

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ БИОГЕРБИЦИДА НА ОСНОВЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Арапова Полина Андреевна

МАОУ «Лицей № 56», г. Новоуральск; Свердловская область;

polarapova@yandex.ru

Несмотря на зелёную революцию, связанную с использованием химических гербицидов, сорные растения и другая нежелательная растительность остаются на сегодняшний день серьёзной проблемой. Для решения данной проблемы разрабатываются микробиологические препараты (биогербициды) на основе природных соединений. В данной работе представлены результаты эксперимента по эффективности воздействия полученного микогербицида на сорные растения в лабораторных условиях.

Ключевые слова: сорные растения; инвазивные виды; гербициды; биогербициды; микогербициды; фитопатогенные микромицеты.

POLINA ARAPOVA

(RUSSIA)

MODELING OF THE PROCESSES OF OBTAINING A BIOGERBICIDE BASED ON PHYTOPATHOGENIC MICROMYCETES

Despite the green revolution associated with the use of chemical herbicides, weeds and other undesirable vegetation remain a serious problem today. To solve this problem, microbiological preparations (biogerbicides) based on natural compounds are being developed. This paper presents the results of an experiment on the effectiveness of the effect of the obtained mycoherbicide on weeds in laboratory conditions.

Keywords: weed plants; invasive species; herbicides; biogerbicides; mycoherbicides; phytopathogenic micromycetes.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Сорные и инвазивные виды растений остаются на сегодняшний день серьезной проблемой, несмотря на зеленую революцию, связанную с использованием химических гербицидов. В промышленно развитых странах гербициды применяются на 85-100% всех основных сельскохозяйственных культур [5]. Широкое бесконтрольное применение химических гербицидов привело к появлению устойчивых форм сорных растений к применяемым препаратам. При этом темп инноваций в области производства гербицидов в последнее время значительно снизился: за последние 20 лет не было открыто ни одного химического гербицида с неизвестным ранее сайтом активности [4]. На Международном гербологическом конгрессе (Прага, 2016 г.) проблема появления резистентных к химическим гербицидам популяций сорных растений была отмечена как приоритетная [1].

В последнее время общество начало опасаться, что повсеместное использование гербицидов может привести к необратимым последствиям для природы и самого человека. Многие исследования указывают на канцерогенность и генотоксичность одного из самых используемых в мире гербицидов – глифосата [5]. Препараты на его основе широко представлены в том числе и на российском рынке («Раундап», «Тайфун», «Торнадо» и др.). Открытие токсичности и долгий период распада многих гербицидов, возникновение резистентности сорных растений вынуждают разрабатывать альтернативные методы борьбы с нежелательной растительностью.

Решением проблемы может стать использование биологических гербицидов. «Биогербицидами называют микробные препараты для борьбы с сорной растительностью, которые направлены на то, чтобы вызывать сильные локальные эпифитотии в популяциях сорных растений» [1. С.6]. Процесс создания биологических гербицидов основан на поиске природных фитофагов и фитопатогенов. Среди фитопатогенов значительную долю

занимают микроскопические грибы, обладающие способностью активно распространяться и проникать в ткани хозяев. Именно микромицеты были выбраны автором для моделирования процесса получения биогербицида.

Цель работы: моделирование процесса получения биогербицида на основе фитопатогенных микромицетов.

Объект исследования – способы борьбы с сорными растениями.

Предмет исследования – использование микромицетов в качестве гербицидов.

Гипотеза: культуры микромицетов, выделенные из биоматериала больного растения и зараженной почвы, способны вызвать некрозы тканей нормальных растений.

Для достижения цели работы и проверки гипотезы были сформулированы следующие задачи: 1) изучить литературу и проанализировать состояние проблемы борьбы с помощью гербицидов с нежелательной растительностью; 2) провести эксперимент по выделению микромицетов с зараженного материала и определить агрессивность выращенных культур микроорганизмов на горохе посевном *Pisum sativum* и бобе обыкновенном *Vicia faba* в условиях лаборатории; 3) на основе результатов модельного эксперимента сделать выводы и спланировать этапы исследования эффективности воздействия микогербицидов на сорные растения в полевых условиях.

Практическая значимость работы. Моделирование процесса получения инфекционного материала для биогербицида и проверка его агрессивности *in vitro* является лишь предварительной стадией для оценки возможности и необходимости последующих исследований в этом направлении в естественных условиях обитания сорных растений.

Поиск новых средств в разработке биологических способов борьбы с сорными растениями позволит в перспективе решать, как проблемы сельского хозяйства (потери урожая из-за засоренности посевов, получение экологически чистой продукции), так и вопросы, связанные с противостоянием распространению инвазивных видов.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент по выделению микромицетов с зараженного материала и определение их агрессивности проводился на основе методики, описанной в пособии по организации учебно-исследовательской и проектной работы «Зелёные биотехнологии» программы «Школьная лига РОСНАНО» [3].

В работе использовались материалы учебного модуля «Зелёные биотехнологии» из кейса «AnUnweededGarden» (Сад без сорняков), разработанного специально для данной программы, в том числе лабораторное оборудование и биоматериалы (листья гороха, пораженные пятнистостью и образец почвы из-под пораженного растения). Эксперимент проводился в декабре-январе 2020 года на базе кабинета биологии лицея № 56 г. Новоуральска.

Модельный эксперимент включал несколько этапов: 1) выделение фитопатогенов с биоматериала и почвы; 2) определение агрессивности выделенных культур микромицетов *in vitro*. Для заражения культурой микромицетов использовались горох посевной *Pisum sativum* (рекомендованный в пособии «Зелёные биотехнологии») и боб обыкновенный *Vicia faba*. На подготовительном этапе из семян гороха (сорт Женева) и бобов (сорт Дачник) были выращены растения, листья которых использовались для определения агрессивности выделенных культур микроорганизмов.

1 этап. Выделение микромицетов с биоматериала и почвы.

Для выделения фитопатогенов на чашку Петри с питательной средой Чапека с антибиотиком, прокаленным в пламени спиртовки пинцетом помещали зараженный лист. Для определения микобиоты почвы навеску земли пересыпали в колбу со стерильной водой и в течение 15 минут периодически взбалтывали. 0,2 мл полученной взвеси с помощью пипетки Пастера впрыскивали в чашку Петри с питательной средой Чапека. После посева чашки с образцами оставляли в теплом месте на 7 дней. На 7 день описывали морфологию колоний, готовили прижизненные препараты для

микроскопирования. Для этого с помощью обработанного спиртом микробиологического бура делали лунки в участках агара, где наблюдался наиболее активный рост гриба. Шпатель переносил круг агара с грибом в пробирку с водой и перемешивали. Далее каплю раствора переносили на предметное стекло, закрывали покровным стеклом, удалив излишки воды. Прижизненные препараты рассматривали под микроскопом.

2 этап. Определение агрессивности выделенных культур микромицетов.

Для определения агрессивности выделенных культур предварительно приготовили 6 чашек Петри, на дно которых поместили фильтровальную бумагу. Чашки залили кипятком, закрыв крышкой оставили на 10 минут, после чего воду слили. После остывания на фильтровальной бумаге разместили листья гороха и бобов по 4 штуки на каждый вариант. В качестве инфекционного материала использовали выращенные культуры микромицетов, полученные с пораженных листьев и проб почвы из-под больных растений. С помощью микробиологического бура, обработанного в спирте и просушенного, вырезали лунки в питательной среде в чашках с культурами грибов и переносили их на середину листа грибом вниз. В контрольных вариантах на листья размещали кружки стерильной питательной среды, не содержащие инфекционный материал. Степень поражения листьев наблюдали на 3 сутки и 7 сутки. Фиксировали изменение цвета листа по сравнению с контролем (потемнение, некроз и пр.) и степень поражения.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое описание колоний микромицетов, выделенных с материала больного растения и зараженной почвой в ходе первого этапа эксперимента, дано в Приложении 1.

На питательной среде с почвой выросли разные по внешнему виду колонии микромицетов. Это объясняется присутствием в почве разнообразной микробиоты. Микроорганизмы образовали небольшие по размеру колонии, значительно меньше, чем колонии, выделенные с листа больного растения. На питательной среде с заражённым листом появились внешне одинаковые колонии большого диаметра. Вероятно, нами выделен один вид микроорганизма, вызвавший пятнистость на листьях растения. Большой диаметр колоний и раннее спорообразование указывают на быстрый рост микромицета.

Микроскопирование высевных грибков позволяет предположить поражение исходного биологического материала пеноспорозом бобовых (возбудитель *Peronosporamanshurica* Syd. из класса Oomycetes), а также возможное присутствие в почве возбудителя аскохитоза гороха - *Ascochyta pinodes* Jones. Фотографии обнаруженных грибов представлены в приложении 2. Точное определение видовой принадлежности фитопатогенных микромицетов затруднено из-за отсутствия информации о морфологических особенностях пораженных частей растения.

Результаты второго этапа эксперимента по определению агрессивности выделенных культур микромицетов представлены ниже в таблице, фотографии поражений листьев в разных вариантах опыта – в приложении 3.

При заражении тканей листа культурой микроорганизмов, выделенной из образца почвы, на 3 сутки на листьях гороха выявлены незначительные изменения (только у 1 из 4 листьев наблюдалось изменение цвета на темно-песочный), на 7 сутки новых изменений не наблюдалось. На листьях боба наблюдали некроз всей поверхности листовой пластинки в 3 случаях из 4 на 3

сутки эксперимента и отмирания тканей всех листьев на 7 сутки. Возможно, что горох и боб отличаются по степени восприимчивости к патогену. Но более вероятно, что инфекционный материал, полученный с образца зараженной почвы был неоднороден, и на листья гороха попали в том числе непатогенные формы микромицетов, обитающие в почве.

Определение агрессивности выделенных культур микромицетов

№ опыта	Материал для заражения	Источник инфекционного материала	Описание поражения листьев на 3 сутки и 7 суток
1	листья гороха	почва	в 3 из 4 случаев цвет листа не изменился, в 1 случае изменился на темно-песочный; на 7 сутки новых изменений не отмечено.
2	листья гороха	пораженный лист	полное почернение 3 листьев из 4, в одном случае цвет изменился на бурозеленый, на 7 сутки новых изменений не отмечено
3 контр.	листья гороха	не использовался	зелёная окраска листьев без изменений и пятен в течение всего эксперимента
4	листья боба	почва	полное почернение листьев в 3 случаях из 4, в одном случае тёмно-бурые пятна (около 40% поверхности), на 7 сутки некроз всех листьев
5	листья боба	пораженный лист	полное почернение всех листьев на 3 сутки
6 контр.	листья боба	не использовался	без пятен, цвет листьев изменился на темно-зеленый, на 7 сутки новых изменений не отмечено

В ходе эксперимента мы наблюдали, как выделенные из зараженных материалов микромицеты инициировали некроз на листьях боба и гороха. Это произошло из-за того, что полученные фитопатогенные микроорганизмы выступили в роли биогербицида. Результаты эксперимента дают нам возможность говорить о том, что выделенные в лабораторных условиях культуры микромицетов обладают достаточной агрессивностью по отношению к используемым в эксперименте растительным тканям и могут быть использованы для дальнейшего исследования на самих растениях *in vivo*.

Воздействие выделенных в ходе опыта культур микромицетов оказалось разным для листьев гороха и боба (некроз на листьях боба развивался быстрее). Можно предположить, что действие патогена нацелено на узкий круг представителей семейства Бобовых. В ходе дальнейших исследований необходим сбор зараженного биоматериала с сорного растения конкретного вида. Но проверка его патогенности для родственных видов также имеет смысл.

В результате проведенного модельного эксперимента по получению биогербицида можно сделать следующие предварительные выводы:

- использование биоматериала больного растения позволяет получить чистую культуру фитопатогена, обладающую относительно высокой агрессивностью;
- выделение фитопатогенных микромицетов из микобиоты зараженной почвы затруднено и не рекомендуется для дальнейшего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и получение биогербицидов является перспективным направлением в борьбе с нежелательной растительностью. Однако число успешных проектов по разработке биогербицидов на сегодняшний момент не велико по сравнению с химическими: 13 препаратов зарегистрировано на мировом рынке, ни одного – в РФ. В первую очередь это связано с селективным характером биогербицидов[2]. Однако еще в 1972 году В.М. Горленко отметил, что «неудачи, связанные с применением микробиометода в борьбе с сорными растениями, являются следствием недостаточной изученности их микобиоты и исследований, проводимых без должного учета сложившихся взаимоотношений растений и патогенов» (цит. По статье [2. С. 8]).

Проведенный эксперимент по моделированию процесса получения биогербицида подтвердил выдвинутую гипотезу: культуры микромицетов, выделенные из биоматериала больного растения и зараженной почвы, способны вызвать некрозы тканей нормальных растений. Результаты исследования позволяет сформулировать следующие выводы:

1. В условиях лаборатории возможно выделение с зараженного материала культур фитопатогенных микромицетов, способных вызывать некроз растительных тканей *invitro*.

2. Для получения чистой культуры фитопатогенных микромицетов предпочтительней использовать биоматериал больного растения, а не зараженную почву.

Моделирование процесса получения инфекционного материала для биогербицида и проверка его агрессивности *in vitro* является лишь предварительной стадией для оценки возможности последующих исследований в этом направлении. На следующих этапах изучения фитопатогенных микромицетов планируется инфицирование патогенами самих растений в лаборатории и в полевых условиях.

Автор выражает благодарность доценту УРФУ, кандидату биологических наук А.А. Ермошину за рекомендации и замечания при рецензировании работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берестецкий А.О. Перспективы разработки биологических и биорациональных гербицидов / Берестецкий А.О. // Вестник защиты растений. 2017, № 1. С. 5-12.
2. Берестецкий А.О. Проблемы и достижения в области биологической борьбы с сорными растениями при помощи фитопатогенных грибов / Берестецкий А.О. // Микол. и фитопатол. 2004. Т. 38, № 5. С. 1-15.
3. Максимова Е.Б., Бондаренко Ф.В., Кудряшов Е.С. Модуль Гид «Зелёные биотехнологии» / учебный модуль программы «Школьная лига РОСНАНО» для организации учебно-исследовательской и проектной работы учащихся, элективных курсов и факультативов. СПб.: Школьная лига, 2016. – 32 с.
4. Разработка гербицидов за тридцать прошедших лет. Перевод статьи доктора Клиффорд Гервик «Обзор прошлого и размышления над будущим». Борисова М. [Электронный ресурс]: Агропромышленном портале АГРОXXI. URL: <https://www.agroxxi.ru/stati/razrabotka-gerbicidev-za-tridcat-proshedshih-let.html> (дата обращения: 05.12.2020).
5. Тенденции на мировом рынке средств защиты растений: синтетические пестициды. [Электронный ресурс]: ГлавАгроном. URL: <https://glavagronom.ru/articles/tendencii-na-mirovom-rynke-sredstv-zashchity-rastenii-sinteticheskie-pestitsidy> (дата обращения: 10.11.2020).
6. Guyton Kathryn Z., Loomis Dana, Grosse Yann, El Ghissassi, Fatiha Benbrahim-Tallaa, Lamia Guha, Scoccianti Chiara, Mattock Heidi, Straif Kurt. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate (англ.) // The Lancet: journal. — Elsevier, 2015. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(15\)70134-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(15)70134-8/fulltext) (дата обращения: 25.01.2021)

Описание колоний микомицетов, выделенных с зараженного материала

Свойства	Материал для посева	
	образец почва	лист растения
Диаметр колонии (см)*	0,5	1,7
Цвет	мицелий белый, отдельные участки колонии серо-желтые и светло-зелёные	мицелий белый, спорангии черные
Реверс	песочный	серый
Поверхность	шероховатая	складчатая
Край колонии	ровные, волнистые	волнистый
Мицелий	стелящийся	стелящийся
Профиль	выпуклый, плоский	выпуклый

* – оценивался размер самой большой колонии

Фотографии микромицетов, выделенных с биоматериала и почвы



Фото 1. Колонии микромицетов, выделенные с заражённого листа (слева),
на питательной среде с почвы (справа)

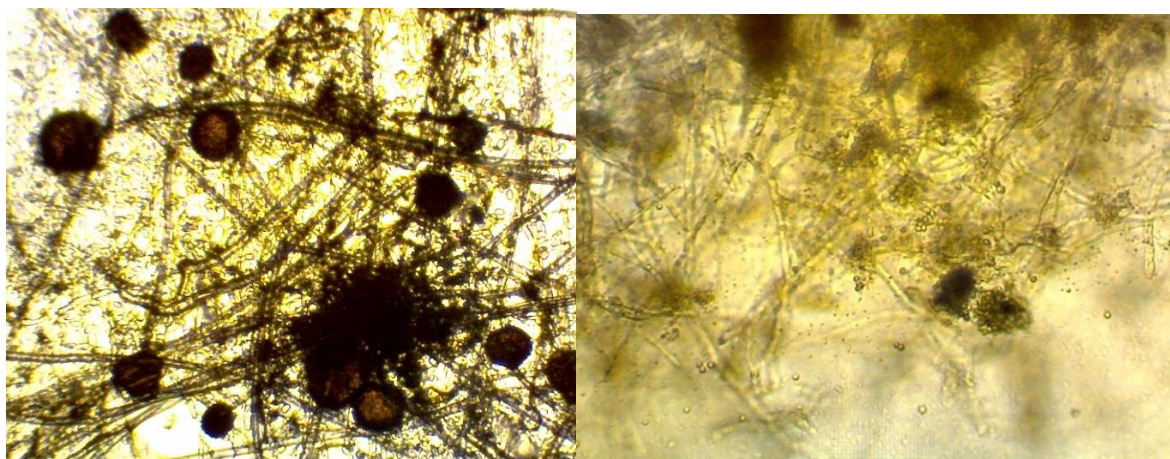


Фото 2. Микромицеты, выделенные с зараженного листа (слева) и почвы
(справа). Увел. в 80 раз

Фотоматериалы второго этапа эксперимента по определению агрессивности выделенных культур



Фото 4. Поражение листьев боба (слева) и гороха (справа) микромицетом, выделенного с биоматериала больного растения



Фото 5. Поражение листьев боба (слева) и гороха (справа) микромицетом, выделенного со среды с поражённой почвой

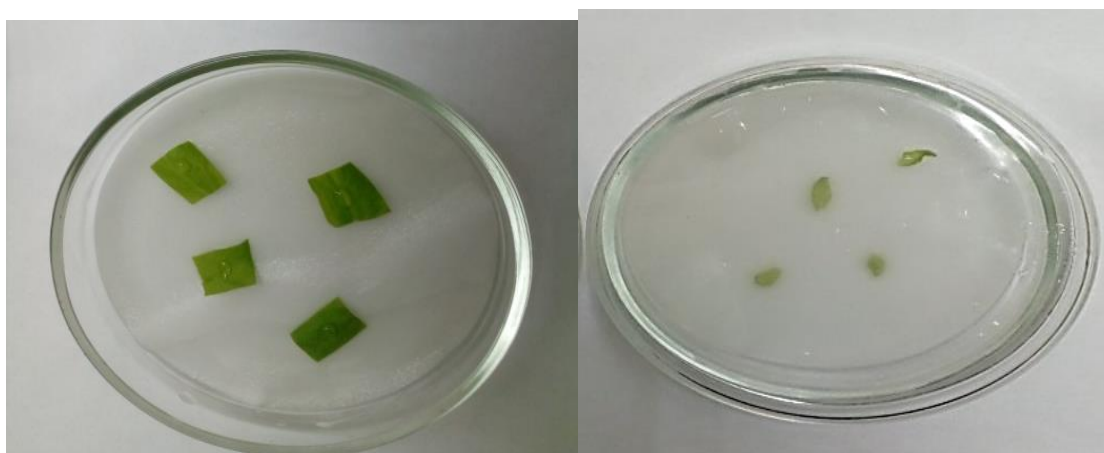


Фото 6. Контрольный опыт листьев боба (слева) и гороха (справа)