

Экологическая стратегия контроля фузариоза может быть технологичной

В.А. ЧИСТЯКОВ^{1,2}, А.В. ГОРОВЦОВ^{1,2} (e-mail: gorovtsov@gmail.com), Н.Г. ВАСИЛЬЧЕНКО^{1,2}, Е.В. ПРАЗДНОВА^{1,2},
А.В. УСАТОВ^{1,2}, Л.Е. КУХАРЕНКО¹, М.Л. ПАК¹

¹ Концерн «Покровский»

² Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского

Введение

Фузариоз — грибковое заболевание растений, следствием которого являются значительные потери урожая и снижение качества продукции. Кроме того, ряд штаммов *Fusarium* могут продуцировать микотоксины, такие как дезоксиниваленол (ДОН), токсины Т-2 и НТ-2, зеараленон, ниваленол и др. Фузариоз поражает практически все известные человечеству сельскохозяйственные культуры, опасен он и для сахарной свёклы. При этом помимо поражения растений свёклы в поле, снижения её урожайности и содержания сахара заражение грибами р. *Fusarium* может приводить к развитию кагатной гнили и потере уже собранного урожая.

Факторами риска при развитии фузариоза являются несоблюдение севооборотов, использование технологии no-till или минимальной обработки почвы, устойчивость сорта и гибрида, а также погодные условия.

Цель исследования

Целью данной работы было оценить перспективы применения биопрепарата на основе аэробных спорообразующих бактерий для защиты сахарной свёклы от фузариоза и его сочетаемость с применяемыми агротехнологиями.

Анализ современного состояния проблемы

Для решения проблемы фузариоза в настоящее время предлагается ряд подходов, основной из которых

лежит в русле химизации агротехнологий. Здесь необходимо иметь в виду, что несмотря на широкий ассортимент таких препаратов, представленный на рынке, химическая основа их в целом однородна. Действующими веществами являются соединения из группы азолов. Создание экономически эффективных технологий синтеза азолов в своё время было серьёзным прорывом. Оно позволило сделать препараты этой химической группы доступными не только для лечения людей и животных, но и для массового применения в целях защиты растений. Широкое применение веществ, принадлежащих к одному классу химических соединений, закономерно обуславливает появление резистентных форм возбудителей. Наиболее хорошо это явление было изучено для фунгицидных фармацевтических препаратов, таких как флуконазол, итраконазол и вориконазол [1]. То же самое наблюдается и в области сельскохозяйственного применения фунгицидов. Поскольку триазолы применяются в течение сезона неоднократно, это вызывает ускорение развития резистентных форм фитопатогенов. Формирование устойчивости развивается очень быстро, так как в данном случае патогены «используют» древние эволюционные механизмы, которые, собственно, и помогли им сохраниться в миллиарднолетней борьбе всех против всех, обычной для микроорганизмов [2].

Современные знания о генетике природных популяций и механиз-

мах поддержания стабильности экосистем позволяют сделать заключение о бесперспективности подходов, связанных как с увеличением дозировки современных фунгицидов, так и с внедрением новых. В качестве примера можно вспомнить о том, что антибиотики первого поколения, например пенициллин и его аналоги, теряли свою активность для лечения болезней человека и животных в течение примерно 40 лет, в то время как появившиеся в начале XXI в. фторхинолоны «продержались» всего около 10 лет [3]. Учитывая, что контроль использования лекарств и развития резистентности к антибиотикам в медицине и ветеринарии гораздо жёстче, чем в области защиты растений, можно прогнозировать и более быстрый рост числа фитопатогенных грибов, устойчивых к современным фунгицидам. Описанные в литературе случаи резистентности к триаколам и бензимидазолам наблюдались ещё в 80-е гг. прошлого века [7], а за прошедшие годы число устойчивых штаммов многократно возросло.

Подход, который может обеспечить успех в деле контроля фузариоза и других инфекционных заболеваний, должен быть основан на принципах экологии, понимаемой не как лозунг, а как часть фундаментального знания, в первую очередь эволюционной экологии. Суть этого подхода в том, что для контроля чрезмерного распространения целевой экологической группы, в нашем случае

грибов рода *Fusarium*, нужно использовать механизмы, которые сдерживают распространение этой группы в природных экосистемах. Таких механизмов, по-видимому, существует множество. Но для использования в агротехнологиях апробированы два из них: первый основан на выращивании устойчивых к патогенам культур, а второй — на применении природных антагонистов, микроорганизмов, подавляющих развитие целевой группы. Проблема повышения устойчивости сахарной свёклы и других культурных растений к патогенным грибам требует отдельного подробного рассмотрения. Отметим лишь, что устойчивые формы зачастую теряют хозяйственно ценные качества, как это получилось при замещении бананов сорта Гросс-Мишель, чувствительного к *Fusarium oxysporum*, сортами, устойчивыми к патогену, но уступающими по органолептическим характеристикам. Кроме того, устойчивость новых сортов растений к патогенам обеспечивается обычно работой одного конкретного биохимического механизма. Скорость же эволюции патогенов настолько высока, что они «обходят» использование устойчивых растений. Это получается не так быстро и эффективно, как при применении синтетических фунгицидов одной химической природы. Однако в эволюционном стипль-чезе всегда побеждает тот, у кого быстрее сменяются поколения.

Второй механизм основан на имитации процессов, идущих в экосистемах, где избыточное размножение грибов сдерживается другими микроорганизмами. Ключевое слово в нашем агротехнологическом контексте — имитация, которая не всегда бывает удачной. Главная проблема в имитации экологических механизмов связана с необходимостью учёта биоразнообразия. При-

родные виды микроорганизмов представляют собой колоссальное количество генетически отличающихся штаммов. Поэтому, если взять один штамм бактерии, которая проявляет антагонизм к одному штамму патогенных грибов одного из видов р. *Fusarium*, создать на основе этого штамма препарат (наработать тонны культуры бактерий), результат его практического применения для защиты посевов будет скорее всего плачевным. В частности, наши исследования показали, что в разных почвенно-климатических условиях существенно различается как устойчивость фитопатогенных грибов к определённым штаммам бактерий-антагонистов, так и встречаемость бактерий-антагонистов в почвах, причём влияние оказывает не только тип почвы, но и культура-предшественник, выращенная на конкретном поле [5].

Разные штаммы бактерий способны вырабатывать разные противогрибковые соединения, поэтому с точки зрения механизмов действия обоснован подход, при котором разные виды и штаммы используются вместе, дополняя друг друга [4].

Приступая к исследованиям с целью создания серии действительно эффективных препаратов для контроля фузариоза, мы сформулировали ряд правил, определяющих успешность технологической имитации экологических механизмов такого контроля.

1. Привязка к месту. При разработке технологии нужно ориентироваться, с одной стороны, на генофонд грибов, выделенных с полей региона, в котором планируется применять технологию, а с другой — на генофонд микроорганизмов-антагонистов, сосуществующих именно с этими грибами, на именно этих полях.

2. Разнообразие «мишеней и снарядов». Нужно использовать максимально большую выборку

как генотипов патогенов, так и генотипов антагонистов.

3. Понимание механизмов. Экспериментальная техника XXI в. позволяет видеть не только феноменологию, но и механизмы явлений. Именно понимание механизмов позволяет спрогнозировать надёжность планируемой к внедрению разработки.

4. Технологичность. Какой бы революционной ни была новая технология, успех её внедрения зависит от того, насколько гармонично она впишется в существующий спектр агротехнологий, который давно уже превратился в своеобразную «техноэкосистему».

Четвёртое правило предусматривает экономические параметры инновации, которые в реальности являются определяющими. Здесь можно упомянуть о том, что если живые компоненты технологии хорошо переносят физические воздействия агротехники, а используемые химпрепараты не снижают их выживаемость и физиологическую активность, то реализация четвёртого правила значительно упрощается.

Согласно нашей концепции на первоначальном этапе осуществлялось выделение и создание коллекции чистых культур фитопатогенных грибов, характерных для конкретного региона. Работа заключалась в сборе пожнивных остатков и образцов почв, выделении возбудителей фузариоза методом посева на селективные питательные среды, микроскопическом исследовании культур для их первоначальной идентификации с последующим молекулярно-генетическим определением вида методом секвенирования. В результате были получены чистые культуры возбудителей фузариоза (*Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. culmorum*), которые затем использовались для подбора регион-специфических антагонистов фитопатогенных грибов, адапти-

рованных к почвенно-климатическим условиям юга России.

Затем отбирались бактерии, демонстрировавшие зону подавления роста гриба вокруг своих колоний. Среди первичной коллекции производился отбор штаммов, обладающих широким спектром активности против фитопатогенных грибов р. *Fusarium*. 10 наиболее активных штаммов, относящиеся к родам *Bacillus* и *Paenibacillus*, были идентифицированы методом секвенирования ДНК.

Следующий этап работы заключался в разработке технологии культивирования штаммов-антагонистов для получения биопрепарата в виде порошка с титром не менее 10^9 КОЕ/г. На штаммы и технологию был получен патент [6].

В дальнейшем оценивалась совместимость полученного биопрепарата с существующими технологиями применения средств защиты растений (применение биопрепарата в баковой смеси). В лабораторных условиях была исследована совместимость биопрепарата с системным фунгицидом «Шансил Трио» при протравливании зерна озимой пшеницы. В результате выявлено, что совместная обработка приводила к увеличению количества спорообразующих бактерий на поверхности семян и снижению количества колоний фитопатогенных грибов, что указывает на возможность комплексного применения баковых смесей и биопрепарата. Кроме того, возможность использования нашего препарата в составе баковой смеси оценена в ходе различных полевых опытов в комплексе с инсектицидами и фунгицидами при листовой обработке пшеницы.

В 2017–2020 гг. была проведена серия опытов по применению биопрепарата на озимой пшенице. Применялись разные варианты обработки, а именно предпосевная обработка семян в баковой

смеси с системными фунгицидами, обработка растений по листу в фазу цветения. По итогам опытов показатели заражённости зерна озимой пшеницы были в 2–5 раз ниже по сравнению с контролем. При этом уровень инфекционного фона в почве на опытных полях снижался до 4,7 раза в конце вегетационного сезона, и оставался в 1,5 раза ниже через год после применения биопрепарата.

Методы исследований

В 2020 г. был заложен опыт по листовой обработке сахарной свёклы в условиях предгорной почвенно-климатической зоны на территории Лабинского района Краснодарского края. Экспериментальный участок (половина поля, площадь 45 га) обработали биопрепаратом в составе баковой смеси с инсектицидами в ходе плановой обработки сахарной свёклы в мае. В контроле (половина поля, площадь 45 га) обработка проводилась теми же препаратами без введения в баковую смесь биопрепарата. Непосредственно перед обработкой был проведён отбор образцов для определения инфекционного фона на контрольном и опытном участках. Определение численности грибов р. *Fusarium* в почве проводилось методом посева на питательную среду Чапека с добавлением стрептомицина с последующим учётом колоний грибов р. *Fusarium*. Для определения частоты встречаемости фитопатогенов в растениях фрагменты корнеплодов и листьев поверхностно стерилизовались 70%-ным спиртом и помещались на поверхность питательной среды, после чего проводился учёт числа фрагментов, давших рост фитопатоген-

ных грибов. Во всех случаях принадлежность грибов к р. *Fusarium* подтверждалась микроскопически.

Результаты испытаний препарата на сахарной свёкле

По итогам определения инфекционного фона до применения препарата встречаемость фитопатогенных грибов в тканях растений в листьях сахарной свёклы составила $74 \pm 7,92$ % в контроле и $80,7 \pm 7,77$ % в опыте. В корнеплодах частота встречаемости составила $61,3 \pm 7,29$ и $76,7 \pm 7,73$ % соответственно. Данные по численности грибов р. *Fusarium* в почве приведены в таблице.

Как можно видеть, в почве наблюдалось высокое содержание фитопатогенных грибов, а при посеве образцов листьев и корнеплодов с данных полей в июне наблюдался массовый рост фузариума, хотя визуально растения были совершенно здоровыми. Тем не менее в августе 2020 г. в хозяйстве, на базе которого проводился опыт, произошла вспышка церкоспороза, приведшая к серьёзному поражению листового аппарата сахарной свёклы. На наш взгляд, первопричиной произошедшей вспышки была именно высокая поражённость растений грибами р. *Fusarium*. Развитие фузариума в тканях листьев и корнеплодах подрывает иммунитет растений, что и спровоцировало развитие вспышки. Для грибов р. *Fusarium* характерны большие сезонные колебания численности. Так, после уборки их содержание снизилось в контроле в 6,3 раза. Для опытного участка зарегистрировано снижение в 13, что говорит об эффективности действия препарата.

Численность грибов р. *Fusarium* в почве до и после обработки биопрепаратом

Численность грибов, КОЕ/г	Контроль	Опыт
До обработки биопрепаратом	$7400,0 \pm 320,2$	$6066,7 \pm 364,9$
После уборки	$1166,7 \pm 451,5$	$466,7 \pm 243,8$



Результаты применения биопрепарата против фузариоза на сахарной свёкле (слева — контроль без обработки, справа — опыт)

Несмотря на то что биопрепарат проявляет активность против фузариоза, а не церкоспороза, его применение привело к очевидному снижению тяжести заболевания: на опытном участке растения сохранили листовой аппарат, тогда как в контроле он был полностью утрачен (см. рис.).

Наблюдаемые эффекты биопрепарата можно объяснить как биологическим контролем фузариума, ослабляющего иммунитет растений, так и возможным прямым действием против основного патогена (церкоспоры).

Выводы и рекомендации производству

Применение биологических методов контроля фузариоза при культивировании сахарной свёклы представляет собой эффективное дополнение к существующим системам защиты растений. Помимо листовой обработки возможно использование биопрепаратов с противогрибковой активностью и при предпосевной обработке семян. Весьма важным представляется то, что применение биопрепаратов благоприятно отражается на состоянии всего агроценоза — снижается инфекционный фон, а это, в свою очередь, способствует снижению риска заражения зерновых культур, участвующих в севообороте. Иными словами, биопрепараты лечат не только конкретную

культуру, но и агроэкосистему в целом. При этом за счёт гибкости и многокомпонентности своего состава биопрепараты такого типа могут эффективно противостоять развитию устойчивости у вредных организмов.

Наконец, приведённый успешный опыт иллюстрирует основное положение данной статьи. В составе баковых смесей биопрепараты на основе спорообразующих бактерий можно вносить на поля в ходе плановых обработок посевов, и проводить дополнительные мероприятия нет необходимости. Эти препараты технологичны, экологически безопасны и легко сочетаются со сложившимися в агротехнике системами защиты растений.

Список литературы

1. *Castanheira, M.* Monitoring antifungal resistance in a global collection of invasive yeasts and molds: application of CLSI epidemiological cutoff values and whole-genome sequencing analysis for detection of azole resistance

in *Candida albicans* / M. Castanheira [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2017. — V. 61. — № 10. — P. 1–20.

2. *Waclaw, B.* Evolution of drug resistance in bacteria / B. Waclaw // *Biophysics of Infection*. — 2016. — C. 49–67.

3. *Redgrave, L.S.* Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success / L.S. Redgrave [et al.] // *Trends in microbiology*. — 2014. — T. 22. — № 8. — C. 438–445.

4. *Leyva Salas, M.* Antifungal microbial agents for food biopreservation — a review / M. Leyva Salas [et al.] // *Microorganisms*. — 2017. — T. 5. — № 3. — C. 37.

5. *Gorovtsov, A.V.* The influence of soil type and preceding crop on the suppression of fusarium by indigenous spore-forming bacteria / A.V. Gorovtsov [et al.] // *Periodico Tch Quimica*. — 2019. — V. 16. — № 33. — P. 225–240.

6. Штаммы, биопрепарат, способ получения биопрепарата и способ биологической защиты сельскохозяйственных культур от фузариоза: пат. 2724464 Рос. Федерация: МПК C12N 1/20, A01N 63/00, A01P 3/00, A01C 1/06, C12R 1/07; В.А. Чистяков, А.В. Горовцов, А.В. Усатов, Е.В. Празднова, М.С. Мазанко, А.Б. Брень, О.А. Усатова, Н.Г. Васильченко; заявитель и патентообладатель ООО «Агрофирма «Урожайная». — Заявка № 2019139147; Заявл. 02.12.2019; Оpubл. 23.06.2020; Бюл. № 18.

7. *Kuck, K.H.* DMI fungicides. Modern Selective Fungicides, 2nd Edn. / K.H. Kuck, H. Scheinpflug, R. Pontzen. — H. Lyr, ed. G. Fisher Verlag. — Jena, Germany, 1987. — P. 205–258.

Аннотация. В статье рассмотрен биологический метод контроля фузариоза с помощью бактерий-антагонистов. Предлагается использовать для разработки биофунгицидов штаммы микроорганизмов, адаптированные к условиям конкретных регионов.

Акцентируется внимание на комплементарности разрабатываемых биофунгицидов существующим агротехнологиям. Описан практический опыт применения данного подхода для защиты сахарной свёклы.

Ключевые слова: фузариоз, биофунгициды, технология, резистентность.

Summary. The article discusses the use of bacteria as biocontrol agents against fusariosis. It is proposed to use strains of microorganisms adapted to the conditions of specific regions for the development of biofungicides. The attention is focused on the complementarity of the developed biofungicides to the existing agricultural technologies. Practical experience of using this approach for sugar beet protection is presented.

Keywords: fusariosis, biofungicides, technology, resistance.