

(19) **KG** (11) **237** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁶ **A01N 63/00; C12N 1/16;
C12R 1:00**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(21) 970032.1

(22) 26.02.1997

(46) 30.09.1998, Бюл. №3, 1998

(71)(73) Внедренческая фирма "Клон" (RU)

(72) Павленко В.В. (RU)

(56) А.с. SU №1145503, кл. A01N 63/00, 1983

(54) **Штамм дрожжей *Exophiala nigrum*, используемый для обработки семян и выращивания растений**

(57) Изобретение относится к области сельскохозяйственного растениеводства, садоводства и лесного хозяйства, а именно к биотехнологическим подходам регулирования размножения роста и развития растений, повышения их урожайности и качества получаемой продукции растениеводства за счет использования специальных микроорганизмов. Поставленная задача решается за счет получения нового штамма *Exophiala nigrum*, который успешно растет и размножается в искусственных питательных средах, удобен в биотехнологическом отношении, позволяет с повышенной эффективностью стимулировать рост и развитие растений, повышает их устойчивость к действию неблагоприятных биотических и абиотических факторов. Увеличивает урожай растений и качество получаемой продукции, позволяет получать диетическую продукцию, не содержащую избыточных нитратов и остаточных пестицидов. 17 табл.

Изобретение относится к области сельскохозяйственного растениеводства, садоводства и лесного хозяйства, а именно к биотехнологическим подходам регулирования размножения, роста и развития растений; повышения их устойчивости и урожайности за счет использования специальных микроорганизмов.

Известно использование штаммов рода *Trichoderma* для обработки семян растений, когда семена за 1 - 3 дня до посева опудривают споровомицелиальным препаратом с целью подавления развития возбудителей заболеваний сельскохозяйственных растений (Методические рекомендации по применению триходермина в овощеводстве/. Сост. Николаева С.Н., Буймистру П.Д., Бондаренко А.Н. - Кишенев, 1987.-С. 9-11).

Известен штамм *Bacillus thuringiensis* ИМП-215, обладающий фунгицидным действием в отношении фитопатогенных грибов (А.с. SU №1144377, МКИ C12P 1/04 / (C12P 1/04; C12R 1/07, 1963).

Известен штамм *Streptomyces hidrosopicus* M A 500, продуцирующий антибиотики, активные против аспергиллов, пенициллов, нейроспоры и ряда других грибов, в т.ч. фитопатогенов (Патент US №4575500, МКИ: A01N 57/12; C07F 9/09, МКИ 514/121, 1984).

Известны штаммы антиномицетов ATCC 39271, 39272, 39273 семейства *Streptomyces*, применяемые в виде водной суспензии спор с титром 1×10^5 спор/мл для внесения в почву или обработки семян путем их погружения в суспензию с целью предупреждения грибных болезней растений (Заявка FR №2524486, МКИ C12N 1/20; A01N 63/04 // C12R 1/465, 1983).

Известен препарат, который готовится на основе непатогенов из семейства *Pseudomonaceae* с добавлением макро- и микроэлементов и ростовых веществ, который усиливает рост растений, повышает устойчивость к болезням. Предназначается для применения в растениеводстве, виноградарстве, плодоводстве и лесоводстве (Заявка FR №2594294, МКИ A01N 63/03, 65/00, 1987).

Недостатком этого препарата является то, что использование даже непатогенных штаммов *Pseudomonaceae* представляет определенную опасность для здоровья человека, поскольку через плазмиды возможна передача свойств вирулентности и патогенности от патогенных и условно-патогенных штаммов *Pseudomonaceae* к непатогенным. Кроме того, этот препарат неудобен в биотехнологическом отношении: для приготовления этого препарата требуется большое число сложных и дорогостоящих добавок, он недостаточно эффективен.

Более эффективны регуляторы роста микробного происхождения (Муромцев Г.С. и др. Регуляторы роста растений, микробного происхождения. // Успехи микробиологии. - М. 1984 г, вып. 19. - С. 106 - 135).

Известен штамм эндомикоризного гриба *Glomus* sp. №7, используемый для повышения урожая сельскохозяйственных растений, используемый для инокуляции семян перед посевом (А.с. SU №1145503, МКИ A01N 63/00, C12N 1/14 (C12N 1/14, C12R 1 : 645, 1983). Инокуляция повышает урожай зерна за счет улучшения фосфорного питания сельскохозяйственных растений на бедных подвижным фосфором дерново-подзолистых почвах, а также при создающемся дефиците фосфора на плодородных почвах при внесении азотно-калийных удобрений. Данный штамм принят за прототип.

Недостатком данного штамма является сложность получения инокуляционного материала, поскольку штамм относится к облигатным симбионтам и не способен размножаться на искусственных питательных средах, оказывает положительное действие только для ограниченного набора семейств, родов и видов, эффективен только в определенных почвенно-климатических условиях. Кроме того, обладает сравнительно низкой способностью повышать урожайность, не оказывает существенного влияния на улучшение продовольственных и диетических свойств получаемой продукции растениеводства.

Задача изобретения - получение нового штамма, удобного в биотехнологическом отношении, обеспечивающего при инокуляции улучшение роста и развития растений, повышающего их урожайность, устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам, улучшающим качество получаемой продукции растениеводства, обеспечивающим экологические преимущества в технологии растениеводства.

Поставленная задача решается за счет нового штамма *Exophiala nigrum* A-26, который повышает урожайность растений, удобен в биотехнологическом отношении, способен размножаться в искусственных питательных средах, сохраняя свои свойства при пересевах, позволяет с повышенной эффективностью стимулировать рост и развитие растений, повышать иммунитет и общую устойчивость растений к неблагоприятному действию биотических и абиотических факторов, существенно улучшает качество получаемой продукции.

Штамм дрожжей *Exophiala nigrum* A-26 получен путем Уф-облучения. Штамм A-26 хранится в коллекции Внедренческой фирмы "Клон".

Штамм имеет следующую характеристику:

1. Номенклатурные данные А-26

Родовое название: *Exophiala*, видовое - *nigrum*. Происхождение: получен как мутант, индуцированный действием УФ-облучения от штамма R-11 *E. nigrum* Павленко В.В. в 1987 году. Исходный штамм R-11 *Exophiala nigrum* был выделен из пробы байкальской воды, взятой из поверхностного слоя в 5 м от берега в районе г. Байкальска в сентябре 1977 г. Предварительная идентификация штамма R-11, его изучение и описание проведены Павленко В.В., Харламовым В.М., Чемериловой В.И. (Павленко В.В., Чемерилова В.П., Харламов В.М. Использование "черных дрожжей" в токсико-генетических экспериментах. В кн. "Исследования по генетике ВМП 9. - Издательство Ленинградского университета, 1981 - С. 9-17). Он используется для улучшения очистки сточных вод ЦБК (А.с. S №1071637, кл. C12N 15/00, C02F 3/34, C12R 1/00, 1982), хранится в лаборатории Внедренческой фирмы "Клон".

2. Способ создания штамма А-26 *Exophiala nigrum*

УФ мутагенез при дробном облучении. На поверхности агаровых пластинок чашек Петри, заполненных питательной средой, наносили газон клеток 4-х суточной культуры R-11 *Exophiala nigrum*. Клетки распределяли по поверхности равномерно с помощью шпателя. На каждую чашку наносили 1-3 тысячи клеток штамма R-11. Поверхность агаровых пластинок с нанесенными на них клетками штамма R-11 облучали лампой БУФ-60, расположенной на расстоянии 60 см от поверхности чашек. Облучение проводили дозированно: 30 - 30 с перерывом между экспозициями 120 мин. После облучения чашки инкубировали в термостате при 22°C в течение 4-х суток. При указанном режиме на чашках выросло в среднем 50-100 колоний (выживаемость около 10 %).

Мутант А-26 выделен как морфологический, при визуальном анализе цвета и морфологии колоний, выросших после облучения клеток R-11. От исходного штамма он отличался более светлой серовато-бурой окраской. При многократных клонированиях новый признак сохранялся. В последующих экспериментах установлено, что частота ревертирования штамма А-26 меньше 1×10 , что является еще одним подтверждением мутационной природы штамма А-26.

3. Биотехнологические характеристики штамма А-26

Штамм А-26 продуцирует комплекс ростовых веществ и ферментов, стимулирующих проращивание семян, процессы корнеобразования, урожайность, а также повышающих иммунитет растений и устойчивость. Предназначен для использования при размножении и выращивании растений, обработки семян и посадочного материала.

В таблице 1 представлены сведения о важных биотехнологических свойствах изобретенного штамма А-26. Отсутствие сведений о биотехнологических свойствах прототипа обусловлено тем, что штамм *Glomus* sp. №7 не растет в искусственных средах и поэтому невозможно провести его сравнительное изучение. В таблице 1 приведены некоторые сведения о биотехнологических свойствах исходного штамма R-11, который используется для очистки сточных вод (А.с. SU №1071637, кл. C12N 15/00, C02F 3/34, C12R 1/00, 1982). Способность исходного штамма стимулировать рост и развитие растений, повышение их урожайности выяснилось позже. Сравнительные исследования показали, что штамм А-26 по активности превосходит родительский R-11 *E. nigrum*.

4. Условия культивирования Возможно поверхностное и глубинное культивирование в средах, применяемых для выращивания дрожжей.

5. Морфолого-культурные свойства штамма А-26

Клетки размером 8.4 x 4.2 - 7.0 x 2.8 мкм, размножаются верхушечным, реже - боковым почкованием, чаще односторонним. Почки овальные или овально-грушевидные.

При культивировании на специальных средах способен переходить к мицелиальному росту. Гифы мицелия образуются из крупных клеток. Мицелий септированный, нерегулярно разветвленный, в основном истинный, субстратный или воздушный образует хламидоспоры овальной формы, слегка удлиненные, трубка прорастания располагается на верхушке, размеры хламидоспор 10.0 x 6.3 - 11.5 x 7.3 мкм.

Половой процесс не обнаружен.

Рост на плотных средах

В агаризованных средах при температуре 22°C колонии дрожжевого типа появляются на 2 - 3 сутки. Штрих прямой, профиль выпуклый, край ровный, цвет серовато-бурый, темный с блеском. Консистенция пастообразная. Через месяц штрих уплотненный, слегка складчатый, неравномерно опушенный. Гигантская колония достигает диаметра 18-26 мм, выпуклая по краям, опушенная, серовато-бурого цвета, край ровный, центр приподнятый, консистенция пастообразная, уплотненная. В бедных средах (минимальной) край опушенный, на YEP- по краю валик темного цвета.

Рост в жидкой среде

При росте в минимальной среде в условиях перемешивания помутнение наблюдается на 2 сутки, на 3 - 4 сутки суспензия темная буроватого оттенка. В отсутствии перемешивания на дне темный осадок дрожжевых клеток; пленки или кольца нет. Через месяц в отсутствии перемешивания на поверхности дерновинка мицелия, обильный осадок на дне; запаха, пенообразования не наблюдается, pH сдвигается в кислую сторону.

6. Физиолого-биохимические свойства штамма A-26

а) Рост штамма в зависимости от условий в сравнении со штаммом R-11 (исходный) характеризуется данными, приведенными в таблице 2.

Прототип *Glomus* sp. 7 поддерживается на микоризованных корнях, что ограничивает возможность исследования физиолого-биохимических свойств.

б) Отношение к источникам углерода: штамм A-26 не сбраживает сахара, способен ассимилировать глюкозу, сахарозу, арабинозу, рамнозу, дульцит, мальтозу, лактозу (слабо), галактозу (слабо), рафинозу, манит; способен утилизировать фенолы и лигнин.

в) Отношение к источникам азота: штамм A-26 способен использовать широкий набор источников азота.

г) Другие особенности штамма A-26: штамм A-26 способен расти в минимальной среде без витаминов, не нуждается в дополнительных факторах роста, обнаруживает слабую протеолитическую активность: разжижение желатина послойное. Жир не гидролизует.

Эфиры и крахмалоподобные соединения не образует. Аминолитической активностью не обладает.

7. Маркерные признаки штамма A-26

Штамм A-26 содержит мутацию, блокирующую один из этапов синтеза меланина. Вместо черного, характерного для родительского штамма пигмента, штамм A-26 синтезирует буроватый пигмент. Ревертирует спонтанно с частотой ниже $1/10^7$: - при анализе выборки в 1×10^7 колонии, спонтанного ревертирования к исходному фенотипу не выявлено.

При культивировании в твердых средах пигмент не выделяет. Продуцирует комплекс ростовых веществ и ферментов, определяющих свойство штамма стимулировать рост, устойчивость и урожайность растений. Эти свойства стабильны при хранении в течение 3-х месяцев и сохраняются при пересевах. Периодичность посевов музейных образцов штамма A-26 *Exophiala nigrum* - 3 месяца.

8. Гено- и хемотаксономические характеристики штамма A-26 не изучали.

9. При проверке патогенных, вирулентных, аллергенных, токсикогенных и токсических свойств установлена полная безопасность штамма A-26 *E. nigrum*.

Штамм A-26 *E. nigrum* рекомендован для практического использования как безопасный для теплокровных организмов и растений.

10. Примеры использования штамма A-26 *E. nigrum*.

Пример 1.

Подготовку маточной культуры штамма A-26 *E. nigrum*, необходимую для изготовления биопрепарата, осуществляли следующим образом. Музейный образец штамма A-26 *E. nigrum* пересевали на чашки Петри с твердой средой. На 4-5 сутки после посева просматривали газон выросших колоний и в случае отсутствия посторонней микрофлоры ис-

пользовали для наращивания маточной культуры А-26 в жидкой среде. В 1 - 2-х литровые колбы, заполненные на 2/3 объема стерильной жидкой средой, опускали 1 агаровую пластинку с газоном выросших на ней клеток штамма А-26.

Колбы со средой, инокулированной штаммом А-26, помещали на качалку или магнитные мешалки и культивировали при постоянном перемешивании 24 ч при температуре 20-22°C. На вторые сутки, когда титр суспензии достигал $1 - 5 \times 10^8$ кл/мл, полученную маточную культуру переносили в ферментеры большего размера, заполненные стерильной жидкой средой того же состава. Возможно использование упрощенных вариантов жидких сред, содержащих азот, фосфор и калий в соотношении 90 : 60 : 30.

Титр исходной суспензии после внесения маточной культуры $1 - 10 \times 10^5$ кл/мл. Культивирование в ферментере при t 18 - 20°C при постоянном или периодическом (интервалы 20' - 20') барботировании воздухом или механическом перемешивании. Через 2 - 3 суток титр суспензии клеток достигал $1 - 5 \times 10^8$ кл/мл.

Полученная суспензия используется в дальнейшем в качестве препарата, применяемого в растениеводстве. В нем, кроме живых клеток А-26, содержатся метаболиты, продуцируемые клетками: - гормоны (ИУК, цитокинин и др.) и ферменты - оксигеназы.

Пример 2.

Исследовали стимулирующее действие штамма А-26 на проращение семян огурца сорта "Нежинский". Для обработки использовали суспензию штамма А-26 с титром 1×10^7 кл/мл (опыт №1) и с титром 5×10^5 кл/мл (опыт №2). Их готовили из маточной культуры. В зависимости от титра ее разбавляли в 10 или 50 раз для варианта опыт №1 и в 200 или 1000 раз для варианта опыт №2. Для разбавления использовали жидкую минимальную среду.

Штамм *Glomus* sp. №7 невозможно использовать в аналогичных условиях; его действие на проращение семян неизвестно.

Обработку суспензией и проращивание семян осуществляли в чашках Петри. На дно чашки помещали по 10 отколотых семян огурца и вносили по 25 мл суспензии соответствующего титра.

Эффективность обработки оценивали по таким показателям, как длина корня, стебля и семядолей; количество придаточных корней, вес проростка. В таблице 4 приведены результаты испытаний.

Представленные в таблице данные свидетельствуют, что обработка семян суспензией А-26 (опытный вариант 1) и суспензией разбавленной в 20 раз с титром 5×10^5 кл/мл (опытный вариант 2) обладают высокими стимулирующими свойствами. Проростки имеют наибольшую массу, укороченный, сильно развитый корень, с наибольшим числом придаточных корешков. Укороченный, хорошо развитый стебель. Причем лучшие показатели развития проростков наблюдали в варианте опыта 1, где использовали титр 1×10^7 . Снижение титра клеток А-26 ниже 5×10^5 нецелесообразно, т.к. положительные эффекты действия штамма А-26 на проращение семян существенно снижаются. Повышение титра суспензии штамма А-26 выше 1×10^7 также нецелесообразно, т.к. в этом случае наблюдается торможение ростовых процессов, вследствие завышенных концентраций ростовых веществ, продуцируемых клетками штамма А-26.

Пример 3

Сравнивали влияние инокуляции эндомикоризными грибами штаммом *Glomus* sp. №7 (прототип) и штаммом *Ectophiala nigrum* А-26 на урожай зерна овса в вегетационных опытах. Использовали окультуренную почву пашни, опыт ставили аналогично описанному для *Glomus* sp. №7 в примере 1 (4).

В вегетационный сосуд емкостью 3 л помещали сухую нестерильную почву, характеризующуюся содержанием гумуса 2.9 %, общего азота 0.19 %, Р2 О5 (по Кирсанову) 2.5 шт/100 г почвы, рН 6.6. Далее в сосуд вносили в качестве инокуляционного материала суспензию клеток *Ectophiala nigrum* А-26 с титром 1×10^7 кл/мл из расчета 200 мл на 1 кг почвы. После тщательного перемешивания с инокуляционным материалом почву засевали

поверхностно простерилизованными семенами овса. Полив почвы, как и в случае с *Glomus* sp. №7, осуществляли до 60 % полной влагоемкости. Результаты опыта в сравнении с данными для *Glomus* sp. №7 (4) представлены в таблице 5.

Полученные данные подтверждают, что штамм А-26 *E. nigrum* эффективно действует в случае использования его для инокуляции почвы. Прибавка урожая овса в вегетационных сосудах, заполненных предварительно инокулированной штаммом А-26 почвой, составляет 26.1 - 27.2 %, что существенно выше, чем в случае с *Glomus* sp. №7. При этом, одно из важнейших преимуществ изобретенного штамма А-26 *E. nigrum* по сравнению с прототипом *Glomus* sp. №7 - способность расти и размножаться на искусственных питательных средах, позволяет использовать его непосредственно для инокуляции семян и другого посадочного материала, а не только почвы, как в случае с прототипом. Благодаря этому возможно применение изобретенного штамма А-26 в производственных условиях на больших площадях без существенного усложнения обычной технологии выращивания зерновых, кормовых и овощных культур; в садоводстве и лесоразведении.

Пример 4.

В производственных условиях исследовали влияние штамма А-26 на рост, развитие, скорость созревания и урожайность пшеницы, ячменя и овса. В опытных вариантах использовали штамм А-26. Маточную культуру готовили, как описано в примере 1. Далее ее разбавляли в 10-50 раз до титра 1×10^7 - 5×10^5 кл/мл. Обработку проводили в день посева или за 1 - 3 дня до посева с помощью машин для протравливания семян: ПС-10 или "Мобитокс". Расход клеточно-ферментной суспензии А-26 составил 10-15 литров на одну тонну зерна. Для озимых и яровых культур установлено, что А-26 стимулирует всхожесть, снижает процент пораженных гнилью семян. В таблице 6 представлены данные о состоянии всходов озимой пшеницы Безостая-1, а также проценты не проросших здоровых и не проросших пораженных гнилью семян. Учет проводили через 1 месяц после посева. Размер учетных делянок - 30 см по рядку, по пять повторностей в каждом варианте.

Обработка семян злаков перед посевом клеточно-ферментной суспензией А-26 стимулирует формирование мощного узла кушения у растений. Мощная корневая система обеспечивает хороший контакт с почвой, что, в свою очередь, является основой для лучшего снабжения растений влагой и минеральными солями. Под действием А-26 обеспечивается закладка и развитие большего числа стеблей. В таблице 7 представлены данные об увеличении продуктивной кустистости у разных сортов пшеницы под действием А-26.

Оценку величины продуктивной кустистости осуществляли за 1 - 2 недели до уборки. Отбирали снопы с равных по площади делянок, чаще всего размер учетной делянки равнялся $1/16 \text{ м}^2$ (0.0625 м^2). В опытном и контрольном вариантах отбирали и анализировали по 3 - 7 снопов. Продуктивную кустистость оценивали как отношение числа стеблей с колосом к числу растений в каждом из снопов. В таблице 7 представлены средние величины продуктивной кустистости для разных сортов пшеницы.

Как для озимых, так и для яровых пшеницы, продуктивная кустистость в опытных вариантах, где семена перед посевом обрабатывали штаммом А-26, существенно выше, чем в контроле. Превышение продуктивной кустистости составляет 25.0 - 37.5 %. При этом установлено, что разница в загущенных посевах меньше, а в незагущенных больше. Учитывая факты увеличения процента всхожести семян под действием А-26, с одной стороны, и увеличения продуктивной кустистости под действием А-26, с другой стороны, логично снизить нормы высева зерновых в случае применения штамма А-26. Наиболее целесообразным представляется снижение нормы высева на 20-30 % по сравнению с контролем, где инокуляцию не применяли.

В таблице 8 представлены результаты, полученные при проведении полевых испытаний (деляночные испытания), по оценке урожайности в опытных и контрольных вариантах. В опыте норма высева снижена на 20 % по сравнению с контролем. Оценивали урожайность ячменя (сорт "Рассвет") и яровой пшеницы (сорт "Скала"). Семена за сутки перед посевом инокулировали суспензией А-26 *E. nigrum*.

Таким образом, установлено, что инокуляция семян штаммом А-26 перед посевом обеспечивает прибавку урожая даже в том случае, когда норма высева снижена по сравнению с необработанным А-26 контролем. Прибавка урожая для ячменя составила 9.2 ц/га (51.1 %), а для пшеницы - 5.8 ц/га (35.8 %).

Анализ структуры урожая позволил установить, что прибавка урожая обусловлена увеличением продуктивной кустистости, повышением озерненности колоса и увеличением массы зерна.

В таблице 9 приведены данные, полученные при проведении производственных испытаний, о влиянии штамма А-26 на урожайность пшеницы.

По сравнению с контролем, где инокуляцию клеточно ферментной суспензией А-26 не проводили, урожайность пшеницы в опыте повышается на 5.8 - 10.9 ц/га (18.9 - 37.5 %), для яровых пшеницы и на 10.3- 11.2 ц/га (26.6 -45.1 %) для озимых сортов пшеницы.

Штамм А-26 оказывает положительное влияние на качество зерна, муки и хлеба. Образцы зерна для проведения полного технологического анализа зерна, муки и хлеба отбирали во время уборки урожая. Результаты анализов приведены в таблице 10.

Применение штамма А-26 позволяет получать продукцию растениеводства, не содержащую остаточных пестицидов. Это обусловлено, во-первых тем, что ферменты - оксигеназы, продуцируемые штаммом А-26 способны с высокой активностью осуществлять деструкцию многих пестицидов, накопившихся в почве. Во-вторых, применение А-26 позволяет исключить протравливание семян ядами, поскольку установлено, что обработка семян штаммом А-26 повышает общую устойчивость растений, в том числе устойчивость к болезням. В опытных вариантах отсутствовали или встречались значительно реже, чем в контрольных вариантах, корневые гнили, твердая и пыльная головня. Растения меньше страдали от бурой ржавчины.

В таблице 11 представлены данные о влиянии А-26 на снижение процента растений, пораженных пыльной головней. Растения, развивающиеся из обработанных А-26 семян, "уходят" от головни.

Таким образом, штамм А-26 стимулирует у злаков устойчивость к неблагоприятным условиям и болезням, увеличивает кустистость, в том числе продуктивную кустистость, повышает урожайность, сокращает сроки прохождения стадий развития, ускоряя созревание, повышает качество зерна и муки за счет увеличения массы зерна, повышения содержания в зерне белка и клейковины.

Пример 5.

Исследовали влияние штамма А-26 на устойчивость к вирусным и бактериальным заболеваниям, урожайность и скорость созревания картофеля. Клубни картофеля обрабатывали перед посадкой штаммом А-26 *Exorhiala nigrum* (опыт) и штамма R-11 (контроль-1), приготовленные как описано в примере 1. Дополнительно в качестве контрольных были заложены варианты, где клубни обрабатывали триходермином (контроль-2) и химическим препаратом купрозаном (контроль-3). Обработку клубней осуществляли в момент посадки. Через форсунки картофелесажалки СКМ-4 препарат - раствор или суспензию клеток и ферментов из емкости подавали в сошник через распылитель при помощи шестеренчатого насоса. Клубни, падая через выбросное окно, проходили через зоны распыла и равномерно обрабатывались препаратом.

В таблице 12 представлены данные, свидетельствующие о положительном влиянии штамма А-26 *Exorhiala nigrum* на устойчивость растений картофеля к поражению вирусными, бактериальными и грибными заболеваниями. Процент пораженных болезнями и удаленных растений в варианте с А-26 значительно ниже, чем в контрольных вариантах. Кроме того, установлено, что в опытном варианте, где клубни перед посадкой обрабатывали штаммом А-26, урожайность была выше, чем в контрольных вариантах на 5 - 35 %, а созревание наступило на 10 - 15 дней раньше.

Пример 6.

Исследовали влияние штамма А-26 на урожайность и качество получаемой

продукции овощных культур, применение штамма А-26 при выращивании овощей позволяет получать диетическую продукцию с повышенным содержанием витаминов и сахара, не содержащих избыточных нитратов.

В таблице 13 представлены данные о содержании нитратов у моркови и капусты, выращенных из семян, обработанных перед посевом А-26 (опыт А-26) и необработанных (контроль б/о).

Применение А-26 для выращивания томатов повышает их устойчивость к болезням и вредителям, повышает урожайность и улучшает вкусовые качества.

В таблице 14 представлены данные о содержании в плодах томатов, выращенных с применением А-26, сахара, витамина С, а также содержание сухого вещества.

Применение А-26 для выращивания сахарной свеклы повышает ее урожайность, увеличивает сахаристость, повышает устойчивость к заболеваниям.

Диетические свойства овощной продукции, выращенной с применением штамма А-26 *E. nigrum*, повышаются еще за счет того, что в них не содержится остаточных пестицидов. Это обусловлено тем, что А-26 позволяет выращивать овощи без применения пестицидов или резко сократить их использование. Кроме того, штамм А-26 продуцирует ферменты, способные осуществлять деструкцию пестицидов, применявшихся для обработки растений и сохранившихся в почве от предыдущих обработок.

В таблице 16 представлены данные о повышении устойчивости растений огурцов к болезням. Семена огурца замачивали в клеточно-ферментной суспензии штамма А-26 (приготовление препарата описано в примере 1). Семена помещали на 3 - 10 ч в прохладное (15 - 18°C) место. Сеяли как обычно. После появления всходов проводили периодическую обработку штаммом А-26.

Штамм А-26 помогает выращивать экологически чистые овощи, ускоряя деструкцию пестицидов. В таблице 17 представлены результаты полупроизводственных испытаний способности штамма А-26 разлагать синтетический перетроид "Суми-альфа", применяемый для борьбы с насекомыми - вредителями, отличающийся высокой персистентностью.

Растения капусты обрабатывали препаратом "Суми-альфа". Через 24 ч половину участка обрабатывали клеточно-ферментной суспензией штамма А-26 (опыт), вторую - водой (контроль).

Через 48, 96 и 144 ч отбирали образцы растений опытного и контрольного вариантов, анализировали в них содержание "Суми-альфа".

Пример 7.

Штамм А-26 использовали для выращивания меристемной гвоздики. Перед высадкой корни рассады гвоздики мульчировали в специально приготовленной болтушке из глинистой почвы, перегноя и суспензии штамма А-26 с титром 5 x 10 кл/мл. Суспензию готовили, как описано в примере 1. Титр рабочей суспензии доводили до нужного путем разбавления водой. В течение первого месяца после высадки опытные грядки поливали суспензией штамма А-26 один раз в неделю. В контроле при высадке рассады гвоздики корни растений мульчировали болтушкой, приготовленной на воде. Полив осуществляли как обычно.

При сравнении опытного и контрольного вариантов было отмечено:

а) у растений в опыте первые бутоны появились значительно раньше, чем в контроле;

б) качество цветов в опытном варианте было существенно выше, чем в контроле;

в) количество цветов в опыте было в 2.5 раза больше, чем в контроле;

г) растения опытного варианта отличались здоровым видом, повышенной устойчивостью к болезням и вредителям;

д) выращивание цветов с применением штамма А-26 позволило исключить обработку ядами.

Таким образом, штамм А-26 *Exophiala nigrum* по сравнению с прототипом *Glomus*

sp. №7 удобен при размножении в искусственных средах и длительном хранении в музейных коллекциях, стабильно сохраняет ценные для практического использования в растениеводстве свойства. Кроме того, этот штамм не требователен к субстрату. Комплекс перечисленных в примерах 1-7 свойств обуславливает преимущества использования изобретенного штамма в практике растениеводства.

Таблица 1

Сравнительная характеристика биотехнологически важных свойств штамма А-26

Сравниваемые показатели	Исходный штамм R-11	Прототип <i>Glomus</i> sp. №7	Изобретенный штамм А-26
Синтез ростовых веществ:	Не идентифицированный комплекс, максимальная активность на 10-12 сутки (по биотестам)	Не растет в искусственных питательных средах, поэтому исследования биотехнологически важных свойств сильно ограничены	Комплекс гормонов, включающий ИУК и цитокинины (по биотестам с максимальной активностью на 7-10 сутки)
Стимулирующее действие в биотестах: а) растяжение coleoptилей пшеницы, мм; б) процент прорастания семян салата.	19.5 = 0.5	Не исследованы	22.5 = 1.5
Выявляемые ферментативные активности	66.7 Уреазная тирозиназная -- (фенолоксидазная)	Не исследованы Не известны	81.8 Уреазная каталазная, тирозиназная - (фенолоксидазная), слабая

Таблица 2

Основные характеристики условий роста штаммов А-26 и R-11

Штамм	Температура	Галлотолерантность	Осмолерант.	pH	Отношение к О	Отношение к циклогексимиду
А-26	+4°C +37°C; оптимальная 22 - 25°C	до 25 % NaCl	40% глюкозы	от 2.0 до 10.0 оптим. 5.0-7.0	аэроб.	чувствит. к 100 мкм/мл
R-11	+4°C +30°C; оптимальная +20°C +25°C	7 % NaCl	до 50 % глюкозы	3.5-7.0 оптим. 5.5-7.0	аэроб.	чувствит. к 100 мкм/мл

Таблица 3

Отношение штамма А-26 к источникам азота

Название вещества	Активность использования
Пептон	+++
KNO ₃	+++
(NH ₄) ₂ SO ₄	+++

аспарагин	+++
мочевина	++

Таблица 4
Стимулирующее действие А-26 на прорастание семян огурца

Вариант	Компоненты	Длина в мм			Вес проростка, мг	Количество придаточных корешков
		корня	стебля	семя долей		
Штамм А-26 (опыт 1)	миним. ср. 25 мл + сусп. А-26 титр 1 х 10 ⁷ кл/м	41.3	24.4	14.4	310.6	13.5
Штамм А-26 (опыт 2)	миним. ср. 25 мл + сусп. А-26 титр 5 х 10 ⁵ кл/м	35.4	26.3	14.2	265.0	8.6

Таблица 5
Влияние инокуляции *Exophiala nigrum* А-26 и *Glomus* sp. №7 на урожай зерна овса в вегетационных опытах

Фон	Варианты	Урожай зерна, г/сосуд	Прибавка урожая, %
НК	Контроль:		
	- без инокуляции	21.92	-
	- <i>Glomus</i> sp. №7 (прототип)	24.23	10.60
	Опыт:		
	- А-26 <i>E. nigrum</i>	27.65	26.10
НРК	Контроль:		
	- без инокуляции	22.13	-
	- <i>Glomus</i> sp. №7 (прототип)	25.49	15.20
	Опыт:		
	- А-26 <i>E. nigrum</i>	28.15	27.20

Таблица 6
Влияние штамма А-26 на всхожесть семян пшеницы "Безостая-1"

Состояние посевов:	Процент всходов в вариантах:	
	опыт А-26	контроль (без обр.)
Всходов	89.7	65.8
Не проросших семян	10.1	23.8
Пораженных гнилью семян	0.2	10.4

Таблица 7
Влияние штамма А-26 на продуктивную кустистость озимых и яровых сортов пшеницы

Сорта пшеницы	Продуктивная кустистость		
	опыт А-26	контроль (без обр.)	Превышение контроля, %
Яровые:			
Тулунская-12	1.5	1.1	36.4
Скала	1.2	0.9	33.3

Ладе	1.4	1.1	27.3
Озимые:			
Каргалыш	1.5	1.2	25.0
Краснодарская-70	2.2	1.6	37.5

Таблица 8

Оценка влияния штамма A-26 *Echophiala nigrum* на урожайность
ячменя и пшеницы при снижении нормы высева

Культура, сорт, вариант	Норма высева (штук зерен на 1 га)	Урожайность		влажность
		ц/га	процент	
Ячмень, с. "Рассвет":				
контроль (без инокул.)	6000000	18.0	100.0	стандарт
опыт (инокул. A-26)	4800000	27.2	151.1	стандарт
Пшеница, с. "Скала":	7000000	162	1000	стандарт
контроль (без инокул.)	5600000	22.0	135.8	стандарт
опыт (инокул. A-26)				

Таблица 9

Влияние штамма A-26 на урожайность разных сортов пшеницы

Сорт	Факт, урожайность, ц/га		Превышение над контролем	
	опыт A-26	контроль без обработ.	ц/га	%
Яровые пшеницы: Ту-				
лунская-10	39.9	29.0	10.9	37.5
Скала	32.3	26.5	5.8	21.9
Ладе	44.6	37.5	7.1	18.9
Тулунская-12	33.0	24.0	9.0	37.5
Озимые пшеницы:				
Каргалыш	36.0	24.8	11.2	45.1
Краснодарская	49.0	38.7	10.3	26.6

Таблица 10

Влияние штамма A-26 на качество зерна пшеницы

Сорт, Вариант	Масса 1000 зерен	Стекловидность, процент	Содержание в зерне	
			протеина, процент	клейковины, процент
Краснодарская-70				
контроль без обработ.	30.2	93	13.85	30.0
опыт A-26	36.8	98	15.95	36.0
Каргалыш контроль	32.1	99	14.50	32.0
без обработ. опыт A-26	32.5	99	15.60	36.0
Ладе контроль без	25.6	43	12.70	19.6
обработ. опыт A-26	29.1	72	14.40	27.2
Тулунская-10	30.1	66	11.01	18.0
контроль опыт A-26	32.8	84	13.13	28.1

Таблица 11

Влияние штамма A-26 на повышение устойчивости пшеницы к
поражению пыльной головней

Сорт, культура	Процент растений, пораженных пыльной головней	
	опыт А-26	контроль без обработки
Ладе, пшеница	0.8	3.07
Скала, пшеница	0.6	0.90

Таблица 12

Влияние штамма А-26 на устойчивость растений картофеля к
вирусным, бактериальным и грибным болезням

Болезни картофеля	Количество пораженных и удал. растений в опыте и контроле			
	Опыт А-26	К-1 R-11	К-2 три- ходермин	К-3 купрозан
Вирусные	26	38	26	27
Ризоктония	-	20	24	19
Черная ножка	-	2	1	4
Ослаблен неясной этиологией	56	81	92	99
Всего шт.	82	141	143	149
Процент от общего числа	0.16	0.28	0.29	0.30

Таблица 13

Влияние А-26 на содержание нитратов у капусты и моркови

Показатели качества	Содержание нитратов мг/кг	
	А-26	контроль б/о
Морковь	103.2	165.0
Капуста	100.0	162.7

Таблица 14

Влияние А-26 на качество плодов томатов

Показатели качества	Варианты	
	опыт А-26	контроль б/о
Витамин С, мг, %	7.12	5.61
Сахара, %	3.30	2.16
Сухое вещество, %	5.28	4.31

Таблица 15

Влияние А-26 на урожайность и сахаристость сахарной свеклы

Показатели	опыт А-26	контроль б/о
Урожайность, ц/га	485.0	448.0
Содержание сахара, %	13.02	12.44

Таблица 16

Влияние штамма А-26 на устойчивость растений
огурца к поражению серой гнилью

Варианты	Процент растений	
	пораженных	погибших
Опыт - (А-26)	4.0	1.2
К - (триходермин)	7.0	2.4

Таблица 17

Влияние штамма А-26 на ускорение деструкции "Суми-альфа"

Интервалы времени после обработки "Суми-альфа", час	Содержание "Суми-альфа", процент	
	опыт А-26	контроль (вода)
0	100	100
48	54	87
96	следы	65
144	отсутств.	32

Формула изобретения

Штамм дрожжей *Exophiala nigrum* ВКПМ У-748, используемый для обработки семян и выращивания растений.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Кожомкулова Г.А.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03