнению авторов, высокая концентрация положительных зарядов на макроцепи хитозана с максимальной СД приводит к образованию наиболее прочной связи с поверхностью клеточной стенки микроорганизмов.

В литературе, однако, нет однозначной корреляции между значением ММ хитозана и его биологическими свойствами [Тютюрев, 2014; El Hardrami A. et al., 2010]. В работе [Fernandes et al, 2009] показано, что с возрастанием ММ хитозана в отношении вегетативных клеток *Bacillus cereus* антимикробный эффект усиливался в ряду от олигосахаридов до образцов с ММ 628 кДа. Биоцидное действие высокомолекулярного хитозана объясняется тем, что увеличение количества аминогрупп способствует более прочному связыванию полимера с поверхностными структурами клетки, что может уменьшить скорость

диффузии питательных веществ, в которых нуждается микробная клетка.

В работе [Kumar et al., 2007] описывается противоположный эффект, а именно, более высокой антибактериальной активностью обладают низкомолекулярные образцы хитозана. Бицидное действие низкомолекулярного хитозана авторы работы связывают с тем, что он обладает большей проникающей способностью через клеточную стенку бактерий, нарушает их функционирование, влияя на физиологические внутриклеточные процессы, что приводит клетку к гибели.

К настоящему времени установлено, что хитозан имеет прямое фунгистатическое действие, которое зависит от его физико-химических свойств (молекулярной массы и степени деацетилирования), а также вида микроорганизма. К хитозану более чувствительны грибы и оомицеты, содержащие незначительное количество хитозана в клеточных стенках, а зигомикеты, содержащие большое количество хитозана в клеточных стенках, устойчивы к его воздействию. Энтомопатогенные грибы, обладающие высокой хитинолитической активностью, устойчивы к действию хитозана [Тютюрев, 2014].

Результаты исследования процесса ингибирования хитозаном с различной молекулярной массой девяти растительных патогенных грибов *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum f.sp cubense*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, and *Sphaceloma ampelinum* показали, что полимеры с низкой ММ обладают более высокой степенью ингибирования мицелия, чем высокомолекулярные хитозаны [Narong Singburadom et al., 2011]. В другой работе, наоборот, установлено, что с увеличением молекулярной массы антигрибная активность против *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata* растет [Seyfarth et al, 2008].

Механизм антигрибного действия хитозана по аналогии с бактериями связывают с нарушением структуры клеточной стенки, ведущее к изменению морфологии мицелия, размера спор и нарушению целостности грибной цитоплазматической мембраны, приводящее к выходу из клеток цитоплазматического содержимого. Электростатическое взаимодействие положительно заряженных свободных аминогрупп хитозана с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран клеток грибов подтверждается его рН-зависимостью, различной для низко- и высокоацетилированного хитозана с одинаковой молекулярной массой и концентрацией в среде [Тютюрев, 2014]. В связи с этим хитозаны с большой степенью деацетилирования (86–90%) во всех случаях проявляли более сильное фунгистатическое действие, чем хитозаны с СД ниже 80%. Этот параметр играет решающую роль в адгезии хитозана к клеткам мицелия и спор грибов.

Биологическая активность хитозана как индуктора устойчивости определяется его способностью индуцировать защитные реакции и устойчивость растений к болезням.

Известно, что хитин и хитозан являются молекулярными детерминантами фитопатогенных грибов, узнаваемых белковыми рецепторами растений. Взаимодействие с рецепторами индуцирует в растениях базовую устойчивость. Хитозан индуцирует в растениях изменения клеточных

мембран, хроматина, ДНК, МАР-киназ, окислительный взрыв (образование АФК), отложение каллозы, РР-белков и фитоалексинов [Тютюрев, 2014].

В отличие от биоцидной активности для элиситорной активности в растениях важную роль играют именно ацетилированные звенья хитозана, которые отвечают за связь хитозанового полимера со специфическими растительными рецепторами. Поэтому в ряде случаев уменьшение ацетилированных звеньев ниже определенной доли в составе хитозана влечет частичную или полную потерю его элиситорных способностей [Тютюрев, 2014].

Элиситорная активность хитозана в растениях, безусловно, зависит также от степени полимеризации молекул хитозана. Так, низкомолекулярный хитозан был наиболее эффективен при подавлении вируса мягкой мозаики фасоли в растениях фасоли [Куликов и др., 2006]. В работе [Васюкова и др., 2001] показано, что хитозаны с молекулярной массой 5, 24 и 200 кДа индуцировали в клубнях картофеля глюканазную и хитиназную активности, образование ингибиторов протеаз и фитоалексина, однако, максимальный эффект достигался при использовании самого низкомолекулярного образца, в то время как хитозан с ММ 200 кДа был наименее активен.

Однако на некоторых растениях элиситорная активность хитозана увеличивалась с ростом его молекулярной массы. Было предположено, что высокомолекулярные молекулы хитозана, длительное время находясь на поверхности листьев растений, постепенно расщепляются выделяемыми растениями ферментами до более мелких фрагментов, которые, обладая большей проникающей способностью, обеспечивают длительный элиситорный эффект. Обработка хитозаном (ММ 120 кДа) за сутки до заражения приводила к более высокой устойчивости картофеля к вирусу, чем при использовании хитозанов с молекулярной массой 3 и 36 кДа. Таким образом, доля растений с индуцированной устойчивостью прямо зависела от молекулярной массы хитозана, использованного для их обработки. [Чирков и др., 2001].

Оценка эффективности хитозанов с разной молекулярной массой (6–753 кД) в повышении устойчивости фасоли к вирусу некроза табака помогла установить положительную корреляцию между иммунологической активностью хитозана и его способностью индуцировать синтез каллозы [Faoro et al., 2007]. Авторами показано, что хитозаны с ММ 76, 120 и 139 кДа были наиболее эффективными в индуцировании синтеза каллозы по сравнению с теми, у которых более низкая или более высокая ММ. Самым эффективным оказался хитозан с ММ 76 кДа, снижающий до 95% вирусные поражения. Хитозаны с ММ более 300 кДа были менее эффективны, причем снижение пораженности растений вирусом составляло 70–50%.

Противоречивые данные в оценке влияния молекулярной массы хитозанового полимера на его биоцидную и иммунизирующую активности, незначительное число работ, касающихся влияния химической структуры хитозана на возбудителей болезней сельскохозяйственных растений свидетельствует о необходимости продолжения исследований и их актуальности.

Можно считать установленным, что любая биологическая активность хитозана в первую очередь определяется наличием положительного заряда на его макромолекулах.

Для установления однозначного влияния структуры хитозана на его биологическую активность исследуемые образцы полимера должны, как правило, иметь одинаковую степень деацетилирования. Основываясь на собственных [Тютюрев, 2014] и литературных данных, можно констатировать, что наибольшую биологическую активность про-

являет хитозан со степенью деацетилирования молекулы от 70% до 90%.

Цель работы состояла в сравнительном изучении антибактериальной, антигрибной и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой и постоянной степенью деацетилирования 85%.

### Материал и методы

Для опытов использовали хитозан с ММ 150 кДа с СД=85% (производство «Биопрогресс»). Путем окислительной деструкции из этого хитозана были получены образцы с различными ММ (3, 5, 6.5, 10, 50, 100 кДа) при сохранении СД=85% [Погореленко, 2003].

Антибактериальная активность образцов хитозана оценивалась по их способности подавлять рост культур бактерий, вызывающих вредоносные заболевания сельскохозяйственных культур:

*Bacillus polymyxa* (Prazmowski 1880) Mace 1989 – бактериальная гниль клубней картофеля;

*Pseudomonas syringae* – пятнистость томата и других овощных культур;

*Erwinia carotovora* – черная ножка картофеля, бактериозы капусты, мягкая гниль тыквы, моркови, редиса, томата и др.

Тест-культуры получены из коллекций типовых культур ВНИИСХМ и лаборатории микробиометода ВИЗР. Оценка биоцидной активности заявленного соединения проводили в соответствии с Методическими указаниями по... [1985].

В основу положен метод диффузии испытуемого соединения в питательную среду. Метод основан на сравнении ингибирования роста тест-микроорганизма испытуемым раствором по отношению к контролю (дистиллированная вода) и определении биологической активности исследуемого соединения по зоне ингибирования роста тест-микроорганизма (радиус зоны ингибирования роста тест-организма в мм).

#### Ход анализа.

В стерильные чашки Петри разливают охлажденную до 45°C картофельно-глюкозный агар. После застывания среды

на поверхность агара наносят 0.2 мл суспензии из бактериальных спор тест-культуры ( $10^6$  в 1 мл). После инокуляции агара тест-микроорганизмами чашки оставляют на 1–2 часа для впитывания инокулюма. Затем на поверхности агара стерильным сверлом делают лунки диаметром 6 мм. В лунки каждой чашки одновременно вносят по 0.2 мл раствора испытуемого препарата в концентрации 0.2% и раствора стандарта. После этого чашки оставляют в течение 1–2 часов при комнатной температуре, а затем помещают в термостат и выдерживают при 25°C в течение 48 часов. Для каждого рабочего раствора измеряют зоны ингибирования роста тест-микроорганизмов в мм (радиус).

Изучение бактерицидной активности препаратов проводили методом агаровых блоков [Билай, 1982]. В качестве тест грибов использовали следующие возбудители болезней: гриб *Fusarium oxysporum*, вызывающий фузариозное увядание томата, и гриб *Sclerotinia sclerotiorum*, вызывающий белую гниль томата.

Эффективность хитозановых образцов против бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz f. sp. *tritici*) проводили на восприимчивом к бурой ржавчине сорте пшеницы Саратовская 29 в модельной системе. Хитозановыми образцами (0.1%) опрыскивали «газоны» из 7-дневных проростков пшеницы из расчета 10 мл на газон. В контроле газоны обрабатывали водой. Через 24 часа такие газоны заражали бурой ржавчиной (*P. recondita*), путем опрыскивания 0.5 мл суспензии спор на газон. Инфекционная нагрузка составила  $10^5$  спор в 1 мл воды. Через 7 дней подсчитывали на листьях газона количество выживших пустил патогена.

### Результаты и их обсуждение

С учетом известного механизма действия хитозанов на микроорганизмы [Куликов, 2013] в опыт были взяты грамтрицательные (*P. syringae*, *E. carotovora*) и грамположительная (*B. polymyxa*) бактерии. Большинство исследователей при изучении антибактериальной активности хитозана в качестве растворителя используют 0.2% соляную или уксусную кислоты, которые сами по себе обладают антимикробной активностью, что может влиять на истинные показатели антимикробного действия исследуемых соединений. В наших экспериментах для растворения образцов хитозана была использована янтарная кислота – природная органическая кислота, не обладающая антимикробными свойствами и широко применяемая в сельском хозяйстве для повышения урожайности.

Проведенные эксперименты по оценке прямой бактерицидной активности показали, что все использованные образцы хитозана с ММ от 3–150 кДа обладают активностью по отношению к обоим типам бактерий (табл. 1).

Выявлена общая закономерность в действии хитозанов на все тест-объекты. Хитозаны с ММ от 5 до 50 кДа обладают достаточно большой антибактериальной активностью. Уменьшение ММ полимера до 3 кДа снижало ингибирующее действие хитозана на рост бактерий. Значительно меньшей бактерицидной активностью обладает хитозан с ММ 150 кДа. Наибольшей чувствительностью

к хитозановым полимерам обладает грамтрицательная бактерия *E. carotovora*. Другая грамтрицательная бактерия *P. syringae*, наоборот, оказалась самой устойчивой к действию поликатиона. Это свидетельствует о том, что различия в типе клеточной стенки у грамтрицательных и грамположительных бактерий не является определяющим в чувствительности клеток к поликатиону

Таблица 1. Антибактериальная активность образцов хитозана с разной молекулярной массой

ММ образцов хитозана, кДа	Зона ингибирования роста бактерий (тест-объекта), R мм		
	грамтрицательные		грамположительные <i>B. polymyxa</i>
	<i>P. syringae</i>	<i>E. carotovora</i>	
3	0.75 ± 0.03	1.0 ± 0.05	0.75 ± 0.05
5	0.80 ± 0.02	2.1 ± 0.10	1.4 ± 0.05
10	1.0 ± 0.05	2.0 ± 0.10	1.7 ± 0.10
50	1.5 ± 0.05	2.2 ± 0.15	1.7 ± 0.10
150	0.05 ± 0.02	1.0 ± 0.05	0.70 ± 0.03

По чувствительности к хитозану бактерии можно ранжировать следующим образом:

*E. carotovora* > *B. polymyxa* > *P. syringae*. Полученные данные согласуются с литературными, что эффективное свя-

зывание хитозана с мембранными структурами бактерий определяется особенностями строения их клеточных стенок, то есть существуют видовые различия в чувствительности микроорганизмов к хитозановому полимеру.

Таким образом, видно, что антимикробные свойства хитозанов с одинаковой степенью деацетилирования, обусловленные уникальной способностью взаимодействовать с клеточной стенкой микроорганизмов, зависят от молекулярной массы хитозанов.

Все хитозановые образцы обладают фунгистатической активностью, сдерживая рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелий гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% в течение 10 суток культивирования по сравнению с контролем. Эффект ингибирования роста колонии грибов зависел от ММ хитозана. Низкомолекулярный образец (3 кДа) эффективно сдерживал рост мицелия гриба *S. sclerotiorum* до 80%, но менее эффективно подавлял мицелиарный рост аскомицета *F. oxysporum*, ингибируя рост мицелия всего на 44% по сравнению с контролем. Напротив, высокомолекулярный хитозан (150 кДа) сильнее подавлял радиальный рост мицелия *F. oxysporum* по сравнению с *S. sclerotiorum*. Хитозаны с молекулярной массой от 5 до 50 кДа одинаково эффективно ингибировали рост колоний обоих грибов в течение 10 суток культивирования (табл. 2).

Таблица 2. Антигрибная активность образцов хитозана с разной молекулярной массой (*in vitro*)

ММ образцов хитозана, кДа	Ингибирование роста мицелия грибов при культивировании, % к контролю			
	<i>F. oxysporum</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
	5-е сутки	10-е сутки	5-е сутки	10-е сутки
3	61.1	44.4	77.7	75.0
5	79.6	78.0	84.4	86.3
10	83.1	77.0	86.4	85.0
50	82.3	80.0	82.2	76.0
150	79.1	72.2	66.0	60.6

Таким образом, антигрибная активность хитозана при оптимальной степени деацетилирования (85%) определяется его молекулярной массой, а также видом патогена.

Известно, что при действии хитозана на растения, в них происходит координированная индукция целого комплекса защитных реакций, приводящая к повышению устойчивости растений к последующему заражению патогеном. При этом интенсивность индукции может зависеть от молекулярной массы хитозана [Faoro, Iriti, 2007]. Но кроме сигнала для включения защитных реакций растени-

ем молекулы хитозана, находясь на поверхности листьев, создают также физический барьер для проникновения патогена, что сдерживает его распространение.

Данные по оценке индуцирующей активности хитозанов с разной молекулярной массой в повышении устойчивости пшеницы к бурой ржавчине представлены в табл.3. Установлено, что обработка растений исследуемыми образцами эффективно защищает пшеницу от бурой ржавчины, что выражается в значительном снижении пораженности листьев пшеницы (до 15–20%) по сравнению с контролем (100%). Все образцы подавляют развитие пустул на листьях от 79.5 до 89.0% и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине. Некоторое снижение эффективности в ингибировании развития пустул (79.5%) отмечено для хитозана с ММ 150 кДа.

Таблица 3. Влияние образцов хитозана в концентрации 0.1% на устойчивость пшеницы к бурой ржавчине

Вариант опыта	ММ хитозана, кДа	Поражение листьев бурой ржавчиной, % от контроля, НСР <sub>0.05</sub> =9.0	Подавление развития пустул бурой ржавчины, % от контроля
Контроль заражение	—	100	—
Хитозан	6.5	15	89.0 ± 0.6
Хитозан	60	18	86.0 ± 0.5
Хитозан	100	15	89.1 ± 0.6
Хитозан	150	20	79.5 ± 0.4

После инокуляции развитие ржавчинного гриба начинается с попадания уредоспор на листья пшеницы, где они начинают прорастать. Так как хитозан является пленкообразующим полимером, то нанесенный на листья растений, он может задерживать процесс проникновения и развития уредоспор. Это подтверждают гистологические исследования, которые показали, что на поверхности плодов цитрусовых, обработанных хитозаном, наблюдается ограничение роста патогена и нарушение структуры его гиф.

Таким образом, независимо от механизмов, лежащих в основе индуцированной устойчивости, структурные параметры хитозана, такие как молекулярная масса и степень деацетилирования, определяют его способность к повышению устойчивости растений к последующему заражению патогеном. Выбор хитозана, оптимального по структуре и являющимся биологически активным по отношению к конкретным патосистемам растение – патоген, имеет фундаментальное значение.

### Заключение

Проведена сравнительная оценка бактерицидной, фунгистатической и индуцирующей активности хитозана с разной молекулярной массой (3–150 кДа) и постоянной степенью деацетилирования (85%). Полученные результаты подтверждают положение о зависимости биоцидной и индуцирующей активности хитозана от ММ. Все образцы хитозана от 5 до 50 кДа обладают антибактериальной активностью против грамотрицательных (*P. syringae*, *E. carotovora*) и грамположительной (*B. polymyxa*) бактерии. Уменьшение Мм полимера до 3кДа и повышение до 150 кДа

снижает ингибирующее действие хитозана на рост бактерий. Наибольшей чувствительностью к хитозановым полимерам обладает грамотрицательная бактерия *E. carotovora*. Все хитозановые образцы характеризуются фунгистатической активностью. Они сдерживают рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 44.4–80.0%, а мицелия гриба *S. sclerotiorum* на 60.6–86.3% в течение 10 суток культивирования по сравнению с контролем. При этом низкомолекулярный образец (3 кДа) эффективно сдерживал рост мицелия гриба *S. sclerotiorum* до 80% на 10-е сутки, но менее эффективно подавлял мицелиарный рост

аскомицета *F. oxysporum*, ингибируя рост мицелия на 44% по сравнению с контролем. Напротив, высокомолекулярный хитозан (150 кДа) сильнее подавлял радиальный рост мицелия *F. oxysporum* по сравнению с *S.sclerotiorum*. Таким образом, при оптимальной степени деацетилирования

(85%) антигрибная активность хитозана зависит от его ММ и вида патогена. Установлено, что хитозановые образцы с ММ от 6.5 до 150 кДа обладают высокой индуцирующей активностью и повышают устойчивость растений пшеницы к бурой ржавчине, что выразилось в подавлении развития пустил на листьях от 79.5 до 89.0%.

#### Библиографический список (References)

- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии // Наукова думка. 1982. 275 с.
- Васюкова Н.И. Модулирование болезнестойчивости растений с помощью водорастворимого хитозана / Васюкова Н.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И., Переход Е. А., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ильина А.В., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. N 1. С. 115–122.
- Ильина А.В. Влияние степени ацетилирования на ферментативный гидролиз хитозана препаратом целловириндин G20x./Ильина А.В., Варламов В.П.// Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. N 3. С. 273–277.
- Куликов С.Н. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях / Куликов С. Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. N 2. С. 224–228.
- Куликов С.Н. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизм действия и роль структуры./Куликов С.Н., Хайрулин Р.З. //Хитозан. М.: «Центр Биоинженерия» РАН. 2013. С. 363–407.
- Методические указания по государственному испытанию фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур.// М.: 1985. 130 с.
- Погореленко А.Б. Конъюгаты хитозана и альдегидпроизводных фенолов./ Погореленко А.Б., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тютюрев С.Л. // Вестник СПбГУ, 2003. сер. 4. вып. 3. С.
- Тютюрев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням.// СПб.: 2014. 212 с.
- Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. / Под ред. Скрябина К.Г., Вихорева Г.А., Варламова В.П. // М.: Наука. 2002. 368 с.
- Чирков С.Н. Влияние хитозана на системную вирусную инфекцию и некоторые защитные реакции в растениях картофеля./Ильина А.В., Сургучева Н.А., Летунова Е.В., Варицев Ю.А., Татарнинова Н.Ю., Варламов В.П. // Физиология растений 2001. Т. 48. вып. 6. С. 890–896.
- Benhamou N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan.// Phytopathology 2004. V. 94. P. 693–705.
- Chen Y.M. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen./ Chen Y.M., Chung Y.C., Wang L.W., Chen K.T., Li S.Y.//J. Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2002.V. 37. N. 7, P. 1379–1390.
- El Hadrami A. Chitosan in Plant Protection / El Hadrami A, Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F.// Marine Drugs. 2010. V. 8. N.4. P. 968–987.
- Fernandes J.C. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation./ Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pimtdo M.E., Xavier Malcata F.// Ultramicroscopy 2009. V. 109. N. 8. P. 854–860.
- Franco F. Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens/ Franco F., Iriti M. // Caryologia 2007. V. 60. N. 1–2. P. 121–124.
- Kong M. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review./ Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.// Int. J. Food Microbiology 2010. V. 144. P. 51–63.
- Kumar A.B.V. Low molecular weight preparation with the aid of pepsin, characterization, and bactericidal activity./Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. // Biomacromolecules. 2007. V. 2. N. 2. P. 566–572.
- Seyfarth F. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*./ Seyfarth F., Schliemann S., Elsner P., Hipler U.C. //Int. J. Pharm. 2008. V. 353. N.1–2. P. 139–148.
- Singburadom N. Antimicrobial Activity of Different Molecular Weight Chitosans to Inhibit Some Important Plant Pathogenic Fungi./ Narong Singburadom N., Piasai O., Dethaib T. //Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2011. V. 45. P. 644–655.

#### Translation of Russian References

- Bilay V.I. Methods of experimental mycology. Kiev: Naukova Dumka. 1982. 275 p. (In Russian).
- Chirkov S.N., Ilyina V.A., Surgucheva, N.A. Leonova E.V., Varitsev Yu.A., Tatarinova N.Yu., Varlamov V.P. Effect of chitosan on systemic viral infection and some defense reaction in potato plants. *Fiziologiya rastenii*, 2001. Vol. 48. N 6. P. 890–896. (In Russian).
- Ilyina A.V., Varlamov V.P. Effect of degree of acetylation on the enzymatic hydrolysis of chitosan drug Celoviridin G20x. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2003. Vol. 39. N 3. P. 273–277. (In Russian).
- Kulikov S.N., Chirkov S.N., Ilyina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P. Influence of molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2006. Vol. 42. N 2. P. 224–228. (In Russian).
- Kulikov S.N., Khairulin R.Z. Antibacterial and antimycotic activity of chitosan: mechanism of action and role of structure. Moscow: Tsentr Bioinzheneriya RAN, 2013. P. 363–407. (In Russian).
- Novozhilov K.V. (Ed.) Methodical instructions on the state testing fungicides, antibiotics and seed dressers on crops. Moscow, 1985. 130 p. (In Russian).
- Pogorelenko A.B., Domnina N.S., Popova E.V., Tyuterev S.L. Conjugates of chitosan and aldehyde derivative phenols. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta*. 2003. Ser. 4. Vol. 3. P. 97–104 (In Russian).
- Skryabin K.G., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P. (Eds.). Chitin and chitosan: production, properties and application. Moscow: Nauka, 2002. 368 p. (In Russian).
- Tyuterev S.L. Natural and synthetic inducers of plant resistance to diseases. St. Petersburg, 2014. 212 p. (In Russian).
- Vasyukova N.I., Zinovieva S.V., Ilyinskaya L.I., Perekhod E.A., Chalenko G.I., Gerasimova N.G., Ilyina A.V., Varlamov V.P. Modulation of balneological plants using water-soluble chitosan. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*. 2001. Vol. 37. N 1. P. 11–122. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 28–33

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF CHITOSAN WITH VARIOUS MOLECULAR WEIGHTS

E.V. Popova<sup>1</sup>, N.S. Domnina<sup>2</sup>, N.M. Kovalenko<sup>1</sup>, E.A. Borisova<sup>3</sup>, L.E. Kolesnikov<sup>3</sup>, S.L. Tyuterev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, Russia

A comparative evaluation of the bactericidal, fungistatic and inducing activity of chitosan with various molecular weights (3 to 150 kDa) and a constant degree of deacetylation (85%) was carried out. Samples of chitosan with molecular mass (MM) 5 to 50 kDa showed higher antibacterial activity against gram-negative (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*) and gram-positive (*Bacillus polymyxa*) bacteria, than chitosan with 3 kDa and 150 kDa. All chitosan samples characterized by fungistatic activity, inhibiting mycelial growth of *Fusarium oxysporum* fungus by 44.4–80.0%, and mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus by 60.6–86.3% during 10 days of cultivation as compared to the control. The decrease of the polymer MM to 3 kDa



reduced the inhibitory effect of chitosan on the growth of the fungus *F. oxysporum*. The obtained results confirm the dependence of the chitosan biocidal activity on MM. It has been established that the chitosan samples with MM 6.5 to 150 kDa increase the resistance of wheat plants to brown rust, suppressing the development of surviving pustules on leaves by 79.5 to 89.0%.

**Keywords:** chitosan; molecular weight; antimicrobial activity; fungal activity; induced resistance.

#### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608  
Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\**Попова Эльза Викторовна*. Ведущий научный сотрудник,  
кандидат биологических наук, e-mail: elzavpopova@mail.ru

*Коваленко Надежда Михайловна*, Старший научный сотрудник,  
кандидат биологических наук, e-mail: nadyakov@mail.ru

*Тютерева Станислав Леонидович*. Главный научный сотрудник,  
доктор биологических наук, e-mail: mail@vizr.spb.ru

Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,  
Университетский пр. 26, 198504, Санкт-Петербург, Петродворец,  
Российская Федерация

*Домнина Нина Семеновна*. Доцент, кандидат химических наук,  
e-mail: n.domnina@spbu.ru

Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,  
Петербургское шоссе, д. 2, 196601, Санкт-Петербург, Пушкин,  
Российская Федерация

*Колесников Леонид Евгеньевич*. Зав. кафедрой,  
кандидат биологических наук, e-mail: kleon9@yandex.ru

*Борисова Елена Алексеевна*. Магистрант, e-mail: dead-people@mail.ru

#### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,  
St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\**Popova Elza Victorovna*. Leading Researcher, PhD in Biology,  
e-mail: elzavpopova@mail.ru

*Kovalenko Nadezhda Mikhailovna*. Senior Researcher, PhD in Biology  
e-mail: nadyakov@mail.ru

*Tyuterev Stanislav Leonidovich*. Principal Researcher, DSc in Biology,  
e-mail: mail@vizr.spb.ru

Institute of chemistry, St. Petersburg state University, University prospect 26,  
198504, Saint-Petersburg, Petrodvorets, Russian Federation

*Domnina Nina Semenovna*. Dozent, PhD in Chemistry,  
e-mail: n.domnina@spbu.ru

Saint-Petersburg State Agrarian University  
Peterburgskoe shosse, 2, 196601, St. Petersburg, Pushkin,  
Russian Federation

*Kolesnikov Leonid Evgenievich*. Head of Department, PhD in Biology,  
e-mail: kleon9@yandex.ru

*Borisova Elena Alekseevna*. Student of Magistrate,  
e-mail: dead-people@mail.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence

УДК 632.937.01:576.895

## АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *XENORHABDUS SP.* (ENTEROBACTERIACEAE) СИМБИОНТОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE)

Л.Г. Данилов, Е.А. Зорина, Т.Ю. Нащекина

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Изучено действие продуктов метаболизма 15 изолятов симбиотических бактерий рода *Xenorhabdus* из природных популяций энтомопатогенных нематод (ЭПН) в отношении грибов – возбудителей заболеваний растений – *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* и *Alternaria solani*. В результате проведенных исследований установлены различия по антибиотической активности первичных форм продуцентов *Xenorhabdus*, выделенных из различных видов и изолятов из природных популяций ЭПН. В опытах *in vitro* в температурных условиях 25 °С и 30 °С отобраны 2 штамма бактерий, обладающих наиболее высокой антибиотической активностью против трех видов грибов. При температуре 20 °С наиболее высокая антибиотическая активность установлена у штамма бактерий-симбионтов нематод вида *S. feltiae pronense*. Результаты исследования свидетельствуют о существенном влиянии температурного фактора на проявлении антибиотической активности видов и штаммов симбиотических бактерий ЭПН, и этот показатель является важным критерием при отборе бактериальных патогенов в качестве эффективного средства борьбы с возбудителями заболеваний растений.

**Ключевые слова:** энтомопатогенные нематоды, антибиотическая активность симбиотических бактерий нематод, метаболиты, биологическая эффективность.

Энтомопатогенные нематоды (сем. *Steinernematidae* и *Heterorhabditidae*) и их симбиотические бактерии, являются облигатными паразитами насекомых и используются, либо изучаются во всем мире, как агенты микробио-

логического контроля численности насекомых вредителей и возбудителей заболеваний растений [Poinar, 1990]. Виды бактерий рода *Xenorhabdus* (*Achromobacteriaceae*: *Eubacteriales*), которые живут в симбиозе с нематодами

рода *Steinernema*, являются грамотрицательными энтомопатогенными бактериями [Voermare, 2002]. Нематодно-бактериальный комплекс токсичен для многих видов насекомых и, в большинстве случаев, бактерии являются высоко вирулентными, когда они проникают в гемоцель насекомого [Forst and Nealson, 1996]. Бактерии при этом быстро размножаются и экскретируют различные метаболиты, которые преодолевают иммунную систему насекомых, убивают их и подавляют рост возбудителей различных грибных и бактериальных заболеваний [Akhurst, 1982; Chen et al., 1996; Dunphy and Webster, 1994], что способствует развитию нематод и бактериальных симбионтов [Gaugler and Kaya, 1996].

Многие штаммы бактерий *Xenorhabdus* производят разнообразные экзоэнзимы. Лецитиназа, производимая *X. nematophilus* и *X. bovienii*, участвует в расщеплении фосфолипидов насекомых, обеспечивая тем самым источник липидов для роста и развития нематод [Thaler et al., 1995]. Тем не менее, есть существенные различия в типе метаболитных антибиотиков, производимых различными видами и штаммами бактериальных симбионтов нематод. В литературных источниках имеются сообщения о нескольких биологически активных вторичных метаболитах из культур симбиотических бактерий, например, ксеноминс [Webster et al., 2002], ксенорабдины [McInerney et al., 1991a], ксенокумадины [McInerney et al., 1991b] и нематофины (производные индола) [Li et al., 1997]. Эти соединения в условиях *in vitro* отличаются активностью в отно-

шении грамположительных бактерий и грибов [Furgani et al., 2008]. Антибиотики, производимые симбиотическими бактериями *X. nematophilus*, могут качественно и количественно различаться в зависимости от штамма и вида бактерий, условий их культивирования [Wang et al., 2008]. Отмечается также, что в процессе культивирования качественный и количественный состав антибиотиков может зависеть от нескольких факторов, таких как pH, температура и состав культуральной среды [Webster et al., 2002].

Вторичные метаболиты бактерий *Xenorhabdus spp.* обладают потенциальной антимикробной и инсектицидной активностью, что свидетельствует о перспективах использования их в сельскохозяйственном производстве. Болезни растений представляют собой серьезную угрозу для производства продовольствия. Грибные заболевания являются основными проблемами для коммерческого производства овощей и фруктов. Наиболее распространенными возбудителями фитозаболеваний растений являются оомицеты из родов *Botrytis* и *Fusarium*. Эти патогены контролируются, главным образом, химическими фунгицидами, большинство из которых высокотоксичны и является основным источником экологического загрязнения экосистем. В этой связи и были проведены исследования по отбору видов и штаммов симбиотических бактерий из природных популяций ЭПН перспективных для возможного их использования в качестве средства защиты растений от возбудителей заболеваний.

### Материалы и методы

Симбиотических бактерий (табл. 1) выделяли из коллекционных видов и штаммов ЭПН, собранных из природных популяций

этих паразитов с использованием метода живых ловушек [Данилов, Карпова, 1990].

Таблица 1. Штаммы симбиотических бактерий, выделенные из изолятов природных популяций энтомопатогенных нематод

№ штамма	Название изолята нематод	Место выделения нематод
1	L-2	п. Пушкинские Горы, Псковская обл., РФ
2	№ 42	Республика Коми, РФ
3	Бел-4	Республика Беларусь
4	<i>S. carpocapsae</i> штамм «agriotos»	с. Погост, Ленинградская обл., РФ
5	<i>S. feltia</i> (SRP18-91)	п. Пушкинские Горы, Псковская обл., РФ
6	№ 51	Республика Коми, РФ
7	№ 8	с. Погост, Ленинградская обл., РФ
8	<i>S. feltiae protense</i>	Республика Саха-Якутия, РФ
9	<i>S. carpocapsae</i> (Кр.)	г. Краснодар, РФ
10	SPG-5	п. Пушкинские Горы, Псковская обл., РФ
11	<i>S. carpocapsae</i> (Бел-1)	Республика Беларусь
12	<i>S. carpocapsae</i> (Погост-2)	с. Погост, Ленинградская обл., РФ
13	Бел-3	Республика Беларусь
14	Бел-2	Республика Беларусь
15	<i>S. carpocapsae</i> (Кор.)	фирма Koppert, Нидерланды

Изоляцию бактериальных симбионтов проводили из трупов гусениц большой вошинной моли (*Galleria mellonella*), инфицированных различными видами и штаммами ЭПН. Гусениц предварительно стерилизовали в 70% спирте в течение 2 мин и помещали в ламинарный поток воздуха в течение 3 мин. Затем из ложноножки гусениц стерильно отбирали каплю гемолимфы, которую переносили в чашки Петри на питательную среду NBTA ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  – 0.5 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.5 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2 г;  $\text{NaCl}$  – 5 г; дрожжевой экстракт – 5 г; агар – 12 г; вода – 1 л, 25 мг бромтимолового синего и 40 мг диметилтетразолиум хлорида) и инкубировали при 26 °С. После 72 часов отбирали чистые колонии симбиотических бактерий (зеленые) одинакового размера и

морфологии. Идентификацию первичных форм симбиотических бактерий проводили по методу Акхурста [Akhurst, 1980]. Чистые колонии переносили в пробирки на косяки с питательной средой NBTA и выращивали в течение 3–4 суток при температуре 26 °С. Затем бактериальной петлей с косяка отбирали биомассу бактерий и переносили в колбы со 100 мл питательного бульона и выращивали на качалке 2 суток при 26 °С.

Грибные патогены высевали в чашки Петри на среду Чапека и выращивали при 25 °С в течение 5–7 суток. Чтобы определить влияние симбиотических бактерий на этих грибных патогенов, бульон с титром бактериальных клеток  $1 \times 10^9$  смешивали с охлажденной до 50 °С средой NBTA (в соотношении 1:9) и полу-

ченную смесь выливали в стерильные чашки Петри (10 мл смеси на чашку). С чашек каждого патогена, растущего на среде Чапека, отбирали мицелиальный диск (0,9 × 0,9 см) и помещали его в центр чашки Петри на питательную среду с симбиотическими бактериями. В качестве контроля использовали среду NBTA без симбиотических бактерий. Все варианты опытов и контроля были заложены в 4-х кратной повторности. Антибиотическая активность определялась по результатам замеров зон роста патогенов – тест-объектов при 20°C, 25°C и 30°C. Учеты ингибирующего действия бактерий на патогены проводили на 2, 3

и 4 день в температурных условиях (25°C), оптимальных для развития нематодно-бактериальных комплексов [Данилов и др., 1994]. С понижением температуры от оптимальной до 20°C и повышением до 30°C учеты проведены на 4 день после начала опыта. Антибиотическую активность симбиотических бактерий определяли методом креста по диаметру зоны роста патогена.

Статистическую обработку и построение диаграмм проводили в программах Microsoft Excel и Sigma Plot 12.0. Биологическую эффективность рассчитывали по формуле Аббота.

### Результаты и обсуждение

Изучено действие продуктов метаболизма 15 изолятов симбиотических бактерий рода *Xenorhabdus* из природных популяций ЭПН в отношении грибов – возбудителей заболеваний растений – *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. и *Alternaria solani* Sorauer (1896). Штаммы симбиотических бактерий были изолированы из нематод *Steinernema feltiae* штамм SRP-91 (*X.bovienii*), *Steinernema feltiae protense* (*X.bovienii*), из 5 культур *Steinernema carpocapsae* (*X. nematophilus*) и из 8 культур нематод, выделенных из природных популяций нематод в различных регионах Российской Федерации и Республики Беларусь.

На основании сравнительной оценки антибиотической активности симбиотических бактерий по зоне ингибирования роста грибов установлено, что все штаммы бактерий, используемые в опытах, показывали антибиотическую активность в отношении тестируемых видов грибов.

В результате проведенных исследований установлены различия по антибиотической активности первичных форм продуцентов *Xenorhabdus*, выделенных из различных видов и изолятов из природных популяций ЭПН.

В опытах *in vitro* в температурных условиях 25°C и 30°C отобраны 2 штамма бактерий, выделенных из двух изолятов – №1 (L-2) и №10 (SPG-5) из природных попу-

ляций нематод в почве садов п. Пушкино Псковской обл. (табл. 2 и рис. 2, 3 и 4).

При температуре 25°C штаммы №1 (L-2) и №10 (SPG-5) обладают наиболее высокой антибиотической активностью практически против трех видов грибов, однако степень ингибирования несколько снижается против грибов рода *Fusarium* (рис. 2, 3 и 4). Антигрибная активность у всех испытуемых штаммов была высокой при использовании их против *A. solani*, при этом наименьшие зоны роста гриба на 2, 3 и 4 дни отмечены у метаболитов штамма №1 соответственно 3.5±0.29, 6.33±0.44 и 10.17±0.17 мм (табл. 2, рис. 1).

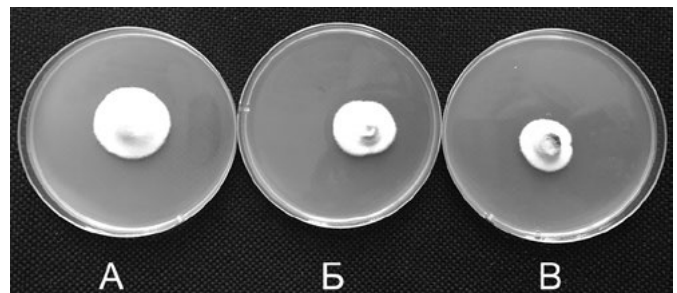


Рисунок 1. Антибиотическая активность изолятов симбиотических бактерий против гриба *Alternaria solani*: А – контроль, Б – №4 (*S. carpocapsae* штамм «agriotos»), В – №1 (L-2)

Таблица 2. Антибиотическая активность штаммов симбиотических бактерий (*Xenorhabdus*), выделенных из изолятов природных популяций энтомопатогенных нематод (*Steinernematidae*) против грибов разных видов при температуре 25°C

№ штамма симбиотических бактерий	Виды грибов								
	<i>Alternaria solani</i>			<i>Fusarium culmorum</i>			<i>Fusarium solani</i>		
	2 сутки	3 сутки	4 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки
	Диаметр зоны ингибирования (мм)								
1	3.5±0.29	6.33±0.44	10.17±0.17	9.5±0.76	29.5±4.37	48.33±6.92	8.17±0.44	21.67±0.17	32.33±0.17
2	8.83±0.17	15.5±0.76	27.83±0.6	21.17±0.7	38.17±0.73	64.33±0.17	11.83±1.36	36.83±0.6	41.5±1.26
3	3.83±0.44	10±0.76	19.17±1.17	20.5±1.6	48.33±2.24	76±0	12.5±0.5	25.83±0.4	76±0
4	14±0.29	15.83±0.44	18.5±0.29	23.33±1.3	48.33±0.83	77.5±1.44	20.5±0.5	32.17±0.1	45.33±0.73
5	15±0.29	19.5±0.5	26.17±0.67	24.17±1.5	45±2.47	66.33±3.6	21.17±0.73	33.83±0.67	46.33±1.01
6	11±0.76	24.33±0.44	32.67±1.2	18.17±0.1	31.33±0.33	43.83±0.72	32±0.58	62.5±1.04	80±0
7	8.33±0.17	11.67±1.09	18.5±1.53	23.83±0.6	46.5±0.76	80±0	13.17±0.17	23.83±0.73	35.5±1.32
8	15.17±0.44	18.5±0.76	22.33±1.83	23.5±1.32	48.67±3.06	70.33±2.46	20.67±0.33	35.17±0.83	46.83±1.17
9	8.17±0.17	13.5±0.5	27.83±1.2	26.17±1.6	54.33±1.64	80±0	14.33±0.83	25.17±0.6	37.33±0.83
10	3.67±0.17	7.5±0.29	14.17±2.68	11.67±0.4	35±0.58	57.83±0.73	10.83±0.93	23.67±0.6	34.17±1.09
11	9.5±0.29	18.5±1.53	35.17±1.42	25.33±1.2	46.5±2.89	72.33±4.76	15±0.87	28.67±1.96	41.17±1.42
12	8.17±0.83	14.5±0.87	26.5±1.04	21.17±0.6	41.83±0.67	60.67±2.05	11.17±0.44	23.83±0.6	35.5±1.04
13	15.17±0.44	11.33±0.33	19.5±2.25	17±1.89	47.17±2.59	74.33±1.67	12±0.58	25±0.58	38±0.87
14	8.5±0.29	13.5±1.15	24.83±1.01	12.83±0.4	36.17±3	60.17±3.98	10.17±0.6	24.83±1.74	42.83±5.86
15	16.33±0.6	22±3.6	33±4.25	31.83±2.5	59.83±3.18	80±0	16±0.5	27.67±0.33	41±0.29
контроль	16±0	26.5±0.29	37.8±1.17	23±0.58	48.5±0.58	80±0	17.83±0.6	28.5±0.76	42.17±0.6
НСР <sub>0.05</sub>	1.19	3.36	4.92	3.63	6.42	7.74	1.954	2.53	4.93

И в тоже время, при температуре 20°C наиболее высокая антибиотическая активность установлена у штамма бактерий №8 – симбионтов нематод вида *S. feltiae pronense* [Иванова и др., 2001] (рис. 2, 3, 4).

Сравнительная характеристика антибиотической активности отобранных изолятов бактерий наиболее показательно оценивается по их биологической эффективности против трех видов грибов в зависимости от температурных условий окружающей среды (рис. 5, 6 и 7).

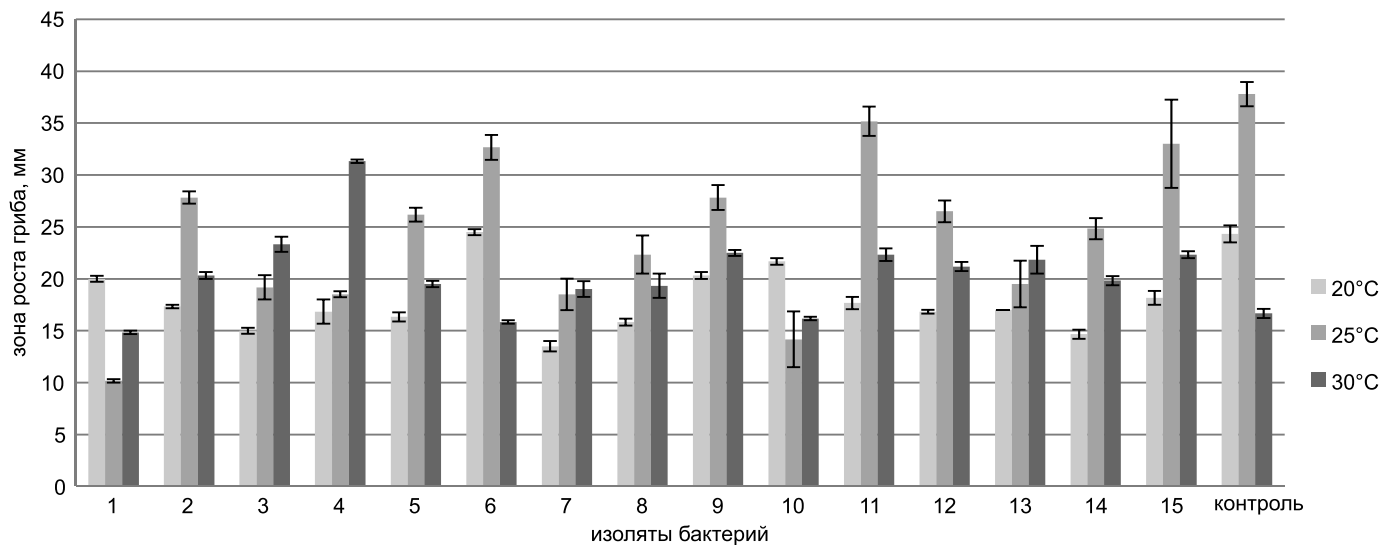


Рисунок 2. Антибиотическая активность изолятов бактерий против гриба *Alternaria solani* при разных температурах

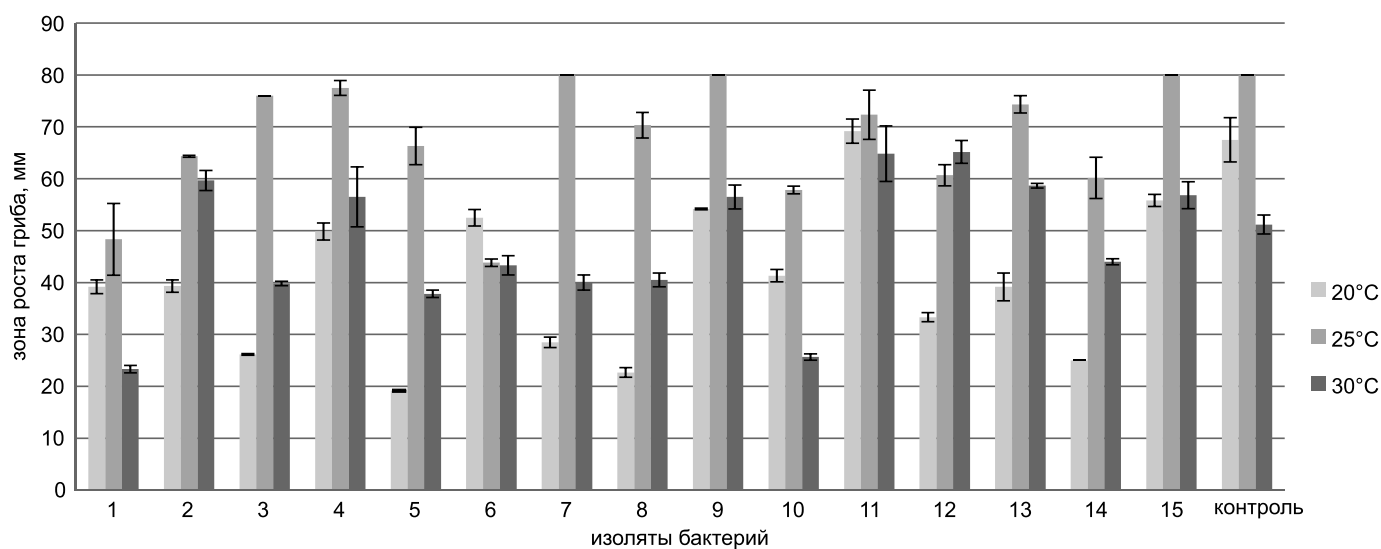


Рисунок 3. Антибиотическая активность изолятов бактерий против гриба *Fusarium culmorum* при разных температурах

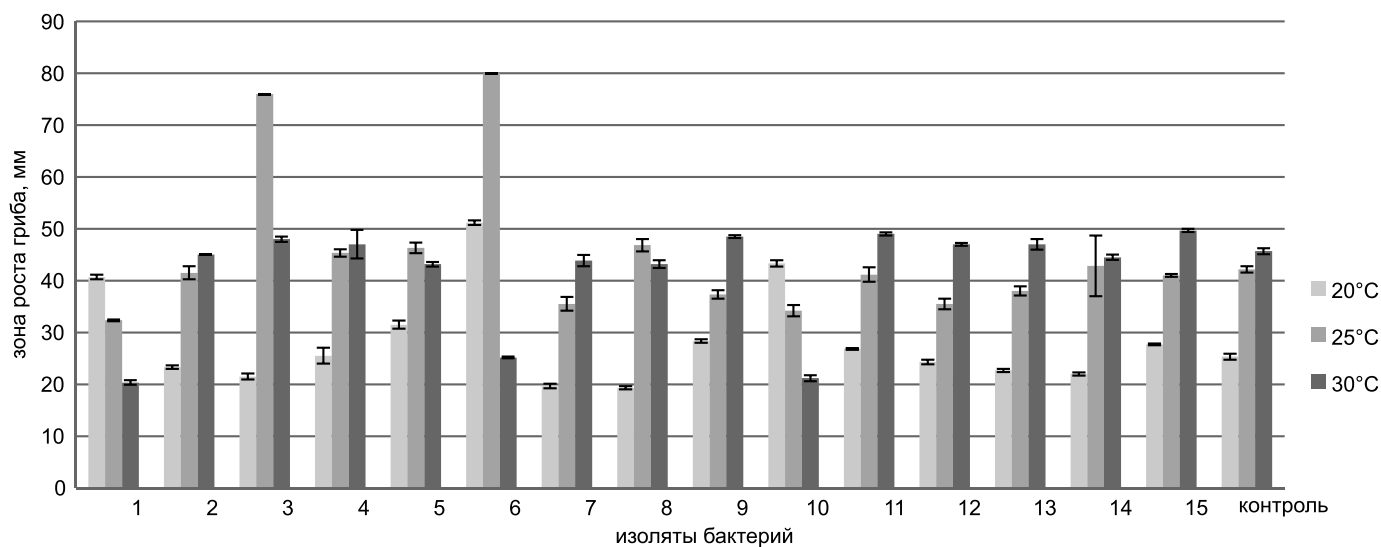
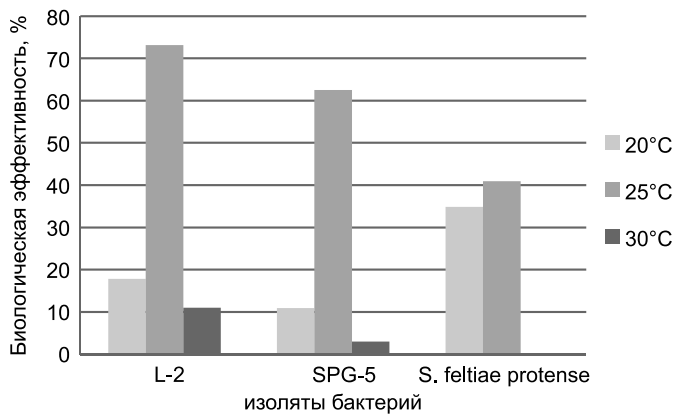
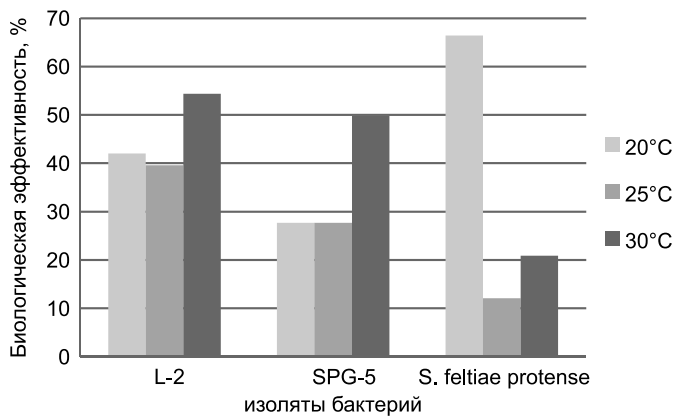
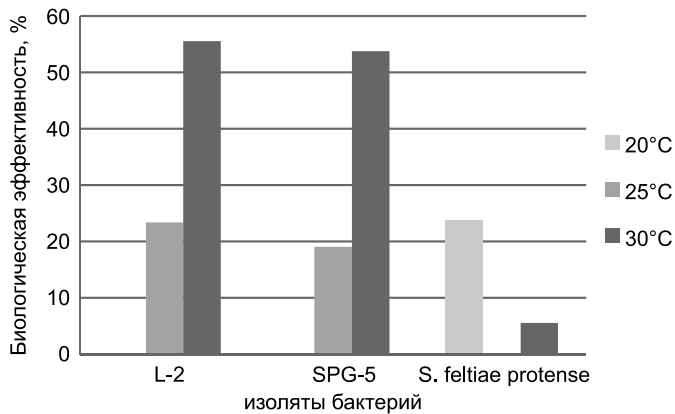


Рисунок 4. Антибиотическая активность изолятов бактерий против гриба *Fusarium solani* при разных температурах

Рисунок 5. Эффективность изолятов бактерий против гриба *Alternaria solani* при разных температурахРисунок 6. Эффективность изолятов бактерий против гриба *Fusarium culmorum* при разных температурахРисунок 7. Эффективность изолятов бактерий против гриба *Fusarium solani* при разных температурах

При 25°C и 30°C бактерии-симбионты нематод *S. feltiae pronense*, по биологической эффективности против трех видов грибов существенно уступали бактериям, выделенным из изолятов природных популяций нематод L-2 и SPG-5. Однако при 20°C у штаммов бактерий №1 и №10 практически отсутствовало антибиотическое влияние на *F. solani* (рис. 7). Различаются также показатели активности штаммов нематод против отдельных видов грибов. При 30°C биологическая эффективность всех штаммов бактерий против *A. solani* была незначительной у штаммов №1 и №10 и отсутствовала у штамма №8 (рис. 5). Лучшие показатели биологической эффективности у всех штаммов бактерий отмечены при их использовании против *F. culmorum* (рис. 6).

По данным других исследователей максимальная антибактериальная и антигрибная активность симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод отмечается при 30°C [Vijayakumari et al., 2013]. Проявление антибиотической активности у различных штаммов симбиотических бактерий в зависимости от температуры, вероятно, следует рассматривать и в связи с особенностями биологии отдельных видов ЭПН в зависимости от биотических и абиотических факторов в зоне обитания природных популяций этих патогенов. Нематоды *S. feltiae pronense*, встречающиеся в почвах аласов тайги Якутии, приспособлены к существованию и активной жизнедеятельности при температурах, близких к нижнему порогу проявления инвазионной активности штейнернематид [Данилов и др., 1994]. Симбиотические бактерии этого вида нематод, вероятно, также адаптированы к биологии развития и существования в специфических температурных условиях и поэтому с понижением температуры до 20°C отмечается существенное повышение антигрибной активности метаболитов рассматриваемого штамма бактерий по сравнению с другими штаммами.

Таким образом, в результате проведенных исследований изучено действие продуктов метаболизма 15 видов и штаммов симбиотических бактерий рода *Xenorhabdus* в отношении грибов – возбудителей заболеваний растений (*F. culmorum*, *F. solani* и *Alternaria solani*) в зависимости от температурных условий. Результаты исследования свидетельствуют о существенном влиянии температурного фактора на проявление антибиотической активности видов и штаммов симбиотических бактерий ЭПН, и этот показатель является важным критерием при отборе бактериальных патогенов в качестве эффективного средства борьбы с возбудителями заболеваний растений.

#### Библиографический список (References)

- Данилов Л.Г., Васильева С.О., Гоголев А.Н. Влияние температуры на инвазионную активность нематод семейств Steinernematidae и Heterorhabditidae // Паразитология. 1994. В. 6. N 28. С. 495–500.
- Данилов Л.Г., Карпова Е.В. Испытания энтомопатогенных нематод против саранчовых // Защита растений 1990. N7. С.34–35.
- Иванова Т.С., Данилов Л.Г., Ивахненко О. А. Новый подвид энтомопатогенных нематод *Steinernema feltiae protense* subsp. N. (Nematoda: Steinernematidae) из Якутии // Паразитология. 2001. В. 35. N4. С. 333–337.
- Akhurst, R. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae // J. Gen. Microbiol. 1982. 128. P. 3061–3065.
- Akhurst, R., & Dunphy, G. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts // Parasites Patho. Insects. 1993. V. 2. P. 1–23.
- Forst, S. and K. Nealson., Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. P. 21–43.
- Furgani G, Böszörményi E, Fodor A, Máthé-Fodor A, Forst S, Hogan JS, Katona Z, Klein MG, Stackebrandt E, Szentirmai A, Sztaricskai F, Wolf SL. *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. P. 745–758.
- Lee DW, Choo HY, Kaya KH, Lee SM, Smitley RD, Shin Hk, Park CG. Laboratory and field evaluation of Korean entomopathogenic nematode isolates against the oriental beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) // J. Econ. Entomol. 2002. V. 95 P. 918–926.

- Li J, Chen G, Webster JM (). Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) // *Can. J. Microbiol.* 1997. V. 43. P. 770–773.
- Li X.H, Ma J, Jiang ZF, Li YG, Chen SL. Antagonism of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Univ. Hebei.* // 2009. V. 32 P. 67–71.
- McInerney BV, Gregson RP, Lacey M, Akhurst RJ, Lyons GR, Rhodes SH, Smith DRJ, Lutz ME, White AH. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotics activity // *J. Nat. Prod.* 1991a. V. 54. P. 774–784.
- McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, Gregson RP. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 2. Benzopyrane-1-one derivatives with gastroprotective activity // *J. Nat. Prod.* 1991b. V. 54. P. 785–795.
- Poinar GO. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae // 1990. P. 23–62 in R. Gaugler and H. K. Kaya eds. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shapiro-Ilan D, Rojas MG, Morales-Ramos JA, Lewis EE, Tedders WL. Effects of host nutrition on virulence and fitness of entomopathogenic nematodes: Lipid- and protein-based supplements in *Tenebrio molitor* diets // *J. Nematol.* 2008. V. 40. P. 13–19.
- Slininger PJ, Shea-Wilbur MA. Liquid culture pH, temperature, carbon and nitrogen source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescence* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995. V. 37. P. 388–392.
- Thaler J. O., Baghdiguian, S. & Boemare, N. Purification and characterization of *Xenorhabdus*, a Phage Tail-Like Bacteriocin, from the Lysogenic Strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus* // *Appl. Environ. Microb.* 1995. V. 61. P. 2049–2052.
- Wang YH, Li YP, Zhang Q, Zhang X. Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization // *Bioresource Technol.* 2008. V. 99. P. 1708–1715.
- Webster JM, Chen G, Hu K, Li J. Bacterial metabolites. - In: Gaugler R. *Entomopathogenic nematology*, CABI international, London, UK, 2002. P. 99–114.
- Vijayakumari S. J., Sasidharannair N. K., Nambisan B., and Mohandas C. Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. // *Iran J. Microbiol.* 2013 Jun; 5(2). P. 136–141.

#### Translation of Russian Referens

- Danilov L.G., Vasilieva S.O., Gogolev A.N. Influence of temperature on invasion activity of nematodes of families Steinernematidae and Heterorhabditidae. *Parazitologiya.* 1994. V. 6. N 28. P. 495–500.
- Danilov L.G., Karpova E.V. Testing entomopathogenic nematodes against locusts. *Zashchita rastenii.* 1990. N 7. P. 34–35.
- Ivanova T.S., Danilov L.G., Ivakhnenko O.A. A new subspecies of entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* protense subsp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yakutia. *Parazitologiya.* 2001. V. 35. N 4. P. 333–337.

*Plant Protection News*, 2017, 3(93), p. 33–38

## ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *XENORHABDUS* SP. (ENTEROBACTERIACEAE) SYMBIONT OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE)

L.G. Danilov, E.A. Zorina, T.Yu. Nashchekina

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

The effect of metabolic products of 15 isolates of symbiotic bacteria of the genus *Xenorhabdus* from natural populations of entomopathogenic nematodes is studied against plant pathogen fungi *Fusarium solani*, *Fusarium culmorum* and *Alternaria solani*. The differences of antibiotic activity are found in primary producers *Xenorhabdus*, extracted from various species and isolates of natural populations of entomopathogenic nematodes. In *in vitro* tests at 25°C temperature and 30°C, two strains of bacteria have been selected, possessing the highest antibiotic activity against three species of fungi. At temperature 20°C, the nematode species *S. feltiae* has the highest antibiotic activity of bacteria strain. The results have showed a significant effect of temperature factor on the manifestation of the antibiotic activity of species and strains of the symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematodes, and this is an important criterion in the selection of bacterial pathogens as effective means of controlling plant diseases.

**Keywords:** entomopathogenic nematode; antibiotic activity; symbiotic bacteria; metabolite; biological efficiency.

#### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация  
 \*Данилов Леонид Григорьевич. Ведущий научный сотрудник, доктор сельскохозяйственных наук, e-mail: biodan@mail.ru  
 Зорина Елена Анатольевна. Младший научный сотрудник, e-mail: biodan@mail.ru  
 Нащечкина Татьяна Юрьевна. Ведущий агроном, e-mail: biodan@mail.ru

\* Ответственный за переписку

#### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation  
 \*Danilov Leonid Grigorievich. Leading Researcher, DSc in Agriculture, e-mail: biodan@mail.ru  
 Zorina Elena Anatolievna. Junior researcher, e-mail: biodan@mail.ru  
 Naschekina Tatiana Yurievna. Leading agronomist, e-mail: biodan@mail.ru

\* Responsible for correspondence

УДК 632.4:633.16

## ФУЗАРИОЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ И КОНТАМИНАЦИЯ МИКОТОКСИНАМИ ЗЕРНА СОРТОВ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ

Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Использование устойчивых к заболеваниям сортов ячменя является оптимальным решением проблемы получения высококачественных продуктов питания. Присутствие грибов рода *Fusarium* оказывает негативное влияние на состояние зерна, снижая его семенные качества. Кроме того, в зараженном зерне накапливаются различные микотоксины, продуцируемые грибами рода *Fusarium*, которые, сохраняясь в зерне и продуктах его переработки, при попадании в организм человека и животных приводят к снижению иммунитета и различным патологическим изменениям. Проведена оценка 38 сортов ячменя, выращенных на госсортоучастке (Ленинградская область, Волосовский район) в 2013 году, включающая установление патогенного комплекса грибов *Fusarium*, выявление степени инфицированности зерна и загрязненности микотоксинами. Зараженность зерна ячменя грибами *Fusarium* варьировала от 7 до 58%. Количество ДНК видов *Fusarium*, продуцирующих трихотеценовые микотоксины, варьировало в образцах ячменя от 0.3 до 109 пкг/мкл. Микотоксин дезоксиниваленол (ДОН) выявлен в зерне 71% образцов в диапазоне от 20 до 816 мкг/кг. Максимальное содержание ДНК грибов *Fusarium* и ДОН в количестве, превышающем установленную предельно допустимую концентрацию, содержал сорт Фабиола. Выявлено, что образцы зерна, выращенные из семян сортов ячменя I репродукции, полученных для посева из других стран содержали значительно больше ДНК грибов *Fusarium* и ДОН (в 3 и 3.5 раза соответственно), по сравнению с образцами зерна из семян той же и более низких репродукций из России.

**Ключевые слова:** ячмень, сорта, грибы *Fusarium*, зараженность, микотоксины, ДНК.

Ячмень (*Hordeum vulgare*) является одной из основных зерновых культур, широко возделываемой во всем мире. Увеличение производства зерна ячменя за счет повышения урожайности является ключевой проблемой в развитии сельского хозяйства России. Важным фактором современной технологии возделывания ячменя является создание и возделывания сортов разнообразного целевого назначения [Кузнецова и др., 2014].

Микробиологическое состояние зерна ячменя сказывается на его внешнем виде, может влиять на всхожесть и энергию прорастания. Кроме того, присутствие в зерне токсинопродуцирующих грибов и образуемых ими вторичных метаболитов – микотоксинов, снижает его пищевое качество. Микотоксикологический анализ зерна показывает, что во многих регионах России значительное число товарных партий ячменя заражены микроскопическими грибами и загрязнены образуемыми ими микотоксинами [Гагкаева и др., 2011; Гаврилова, Гагкаева, 2010]. Известно, что разные виды грибов *Fusarium* продуцируют различные по химической природе токсичные метаболиты, которые влияют на здоровье теплокровных организмов, вызывая нервные расстройства, подавление иммунной системы, снижение репродуктивной способности [D’Mello et al., 1999; Desjardins, 2006].

Ячмень является основным сырьем для пивоваренной промышленности. До сих пор нет однозначного мнения о влиянии фузариевых грибов и их микотоксинов на процесс солодоращения и о переходе токсичных метаболитов в конечный продукт. Отсутствие подобных знаний зачастую приводит к непредсказуемости протекания технологического процесса изготовления качественного пива.

Зараженность *Fusarium* оказывает негативное влияние на питательные вещества зерновки, такие как крахмал и белок, поскольку в процессе колонизации грибы гидролизуют протеолитические и целлюлолитические ферменты ячменя, что может отрицательно сказываться на получаемом солоде [Oliveira et al., 2012]. Показано отрицательное влияние грибов *F. langsethiae* и *F. poae* на экстрактивность солода трёх сортов ячменя Optic, Quench и Tipple [Nielsen

et al., 2014]. Выявлено, что наличие микотоксинов дезоксиниваленола (ДОН) и Т-2 токсина в солоде влияет на амилолитическую активность ферментов  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз в процессе солодования [Garda-Buffon et al., 2010].

Некоторые исследователи показывают, что присутствие фузариевых грибов и их микотоксинов в зерне приводит к снижению его всхожести, а также изменению цвета суслу и вкуса производимого пива [Oliveira et al., 2012; Schwarz et al., 2006; Wolf-Hall, 2007]. Установлено, что если для пивоварения использовали зерно со значительными количествами ДОН, ниваленола (НИВ), фузаренона-Х и неосоланиола, то эти же микотоксины затем обнаруживали в готовом продукте - пиве. По данным чешских исследователей не выявлено четкой связи между количествами ДОН в исходном зерне и полученном солоде [Malachova et al., 2010]. Также показано, что присутствие Т-2 и НТ-2 токсинов, диацетоксисцирпенола (ДАС) в конечной продукции было существенно ниже, по сравнению с исходным зерном [Baxter, Muller, 2006].

Установлена различная чувствительность к действию микотоксинов штаммов некоторых пивоваренных дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis* I-S.ca./13, *S. cerevisiae* (lager) 23, *S. cerevisiae* I-S. c./46 и *S. cerevisiae* I-S.c./57). Трихотеценовые фузариотоксины ДАС и Т-2 токсин в значительной степени ингибировали рост дрожжей, а микотоксин ЗЕН не оказывал существенного влияния [Dziuba et al., 2007].

Присутствие метаболитов грибов *Fusarium* в зерне ячменя также связывают с первичным гашингом – самопроизвольном внезапном обильном образовании пены [Волкова, 2007; Schwarz et al., 1996; Sarlin et al., 2005]. Проведенные исследования выявили, что варианты солода, полученного из зараженного *F. culmorum* зерна пшеницы сорта Lucija, были значительно подвержены гашингу, по сравнению с незараженным контролем [Habschied et al., 2014]. Установлено, что проявление гашинга не коррелировало с количеством микотоксина ДОН в ячмене, но было связано с присутствием гидрофобов, образуемых грибами *Fusarium* [Sarlin et al., 2005].



Мониторинг зараженности зерна грибами не может проводиться по данным визуальной оценки, поскольку большинство инфицированных зерен внешне не отличаются от здоровых, но могут быть загрязнены микотоксинами. Для выявления зараженности обычно используют традиционные микробиологические методы, которые основаны на стимуляции роста микроорганизмов питательными средами. Для анализа безопасности зерновой продукции широко применяется иммуноферментный метод, с помощью которого определяют содержание микотоксинов в зерне и соотносят его с регламентированными нормами.

Предельно допустимые концентрации (ПДК) фузариотоксинов в зерне, идущем на пищевые цели, установленные СанПиН 2.3.2.1078-01, составляют для ДОН – 700-1000 мкг/кг, ЗЕН – 1000 мкг/кг и 100 мкг/кг для Т-2 токсина. Оценка риска негативного влияния продукции на основе зерна при употреблении в пищу человеком или животными, как правило, учитывает токсичность только регламентированных микотоксинов. В то же время негативное воздействие могут оказывать низкие количества различных микотоксинов при их совместном присутствии.

### Материалы и методы

В условиях Ленинградской области на Волосовском госсортоучастке (ГСУ) в 2013 году возделывали 38 сортов ярового ячменя, из которых 28 были выращены из семян первой репродукции, 8 – второй и 6 – третьей. На ГСУ возделывают сорта или перспективные генетические линии, переданные на испытание из различных селекционных учреждений России и из-за рубежа (Германия, Финляндия, Дания, Великобритания). Как правило, в первый год высевают семена I репродукции, полученные непосредственно от оригинатора. На второй-третий года испытаний оцениваемые сорта высевают семенами, полученными уже непосредственно на данном ГСУ (II и III репродукции).

В лабораторных условиях 100–150 зерен из среднего образца каждого сорта дезинфицировали 70%-ным раствором этанола и раскладывали на поверхность агаризованной питательной среды [Гагкаева и др., 2011]. Через 7–10 суток инкубации при 24 °С учитывали количество зерен, на поверхности которых образовались колонии фузариевых грибов. Видовую идентификацию грибов рода *Fusarium* проводили с использованием определителя [Gerlach, Nirenberg, 1982]. Общую зараженность образца зерна грибами *Fusarium* (%) определяли как отношение числа зерен, зараженных грибами, к общему числу проанализированных зерен. Долю конкретного вида (%) в каждом образце рассчи-

В последние годы начали активно использовать современные молекулярно-генетические методы, позволяющие по количеству ДНК грибов в зерне определять его контаминированность токсигенными грибами, что значительно увеличивает точность и ускоряет проведение анализа и получение результатов. К такому методу относится метод количественной ПЦР (кПЦР), который позволяет оценить количественное присутствие одного или группы сходных микроорганизмов в образце растительной ткани и прогнозировать количества образуемых микотоксинов. Этот метод имеет неоспоримые преимущества перед микробиологическими методами, вследствие быстроты анализа, возможности одновременного тестирования большого количества образцов и получения объективных данных о качестве зерна.

Целью нашего исследования являлась сравнительная характеристика различных сортов ярового ячменя по степени инфицированности зерна грибами *Fusarium* и загрязненности микотоксинами.

тывали, как отношение числа зерен, зараженных определенным видом *Fusarium* к числу зерен, зараженных грибами *Fusarium*.

Средний образец зерна каждого сорта размалывали на лабораторной мельнице и полученную муку использовали для выделения ДНК грибов и экстракции микотоксинов. Из 200 мг полученной муки экстрагировали ДНК, используя СТАВ-метод по протоколу, предложенному European Commission [Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2005]. Далее проводили измерение суммарного содержания в зерне ДНК комплекса видов грибов, имеющих *Tri5* ген в геноме и продуцирующих трихотеценовые микотоксины – метод TaqMan-ПЦР с флуоресцентными пробамми [Halstensen et al., 2006].

Микотоксины экстрагировали из 1 г муки смесью ацетонитрил:вода (84:16). Определение количества ДОН в зерне проводили иммуноферментным методом (ИФА) с использованием тест-систем компании «Фарматех» с пределом определения микотоксина 20 мкг/кг. ИФА выполняли в полистироловых планшетах «Медполимер», оптическую плотность растворов измеряли при длине волн 492 нм на спектрофотометре Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific).

Статистическую обработку результатов провели с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 10.0. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

Зараженность зерна сортов ячменя грибами *Fusarium* варьировала от 7 до 58%. Сорт Криничный был заражен в меньшей степени, по сравнению с другими сортами ячменя, наибольшая зараженность зерна выявлена у сортов Суздалец и Фабиола (51–58%). В течение ряда лет наблюдений нами неоднократно показано, что сорт Суздалец, который на госсортоучастках используют в качестве стандарта, является высоко восприимчивым к заражению зерна [Гаврилова и др., 2014].

Микологический анализ выявил присутствие в зерне ячменя 9 видов грибов *Fusarium*, среди которых доминировали *F. avenaceum* и *F. poae*. Их доли в комплексе патогенов составили 26 и 15.4%. С меньшей частотой встречались *F. culmorum* (17.2%), *F. tricinctum* (18.8%),

*F. incarnatum* (9.6%), *F. sporotrichioides* (4.8%), *F. equiseti* (4.3%), *F. graminearum* (2.9%), *F. anguioides* (1%).

Поскольку в одном образце зерна одновременно присутствуют несколько видов микроскопических грибов, следовательно, возможно присутствие различных микотоксинов. Около 46% выделенных из зерна ячменя штаммов относятся к видам *F. avenaceum*, *F. anguioides* и *F. tricinctum*, которые не образуют трихотеценовые микотоксины, однако продуцируют монилиформин. Остальные штаммы способны продуцировать группу трихотеценовых микотоксинов (ДОН, Т-2 и НТ-2 токсины, НИВ, ДАС и др.).

С высокой частотой выявленный в зерне *F. poae*, образует микотоксин НИВ, содержание которого в зерне не нормировано. Доля вида *F. sporotrichioides*, образующего



Т-2 и НТ-2 токсины, была низкой. Нормированный в зерне ДОН образуют только виды *F. culmorum* и *F. graminearum*, суммарная доля которых составила 19.7%. Анализ микотоксина ДОН в зерне ячменя выявил его присутствие в 71% образцов в количестве от 20 до 816 мкг/кг (табл.). Только один сорт Фабиола содержал ДОН в количестве, превышающем установленную ПДК для этого микотокси-

на в зерновой продукции.

Количество ДНК грибов *Fusarium*, продуцирующих трихотеценовые микотоксины, варьировало в образцах ячменя от 0.3 до 109 пкг/мкл. Максимальное количество ДНК грибов содержал сорт Фабиола. Минимальные количество ДНК грибов выявлены у сортов Криничный, Кати, Рамблер и КВС 09 410.

Таблица. Содержание ДНК трихотеценпродуцирующих видов *Fusarium* и микотоксина ДОН в зерне ячменя различных сортов

Сорт	Оригинатор	Репродукция	ДНК, пкг/мкл	ДОН, мкг/кг
Автограф	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	I	3.4	0
Апрель	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	I	37.5	49
АС 07/568/5	Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Германия)	I	4.5	20
Даниэлле	Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Германия)	I	9.9	0
ЗУ Гезине	Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Германия)	I	46.3	31
ЗУ Заза	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	I	23.4	30
ЗУ Сурен	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	I	57.0	187
Инари	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	I	34.0	180
КВС 10-206	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	I	7.5	50
КВС 107545	KWS Lochow GmbH (Германия)	I	13.3	413
КВС 11-243	KWS Lochow GmbH (Германия)	I	4.2	50
Керстин	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	I	2.7	52
Ленинградский	ФГБНУ «Ленинградский НИИСХ «Белогорка» (Россия)	I	0.9	125
Московский 86	ФГБНУ «Московский НИИСХ «Немчиновка» (Россия)	I	1.6	37
Олимпик	BAUWA AG (Франция)	I	2.2	65
СА 715205	Carlsberg Research Laboratory, Carlsberg AS (Дания)	I	15.6	0
Саломе	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	I	41.8	213
Суздалец	НИИСХ ЦР НЗ Рязанский НИПТИ АПК (Россия)	I	1.8	138
Татум	Saaten-Union GmbH (Германия)	I	14.5	69
Фабиола	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	I	109.0	816
Чайна	Carlsberg Research Laboratory, Carlsberg AS (Дания)	I	3.3	18
Шафль	Syngenta seeds Ltd. (Великобритания)	I	5.7	27
Яромир	ФГБНУ «Московский НИИСХ «Немчиновка» и ФГБНУ «Рязанский НИИСХ» (Россия)	I	8.7	43
средние показатели (±ДИ*) по репродукции I			19.5±3.8	113.6±22.7
Вендела	Nordsaat Saatzucht GmbH (Германия)	II	9.2	0
Вибке	Saaten-Union GmbH (Германия)	II	4.3	0
Кати	Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Германия)	II	0.5	0
КВС 09 321	Ackermann Saatzucht GmbH & Co. KG (Германия)	II	0.8	61
КВС 09 410	KWS Lochow GmbH (Германия)	II	0.5	0
Рамблер	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	II	0.3	0
СИ 409-228	Syngenta seeds Ltd. (Великобритания)	II	12.2	20
Харбингер	Boreal Plant Breeding Ltd. (Финляндия)	II	13.5	200
средние показатели (±ДИ*) по репродукции II			5.2±1.7	35.1±16.5
Владимир	ФГБНУ «Московский НИИСХ «Немчиновка» и ФГБНУ «Рязанский НИИСХ» (Россия)	III	27.8	51
Деспина	Saaten-Union GmbH (Германия)	III	8.1	0
Изумруд	ФГБО «Вятская Государственная сельскохозяйственная академия» (Россия)	III	55.3	160
Криничный	Белорусский НИИ земледелия и кормов (Республика Беларусь)	III	0.4	0
Таусень	ФГУП «Котласское» (Россия)	III	2.8	36
Черно	Carlsberg Research Laboratory, Carlsberg AS (Дания)	III	1.2	28
средние показатели (±ДИ*) по репродукции III			15.9±6.4	45.8±18.3

\*ДИ – доверительный интервал при уровне значимости  $p < 0.05$

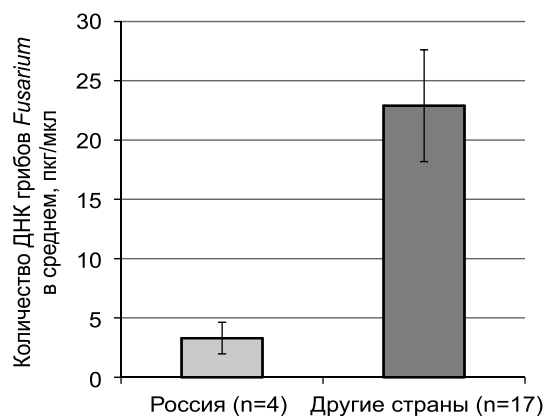
Выявлена положительная взаимосвязь между содержанием ДНК грибов в зерне и количеством накапливаемого ДОН (коэффициент корреляции по натуральным показателям составил 0.75, при уровне значимости  $p < 0.01$ ), несмотря на то, что доля штаммов – продуцентов ДОН составляла менее половины (20.1%) от всех штаммов *Fusarium* продуцирующих трихотеценовые микотоксины (54.2%).

При сходной зараженности образцов, в зависимости от устойчивости растения, патогены могут быть локализованы в цветочной пленке, в алейроновом слое или же полностью колонизировать эндосперм и зародышевую часть зерна. Содержание ДНК грибов полнее отражает степень инвазии зерновки, чем показатели зараженности зерна,

выявленные микробиологическим методом на питательной среде.

На качество зерна выращенного урожая значительное влияние оказывает исходная зараженность семенного материала. Установлено, что на количество ДНК грибов рода *Fusarium* и содержание ДОН в зерне существенное влияние оказывают как происхождение, так и репродукция семян.

Выявлено, образцы зерна, выращенные из семян I репродукции, полученных из других стран (в основном из Германии) содержали значительно больше ДНК грибов *Fusarium* и микотоксина, по сравнению с образцами из



семян той же репродукции из России в 7.1 и 1.4 раза соответственно (рис.). Даже при исключении из расчётов высоко восприимчивого сорта Фабиола, содержащего экстремально высокие уровни ДНК грибов и ДОН, образцы зерна из семян I репродукции в среднем содержали ДНК (18.2 пкг/мкл) больше, чем образцы из семян II репродукции и столько же, сколько образцы, выращенные из семян III репродукции. Количество микотоксина при таком расчёте в образцах из семян I репродукции (80.2 мкг/кг) было достоверно больше, чем в образцах из семян последующих репродукций.

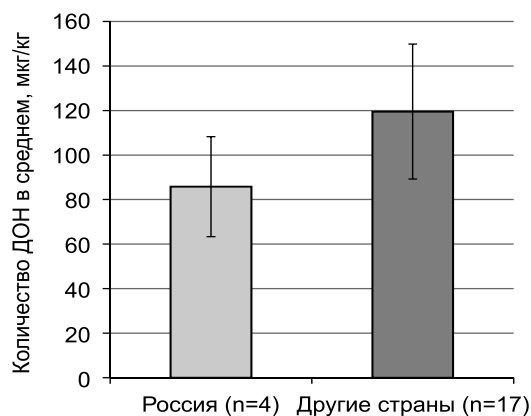


Рисунок. Сравнительная характеристика по содержанию ДНК грибов *Fusarium* и микотоксина ДОН в зерне сортов ячменя, выращенных из семян первой репродукции различного происхождения

Результаты наших исследований ещё раз подтверждают необходимость тщательного контроля ввозимого семенного материала из-за рубежа для предотвращения заноса опасных и вредоносных видов микроорганизмов.

Контаминация грибами и микотоксинами зерновой продукции является общемировой проблемой. Видовой состав патогенов, количество и разнообразие микотоксинов, образуемых этими грибами зависят, прежде всего, от устойчивости выращиваемых сортов, условий окружающей среды и комплекса организационно-хозяйственных приёмов возделывания культуры.

По сумме использованных показателей выявлена группа сортов, которые характеризовались содержанием низких количеств ДНК грибов и ДОН – Рамблер, Криничный, Каги и КВС 09 410. У сорта Фабиола выявлены значительная зараженность зерна и сопутствующие ей максимальные количества ДНК грибов и микотоксина. Этот сорт,

охарактеризованный по результатам наших исследований как высоковосприимчивый к фузариозу, был исключен из сортоиспытаний и не рекомендован для возделывания на территории России.

К сожалению, наметившаяся в последние годы тенденция преобладания западных сортов ячменя в Госсортоиспытании, демонстрирует ослабление в РФ эффективной селекции такой важной сельскохозяйственной культуры, как ячмень. Завоз семенного материала зарубежной селекции приводит не только к зависимости рынка от импорта семян различных агрокультур, но он также опасен с точки зрения заноса в регионы нашей страны новых опасных видов патогенов. Необходимо усиление отечественной селекции, направленной на создание высокопродуктивных сортов, адаптированных к условиям регионов и устойчивых к опасным заболеваниям.

*Авторы выражают благодарность сотрудникам Вологовского госсортоучастка (Ленинградская область) Вагину А.В. и Камориной И.Н. за предоставленные образцы зерна ячменя.*

*Исследование финансировано Российским научным фондом (проект № 14-26-00067).*

#### Библиографический список (References)

- Волкова Т.Н. Причины гашинга пива и меры его предотвращения: обзор // Индустрия напитков. 2007. N 3. С. 10–18.
- Гаврилова О. П., Гагкаева Т. Ю. Фузариоз зерна на севере Нечерноземья и в Калининградской области в 2007–2008 годах // Защита и карантин растений. 2010. N 2. С. 23–25.
- Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю., Вагин А.В., Каморина И.Н. Оценка зараженности зерна фузариевыми грибами сортов ячменя и овса, выращенных в условиях Ленинградской области // Зерновое хозяйство России. 2014. N 3. С. 66–70.
- Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур // Приложение к журналу “Защита и карантин растений”. 2011. N 5. С. 69–120.
- Кузнецова Т.Е., Серкин Н.В., Левштанов С.А. Итоги селекционной работы с ячменем // Земледелие. 2014. N 3. С. 6–8.
- Baxter E.D., Muller R.E. Investigations into selected mycotoxins in barley, malt and wheat. Brewing Research International. Project Report. No. 406. 2006. 73 p.
- Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, European Commission, 2005. Event-specific for the quantitation of maize line NK603 using real-time PCR, [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report\\_mm.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report_mm.pdf)
- Desjardins A.E. *Fusarium* Mycotoxins: chemistry, genetics and biology. American Phytopathological Society Press. 2006. 260 p.
- D’Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity // Animal Feed Sci. and Technol. 1999. V. 80. N 3–4. P. 183–205.

- Dziuba E., Foszczyńska B., Stempniewicz R. Effect of mycotoxins DAS, ZEA and OTA on the growth of brewing yeast // Pol. J. Food Nutr. Sci. 2007. V. 57. N. 4(A). P. 123–129.
- Garda-Buffon J., Baraj E., Badiale-Furlong E. Effect of deoxynivalenol and T-2 toxin in malt amylase activity // Braz. Arch. Biol. Technol. 2010. V. 3.N 3. P. 505–511.
- Gerlach W., Nirenberg H. The genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Ld. Berlin. 1982. 406 p.
- Habschied K., Krstanović V., Velić N., Šantek B., Novak M., Slačanac V. Gushing potential of wheat malt infected with *Fusarium culmorum* // J. of Hygienic Engineering and Design. 2014. N 6. P. 166–170.
- Halstensen A.S., Nordby K.C., Eduard W., Klemsdal S.S. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins // J. Environm Monitoring. 2006. V. 8. P. 1235–1241.
- Malachova A., Cerkal R., Ehrenbergerova J., Dzuman Z., Vaculova K., Hajslova J. *Fusarium* mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt // J. of the Science of Food and Agriculture. 2010. V. 90. P. 2495–2505.
- Nielsen L.K., Cook D.J., Edwards S.G., Ray R.V. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK // Int. J. of Food Microbiology. 2014. V. 179. P. 38–49.
- Oliveira P.M., Mauch A., Jacob F., Waters D.M., Arendt E.K. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt // Int. J. of Food Microbiology. 2012. 156. P. 32–43.
- Sarlin T., Nakari-Setälä T., Linder M., Penttilä M., Haikara A. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt // J. Inst. Brew. 2005. V. 111(2). P. 105–111.
- Schwarz P.B., Beattie S., Casper H.H. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt // J. Inst. Brew. 1996. V. 102. P. 93–96.
- Schwarz P.B., Horsley R.D., Steffenson B.J., Salas B., Barr J.M. Quality risks associated with the utilization of *Fusarium* head blight infected malting barley // J. Am. Soc. Brew. Chem. 2006. V. 64(1). P. 1–7.
- Wolf-Hall C.E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing // Int. J. of Food Microbiology. 2007. V. 119. P. 89–94.

#### Translation of Russian References

- Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Levitin M.M., Novozhilov K.V. *Fusarium* head blight // Prilozhenie k «Zaschita i karantin rasteniy». 2011. N 5. P. 69–120. (In Russian).
- Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. *Fusarium* head blight of small grain cereals in the north of Nechernozemye zone and in Kaliningrad region in 2007–2008 // Zashchita i karantin rasteniy. 2010. N 2. P. 23–25. (In Russian).
- Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Vagin A.V., Kamorina I.N. The evaluation of grain infection of barley and oats cultivars grown in Leningrad region // Zernovoe hozyaistvo Rossii. 2014. N 3. P. 66–70. (In Russian).
- Kuznetzova T.E., Serkin N.V., Levshantov S.A. The results of barley breeding // Zemledelie. 2014. N 3. P. 6–8. (In Russian).
- Volkova T.N. The causes of beer gushing and its prevention: review // Industriya napitkov. 2007. N 3. P. 10–18. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 39–43

## FUSARIUM INFECTION AND MYCOTOXINS CONTAMINATION IN GRAIN OF SPRING BARLEY CULTIVARS

T.Yu. Gagkaeva, O.P. Gavrilova

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

*Fusarium* head blight is one of the most important diseases of cultivated barley. *Fusarium* damaged grains contribute to loss of yield and quality due to colonization by fungi and contamination with mycotoxins. The objective of this study was to examine 38 barley cultivars harvested in Leningrad region, including causal *Fusarium* species, resistance of cultivars to penetration of pathogens and mycotoxin accumulation. *Fusarium* infection of grain samples is varied from 7 to 58%, the least infected was cultivar Krinichnyi. At the same time the cultivars Suzdalets and Fabiola were highly infected in comparison with other cultivars. It was detected that the species composition of naturally infected grains includes 9 *Fusarium* species. The most common *Fusarium* species in barley were *F. avenaceum* (26%) and *F. poae* (15.4%), they were followed by *F. anguoides*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. incarnatum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*. By real-time PCR it was found that the grain of all genotypes contained DNA of *Fusarium* fungi, but considerably varied in its amount – from 0.3 to 109 µg/µL. Using ELISA it was found that 71% of grain cultivars accumulated deoxynivalenol (DON) within 20–816 µg/kg. The maximum content of *Fusarium* DNA and DON in quantity exceeding the maximum level of mycotoxin, permitted in food was detected in cultivar Fabiola. It was shown that barley grain samples from the seeds of reproduction I harvested from other countries have contained significantly more *Fusarium* DNA and DON (3 and 3.5 times, respectively), in compare with the grain samples from seeds of the same and lower reproductions obtained from regions of Russia.

**Keywords:** barley; cultivar; *Fusarium*; fungus; infection; mycotoxin; DNA.

#### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

\*Гэгкаева Татьяна Юрьевна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, доцент по специальности «микология», e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

Гаврилова Ольга Павловна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

#### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

\*Gagkaeva Tatiana Yurievna. Senior scientist, PhD in Biology, docent in mycology, e-mail: t.gagkaeva@mail.ru  
Gavrilova Olga Pavlovna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence

УДК 632: 631.153.2

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕРОПРИЯТИЙ ПО ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОТДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Н.Р. Гончаров

*Всероссийский НИИ защиты растений. Санкт-Петербург*

В работе на основе анализа, предшествующего в Российской Федерации опыта и современной правовой базы, представлен алгоритм и изложены методические аспекты экономической оценки мероприятий по защите растений в условиях отдельного эксперимента. Материал рассмотрен на конкретном примере.

**Ключевые слова:** защита растений, экономическая эффективность, методика оценки.

В СССР была создана хорошо структурно организованная государственная служба защиты растений с профессионально подготовленным кадровым составом специалистов. В своей консультационной, организационно-управленческой и экономической фитосанитарной деятельности служба руководствовалась обширной методической и нормативной базой, разработанной в ВИЗР совместно с другими научными центрами страны [Захаренко и др., 1984; Гончаров и др., 1984; 1985; 1989; 1989; Ченкин и др., 1990; Новожилов и др., 1998; Гончаров и др., 1999].

Однако, в связи с изменением социальных и производственных отношений указанные научные разработки в настоящее время не могут быть использованы в практической деятельности без существенной переработки на основе новых методических подходов.

Во время перестройки основное внимание по проблемам защиты растений уделяли важным, но отдельным частным проблемам и явно недостаточно методическим вопросам в области экономики с учетом требований рыночных отношений. Для решения производственных задач все большее значение приобретает экономическая оценка защитных мероприятий [Гончаров, 2006; Гончаров и др., 2012; Лаптев и др., 2010; 2015; Якуткин и др., 2010; Павлюшин и др. 2015]. При этом методические подходы по уровню и полноте оценки могут существенно различаться в зависимости от целевых установок. Мы намерены последовательно их рассмотреть в нескольких публикациях.

В данной работе будут рассмотрены необходимые методические подходы по “Сравнительной экономической оценке мероприятий по защите растений в условиях отдельного полевого эксперимента”.

### 1. Общие положения и организация производственного опыта

Экономическую оценку мероприятий целесообразно проводить на базе типичного для региона (зоны) хозяйства. При оценке мероприятий в условиях отдельного эксперимента, полученные результаты отражают строго обусловленную ситуацию: тип почвы на конкретном поле, культуру, сорт, численность вредных организмов, погодные условия, технологические регламенты, организацию работ и т.д.

При изменении условий (например, численности вредных организмов) изменится и уровень экономических показателей. Поэтому результаты отдельного эксперимента нельзя переносить за пределы опыта, например, на регион (зону), где проявляется действие более широкого спектра факторов.

Таким образом, оценка мероприятий в условиях отдельного эксперимента является начальным этапом экономических исследований с целью накопления частной информации, необходимой для последующих обобщений.

Экономическая оценка новых мероприятий должна обязательно проводиться в сравнении с базовым (т. е. принятым в качестве эталона заменяемым) вариантом. Базовым вариантом, как правило, служит лучшее по показателям однотипное мероприятие, широко применяемое в регионе.

Для экономической оценки мероприятий организуется производственный опыт. Для опытов следует выбрать участок, однородный по рельефу, почвенному типу, сортовому

и возрастному составу растений, уровню плотности вредных организмов, агротехническим и другим условиям.

По каждому варианту опыт проводится, как правило, в трех повторностях. Размер и форма делянок и их размещение должны удовлетворять требованиям механизированного выполнения работ по возделыванию сельскохозяйственных культур и уборке урожая. Целесообразнее удлиненная форма делянок. При малом количестве вариантов обычно применяют последовательное их размещение в пределах каждой повторности.

В отчетной документации по каждому опыту отражаются сведения:

1. Общая характеристика опытного участка (тип почвы, механический состав, численность вредных организмов и т. д.);

2. Агротехнические условия проведения опыта (обработка почвы, удобрения, сроки и нормы посева культуры, сорт и приемы ухода за посевами);

3. Погодные условия;

4. Описание опыта (схема опыта, размер делянок, повторность, срок и способ применения пестицидов и других средств защиты растений, используемая аппаратура, нормы применения препаратов, расход жидкости, сроки и методы учета биологической эффективности и урожая, особенности технологических приемов и организации работ);

5. Результаты опыта и пояснения к ним.

## 2. Определение исходных показателей экономической оценки

### 2.1. Затраты, связанные с обеспечением фитосанитарных мероприятий

В соответствии с Налоговым Кодексом (часть 2), статья 318, расходы на производство и реализацию подразделяются на прямые и косвенные. (в ред. Федеральных законов от 29.05.2002 №57-ФЗ, от 06.06.2005 №58-ФЗ, 24.07.2009 №213-ФЗ).

К прямым расходам могут быть отнесены:

- материальные затраты (семена, удобрения, пестициды, дизельное топливо и т.д.);
- расходы на оплату труда персонала, участвующего в процессе производства товаров, выполнения работ, оказания услуг с учетом страховых начислений;
- суммы начислений амортизации по основным фондам, используемым при производстве товаров, работ и услуг.

Перечень прямых расходов, связанных с производством товаров, выполнением работ, оказанием услуг, налогоплательщик определяет самостоятельно в соответствии с учетной политикой учреждения (организации, предприятия).

К косвенным расходам за исключением внереализационных расходов относятся все иные суммы расходов, определяемых в соответствии со статьей 265 Налогового Кодекса (часть 2), осуществляемых налогоплательщиком в течение отчетного текущего (налогового) периода. В расходы текущего периода в аналогичном порядке включаются и внереализационные расходы.

В состав затрат, связанных с защитой растений, входят стоимость пестицидов или других материальных средств; заработная плата; затраты на фитосанитарный мониторинг; амортизация основных фондов; расходы на текущий ремонт и техническое обслуживание; накладные расходы; оплата услуг хозрасчетных организаций, выполняющих работу на договорных началах; затраты на уборку, транспортировку и доработку сохраненного урожая.

#### 2.1.1. Расходы на оплату труда

Расходы на оплату труда складываются из заработной платы специалистов и рабочих, обеспечивающих выполнение фитосанитарных мероприятий, включая работы по применению средств защиты растений и проведение фитосанитарного мониторинга и др.

При определении затрат на оплату труда исходят из следующих условий. Конкретные виды работ, в зависимости от их сложности, выполняются специалистами различного уровня квалификации, что определяется должностными обязанностями и условиями контракта.

Трудовые затраты на выполнение операций определяются с использованием официальных нормативных материалов, а также на основе обобщения многолетних данных и экспертных оценок ведущих специалистов, имеющих многолетний опыт по данному направлению работ.

Норма рабочего времени за месяц установлена на основе производственного календаря текущего года при 40-часовой рабочей неделе – 165 час.

В расходы на оплату труда включаются любые начисления работникам в денежной и (или) натуральной формах, стимулирующие начисления и надбавки, компенса-

ционные начисления, связанные с режимом работы или условиями труда, премии и единовременные поощрительные начисления, расходы, связанные с содержанием этих работников, предусмотренные нормами законодательства Российской Федерации (ст. 255 Налогового Кодекса, часть 2., в ред. Федерального закона от 29.05.2002 N 57-ФЗ, 30.12.2006 №197-ФЗ ст.22 (в ред. от 03.07.2016.), от 24.11.2014 №366-ФЗ, от 29.11.2014 №382-ФЗ, Трудовой Кодекс. Федеральный закон от 04.12.2006 №202-ФЗ, от 05.08.2008 № 583 (в ред. от 10.12.2016 г.). Постановление правительства РФ от 05.08.2008 №583 “О введении новых систем оплаты труда работников федеральных органов, а также гражданского персонала воинских частей, учреждений и подразделений федеральных органов исполнительной власти, в которых законом предусмотрена военная и приравненная к ней служба, оплата труда которых в настоящее время осуществляется на основе Единой тарифной сетки по оплате труда работников федеральных государственных учреждений” (Собрание законодательства Российской Федерации, 2008, №33, ст. 3852, №40, ст. 4544). Приказы Минздравразвития России от 29 декабря 2007 г. № 822 и от 29 мая 2008 г. №247), трудовыми договорами (контрактами) и (или) коллективными договорами. Уровень расходов на заработную плату определяется на основе разработанного в организации Положения об оплате труда.

Начисления на заработную плату определяются в соответствии с Федеральным законом №212-ФЗ от 24.07.2009 (в ред. Федеральных законов от 25.11.2009 №276-ФЗ, от 10.05.2010 №85-ФЗ, от 27.07.2010 №227-ФЗ, от 28.09.2010 №243-ФЗ, от 16.10.2010 №272-ФЗ, от 29.11.2010 №313-ФЗ, от 08.12.2010 №339-ФЗ, от 23.12.2010 №383-ФЗ, от 28.12.2010 №428-ФЗ, от 28.12.2010 №432-ФЗ, от 19.12.2016)

При расчете величины затрат на оплату труда и начислений учитываются затраты на оплату труда только тех работников, которые принимают непосредственное участие в выполнении работ (вспомогательный, технический и административно-управленческий персонал не учитываются).

Исходными данными для определения заработной платы являются также установленные в хозяйстве нормы выработки, действующие положения по оплате труда, тарифные ставки и расценки. Заработная плата на единицу обрабатываемой площади для каждого ( $Z_i$ ) вида работ определяется по формуле 1:

$$Z_i = \sum_{f=1}^g \frac{N_{if} \times T_{if}}{H} \quad (1),$$

где:

$N_{if}$  – уровень среднемесячной суммарной оплаты труда с начислениями работников, занимающих должности ( $f$ ) наименования, участвующих в выполнении ( $i$ ) вида работ, руб.;

$g$  – количество наименований должностей работников, участвующих в выполнении ( $i$ ) вида работ;

$f$  – номер должности работников текущего наименования, участвующих в выполнении ( $i$ ) вида работ ( $f=1 \dots g$ );

$H$  – норма рабочего времени за месяц на основе производственного календаря при 40-часовой рабочей неделе 165

час, а при вредном производстве (работе с пестицидами) 30-часовой рабочей неделе 124 час;

$T_{if}$  – время, затраченное работниками, занимающими должности ( $f$ ) наименования, на выполнение ( $i$ ) вида работ, час/га.

Суммарные прямые затраты на оплату труда с начислениями при выполнении всех видов в комплексе работ ( $Z$ ) определяются по формуле 2:

$$Z = \sum_{i=1}^k Z_i \quad (2),$$

где:

$k$  – количество видов работ ( $i=1 \dots k$ )

### 2.1.2. Определение затрат на амортизацию основных фондов

К основным фондам относятся производственные активы, используемые неоднократно или постоянно в течение длительного периода, но не менее одного года, для производства товаров, оказания рыночных и нерыночных услуг. Их классификация, установление сроков полезного действия, включение имущества в амортизационные группы и методы расчета сумм амортизации определены Налоговым Кодексом РФ.

Амортизируемым имуществом признаются имущество, результаты интеллектуальной деятельности и иные объекты интеллектуальной собственности, которые находятся у налогоплательщика на праве собственности, используются им для извлечения дохода и стоимость которых погашается путем начисления амортизации. Амортизируемым имуществом признается имущество со сроком полезного использования более 12 месяцев и первоначальной стоимостью более 100000 рублей (Налоговый Кодекс ст.ст.256-259, в ред. Федеральных законов от 29.05.2002 №57-ФЗ, от 24.07.2002 №110-ФЗ, от 06.06.2005 №58-ФЗ, от 24.07.2007 № 216-ФЗ, от 22.07.2008 №158-ФЗ, от 26.11.2008 №224-ФЗ, от 24.07.2009 №213-ФЗ, от 27.07.2010 № 229-ФЗ, 08.06.2015 №150-ФЗ, от 03.07.2016 №242-ФЗ).

Амортизируемое имущество распределяется по амортизационным группам в соответствии со сроком его полезного использования. Срок полезного использования определяется налогоплательщиком самостоятельно на дату ввода в эксплуатацию данного объекта амортизируемого имущества в соответствии с учетом классификации основных средств, утвержденной Правительством Российской Федерации. Амортизационные расходы исчисляются на основе балансовой стоимости в хозяйстве используемых основных средств (тракторов, сельскохозяйственных машин, пунктов по приготовлению рабочих растворов и т. д.), а также норм выработки и годовой загрузки техники. Затраты на амортизацию основных средств ( $A_i$ ), в прямых затратах по каждому виду работ (руб.) определяются как сумма амортизационных отчислений по формуле 3:

$$A_i = \sum_{u=1}^{n_i} \frac{B_{iu} \times M_{iu} \times E_{iu}}{100 \times L_u} \quad (3),$$

где:

$n$  – количество наименований оборудования, используемого в ( $i$ ) виде работ ( $u=1 \dots n$ );

$B_{iu}$  – балансовая стоимость оборудования ( $u$ ) наименования, используемого в ( $i$ ) виде работ, руб.;

$M_{iu}$  – норма амортизации для оборудования ( $u$ ) наименования, используемого в ( $i$ ) виде работ, за год в % к первоначальной его стоимости;

$E_{iu}$  – суммарное время использования комплекса оборудования ( $u$ ) наименования в ( $i$ ) виде работ, час/га;

$L_u$  – суммарное время использования комплекса оборудования ( $u$ ) наименования в течение года, час.

Суммарные прямые затраты на амортизацию основных фондов при выполнении всех видов в комплексе работ ( $A$ ) определяются по формуле 4:

$$A = \sum_{i=1}^k A_i \quad (4)$$

### 2.1.3. Определение затрат на электроэнергию

Затраты на электроэнергию, потребляемую электрооборудованием, в прямых затратах по каждому виду работ (руб.) определяются по формуле 5:

$$\Xi_i = \sum_{w=1}^{n_i} Q_{iw} \times E_{iw} \times \Pi \quad (5),$$

где:

$n_i$  – количество наименований электрооборудования, используемого в ( $i$ ) виде работ;

$Q_{iw}$  – мощность, потребляемая электрооборудованием ( $w$ ) наименования, используемым в ( $i$ ) виде работ, кВт;

$E_{iw}$  – суммарное время использования комплекса электрооборудования ( $w$ ) наименования в ( $i$ ) виде работ, час/га;

$\Pi$  – цена электроэнергии, руб./кВт час.

Суммарные прямые затраты на электроэнергию, потребляемую электрооборудованием при выполнении всех видов в комплексе работ ( $\Xi$ ), определяются по формуле 6:

$$\Xi = \sum_{i=1}^k \Xi_i \quad (6)$$

### 2.1.4. Определение затрат на расходные материалы в прямых затратах, включая расходы на пестициды

В соответствии со статьей 254 Налогового Кодекса (часть 2) (в ред. Федеральных законов от 29.05.2002 № 57-ФЗ, от 08.06.2005 № 58-ФЗ) к материальным прямым расходам относятся затраты:

- на приобретение сырья и (или) материалов, используемых в производстве товаров (выполнении работ, оказании услуг) и (или) образующих их основу, либо являющихся необходимым компонентом при производстве товаров (выполнении работ, оказании услуг);

- на приобретение комплектующих изделий, подвергающихся монтажу, и (или) полуфабрикатов, подвергающихся дополнительной обработке у налогоплательщика;

Стоимость материально-производственных запасов, включаемых в материальные расходы, определяется исходя из цен их приобретения (с учетом налога на добавленную стоимость и акцизов), включая комиссионные вознаграждения, уплачиваемые посредническим организациям, ввозные таможенные пошлины и сборы, расходы на транспортировку и иные затраты, связанные с приобретением материально-производственных запасов.

Затраты (руб.) на расходные материалы с учетом торговых наценок ( $R_i$ ) в прямых затратах по каждому виду работ определяются по формуле 7:

$$R_i = \sum_{y=1}^z \chi_{iy} \times D_{iy} \quad (7),$$

где:

$z$  – количество наименований расходных материалов, используемых при выполнении ( $i$ ) вида работ;

$\chi_{iy}$  – цена приобретения расходного материала ( $y$ ) наименования, используемого в ( $i$ ) виде работ, в рублях;

$D_{iy}$  – количество расходного материала ( $y$ ) наименования, используемого в ( $i$ ) виде работ.

Суммарные прямые затраты на расходные материалы при выполнении всех видов работ ( $R$ ) определяются по формуле 8:

$$R = \sum_i^k R_i \quad (8)$$

### 2.1.5. Определение комплекса прямых затрат на защиту растений по базовому и новому вариантам

Суммарные прямые затраты на защиту растений определяются по базовому ( $C_{пзб}$ ) и новому ( $C_{пзн}$ ) вариантам раздельно с использованием формул 9 и 10:

$$C_{пзб} = (3+A+R+\Theta)$$

с исходной информацией по базовому варианту (9);

$$C_{пзн} = (3+A+R+\Theta)$$

с исходной информацией по новому варианту (10).

### 2.1.6. Расчет затрат на общехозяйственные (прочие) расходы

Прочие (общехозяйственные) расходы ( $O$ ) на производство и реализацию включают (ст. 264 Налогового Кодекса в ред. Федеральных законов от 29.05.2002 N 57-ФЗ, от 06.06.2005 N 58-ФЗ, от 30.12.2006 N 268-ФЗ, от 22.07.2008 N 158-ФЗ, от 30.12.2008 N 313-ФЗ, от 17.07.2009 N 161-ФЗ, от 27.07.2010 N 229-ФЗ, от 28.12.2010 N 395-ФЗ, от 07.06.2011 № 132-ФЗ, от 03.07.2016 № 2016 №243-ФЗ): – арендные платежи за арендуемое имущество; – аренда земельных участков; – оплата труда АУП (административно-управленческого персонала); – взносы, вклады, обязательные платежи; – другие расходы, связанные с производством и реализацией; – канцелярские расходы; – командировочные расходы; – комиссионные сборы; маркетинговые расходы; – материальные общехозяйственные расходы; – налоги и сборы (транспортный, экология и пр. региональные налоги и сборы); – пособия по временной нетрудоспособности за счет предприятия; – почтовые, телефонные расходы, телеграф; – представительские расходы; – расходы на аудиторские услуги; – расходы на нотариальные услуги; – расходы на обеспечение нормальных условий труда; – расходы на подготовку и переподготовку кадров; – расходы на содержание транспорта; – расходы на услуги по ведению бухгалтерии; – расходы на юридические, информационные, консультационные услуги; – расходы на содержание помещений; – расходы по договорам гражданско-правового характера и с юридическими лицами.

Затраты на общехозяйственные расходы колеблются в пределах от 15 до 50% по отношению к прямым затратам в соответствии с принятой в учреждении учетной политикой. Определение общехозяйственных расходов производится по базовому и новому вариантам раздельно на основе данных, полученных при анализе предшествующего опыта в хозяйстве по формулам 11 и 12:

$$O_{зб} = \frac{C_{пзб}}{100} \times v \quad (11);$$

$$O_{зн} = \frac{C_{пзн}}{100} \times v \quad (12),$$

где:

$v$  – коэффициент для расчета затрат на общехозяйственные расходы, %.

### 2.1.7. Определение затрат на внереализационные расходы

В состав внереализационных расходов ( $B$ ), не связанных с производством и реализацией (в соответствии со статьей 254 Налогового Кодекса в ред. Федеральных законов от 29.05.2002 N 57-ФЗ, от 06.06.2005 N 58-ФЗ, от 27.07.2006 N 1Э7-ФЗ, от 26.11.2008 N 224-ФЗ, от 25.11.2009 N 281-ФЗЛ), включаются обоснованные затраты на осуществление деятельности, непосредственно не связанной с производством и (или) реализацией. К таким расходам относятся, в частности:

- расходы на содержание переданного по договору аренды (лизинга) имущества (включая амортизацию по этому имуществу);

- расходы в виде процентов по долговым обязательствам любого вида, в том числе процентов, начисленных по ценным бумагам и иным обязательствам;

- расходы в виде отрицательной курсовой разницы, возникающей от переоценки имущества в виде валютных ценностей;

- расходы на ликвидацию выводимых из эксплуатации основных средств, на списание нематериальных активов;

- расходы на услуги банков, включая услуги, связанные с продажей иностранной валюты при взыскании налога, сбора, пени и штрафа в порядке, предусмотренном статьей 46 настоящего Кодекса, с установкой и эксплуатацией электронных систем документооборота между банком и клиентами, в том числе систем «клиент-банк»;

- потери от стихийных бедствий, пожаров, аварий и других чрезвычайных ситуаций, включая затраты, связанные с предотвращением или ликвидацией последствий стихийных бедствий или чрезвычайных ситуаций;

- возмещение потерь урожая, связанное с проведением НИР.

Затраты на внереализационные расходы ( $B_{зб}$  и  $B_{зн}$ ) определяются в соответствии с принятой в учреждении учетной политикой в процентном отношении к сумме общих прямых затрат и затрат на общехозяйственные расходы по формулам 13 и 14:

$$B_{зб} = \frac{C_{пзб} + O_{зб}}{100} \times v_2 \quad (13);$$

$$B_{зн} = \frac{C_{пзн} + O_{зн}}{100} \times v_2 \quad (14),$$

где:

$v_2$  – коэффициент для расчета затрат на внереализационные расходы, % (по данным исследований внереализационные расходы составляют около 0.8% по отношению к сумме прямых затрат и затрат на общехозяйственные расходы).

### 2.1.8. Определение плановой прибыли

Плановая прибыль по базовому и новому вариантам ( $P_б$  и  $P_н$ ) определяется в денежном выражении на основе процентного отношения к сумме прямых затрат, общехозяйственных и внереализационных расходов, т.е. затрат на производство, работы, услуги и активы организации в сельском хозяйстве (8.4% в соответствии с Приказом ФНС РФ от 22.09.2010 № ММВ-7-2/461) по формулам 15 и 16:

$$P_{зб} = \frac{C_{пзб} + O_{зб} + B_{зб}}{100} \times v_3 \quad (15);$$

$$P_{зн} = \frac{C_{пзн} + O_{зн} + B_{зн}}{100} \times v_3 \quad (16),$$

где

$v_3$  – коэффициент для определения плановой прибыли учреждения – 8.4%.

**2.1.9. Определение итоговых затрат на проведение фитосанитарных мероприятий по базовому и новому вариантам ( $C_{сзб}$  и  $C_{сзн}$ ):**

$$C_{сзб} = C_{пзб} + O_{зб} + B_{зб} + P_{зб} \quad (17);$$

$$C_{сзн} = C_{пзн} + O_{зн} + B_{зн} + P_{зн} \quad (18).$$

## 2.2. Учет урожая

Очень важно обеспечить одновременность уборки урожая со всех делянок опыта. Отступления могут быть, когда различия в сроках уборки предусмотрены программой эксперимента. В зависимости от особенностей сельскохозяйственных культур учет урожая проводят с использованием средств механизации сплошным способом на выделенных учетных полосах или вручную на учетных площадках. При отсутствии защитных полос между вариантами учетные полосы и площадки следует выделять в центральной части делянки на расстоянии не менее 10 м от ее границ при использовании штанговых опрыскивателей и не менее 30 м при использовании вентиляторной аппаратуры.

При уборке урожая необходимо учитывать характер повреждения и поражения растений различными вредителями и болезнями. Так, например, в результате повреждения зерновых культур гессенской мухой при механизированной уборке значительная часть полеглих и сломанных растений остается в поле и происходят дополнительные потери зерна.

При учете урожая важно выявить не только количественную, но и качественную стороны. Показателями качества продукции для различных культур могут быть, к примеру, содержание клейковинного белка в зерне, стандартность клубней картофеля, содержание сахаров в винограде, корнях сахарной свеклы, номерность и выход волокна прядильных культур, сортность плодов и т. д. Показатели урожайности и прироста урожая, а также качества продукции подлежат тщательному анализу и статистической обработке.

## 2.3. Оценка урожая и затрат на уборку и доработку дополнительного урожая

Стоимость продукции в каждом варианте складывается из стоимости основной и побочной продукции. Основ-

ную продукцию оценивают по ценам реализации с учетом ее качественных показателей. Побочная продукция переводится в основную посредством установленных коэффициентов. Например, продукция на корм скоту, цены на которую не установлены, обычно приравнивается, исходя из питательности, к соответствующему количеству овса.

В целом, стоимость продукции в новом и базовом вариантах в расчете на единицу площади можно рассчитать по формулам:

$$V_{пн} = \sum V_{ни} \times C_i \quad (19) \text{ и}$$

$$V_{пб} = \sum V_{би} \times C_i \quad (20),$$

где:

$V_{ни}$  и  $V_{би}$  – продукция (i) качества в натуральном выражении в расчете на единицу площади в новом и базовом вариантах, соответственно, ц/га;

$C_i$  – цена реализации продукции (i) качества, руб./ц.

Затраты на уборку и доработку дополнительного урожая ( $V_{убор}$ ) можно рассчитать по формуле 21:

$$\Delta V_{убор} = (\sum V_{ни} - \sum V_{би}) \times Z_{убор} \quad (21),$$

где:

$Z_{убор}$  – затраты на уборку и доработку продукции по данным хозяйства, руб./ц.

## 2.4. Анализ результатов экономической оценки

Полученные данные эксперимента позволят установить степень влияния нового комплекса фитосанитарных мероприятий на рост урожайности сельскохозяйственных культур ( $\Delta V_{урож}$ ) и качества продукции в условиях предприятия, а также дополнительную стоимость урожая ( $\Delta V_{ст.ур}$ ), дополнительные затраты на фитозащиту ( $\Delta C_{затр}$ ) с использованием формул 22; 23; 24:

$$\Delta V_{урож} = \sum V_{ни} - \sum V_{би} \quad (22);$$

$$\Delta V_{ст.ур} = V_{пн} - V_{пб} \quad (23);$$

$$\Delta C_{затр} = C_{сзн} - C_{сзб} \quad (24).$$

Основными показателями экономической оценки являются годовой экономической эффект ( $\Delta_{год}$ ), и рентабельность мероприятий ( $R_{рент}$ ), которые могут быть рассчитаны на основе формул 25 и 26:

$$\Delta_{год} = \Delta V_{ст.ур} - \Delta C_{затр} - \Delta V_{уб} \quad (25);$$

$$R_{рент} = \frac{\Delta_{год}}{\Delta C_{затр} + \Delta V_{уб}} \quad (26).$$

Следует отметить, что полученные данные экономической оценки будут отражать только конкретные условия эксперимента и не могут без должного обсуждения переноситься на региональный уровень.

### ПРИМЕР РАСЧЕТА (исходные данные условны)

Цель работы – оценка экономической эффективности применения новой системы защиты картофеля в период вегетации от комплекса возбудителей заболеваний в условиях Северо-Западного региона РФ.

Опыты были выполнены на базе ОАО «Балтика», Гатчинского района, Ленинградской области. Картофель является одной из основных товарных культур хозяйства. Сорт картофеля Елизавета, широко районированный в ре-

гионе. Тип почвы суглинистые; содержание гумуса около 2.1; pH около 5.0; предшественник зернобобовые. В послеуборочный период на поле под посадку картофеля применили гербициды сплошного действия. Осенью проведено лущение стерни и зяблевая вспашка. Весной проведена культивация с боронованием и безотвальная вспашка, а также нарезка гребней. Посадка клубней проведена с 15 по 18 мая. Посадочный материал был качественный и по



фитосанитарному состоянию соответствовал ГОСТу Р 53136-2008. В борьбе с однолетними двудольными и злаковыми сорными растениями на поле проведена одна обработка гербицидом Зенкор Техно, ВДГ при высоте ботвы около 5 см.

Из общей площади поля 13 га был выделен опытный участок около 6 га (длина гона – 200 м). Полевые опыты проводились в соответствии с принятыми методическими указаниями по регистрационным испытаниям пестицидов. Программой эксперимента предусмотрено два варианта опыта. Размер каждой делянки около одного гектара в трехкратной повторности. В каждой делянке выделена защитная полоса в 10 м. Новым (опытным) вариантом предусматривалась трехкратная обработка посадок картофеля препаратами: Ридомил Голд МЦ СП (640+40 г/кг) – 2.5 кг/га; Ордан СП (689+42 г/кг) – 2.0 кг/га; Сектин ВДГ (500+100 г/кг) – 1 кг/га. В базовом варианте запланировано две обработки. Первая обработка профилакти-

ческая препаратом Ордан СП (689+42 г/кг) – 2.0 кг/га и вторая обработка фунгицидом Оксихом СП (670+150 г/кг) – 2.0 кг/га. Первые профилактические обработки на всех делянках проведены тракторным опрыскивателем в оптимальные сроки до смыкания рядков (высота растений около 15–20 см). Последующая 2-я обработка выполнена на всех делянках через 7 дней, так как погодные условия (частые дожди и высокие температуры способствовали проявлению комплекса возбудителей заболеваний). Третья обработка проведена только на опытных делянках через 7 дней после второй обработки. Перед уборкой проведена фитосанитарная оценка урожая. В опытном варианте защиты картофеля пораженных фитофторозом и альтернариозом клубней не было выявлено. Развитие ризоктониоза составило 0.2%. В базовом варианте развитие фитофтороза и ризоктониоза составило около 0.7%, а альтернариоза – 0.2%.

### 1. Расчет затрат по базовому варианту

Таблица 1а. Перечень видов фитосанитарных работ, предусмотренных к оценке в базовом варианте

№ п.п.	Наименование вида работ (i)
1	Полевые работы по опрыскиванию растений картофеля с использованием тракторных опрыскивателей (2-кратно)
2	Работы по подвозке воды (рабочих растворов пестицидов) с использованием средств механизации, заправке опрыскивателей водой и рабочими растворами (2-кратно)
3	Проведение фитосанитарного предуборочного мониторинга поражения клубней болезнями

Таблица 2а. Справочная информация и расчет затрат на оплату труда с начислениями исполнителей по базовому варианту

№ п.п.	Должность исполнителя (f)	Среднемесячная оплата труда с начислениями, руб. ( $N_{if}$ )	Затраты труда на выполнение работ, час/га ( $T_{if}$ )	Затраты на оплату труда, руб./га $Z_i = \sum_{f=1}^g \frac{N_{if} \times T_{if}}{H}$
1	Тракторист на работах с использованием опрыскивателя растений.	– Заработная плата по тарифу составляет 56.0 руб./га при выполнении нормы 16 га (за 6 часовую смену). Таким образом в расчете за смену тарифная ставка составит (56 x 16) 896 руб., за час (896: 6) 149.33 руб., за месяц – (149.33 x 124) 18517.33 руб. Доплаты: – за вредные условия (20%) – 3703.47 руб.; – резерв на отпуски (10%) – 1851.73 руб.; – начисления (30.2%) – 7269.91 руб. Итого издержки на оплату труда с начислениями в среднем за месяц составят <b>31342.44 руб.</b>	$T_{if} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратном применении – <b>0.75 час/га</b>	$Z_i = 189.57 \text{ руб./га}$
2	Тракторист на работах по подвозке воды (рабочего раствора) и заправке опрыскивающего агрегата.	– Заработная плата по тарифу (80% от зарплаты тракториста на опрыскивании). Итого издержки на оплату труда с начислениями в среднем за месяц составят $31342.44 : 100 \times 80 = 25073.95 \text{ руб.}$	$T_{if} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратном применении – <b>0.75 час/га</b>	$Z_i = 151.66 \text{ руб./га}$
6	Специалист, проводящий работы по фитосанитарному мониторингу.	Оклад агронома за месяц 20000 руб. За 8 часовый рабочий день может быть обследовано 3 поля по 10 га. Резерв на отпуск (10%) – 2000 Начисления (30.2%) – 6644 руб. Расходы на оплату труда с начислениями составят за месяц <b>28644.00 руб.</b>	$T_{if} = 8 : 30 = 0.267$ <b>час/га</b>	$Z_i = 46.35 \text{ руб./га}$
ИТОГО				$Z = \sum_{i=1}^k Z_i = 387.58 \text{ руб./га}$

Таблица 3а. Справочная информация и расчет затрат на использование основных средств по базовому варианту

№ п.п.	Основные средства	Балансовая стоимость, руб., $B_{iu}$	Суммарное время использования (и) оборудования в течении года, час, $L_{iu}$	Годовая норма амортизационных отчислений, % $M_{iu}$	Затраты времени использования технических средств, час/га. $E_{iu}$	Затраты на амортизацию, руб./га $A_i = \sum_{u=1}^{ni} \frac{B_{iu} \times M_{iu} \times E_{iu}}{100 \times L_{iu}}$
1	Трактор МТЗ-80	1200000	1000	20	При времени смены 6 час и норме выработки за смену 16 га $E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратной обработке – <b>0.75 час/га</b>	<b><math>A_i = 180.0</math> руб./га</b>
2	Опрыскиватель ОП-2000 серии “Руслан”	350000	160	16.7	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратной обработке – <b>0.75 час/га</b>	<b><math>A_i = 273.98</math> руб./га</b>
3	Трактор МТЗ-80 на подвозке рабочего раствора и заправки опрыскивателя	1200000	1000	20	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратном применении – <b>0.75 час/га</b>	<b><math>A_i = 180.0</math> руб./га</b>
4	Прицеп с емкостью 1200 л для подготовки рабочего раствора, его транспортировки и заправки опрыскивателя	150000	160	10	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при двукратном применении – <b>0.75 час/га</b>	<b><math>A_i = 70.31</math> руб./га</b>
ИТОГО						<b><math>A = \sum_{i=1}^k A_i = 704.29</math> руб./га</b>

Таблица 4а. Справочная информация и расчет затрат на расходные материалы в прямых затратах по базовому варианту

Виды (i) работ (шифр)	Наименование расходных материалов	Ед. изм.	Потребность	Цена, руб. за ед. изм.	Затраты на приобретение, руб./га $R_i = \sum_{y=1}^z C_{iy} \times D_{iy}$
	1. Фунгицид Ордан СП (689+42 г/кг) 2. Дизельное топливо	кг/га л/га	2.0 2.5	316.0 35.0	632.0 + 87.5 = <b>719.5</b>
	1. Фунгицид Оксихом (670+150 г/кг) 2. Дизельное топливо	кг/га л/га	2.0 2.5	629.0 35.0	1258.0 + 87.5 = <b>1345.5</b>
ИТОГО					<b><math>R = \sum_i R_i = 2065.0</math> руб./га</b>

5а. Определение суммы прямых затрат на защиту растений по базовому варианту.

$$C_{пзб} = (3+A+R+\text{Э}) = 387.58+704.29+2065.0+ 0=3156.87 \text{ руб./га}$$

6а. Определение затрат по базовому варианту на общехозяйственные расходы, составляющие 25 % от прямых.

$$O_{зб} = \frac{C_{пзб}}{100} \times v = 3156.87 : 100 \times 25 = 789.22 \text{ руб./га}$$

7а. Определение затрат по базовому варианту на внереализационные расходы (0.8 % от суммы прямых и общехозяйственных).

$$B_{зб} = \frac{C_{пзб} + O_{зб}}{100} \times v_2 = (3156.87 + 789.22) : 100 \times 0.8 = 31.57 \text{ руб./га}$$

8а. Определение плановой прибыли по базовому варианту (8.4 %).

$$P_{зб} = \frac{C_{пзб} + O_{зб} + B_{зб}}{100} \times v_3 = (3156.87 + 789.22 + 31.57) : 100 \times 8.4 = 334.12 \text{ руб./га.}$$

9а. Определение итоговых затрат по базовому варианту

$$C_{сзб} = C_{пзб} + O_{зб} + B_{зб} + P_{зб} = 3156.87 + 789.22 + 31.57 + 334.12 = 4311.78 \text{ руб./га}$$

## 2. Расчет затрат по новому варианту

Таблица 16. Перечень видов фитосанитарных работ, предусмотренных к оценке в новом варианте

№ п.п.	Наименование вида работ (i)
1	Полевые работы по опрыскиванию растений картофеля рабочим раствором фунгицидов с использованием тракторных опрыскивателей (3-кратно)
2	Работы по подвозке воды (рабочих растворов фунгицидов) с использованием средств механизации, заправке опрыскивателей водой и рабочими растворами (3-кратно)
3	Проведение предуборочного фитосанитарного мониторинга поражения клубней болезнями.

Таблица 26. Справочная информация и расчет затрат на оплату труда с начислениями исполнителей по новому варианту

№ п.п.	Должность исполнителя (f)	Среднемесячная оплата труда с начислениями, руб. ( $N_{if}$ )	Затраты труда на выполнение работ, час/га ( $T_{if}$ )	Затраты на оплату труда, руб./га $Z_i = \sum_{f=1}^g \frac{N_{if} \times T_{if}}{H}$
1	Тракторист на работах с использованием опрыскивателя растений	<p>– Заработная плата по тарифу оставляет 56.0 руб/га при выполнении нормы 16 га (за 6 часовую смену).</p> <p>Таким образом в расчете за смену тарифная ставка составит (56 x 16) 896 руб., за час (896 : 6) 149.33 руб., за месяц – (149.33 x 124) 18516.92 руб.</p> <p>Доплаты: –за вредные условия (20%) – 3703.38 руб.; –резерв на отпуска (10%) – 1851.69 руб.; –начисления (30.2%) – 7269.74 руб.</p> <p>Итого издержки на оплату труда с начислениями в среднем за месяц составят: <b>31341.73 руб.</b></p>	<p><math>T_{if} = 6 : 16 = 0.375</math>, а при трехкратном применении – <b>1.125 час/га</b></p>	<b><math>Z_i = 284.36</math> руб./га</b>
2	Тракторист на работах по подвозке воды (рабочего раствора) и заправке опрыскивающего агрегата	<p>– Заработная плата по тарифу (80% от зарплаты тракториста на опрыскивании);</p> <p>Итого издержки на оплату труда с начислениями в среднем за месяц составят: 1516.57 : 100 X 80 = <b>25073.38 руб.</b></p>	<p><math>T_{if} = 6 : 16 = 0.375</math>, а при трехкратном применении – <b>1.125 час/га</b></p>	<b><math>Z_i = 227.49</math> руб./га</b>
6	Специалист, проводящий работы по фитосанитарному мониторингу	<p>Оклад агронома за месяц 20000 руб.</p> <p>За 8 часовый рабочий день может быть обследовано 3 поля по 10 га.</p> <p>Резерв на отпуск (10%) – 2000 Начисления (30.2%) – 6644 руб.</p> <p>Расходы на оплату труда с начислениями составят за месяц <b>28644 руб.</b></p>	<p><math>T_{if} = 8 : 30 = 0.267</math>, час/га</p>	<b><math>Z_i = 46.35</math> руб./га</b>
ИТОГО				<b><math>Z = \sum_{i=1}^k Z_i = 558.20</math> руб./га</b>

Таблица 36. Справочная информация и расчет затрат на использование основных средств по новому варианту

№ п.п.	Основные средства	Балансовая стоимость, руб. $B_{iu}$	Суммарное время использования (u) оборудования в течении года, час $L_{iu}$	Годовая норма амортизационных отчислений, % $M_{iu}$	Затраты времени использования технических средств, час/га. $E_{iu}$	Затраты на амортизацию, руб./га $A_i = \sum_{u=1}^{ni} \frac{B_{iu} \times M_{iu} \times E_{iu}}{100 \times L_u}$
1	Трактор МТЗ-80	1200000	1000	20	При времени смены 6 час и норме выработки за смену 16 га $E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при трехкратной обработке – <b>1.125 час/га</b>	<b><math>A_i = 270.0</math> руб./га</b>
2	Опрыскиватель ОП-2000 серии “Руслан”	350000	160	16.7	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при трехкратной обработке – <b>1.125 час/га</b>	<b><math>A_i = 410.98</math> руб./га</b>
3	Трактор МТЗ-80 на подвозке рабочего раствора и заправки опрыскивателя	1200000	1000	20	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при трехкратном применении – <b>1.125 час/га</b>	<b><math>A_i = 270.0</math></b>
4	Прицеп с емкостью 1200 л для подготовки рабочего раствора, его транспортировки и заправки опрыскивателя	150000	160	10	$E_{iu} = 6 : 16 = 0.375$ , а при трехкратном применении – <b>1.125 час/га</b>	<b><math>A_i = 105.47</math> руб./га</b>
ИТОГО						<b><math>A = \sum_{i=1}^k A_i = 1056.45</math> руб./га</b>

Таблица 46. Расходные материалы в прямых затратах и их стоимость в новом варианте

Наименование расходных материалов	Ед. изм.	Потребность	Цена, руб. за ед. изм.	Затраты на приобретение, руб./га $R_i = \sum_{y=1}^z C_{iy} \times D_{iy}$
1. Фунгицид Ридомил Голд МЦ СП (640+40 г/кг)	кг/га	2.5	420.5	1051.25 + 87.5 = <b>1138.75</b>
2. Дизельное топливо	л/га	2.5	35.0	
1. Фунгицид Ордан СП (689+42 г/кг)	кг/га	2.0	316.0	632.0 + 87.5 = <b>719.5</b>
2. Дизельное топливо	л/га	2.5	35.0	
1. Фунгицид Сектин ВДГ (500+100 г/кг)	кг/га	1.0	664.1	664.1 + 87.5 = <b>751.6</b>
2. Дизельное топливо	л/га	2.5	35.0	
ИТОГО				<b><math>R = \sum_i^k R_i = 2609.85</math> руб./га</b>

5б. Определение суммы прямых затрат на защиту растений по новому варианту.

$$C_{пзн} = (3+A+R+\Theta) = 558.20+1056.45+2609.85+0=4224.50 \text{ руб./га}$$

6б. Определение затрат по новому варианту на общехозяйственные расходы, составляющие 25% от прямых.

$$O_{зн} = \frac{C_{пзн}}{100} \times v^* = 4224.50 : 100 \times 25 = 1056.12 \text{ руб./га}$$

7б. Определение затрат по новому варианту на внереализационные расходы (0.8% от суммы прямых и общехозяйственных).

$$B_{зн} = \frac{C_{пзн} + O_{зн}}{100} \times v_2 = (4224.50 + 1056.12) : 100 \times 0.8 = 42.25 \text{ руб./га}$$

8б. Определение плановой прибыли по новому варианту (8.4%).

$$P_{зн} = \frac{C_{пзн} + O_{зн} + B_{зн}}{100} \times v_3 = (4224.50 + 1056.12 + 42.25) : 100 \times 8.4 = 447.12 \text{ руб./га.}$$

9б. Определение итоговых затрат на защиту растений по новому варианту.

$$C_{сзн} = C_{пзн} + O_{зн} + B_{зн} + P_{зн} = 4224.50 + 1056.12 + 42.25 + 447.12 = 5769.99 \text{ руб./га}$$

## Экономическая оценка результатов

Таблица 5. Итоговая таблица по хозяйственной эффективности фитосанитарных мероприятий

Распределение клубней картофеля по фракциям по ГОСТ. Р 51808-2001	Новый вариант защиты картофеля			Базовый вариант защиты картофеля		
	ц/га $B_{Hi}$	Цена реализации картофеля, руб./кг	Выручка от реализации картофеля, руб./га	ц/га $B_{Bi}$	Цена реализации картофеля, руб./кг	Выручка от реализации картофеля, руб./га
1 класс	92.0	20.0	184000	30.0	20	60000
2 класс	72.0	15.0	108000	55.0	15	82500
нестандарт	20.0	4.0	8000	55.0	4	22000
ИТОГО	184 $\Sigma B_{Hi}$		300000.0 ( $B_{Pi}$ )	140.0 $\Sigma B_{Bi}$		164500 ( $B_{Pi}$ )

Дополнительный урожай ( $\Delta B_{урож} = \Sigma B_{Hi} - \Sigma B_{Bi} = 184 - 140 = 44$  ц/га.

Стоимость дополнительного урожая  $\Delta B_{ст.ур} = B_{Pi} - B_{Pi} = 300000 - 164500 = 135500$  руб./га.

Таблица 6. Итоговая таблица по экономической эффективности применения нового варианта защиты картофеля в сравнении с базовым вариантом

Наименование	Новый вариант защита картофеля	Базовый вариант защиты картофеля
Полученный урожай, ц/га	184	140
Сохраненный урожай, ц/га	44	—
Стоимость сохраненного урожая, руб./га	135500	—
Затраты на защиту растений, руб./га	5769.99	4311.78
Дополнительные затраты на защиту растений, руб./га	1458.21	—
Дополнительные затраты на уборку урожая, руб./га	22000.00	—
Чистый доход, руб./га	112041.79	—
Рентабельность, %	477.62	—

Дополнительные затраты на фитосанитарные мероприятия составили –

$$\Delta C_{затр} = C_{сзн} - C_{сзб} = 5768.99 - 4311.78 = 1458.21 \text{ руб./га.}$$

Затраты на уборку дополнительного урожая ( $Z_{убор}$ ), по экспертной оценке, – 500 руб./ц. Затраты на уборку всего дополнительного урожая  $\Delta B_{убор} = (\Sigma B_{Hi} - \Sigma B_{Bi}) \times Z_{убор} = (184 - 140) \times 500 = 22000$  руб./га.

Годовой экономический эффект  $\Delta_{год} = (\Delta B_{ст.ур} - \Delta C_{затр} - \Delta B_{уб}) = 135500 - 1458.21 - 22000 = 112041.79$  руб.

Рентабельность мероприятий =  $112041.79 : (1458.21 + 22000) \times 100 = 477.62\%$

Таким образом, применение новой системы в период вегетации растений, в условиях благоприятных для усиления патогенной активности комплекса возбудителей болезней, имеет высокий экономический эффект (более 112000 руб./га) и высокую рентабельность фитосанитарных мероприятий (около 480%). Однако полученных дан-

ных еще не достаточно для рекомендации системы к широкому использованию. Для этого необходимо накопление экспериментальных данных и их обобщение. Методические аспекты этого вопроса будут рассмотрены в последующей публикации.

## Библиографический список (References)

- Гончаров Н.Р. и кол. авторов. Нормативы расхода пестицидов (в кг на га обрабатываемой площади сельскохозяйственных культур и угодий) при обработке наземными машинами. (Утв. Председателем объединения «Союзсельхозхимия»). Москва. 1984. 190 с.
- Гончаров Н.Р., Колычев Н.Г., Черкасов В.А. Организация защиты растений. Москва: Россельхозиздат. 1985. 176 с.
- Гончаров Н.Р. и кол. авторов. Методические указания по разработке нормативов для планирования потребности сельского хозяйства в химических средствах защиты растений. (Утв. Академиком-секретарем отделения защиты растений ВАСХНИЛ). Москва. 1985. 60 с.
- Гончаров Н.Р. и кол. авторов. Нормативы затрат (руб. на га) на химическую обработку сельскохозяйственных растений от вредителей, болезней и сорняков наземными машинами. (Утв. Зам председателя объединения «Союзсельхозхимия»). Ленинград. 1989. 25 с.
- Гончаров Н.Р. и кол. авторов. Нормативы сохраняемого урожая от применения химических средств защиты растений (по данным научно-производственных опытов). (Утв. Зам председателя объединения «Союзсельхозхимия»). Ленинград. 1989. 72 с.
- Гончаров Н.Р., Долженко В.И., Каширский О.П. Нормативы энергетических затрат на пестициды при обработке наземными машинами. СПб. 1999. 68 с.
- Гончаров Н.Р. Экономические, организационные и правовые проблемы защиты растений. //Защита и карантин растений. 2006. №9. С.10–13.
- Гончаров Н.Р., Белякова Н.А., Тимофеев А.В., Козлова Е.Г. Методика определения экономических показателей массового производства энтомофагов. СПб. 2012. 32 с.
- Захаренко В.А., Гончаров Н.Р. Экономическая эффективность применения пестицидов. //Научные основы защиты растений (Ред. Ю.Н. Фадеев и К.В. Новожилов). Москва: Колос. 1984. С. 245–265.
- Лаптиев А.Б., Шпанев А.М., Гончаров Н.Р., Перетрухина А.В. Технология защиты яровых зерновых культур от комплекса вредных организмов на юго-востоке ЦЧЗ. СПб. 2010. 24 с.
- Лаптиев А.Б., Гончаров Н.Р., Хилевский В.А. Интегрированная защита пшеницы озимой в Ростовской области. //Сборник. Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов. 2015. С. 136–140.
- Новожилов К.В. и др. Сборник методических рекомендаций по защите растений. СПб. 1998. 306 с.

Павлюшин В.А. и др. Интегрированная защита озимой пшеницы. // Защита и карантин растений. 2015. №5. С. 38–71.  
 Ченкин А.Ф., Черкасов В.А., Захаренко В.А., Гончаров Н.Р. Справочник агронома по защите растений. Москва: Агропромиздат. 1990. 368 с.

Якуткин В.И., Таволжанский Н.П., Гончаров Н.Р. Система мероприятий и экономическая оценка защиты подсолнечника от болезней в центральной черноземной зоне России. СПб. 2010. 39 с.

#### Translation of Russian References

- Chenkin A.F., Cherkasov V.A., Zakharenko V.A., Goncharov N.R. Reference book for agronomist on plant protection. Moscow: Agropromizdat. 1990. 368 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R. Economic, organizational and legal problems of plant protection. *Zashchita i karantin rastenii*. 2006. N 9. P. 10–13. (In Russian).  
 Goncharov N.R. et al. Methodical instructions on development of standards for planning of need of agriculture for chemical means of plant protection. Moscow: 1985. 60 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R. et al. Standards of costs (rubles per hectare) on chemical treatment of agricultural plants against pests, diseases and weeds by land machines. Leningrad. 1989. 25 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R. et al. Standards of pesticide rate (in kg per hectare of treated area of crops and lands) at treatment by land machines. Moscow. 1984. 190 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R. et al. Standards of saved harvest at use of chemical means of plant protection (according to research and production trials). Leningrad. 1989. 72 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R., Belyakova N.A., Timofeev A.V., Kozlova E.G. Technique of definition of economic indicators of mass production of entomophages. St. Petersburg. 2012. 32 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R., Dolzhenko V.I., Kashirsky O.P. Standards of power expenditures on pesticides at treatment by land machines. St. Petersburg. 1999. 68 p. (In Russian).  
 Goncharov N.R., Kolychev N.G., Cherkasov V.A. Organization of plant protection. Moscow: Rosselkhozizdat. 1985. 176 p. (In Russian).  
 Laptiev A.B., Goncharov N.R., Khilevsky V.A. Integrated protection of winter wheat in Rostov region. In: *Sbornik. Agrotekhnicheskii metod zashchity rastenii ot vrednykh organizmov*. 2015. P. 136–140. (In Russian).  
 Laptiev A.B., Shpanev A.M., Goncharov N.R., Peretrakhina A.V. Technology of summer grain protection against complex of harmful organisms in the southeast of Central Chernozem Region. St. Petersburg. 2010. 24 p. (In Russian).  
 Novozhilov K.V. Collection of methodical recommendations on plant protection. St. Petersburg. 1998. 306 p. (In Russian).  
 Pavlyushin V.A. et al. Integrated protection of winter wheat. *Zashchita i karantin rastenii*. 2015. N5. P. 38–71. (In Russian).  
 Yakutkin V.I., Tavalzhansky N.P., Goncharov N.R. System of actions and economic assessment of sunflower protection against diseases in the Central Chernozem area of Russia. St. Petersburg. 2010. 39 p. (In Russian).  
 Zakharenko V.A., Goncharov N.R. Economic efficiency of pesticide use. In: Fadeev Y.N. and Novozhilov K.V., eds. *Nauchnye osnovy zashchity rastenii*. Moscow: Kolos. 1984. P. 245–265. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 44–54

## ECONOMIC EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF PLANT PROTECTION ACTIVITIES IN CONDITIONS OF SEPARATE EXPERIMENT: METHODOLOGICAL APPROACH

N.R. Goncharov

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

Based on the analysis of previous experience and modern legal framework in the Russian Federation, an algorithm is presented and methodological aspects of economic evaluation of plant protection measures in conditions of a separate experiment are presented. The material is considered on a concrete example.

**Keywords:** plant protection; economic efficiency; estimation technique.

#### Сведения об авторе

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608  
 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация  
 Гончаров Николай Романович. Зав. сектором,  
 e-mail: nrg@icZR.ru

#### Information about the author

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,  
 St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation  
 Goncharov Nicolay Romanovich. Head of Sector,  
 e-mail: nrg@icZR.ru

УДК 577:58.087

## РОСТ КОРНЕЙ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* L. С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ГЛУТАТИОНСИНТЕТАЗЫ РАПСА *BnGSH* ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

З.А. Бережнева<sup>1</sup>, А.Р. Кашафутдинова<sup>2</sup>, Б.Р. Кулуев<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Россия<sup>2</sup>Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Россия

Глутатион – жизненно важный элемент антиоксидантной системы растений, защищающий их клетки от окислительного стресса, вызванного действием различных неблагоприятных факторов внешней среды. Глутатионсинтетаза катализирует присоединение к дипептиду  $\gamma$ -глутамилцистеину аминокислоты глицина. Из литературных источников известно, что экспрессия генов, кодирующих глутатионсинтетазы, способствует повышению металлоустойчивости растений. Однако о роли глутатионсинтазы в регуляции и обеспечении роста растений при действии засоления и низких положительных температур известно очень мало. Исходя из этого, целью нашего исследования была оценка ростовых параметров корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при действии засоления, низких положительных температур и кадмия. Корни трансгенных растений табака росли лучше, чем у растений дикого типа как при выращивании в нормальных условиях, так и при действии всех трех стрессовых факторов.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, глутатион, глутатионсинтетаза, холод, солевой стресс, тяжелые металлы.

Глутатион – низкомолекулярный трипептид с высоким содержанием серы [Seth et al., 2012]. Он является одним из самых эффективных низкомолекулярных антиоксидантов и защищает растительную клетку от повреждающего действия активных форм кислорода (АФК), участвует в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала и целостности мембран, участвует в клеточном сигналинге, является запасной и транспортной формами серы в клетке, участвует в детоксикации ксенобиотиков и тяжелых металлов [Zhu et al., 1999; Pietrini et al., 2003; Noctor et al., 2011]. У растений глутатион является предшественником фитохелатинов, которые участвуют в детоксикации тяжелых металлов путем их хелатирования [Cobbett, Goldsbrough, 2002].

Молекула глутатиона – пептид, состоящий из остатков трех аминокислот: цистеина, глицина и глутамина [Carcia-Gimenez et al., 2013]. Синтез глутатиона осуществляется в два этапа. Первый из них включает образование  $\gamma$ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина и катализируется ферментом  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазой (GCS). Второй этап заключается в соединении  $\gamma$ -глутамилцистеина с глицином и катализируется ферментом глутатионсинтетазой (GS) [Meyer, 2008; Estrella-Gomez et al., 2012]. Синтез глутатиона в растительной клетке происходит в хлоропластах и цитоплазме [Mendoza-Cozatl et al., 2002; Гришко, Сыщиков, 2012]. Синтезируясь преимущественно в листьях, он по сосудам флоэмы и ксилемы транспортируется в клетки корня и плодов [Gomez, Pallas, 2004].

Повышение активности ферментов синтеза глутатиона (GSH) коррелирует с усилением экспрессии соответствующих генов  $\gamma$ -GCS и GS, при этом увеличивается и количество глутатиона в клетках [Xiang, Oliver, 1998; Li et al., 2006]. Имеются сведения, что заметное усиление биосинтеза глутатиона при стрессовых воздействиях наблюдает-

ся в основном при увеличении уровня экспрессии обоих генов  $\gamma$ -GCS и GS [Mendoza-Cozatl, Moreno-Sanchez, 2006].

Благодаря своим уникальным окислительно-восстановительным и нуклеофильным свойствам глутатион играет важную роль в защите растительных клеток от токсического действия тяжелых металлов [Chen et al., 2010]. Наличие в его молекуле SH-группы, которая содержит остаток цистеина, дает возможность связывать катионы тяжелых металлов, образуя комплексы, которые затем транспортируются в вакуоли. В настоящее время доказано, что образование такого комплекса и его транспорт через тонопласт является важным механизмом, обеспечивающим детоксикацию тяжелых металлов в клетках растений [Lux et al., 2011; Mendoza-Cózatl et al., 2011]. В формировании комплекса металл-GSH участвует фермент глутатион-S-трансфераза (GST), увеличение активности которой обнаружено в присутствии тяжелых металлов, таких как кадмий, свинец, медь, ртуть, кобальт и цинк [Титов и др., 2014].

Таким образом, из анализа литературных источников следует, что глутатион и ферменты глутатионового цикла играют важную роль в механизмах детоксикации тяжелых металлов в растительных клетках. Однако о роли глутатиона и глутатионсинтазы при действии других стрессовых факторов, таких как засоление и низкие положительные температуры почти ничего неизвестно. Засоление и низкие положительные температуры наряду с тяжелыми металлами являются существенным лимитирующим фактором для роста корней. Исходя из этого, целью данной работы была оценка параметров роста корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* не только при действии тяжелых металлов, но и при действии низких положительных температур и засоления.

### Материалы и методы

Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* (35S::*BnGSH*) были созданы методом агробактериальной трансформации листовых эксплантов (Kuluev et al., 2012). Ген глутатионсинтетазы *BnGSH* (XM\_013788447) амплифицировали из геномной ДНК рапса при помощи HiFi

ДНК-полимеразы (Кара Biosystems, USA) с использованием праймеров 5'-TGGGCGATGGCTGCTATTCTC-3' и 5'-TAAATGTAAAGAGCTTTGTCTAG-3'. Размер амплифицированного участка ДНК генома рапса, согласно теоретическим расчетам и результатам агарозного гель-электрофореза, составил 1689 п.н. Для морфометрического анализа были отобраны

линии трансгенных растений табака под номерами 4, 6, 8, 10, 12 и 13, характеризующиеся стабильным и высоким уровнем экспрессии трансгена как в листьях, так и в корнях. Для определения уровня содержания мРНК целевого гена использовали метод количественной ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием праймеров 5'-AATGCTTTGCTGGACTTTG-3' и 5'-ACCGCTCTGCTCGTTTATGAT-3'. В качестве стандарта использовали ген *EF-1a* (AF120093.1), уровень содержания мРНК которого принимали за 100%. Для ОТ-ПЦР гена *EF-1a* использовали праймеры 5'-GAATTGGTACTGTCCTGTT-3' / 5'-TTGCCAATCTGTCCTGAAT-3'.

Для морфометрического анализа трансгенные растения табака *N. tabacum* проращивали в климатостатах Binder (Германия) при температуре +25 °С, освещенности около 140 ммоль на кв. м в сек и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде с гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней

### Результаты

#### Рост корней трансгенных растений табака при действии низких положительных температур

Способность корней расти в условиях низких положительных температур является ценным признаком для культурных растений. Особенно это актуально при выращивании теплолюбивых южных растений в умеренной зоне, к каковым относится и табак. Нами был проанализирован прирост корней трансгенных растений табака при нормальных условиях (+25 °С) и при действии таких низких положительных температур, как +12 °С и +15 °С. При температуре +25 °С наиболее существенный рост корней наблюдался у линий 4 и 13 (увеличение длины в 2 раза) и линий 6 и 10 (в 1.3 раза) по сравнению с растениями дикого типа (рис. 1а).

При действии температуры +15 °С более быстрый, чем у контроля рост корней наблюдался у 5 линий: у линий 10 и 12 произошло увеличение длины корней в 3.3 раза, у линии 6 – в 2.5 раза, у линий 4 и 8 – увеличение в 1.5 раза по сравнению с диким типом (рис. 1б).

Было установлено, что при действии +12 °С рост корней как у дикого типа, так и у трансгенных растений замедлялся еще более существенно. Отметим, что у линий 8 и 10 скорость роста корней при действии данной температуры была выше, чем у контроля в 1.6 раза (рис. 1в). В целом у линии 10 наблюдалось наиболее существенное увеличение длины корней при действии холода по сравнению с другими линиями трансгенных растений.

#### Рост корней трансгенных растений табака при действии NaCl

Засоление почвы – распространенное явление, которое отрицательно сказывается на росте и урожайности растений. Так как NaCl содержится в почве, то этот стрессовый фактор оказывает свой отрицательный эффект, прежде всего, на рост корней растений. При нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с диким типом было выявлено у линий 4, 6, 10, 13, как и при экспериментах с выращиванием растений при низких положительных температурах. У линии 4 наблюдалось увеличение длины корней в 2 раза, у линии 13 – в 1.75 раза, у линий 6 и 10 – в 1.3 раза по сравнению с растениями дикого типа (рис. 2а).

При выращивании на среде с 50 мМ NaCl улучшенные по сравнению с диким типом скорости роста корней были обнаружены у линий 6, 10, 12, 13. У линии 13 наблюда-

переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС и по прошествии 10 дней с помощью миллиметровой линейки определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль), действии 50 мМ и 100 мМ NaCl, 100 мкМ, 200 мкМ и 400 мкМ ацетата кадмия; а также низких положительных температур +12 °С и +15 °С. Эксперименты, моделирующие солевой стресс и действие токсичного иона металла кадмия проводились при температуре +25 °С. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 дикого типа, выращенные в тех же условиях, как и трансгенные растения табака, только без добавления в среду МС гигромицина. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

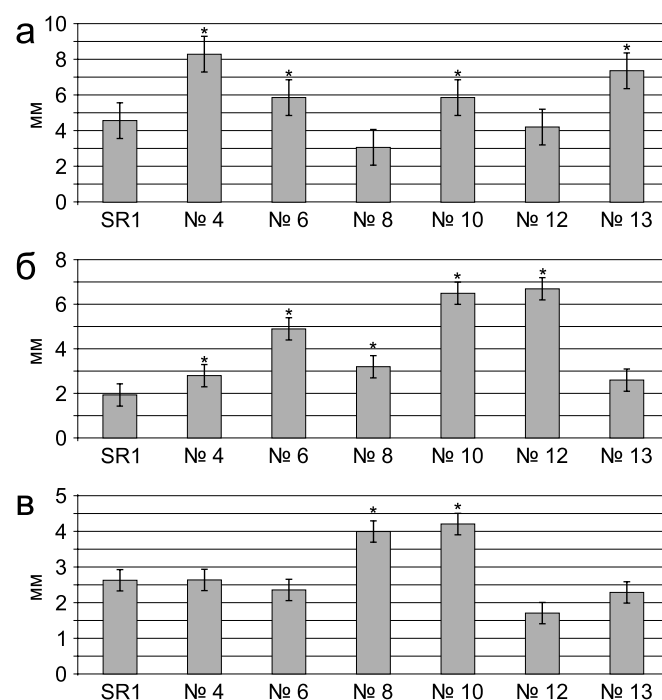


Рисунок 1. Удлинение корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при выращивании в течение 10 дней на вертикально ориентированных чашках Петри при различных температурах: а) +25 °С, б) +15 °С, в) +12 °С. SR1 – дикий тип, №4 – 13 – линии трансгенных растений табака.

лось увеличение длины корней в 2.2 раза, у линии 10 – в 1.6 раз, у линий 6 и 12 – в 1.3 раза (рис. 2б) по сравнению с длиной корней растений дикого типа.

При действии 100 мМ NaCl более быстрыми, чем у контроля темпами роста корней характеризовались линии 4, 8, 12 и 13. У линии 8 длина корней трансгенных растений увеличилась в 1.5 раза, а у линий 4, 12, 13 – в 1.25 раза. Остальные линии трансгенных растений не отличались по длине корней от растений дикого типа (рис. 2в).

#### Рост корней трансгенных растений табака при действии ацетата кадмия

Среди тяжелых металлов кадмий является одним из наиболее токсичных и распространенных элементов, оказывающих негативное воздействие на важнейшие физиологические и биохимические процессы жизнедея-



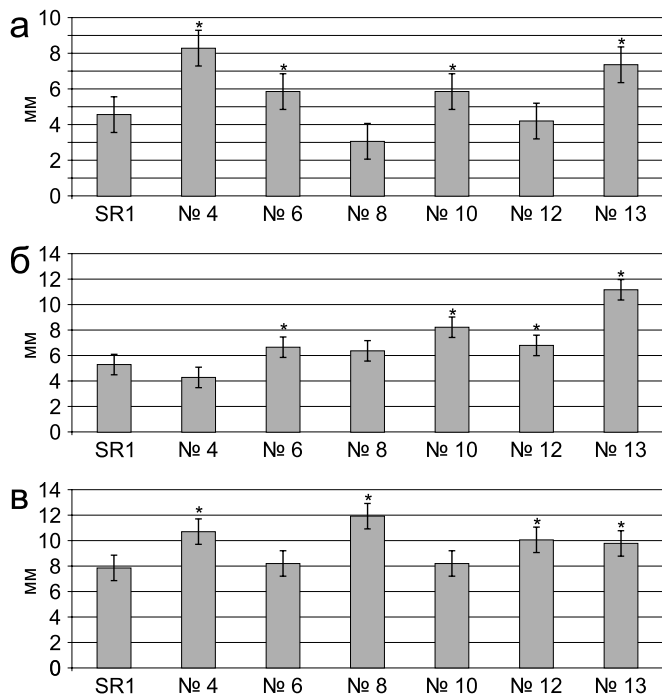


Рисунок 2. Удлинение корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при выращивании в течение 10 дней на вертикально ориентированных чашках Петри при различных концентрациях NaCl: а) 0 мМ, б) 50 мМ, в) 100 мМ.

тельности растений. В связи с этим представлял большой интерес изучение прироста корней трансгенных растений табака при добавлении ацетата кадмия в среду МС.

При добавлении ацетата кадмия в концентрации 100 мкМ, увеличенная по сравнению с контролем длина корней была характерна только для линий 4 (в 2 раза) и 6 (в 1.3 раза). При этом у остальных линий трансгенных растений длина корней сохранялась на уровне растений дикого типа (рис. 3а).

Результаты опыта показали, что при концентрации ацетата кадмия 200 мкМ увеличение длины корней по срав-

нению с контролем происходило у 5-ти линий. Для линии 10 было характерно увеличение длины корней в 8 раз, у линий 13 и 6 происходило увеличение длины корней в 4.4 и 3.8 раз соответственно, у линии 8 и 12 – в 2.5 раза по сравнению с длиной корней дикого типа (рис. 3б).

При действии 400 мкМ ацетата кадмия более быстрыми темпами роста корней, чем у дикого типа, характеризовались линии 4, 8, 10, 12 и 13. У линии 4 наблюдалось увеличение длины корней в 2 раза, у линии 12 – в 1.7 раза, у линии 6 и 10 – в 1.5 раза, у линии 13 в 1.3 раза по сравнению с длиной корней растений дикого типа (рис. 3в).

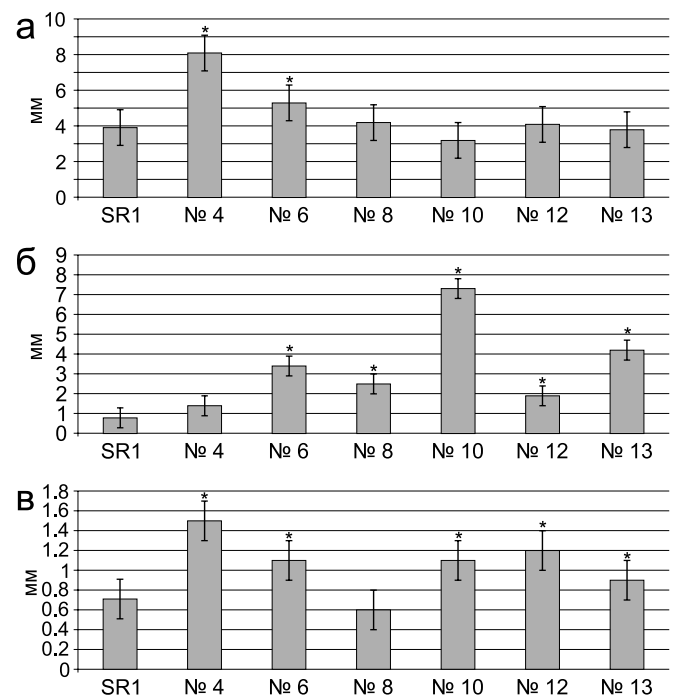


Рисунок 3. Удлинение корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при выращивании в течение 10 дней на вертикально ориентированных чашках Петри при различных концентрациях ацетата кадмия: а) 100 мкМ, б) 200 мкМ, в) 400 мкМ.

## Обсуждение

Ген *BnGSH* кодирует одну из глутатионсинтетаз рапса, участвующих в биосинтезе важнейшего антиоксиданта клетки – глутатиона. Нами были созданы трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией гена *BnGSH*. Для морфометрического анализа корней были отобраны линии трансгенных растений с высоким и примерно одинаковым уровнем экспрессии целевого гена.

При выращивании в условиях низких положительных температур более быстрые темпы роста корней трансгенных растений табака обнаруживались при +12°C у линий 8 и 10, а при +15°C – у линий 10 и 12. В целом большинство линий трансгенных растений, несмотря на высокий уровень экспрессии гена *BnGSH*, характеризовались меньшей длиной корней, чем растения дикого типа, при действии температуры +12°C. В то же время при температуре +15°C длина корней всех линий трансгенных растений увеличивалась по сравнению с растениями дикого типа. Исходя из этого, можно предполагать, что продукт гена *BnGSH* оказывает положительное влияние на рост растений в условиях умеренно низких положительных температур, таких как +15°C. Вероятнее всего +12°C для

корней табака является настолько низкой, что один лишь повышенный уровень экспрессии глутатионсинтетазы не может способствовать улучшению роста этого органа. В литературе имеются сведения о связи генов различных глутатион-зависимых ферментов с холодовым стрессом [Vijayakumar et al., 2016], однако что касается глутатионсинтетаз, такие сведения до наших исследований не обобщались. Итак, судя по нашим данным, глутатионсинтетазы могут играть положительную роль при росте корней в условиях небольшого уменьшения температуры грунта.

Совокупность всех полученных данных при выращивании трансгенных растений табака в условиях засоления позволяют делать вывод, что продукт гена *BnGSH* способствует повышению солеустойчивости. Улучшенными параметрами роста корней характеризовались линии 8 (при 100 мМ NaCl) и 13 (при 50 мМ NaCl). В литературе имеется информация как о том, что солеустойчивость может быть обусловлена повышением содержания в клетках глутатиона [Cheng et al., 2015], так и о том, что повышенная экспрессия генов глутатионсинтетаз может приводить к увеличению содержания глутатиона в клетках [Flocco et

al., 2004]. Исходя из этих данных, можно предположить, что изученные нами трансгенные растения табака характеризуются повышенным содержанием глутатиона. Однако, для подтверждения этого предположения требуются дополнительные исследования.

При выращивании трансгенных растений в условиях избытка тяжелых металлов повышенная стрессоустойчивость наблюдалась у линий 4 (100 мкМ и 400 мкМ ацетата кадмия) и 10 (200 мкМ ацетата кадмия). В целом большинство трансгенных растений при концентрациях 200 и 400 мкМ ацетата кадмия характеризовались более высокой устойчивостью к тяжелым металлам.

Торможение роста является одним из самых важных и наиболее легко регистрируемых проявлений токсичности тяжелых металлов в отношении растений [Ivanov et al., 2003; Титов и др., 2007]. Под влиянием тяжелых металлов у растений уменьшаются линейные размеры корней и побегов, снижается накопление биомассы. Наибольшее число исследований в этом направлении посвящено действию на растения кадмия, как одного из наиболее токсичных тяжелых металлов. Механизм воздействия тяжелых металлов на растяжение клеток связан, в первую очередь,

со снижением эластичности клеточных стенок, причинами которого являются образование ионами металлов прочных связей с SH-группами белков, входящих в ее состав, с повреждением структуры микротрубочек и нарушением водного режима клеток [Ivanov et al., 2003; Seregin, Kozhevnikova, 2004; Villiers et al., 2011]. Положительное действие глутатиона при кадмиевом стрессе может объясняться не только обезвреживанием АФК, но и тем, что глутатион непосредственно связывает ионы тяжелых металлов [Pilon-Smits, 2005]. Более того, глутатион является предшественником фитохелатинов, специфическая функция которых заключается в хелатировании и детоксикации тяжелых металлов [Postrigan, 2012; 2013].

Итак, в данной работе нами было показано, что ген *BnGSH* рапса может быть использован для улучшения роста корней при действии умеренно низких положительных температур, засоления и тяжелых металлов. Совокупность полученных нами результатов позволяет делать вывод о вовлеченности гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* в регуляцию роста корней, как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов.

#### Библиографический список

- Гришко В.Н., Сыщиков Д.В. Функционирование глутатионзависимой антиоксидантной системы и устойчивость растений при действии тяжелых металлов и фтора. Киев: Наук. думка, 2012. 238 с.
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Монография. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 170 с.
- Carcia-Gimenez J.L. Nuclear glutathione / Carcia-Gimenez J.L., Markovic J., Dasi F. / Biochem. Biophys. Acta. 2013. N. 1830. P. 3304–3316.
- Chen F. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in two barley genotypes differing in Cd tolerance / Chen F., Wang F., Wu F. / Plant Physiol. Biochem. 2010. N. 48. P. 6636–6672.
- Cheng M.C. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis / Cheng M.C., Ko K., Chang W.L., Kuo W.C., Chen G.H., Lin T.P. / Plant J. 2015. N. 83. P. 926–939.
- Cobbett C. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis / Cobbett C., Goldsbrough P. / Annu. Rev. Plant Biol. 2002. N. 53. P. 159–182.
- Estrella-Gomez N.E. Glutathione plays a role in protecting leaves of Sedium minima from Pb<sup>2+</sup> damage associated with changes in the expression of SmGS genes and increased activity of GS / Estrella-Gomez N.E., Sauri-Duch E., Zapata-Perez O., Santamaria J.M. / Environ. Exp. Bot. 2012. N. 75. P. 188–194.
- Flocco C.G. Overexpression of enzymes involved in glutathione synthesis enhances tolerance to organic pollutants in *Brassica juncea* / Flocco C.G., Lindblom S.D., Smits E.A. / Int J Phytoremediation. 2004. N. 6. P. 289–304.
- Gomez G. A long distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA / Gomez G., Pallas V. / J. Virol. 2004. N. 78. P. 10104–10110.
- Ivanov V.B. Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity / Ivanov V.B., Bystrova E.I., Seregin I.V. / Russ J Plant Physiol. 2003. N. 50 (3). P. 445–454.
- Kuluev B.R. Obtaining transgenic tobacco plants expressing conserved regions of the *AINTEGUMENTA* gene in antisense orientation / Kuluev B.R., Knyazev A.V., Lebedev Ya.P., Postrigan B.N., Chemeris A.V. / Russ J Plant Physiol. 2012. N. 59. P. 307–317.
- Li Y. The shoot-specific expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiolpeptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic / Li Y., Dhankher O.P., Carreira L. / Plant Physiol. 2006. N. 141. P. 288–298.
- Lux A. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review / Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P.J. / J. Exp. Bot. 2011. N. 62 (1). P. 21–37.
- Mendoza-Cozatl D. G. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis* / Mendoza-Cozatl D. G., Devars S., Loza-Tavera H., Moreno-Sanchez R. / Physiol. Plant. 2002. N. 115. P. 276–283.
- Mendoza-Cozatl D.G. Longdistance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic / Mendoza-Cozatl D.G., Jobe T.O., Hauser F., Schroeder J.I. / Curr. Opin. Plant Biol. 2011. N. 14. P. 554–562.
- Mendoza-Cozatl D.G. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants / Mendoza-Cozatl D.G., Moreno-Sanchez R. / J. Theor. Biol. 2006. N. 238 (4). P. 919–936.
- Meyer A.J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling / J. Plant Physiol. 2008. N. 165. P. 1390–1403.
- Noctor G. Glutathione / Noctor G., Queval G., Mhamdi A. / The Arabidopsis Book 9. 2011. P. 1–42.
- Pietrini F. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. / Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S., Massacci A. / Plant Physiol. 2003. N. 133 (2). P. 829–937.
- Pilon-Smits E. Phytoremediation / Annu. Rev. Plant Biol. 2005. N. 56. P. 15–39.
- Postrigan B.N. Effect of cadmium on promoter activity of rice phytochelatin synthase gene in transgenic tobacco plants / Postrigan B.N., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Chemeris A.V. / Russ J Plant Physiol. 2013. N. 60. P. 701–705.
- Postrigan B.N. Expression of the synthetic phytochelatin gene in tobacco / Postrigan B.N., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Yakhin O.I., Chemeris A.V. / Russ J Plant Physiol. 2012. N. 59. P. 275–280.
- Seregin I.V. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants / Seregin I.V., Kozhevnikova A.D. / Russ J Plant Physiol. 2006. N. 53. P. 285–308.
- Seth C.S. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione / Seth C.S., Remans T., Keunen E. / Plant Cell Environ. 2012. N. 35. P. 334–346.
- Vijayakumar H., Glutathione transferases superfamily: cold-inducible expression of distinct *GST* genes in *Brassica oleracea* / Vijayakumar H., Thamilarasan S.K., Shanmugam A., Natarajan S., Jung H.J., Park J.I., Kim H., Chung M.Y., Nou I.S. / Int J Mol Sci. 2016. N. 17.
- Villiers F. Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches / Villiers F., Ducruix C., Hugouvieux V. / Proteomics. 2011. N. 11. P. 1650–1663.
- Xiang C. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis / Xiang C., Oliver D.J. / Plant Cell. 1998. N. 10. P. 1539–1550.
- Zhu Y.L. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance / Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Jouanin L., Terry N. / Plant Physiol. 1999. N. 119 (1). P. 73–79.

## Translation of Russian References

Grishko V.N., Syshchikov D.V. Functioning of glutathione-dependant antioxidant system and resistance of plants at effect of heavy metals and fluorine. Kiev: Nauk. dumka, 2012. 238 p.

Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. Heavy metals and plants. Monograph. Petrozavodsk: KarNTs RAN, 2014. 194 p.

Titov A.F., Talanova V.V., Kaznina N.M., Laidinen G.F. Plant resistance to heavy metals. Petrozavodsk: KarNTs RAN, 2007. 170 p.

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 55–59

ROOT GROWTH IN *NICOTIANA TABACUM* TRANSGENIC PLANTS WITH OVEREXPRESSION OF BNGSH GENE OF OILSEED RAPE GLUTATHIONE SYNTHETASE UNDER STRESS FACTORS

Z.A. Berezhneva<sup>1</sup>, A.R. Kashafutdinova<sup>2</sup>, B.R. Kuluev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics USC RAS, Ufa, Russia;*

<sup>2</sup>*Bashkir State Pedagogical University, Ufa, Russia*

Glutathione is a vital component of the antioxidant system of plants. It protects the cells from oxidative stress caused by various adverse environmental factors. Glutathione synthetase catalyzes the addition of the amino acid glycine to the dipeptide  $\gamma$ -glutamylcysteine. It is known that the expression of genes encoding the glutathione synthetase contributes to the improvement of heavy metal tolerance of plants. However, very little is known about the role of glutathione synthetase in regulation of plant growth under salinity and low positive temperatures. On this basis, the aim of our study was to assess the root growth parameters of transgenic tobacco plants with constitutive expression of the BnGSH gene of oilseed rape glutathione synthetase under salinity stress, low positive temperatures and cadmium. In the transgenic tobacco plants, we observed better root growth than this in wild type plants, both in normal conditions and under the influence of all three types of stressors.

**Keywords:** *Nicotiana tabacum*; glutathione synthetase; cold; salt stress; heavy metals.

## Сведения об авторах

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,  
г. Уфа, ул. Проспект Октября, 71, 450054.

\*Бережнева Зоя Александровна. Аспирант,  
e-mail: berezhneva-z@yandex.ru

Кулueв Булат Разяпович. Старший научный сотрудник,  
доктор биологических наук, e-mail: kuluev@bk.ru

Башкирский государственный педагогический университет им.  
М.Акумуллы, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а, 450008

Кашафутдинова Алия Ринатовна. Студент,  
e-mail: kashafutdinova.aliya@mail.ru

## Information about the authors

Institute of Biochemistry and Genetics USC RAS,  
Prospekt Oktyabrya, 71, 450054, Ufa, Russia

\*Berezhneva Zoya Aleksandrovna. PhD Student,  
e-mail: berezhneva-z@yandex.ru

Kuluev Bulat Razyapovich. Senior Researcher, DSc in Biology,  
e-mail: kuluev@bk.ru

Bashkir State Pedagogical University,  
ul. Oktyabr'skoi revolyutsii, 3a, 450008, Ufa, Russia

Kashafutdinova Aliya Rinatovna. Student,  
e-mail: kashafutdinova.aliya@mail.ru

\* Ответственный за переписку

\* Responsible for correspondence

УДК 632.76:632.92:631.348.32

**ЖУКИ-ЩЕЛКУНЫ В АГРОЦЕНОЗАХ ЮГО-ЗАПАДА ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ****В.Н. Орлов, О.М. Зеленская***Краснодарский научно-исследовательский институт им. П.П. Лукьяненко*

Проведено картирование вредящих видов жуков-щелкунов (проволочников) в посевах сельскохозяйственных культур Краснодарского, Ставропольского краёв и Ростовской, Воронежской и Белгородской областей. На полях встречаются *Agriotes lineatus* L. и *A. sputator* L. Локально вредят личинки *Agriotes gurgistanus* Fald., *A. tauricus* Heyd., *A. ponticus* Step., *Melanotus fusciceps* Gyll., *Selatosomus latus* F., *Agriotes ustulatus* Schall. и другие виды.

**Ключевые слова:** жуки-щелкуны, проволочники, почвенные раскопки, распространение, картирование, феромонные ловушки, *Agriotes*, *Melanotus*, *Selatosomus*.

Проволочники (личинки жуков-щелкунов) являются серьёзными вредителями сельскохозяйственных культур в земледельческих зонах страны. Наиболее актуальна вредоносность проволочников в степной зоне. Здесь же сосредоточены площади интенсивного возделывания культур, которые наиболее сильно страдают от проволочников. Широкое распространение вредящих видов в сочетании со скрытым образом жизни, как жуков, так и личинок сильно затрудняет эффективное применение мер борьбы с ними.

В полевых биотопах часто вредят личинки жуков-щелкунов рода *Agriotes*, *Melanotus* и *Selatosomus* (отр. Coleoptera, сем. Elateridae), которые даже при небольшой численности наносят ощутимый вред посевам. Экономическая значимость отдельных видов различна и сильно варьирует в зависимости от региона [Гурьева, 1979; Долин, 1978, 1988; Степанова, 1969; Космачевский, 1957].

Высокая численность проволочников вызывает выпадение всходов, что в дальнейшем обычно ведёт к пересеву сельскохозяйственных культур. Наиболее чувствительными оказываются посевы, где в технологиях используются низкие нормы высева семян. Повреждаемость культур заметно увеличивается в дождливую и тёплую весну. Ощутимый вред проволочники некоторых видов наносят культурным растениям и в условиях сильного увлажнения почв. С другой стороны, в относительно сухих почвах наиболее сильно страдают сами растения и выше вредоносность некоторых видов.

Результативность защиты всходов от повреждения проволочниками, в первую очередь, зависит от целенаправленности организационно – хозяйственных мероприятий, а также своевременного применения технологических, химических и биологических приёмов. Учитывая совре-

менное состояние отрасли, доступность мер контроля вредителей в хозяйствах сильно отличается. В предприятиях, сохранивших севообороты, применяют чередование культур, что препятствует накоплению вредных видов или способствует снижению численности проволочников. Большинство хозяйств проводит регулярную борьбу с сорной растительностью, применение удобрений и посев в оптимальные сроки. Иногда планируют механические обработки почвы в уязвимые фазы развития вредителей и ещё реже применяют биологические средства и феромоны. В хозяйствах разного экономического уровня сейчас наиболее популярным способом борьбы с проволочниками на большинстве культур является обработка семян инсектицидными протравителями.

Скрытность обитания личинок жуков-щелкунов, разнообразие вредящих видов и условий возделывания сельскохозяйственных культур предполагает применение в хозяйствах сегодня только профилактических мероприятий по защите уязвимых сельскохозяйственных культур. Направленное применение системы защиты и знание объектов повышает результативность используемых мер.

Для повышения эффекта от защитных мероприятий против проволочников необходимо знать видовой состав вредителей на посевах, их распределение на полях в хозяйстве, биологические особенности вредящих и сопутствующих видов [Зеленская, 2015]. Например, прогноз сроков подъёма личинок в верхние слои почвы после зимовки или начала их активности может позволить значительно сократить повреждаемость некоторых культур, как за счёт варьирования их сроков сева, проведения механических обработок почвы, так и подбора протравителей.

**Материалы и методы исследований**

Полевые исследования проводились по общепринятым методикам. Для проведения работ по определению видового состава и плотности личинок использовали различные методы сбора: почвенные раскопки, кошение энтомологическим сачком, отлов в почвенные и притеняющие ловушки, привлечение на половые феромоны и на свет. Феромонные ловушки выставляли в период сезонного лёта самцов. Численность личинок учитывали методом почвенных раскопок [Бызова, Гиляров, 1987; Методические указания..., 2009].

Работы по картированию жуков-щелкунов и определению численности проволочников на посевах пропашных с.-х. культур проводили в период с 2010 по 2015 гг. Были обследованы выборочно поля районов с наличием в севообороте таких уязвимых культур как сахарная свёкла, подсолнечник и кукуруза в Краснодарском крае, Ставропольском крае, Ростовской области, Воронежской области и Белгородской области.

Всего проанализировано более 2 тыс. экземпляров имаго и личинок.

**Результаты исследований**

В ходе исследований установлен видовой состав жуков-щелкунов, вредящих сельскохозяйственным культурам. Выявлено, что сельскохозяйственным растениям вредили представители нескольких родов жуков-щелкунов. Наиболее часто встречались виды родов *Agriotes* и *Melanotus*, ко-

торые наносили значительный вред изучаемым пропашным культурам. По результатам почвенных обследований на полях хозяйств Белгородской, Воронежской, Ростовской областей, Краснодарского и Ставропольского краёв было собрано 16 видов жуков-щелкунов. Из экономически значимых

фитофагов следует отметить следующие виды щелкунов: посевной – *Agriotes sputator* L., полосатый – *A. lineatus* L., степной – *A. gurgistanus* Fald., крымский – *A. tauricus* Heyd., красно-бурый – *Melanotus fusciceps* Gyll., буруногий – *M. brunnipipes* Germ., широкий – *Selatosomus latus* F., западный – *Agriotes ustulatus* Schäll., темный – *A. obscurus* L.

Щелкуны полосатый, темный, западный и широкий встречались обычно на более увлажнённых участках. Щелкуны буруногий, красно-бурый и степной встречались или доминировали в более засушливых условиях. Щелкуны посевной и крымский, при явном предпочтении более влажных почв, были отмечены в высокой численности на разных по режиму увлажнения участках.

В зависимости от доминирующих видов и их численности, а так же устойчивости растений, вред проявлялся от частичных выпадов растений до полного уничтожения культуры в очагах. В ходе исследований отмечена сильная вредоносность проволочников и на озимой пшенице.

Почвенные раскопки в изучаемых зонах показали, что на пропашных культурах в весенний период численность личинок на метр квадратный превышала ЭПВ в зависимости от района и культуры. Так, в Каневском районе Краснодарского края численность личинок находилась в пределах 5.6–9 экз./м<sup>2</sup>. В Песчанокопском районе Ростовской области

плотность личинок на единицу площади в весенний период варьировала в зависимости от культуры от 6.4 до 7.6 экз., а в Милютинском районе от 1.6 до 10 экз./м<sup>2</sup>. Также, в Белгородской области на единицу площади приходилось от 5.6 до 12 личинок. В Ставропольском крае максимальная численность в Ипатовском районе доходила до 11.4 экз./м<sup>2</sup>, а в Краснодарском крае до 9 экз./м<sup>2</sup> в Каневском районе. В Воронежской области в почве отмечено до 5.4 экз./м<sup>2</sup> проволочников.

Распределение видов по исследуемым регионам показывает, что *A. gurgistanus* Fald. составил треть собранного материала в Краснодарском и Ставропольском краях – 31–34% (см. табл.). *A. tauricus* Heyd. был отмечен только в Краснодарском крае (18%). *A. sputator* L. присутствует во всех обследуемых регионах. Массово этот вид встречался в Белгородской, Воронежской, Ростовской областях и Ставропольском крае. На полях пропашных культур в агроценозах юга-запада европейской части России часто встречаются личинки *M. fusciceps* Gyll.. Их численность от общего количества собранных видов составила 16–25%. Отмечено, что в Воронежской области на полях пропашных культур численность *Hemicrepidius niger* L. составляет 26% от общего числа видов проволочников. Доля остальных видов была менее значительна (табл.).

Таблица. Личинки жуков-щелкунов, собранные в почве полей под пропашными культурами в агроценозах юго-запада европейской части России (2010–2015 гг.)

Виды жуков-щелкунов	Соотношение видов по регионам. %				
	Краснодарский край	Ставропольский край	Ростовская область	Белгородская область	Воронежская область
<i>Agriotes gurgistanus</i> Fald.	34.1	31.3	13.4	4.8	—
<i>Agriotes tauricus</i> Heyd.	18.2	—	—	—	—
<i>Agriotes ponticus</i> Step.	6.8	2	6.7	—	2.9
<i>Agriotes sputator</i> L.	11.4	23.5	24.4	34.9	25.7
<i>Agriotes lineatus</i> L.	9.1	3.9	2.2	11.1	5.7
<i>Agriotes ustulatus</i> Schäll	—	5.9	2.2	11.1	2.9
<i>Melanotus brunnipipes</i> Germ.	—	7.8	17.8	17.5	11.4
<i>Melanotus fusciceps</i> Gyll.	15.9	19.6	24.4	—	22.8
<i>Selatosomus latus</i> F.	—	2	2.2	8	—
<i>Hemicrepidius niger</i> L.	—	2	—	6.3	25.7
Др. виды	4.5	2	6.7	6.3	2.9

В ходе осенних раскопок численность проволочников была ниже, что можно объяснить температурой и низким содержанием влаги в почве, а также агротехнологическими мероприятиями по подготовке полей к новому сельскохозяйственному сезону.

Исходя из почвенно-климатических условий, соотношения видов жуков-щелкунов открытых биотопов, особенностей доминирования вредящих видов и степени их вредоносности на изучаемой территории условно можно выделить несколько зон с целью планирования защитных мероприятий против проволочников: 1. Белгородская и Воронежская области; 2. Ростовская область – северная часть Краснодарского края и Ставропольский край; 3. Центральная и предгорная части Краснодарского края. Изучение прилегающих регионов Калмыкии и Волгоградской области позволит дать более точное разделение изучаемой территории.

В северной части исследуемого региона (Белгородская и Воронежская области) на почвах с достаточным увлажнением, где видами-индикаторами могут служить *Agriotes sputator* L. и *A. ustulatus* Schäll., использование протравите-

лей с минимальными нормами расхода вполне допустимо. Но на более сухих почвах, где видами-индикаторами могут служить виды рода *Melanotus* (иногда *Agriotes gurgistanus* Fald.), применение протравителей уже в максимальной норме расхода будет более оправдано. В центральной части исследуемого региона (Ростовская область, Ставропольский край и прилегающие северные районы Кубани – территория, большей частью расположенная на равнине Западного Предкавказья) в большинстве случаев индикаторами могут служить *A. gurgistanus* Fald. и виды рода *Melanotus*. По южному выделу изучаемого региона (Центральная и предгорная части Краснодарского края) целесообразно практически везде использовать более интенсивные меры воздействия, такие, например, как применение для обработки семян только высокоэффективных инсектицидов и в максимальных нормах расхода. Видом-индикатором таких условий может служить *A. tauricus* Heyd.

По результатам анализа видового состава жуков-щелкунов собранных в агроценозах юга-запада европейской части России выделены экономически значимые фитофаги – *A. sputator* L., *A. gurgistanus* Fald., *A. tauricus* Heyd.,

*A. ustulatus* Schäll, *M. fusciceps* Gyll., *M. brunripes* Germ., *A. lineatus* L. Во всех регионах на полях регистрировались в высокой численности личинки посевного и степного шелкоунов. Наибольшая численность проволочников (до 9–12 экз./м<sup>2</sup>), зарегистрирована в Белгородской области, Ставропольском крае, Ростовской области и в Краснодарском крае.

Комплекс экономически значимых видов жуков-шелкунов в регионах претерпел как качественные, так и количественные изменения. В фауне ряда регионов в полевых севооборотах сменились доминирующие виды, что в ближайшие годы может повлечь коррекцию зон вредоносности. Ареалы некоторых видов значительно продвинулись в северном направлении. На сдвиг в соотношении видового состава вредителей влияют как климатические процессы, так и изменения в хозяйственной деятельности сельскохозяйственных предприятий. На расширение ареалов могли повлиять не только увеличение температурных показателей в регионах, но и значительно возросший товарооборот культурных растений, реализуемых вместе с почвой.

На основе полученных данных состава вредных видов жуков-шелкунов возможно просчитывать потенциальные вспышки численности вредителя на посевах и необходимость проведения защитных мероприятий.

Меры борьбы с проволочниками целесообразно планировать исходя из видового состава и численности вредных объектов. Исходя из полученных данных, в районах с высокой численностью следует планировать систему мероприятий, включающую как организационные и непосредственно агротехнические мероприятия, так и применение химического метода. При этих условиях более целесообразны химические меры борьбы обработки семян протравителями на основе инсектицидных протравителей, в максимальных нормах расхода. В некоторых районах с низкой численностью вредных объектов достаточно регулярно проводить обследования, а на полях, где численность близка к пороговой или выше, использовать протравители в минимальных нормах расхода. При разработке защитных мероприятий необходимо учитывать, что проволочники – это вредители с многолетним циклом развития, повреждающие практически все культуры севооборота. Поэтому целесообразно регулярные ежегодные обследования, а семенной материал, который будет высеваться на участках с высоким риском повреждения вредителем, в обязательном порядке обрабатывать инсектицидными протравителями.

#### Библиографический список

- Бызова Ю.Б. Количественные методы в почвенной зоологии / Бызова Ю.Б., Гиляров М.С. // М.: Наука, 1987. 238 с.
- Гурьева Е.Л. Жуки-шелкуны /Е.Л. Гурьева // Фауна СССР (жесткокрылые). Л. 1979. Т.7. Вып.4. С. 363–438.
- Долин В.Г. Определитель личинок жуков-шелкунов фауны СССР /В.Г. Долин // Киев, Издательство «Урожай», 1978. С. 106–114.
- Долин В.Г. Жуки-шелкуны. Кардиофорины и Элатерины / В.Г. Долин // Фауна Украины. Киев. 1988. Т. 19. Вып. 4. 202 с.
- Зеленская О.М. Распространение вредящих видов жуков – шелкоунов в агроценозах юга России / О.М. Зеленская, В.Н. Орлов //Агро XXI. 2015. N 1–3. С. 14–16.
- Космачевский А.С. Вредители сельскохозяйственных культур и меры борьбы с ними /А.С. Космачевский // Краснодар: Краснодарское книж. изд-во. 1957. 200 с.
- Методические указания по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве, М.: 2009 г. С. 63–65.
- Степанова Н.Е. Фауна жуков семейства Elateridae Краснодарского края и закономерности распределения ее представителей /Н.Е. Степанова // Биологические науки. 1969. N 3. С. 7–10.

#### Translation of Russian References

- Dolin V.G. Click Beetles. Cardiophorines and Elaterines. In: Fauna Ukrainy. Kiev. 1988. V. 19. Issue. 4. 202 p. (In Russian).
- Dolin V.G. Keys to larvae of beetles of the USSR fauna. Kiev: Urozhai, 1978. P. 106–114. (In Russian).
- Dolzhenko V.I. (ed.). Methodical instructions on registration tests of insecticides, acaricides, molluscicides and rodenticides in agriculture. St. Petersburg. 2009. 321p. (In Russian).
- Gurieva E.L. Click Beetles. In: Fauna SSSR (Coleoptera). Leningrad. 1979. V. 7. Issue 4. P. 363–438. (In Russian).
- Kosmachevsky A.S. Pests of agricultural crops and measures of their control. Krasnodar: Krasnodarskoe knizhnoe izdatelstvo. 1957. 200 p. (In Russian).
- Stepanova N.E. Fauna of beetles of family Elateridae of Krasnodar territory and pattern of distribution of its representatives. Biologicheskie nauki. 1969. N. 3. P. 7–10. (In Russian).
- Zelenskaya O.M., Orlov V.N. Distribution of harmful species of click beetles in agrocenoses of the south of Russia. Agro XXI. 2015. N 1–3. P. 14–16. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 3(93), p. 60-62

## CLICK BEETLES IN AGROCENOSES OF SOUTH-WESTERN EUROPEAN RUSSIA

V.N. Orlov, O.M. Zelenskaya

*P.P. Lukyanenko Krasnodar Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia*

Researches for mapping pest species of click beetles on the agricultural territories of Krasnodar, Stavropol, Rostov, Voronezh and Belgorod regions were conducted. Wireworms of *Agriotes lineatus* L. and *A. sputator* L., locally *A. gurgistanus* Fald., *A. tauricus* Heyd., *A. ponticus* Step., *A. ustulatus* Schall., *Melanotus fusciceps* Gyll., *Selatosomus latus* F. and other pest species were found.

**Keywords:** click beetle; wireworm; soil probe; mapping; chart-making; pheromone trap; *Agriotes*; *Melanotus*; *Selatosomus*.

#### Сведения об авторах

Краснодарский НИИ им. П.П. Лукьяненко, Центральная Усадьба КНИИСХ, Краснодар, 350012, Российская Федерация  
\*Орлов Валерий Николаевич. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: elater@mail.ru  
Зеленская Ольга Михайловна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: olya\_zelenskaya@mail.ru

\* Ответственный за переписку

#### Information about the authors

P.P. Lukyanenko Krasnodar Research Institute of Agriculture, Central Estate of KNIISH, Krasnodar, 350012, Russian Federation  
\*Orlov Valerii Nikolaevich. Leading Researcher, PhD in Biology e-mail: elater@mail.ru  
Zelenskaya Olga Mihailovna. Leading Researcher, PhD in Biology e-mail: olya\_zelenskaya@mail.ru

\* Responsible for correspondence

## ИЗДАНО В ВИЗР

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР),  
ООО “Инновационный центр защиты растений”  
предлагают для приобретения следующие издания ВИЗР:

**Фоминых Т.С., Богоутдинов Д.З. Диагностика вирусных, виroidных и фитоплазменных болезней овощных культур и картофеля. СПб.: 2017. 97 с. – 250 руб.**

Учебно-методическое пособие рассчитано на фитопатологов, иммунологов селекционеров, семеноводов, специалистов службы защиты растений. Может использоваться студентами и аспирантами аграрных вузов.

**Власов Ю.И., Ларина Э.И., Трускинов Э.В. Сельскохозяйственная фитовирусология. СПб.: 2016. 238 с. – 215 руб.**

В данной публикации приведены сведения об основных свойствах вирусов, фитоплазм, методах их диагностики и способах передачи. В специальной части дается описание основных вирусных болезней главных сельскохозяйственных культур и мер борьбы с ними. Книга рассчитана на фитопатологов, иммунологов селекционеров, семеноводов, специалистов службы защиты растений. Может использоваться для обучения студентов вузов.

**Нарбут М.А., Семенова Н.Н., Гончаров Н.Р., Сухорученко Г.И., Долженко О.В., Белякова Н.А. Избранные статистические методы в агроэкологии. (Учебное пособие). СПб: 2016. 100 с. – 130 руб.**

Данное учебное пособие подготовлено к публикации кафедрой математики и информатики математико-механического факультета СПбГУ и лабораториями интегрированной защиты растений и агроэкоцикологии ВИЗР-ФГБНУ ВИЗР. Оно предназначено для студентов и аспирантов, специализирующихся в области агроэкологии.

**Система интегрированной защиты репродукционного семенного картофеля от комплекса вредных организмов в Северо-Западном регионе Российской Федерации. СПб.: 2016. 64 с. – 130 руб.**

Данная публикация предназначена для специалистов картофелеводческих хозяйств различных форм собственности, занимающихся производством семенного картофеля, а также специалистов научно-исследовательских учреждений, Россельхозцентра и Россельхознадзора.

**Павлюшин В.А., Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Нефедова Л.И., Капусткина А.В. Вредная черепашка и другие хлебные клопы. СПб.: 2015. 280 с. – 300 руб.**

Издание посвящено важнейшей группе вредителей зерновых колосовых культур в России – хлебным клопам, среди которых по численности и экономическому значению доминирует вредная черепашка, требующая постоянного внимания специалистов по защите растений и проведения крупномасштабных мероприятий в борьбе с ней. Книга обобщает исследования ученых ВИЗР, связанных с изучением видового ареала и зон вредности вредной черепашки, особенностям фенотипической изменчивости ее популяций в видовом ареале под влиянием антропогенных воздействий на агробиоценозы хлебных злаков. Приводятся оригинальные данные по пищевой специализации, особое внимание уделено вопросам вредности вредной черепашки. Рассмотрены патологические нарушения пшеницы при повреждении клопами, описаны особенности воздействия черепашки на хлебопекарные и посевные качества семян. Рассмотрено в ретроспективе развитие основных методов борьбы с вредной черепашкой и сформулированы положения перехода на управление фитосанитарным состоянием агроэкосистем зерновых культур, направленного на предотвращение возникающих в них стрессовых ситуаций под влиянием человеческой деятельности. Книга рассчитана на экологов, энтомологов и специалистов в области защиты растений, занимающихся вопросами разработки систем интегрированного управления популяциями вредных видов в агроэкосистемах.

**Иващенко В.Г. Болезни кукурузы: этиология, мониторинг и проблемы сортоустойчивости. СПб.: 2015. 286 с. – 300 руб.**

В настоящей работе на основе многолетних экспериментальных данных, а также достижений отечественного и зарубежного опыта, приведены материалы, касающиеся этиологии, патогенеза и вредности болезней кукурузы. Значительное место уделено селекционно-генетическим и экологическим аспектам устойчивости к возбудителям наиболее вредоносных заболеваний, путям и способам её идентификации, отбору исходного материала и его использованию. Приведены данные о фитосанитарных и прогностических аспектах защиты растений, перспективах и ограничениях роста урожайности.

**Гончаров Н.Р., Тимофеев А.В., Воробьев Н.И. Методика автоматизированного расчета стоимости научно-исследовательских полевых экспериментальных работ по оценке биологической эффективности и регламентов применения пестицидов с программой для ПЭВМ на диске. СПб.: 2015, 30 с. – 500 руб.**

Методика предназначена для сотрудников и специалистов научно-исследовательских учреждений, экологов, энтомологов и специалистов в области защиты растений, занимающихся вопросами биологической регламентации использования пестицидов в сфере регистрационных испытаний пестицидов.

**Лазарев А.М. Бактериальные болезни томата и меры борьбы с ними. СПб.: 2015. 116 с.– 200 руб.**

В монографии представлены сведения об основных бактериальных болезнях томата и мерах борьбы с ними. Книга рассчитана на фитопатологов, специалистов службы защиты растений, занимающихся разработкой систем интегрированной защиты растений томата в современном агропромышленном комплексе. Может быть использована для обучения студентов и аспирантов вузов в качестве дополнительного учебного пособия.

**Тютюрев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням.**

**СПб.: 2014. 212 с. – 150 руб.**

В монографии представлены сведения о биохимических механизмах индуцированной устойчивости растений к болезням. Приведенный в книге материал знакомит читателя с разнообразием сигнальных молекул, контролируемых защитных реакций растений от патогенов. Книга рассчитана на фитопатологов, иммунологов селекционеров, семеноводов, специалистов службы защиты растений, занимающихся применением экологически безопасных средств в системах интегрированной защиты растений. Может быть использована для обучения студентов и аспирантов вузов.

**Вестник защиты растений, № 1–4. – СПб., 2015 – 170 руб. за каждый номер.**

**Вестник защиты растений, № 1–4. – СПб., 2016 – 170 руб. за каждый номер.**

**Вестник защиты растений, № 1–3. – СПб., 2017 – 170 руб. за каждый номер.**

Периодическое издание ВИЗР содержит статьи по актуальным вопросам защиты растений. Предназначено для специалистов, занимающихся вопросами защиты растений.

**Другие издания 2000-х годов выпуска (см. сайт [centr.iczr.ru](http://centr.iczr.ru))**

Цены указаны без учета стоимости почтовой пересылки и 18 % НДС.

Заявки направлять по адресу: 196608, Санкт-Петербург-Пушкин-8,

а/я 5, ООО “Инновационный центр защиты растений”

или

e-mail: [zakaz@iczr.ru](mailto:zakaz@iczr.ru); [vkm@iczr.ru](mailto:vkm@iczr.ru); [nrg@iczr.ru](mailto:nrg@iczr.ru)

Тел/факс: (812) 466-05-68.

---

Научное издание.

**Индекс 36189**

Подписано к печати 11 сентября 2017 г.

Формат 60x84/8. Объем 8 п.л. Тираж 500 экз. Заказ