

Штамм микроорганизма *Clonostachys rosea* f. *catenulata* в качестве биофунгицида , стимулятора роста растений и продуцента метаболитов для сельскохозяйственного применения .

Изобретение относится к микробиологии , биотехнологии и сельскому хозяйству и представляет собой штамм микроорганизма *Clonostachys rosea* f. *catenulata* ВКПМ-F1324 , используемый для защиты сельскохозяйственных растений от различных заболеваний , вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями , а также в качестве стимулятора роста растений и продуцента метаболитов для сельскохозяйственного применения .

Микроорганизмы *Clonostachys rosea* f. *catenulata* известны с одной стороны в качестве деструктора поливинилового спирта . Из уровня техники известен документ RU 2415915 10.04.2011 С1, в котором описан штамм *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (J.C.Gilman et E.V.Abbott) Schroers ВКПМ F-991, используемый в качестве биодеструктора поливинилового спирта .

С другой стороны известно , что микроорганизмы вида *Clonostachys rosea* f. *catenulata* используют в сельском хозяйстве . Известно использование для улучшения роста растений , например , в составе композиций , содержащих помимо микроорганизма также мульчу (см. WO 2014076663 22.05.2014 А 1).

Из уровня техники известны фунгицидные смеси на основе азолопиримидиниламинов , в которых в качестве противогрибковых агентов биологического контроля , биоактиваторов растений используют штамм или бесклеточный экстракт , и/или мутант этого штамма или экстракта , имеющий все отличительные характеристики соответствующего штамма или экстракта *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (WO 2011/17271 29.09.2011).

Из уровня техники известно также использование других видов данного микроорганизма . Так , известен штамм *Clonostachys rosea* f. *rosea*,

IDAC 040913-01, который подавляет или контролирует заболевание или патоген, которые поражают листья, цветы, плоды и/или корни растения (WO 2015/035504, 19.03.2015). В данном документе описана также композиция, включающая выделенную культуру данного штамма, способ обработки растения агентом биологической защиты, включающий контактирование растения с выделенной культурой, спорами гриба или указанной композицией, способ уменьшения порчи растительного материала, где способ включает контактирование растительного материала с выделенной культурой, спорами гриба или композицией.

Штамм *Clonostachys solani* f. *nigrovirens* (van Beyma) Schroers ВКПМ F-990 известен как биодеструктор термопластичного полиуретана и латекса на основе акриловой кислоты (RU 2415917 10.04.2011 С 1).

Задачей же настоящего изобретения является получение высокоэффективного штамма для использования в сельском хозяйстве для защиты сельскохозяйственных растений от различных заболеваний, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями, для ускорения роста и развития растений, для увеличения урожайности и качества продукции, а также для получения используемых в сельском хозяйстве ценных метаболитов, таких как аминокислоты и фитогормоны.

Авторами настоящего изобретения был выделен штамм *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, депонированный во Всероссийской Коллекции Промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ-F1324.

Штамм выделен из ризосферы хлопчатника в Ташкентской области.

Культурально-морфологические признаки штамма:

Колонии на сусло-агаре вначале белые, опушенные, со временем приобретающие серо-зеленоватый цвет) с концентрической зональностью, реверс светло-желтый. Конидиеносцы по периферии колонии вертициллоидного типа, с широко расходящимися фиалидами, в центре преобладают конидиеносцы пенициллоидного типа с более плотно сжатыми

фиалидами , двух -и трехъярусные , конидии овальные) в длинных цепочках , слизистые .

Растет в аэробных условиях . Хороший рост при Ю...30°С, растет в широких пределах рН от 3,0 до 9.

Для штамма характерен хороший рост и спороношение при выращивании на агаровых средах - сусло -агар, картофельно -сахарозная среда, среда Чапека , крахмально -соевая , среда из отвара отрубей .

Спорообразование начинается на пятый день роста при 24...26°С.

Линейный рост колонии на агаризованных средах :

На сусло -агаровой среде на чашках Петри - на 10-й день роста -размером в 50 мм, на 20-й день - 80 мм .

На картофельном агаре на 14-й день роста - 45 мм, на 20-й день 90 мм .

На агаровой среде Чапека с сахарозой на 12-й день роста - 45 мм, на 20-й день - 85 мм .

При глубинном культивировании на минеральных и органических средах штамм растет в виде гомогенной массы бежевого или зеленого цвета .

Колонии на агаре Чапека белые , распростертые , пушистые , с конидиеносной зоной в центре колонии , оливково -зеленого или зеленого цвета , при старении темно -зеленого , разделенной 1-2 концентрическими кругами (зонами) стерильного светлого мицелия . Воздушный мицелий обильный , часто в виде гифальных тяжей . Конидиеносцы обычно однократно , иногда двукратно ветвистые , грубые , с шероховатой или точечной оболочкой 50-125 μ длины , с цепочками конидий , соединенными слизью в плотную колонку до 150 μ длины . Первичные веточки 15-20=3,5-4 μ ; метули 15-25 μ , стеригмы 10-20 μ

длины . Конидии эллиптические , гладкие , бледно или темно -зеленые 4-7,5=3-4 μ .

Физиолого -биохимические свойства .

При росте на среде Чапека из источников углерода усваивает глюкозу , сахарозу , мальтозу , маннозу , галактозу , лактозу , рафинозу , арабинозу , сорбозу , крахмал , глицерин . Из источников азота использует нитрат Na и нитрат K , сернокислый аммоний , нитрат аммония , хлористый аммоний , аммоний фосфорнокислый однозамещенный , пептон , лейцин , лизин , аспарагин .

Штамм синтезирует :

Антибиотики : глиокладин , глиоверин , виридин , ; ферменты : Бета -1,2-глюконазу , целлобиазу , хитиназу ; аминокислоты : глутаминовую , глицин , аргинин , пролин , цистеин , меионин , орнитин , лизин , фенилаланин ; ауксины : индолилмолочную , индолилуксусную , индолилкарбоновую кислоты ; гибберрилиновую и абсцизовую кислоту ; углеводороды , в том числе этилен .

Штамм гриба *Clonostachys rosea* f. *catenulata* VKriM-F1324 не патогенен для теплокровных животных и человека .

Были исследованы антагонистические свойства по отношению к широкому перечню фитопатогенных грибов и бактерий . Также был проведен анализ синтеза ряда метаболитов .

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено , что в результате действия штамма существенно снижается заболеваемость растений , снимаются острые формы поражения , ускоряется развитие растений , возрастает урожай и качество продукции .

Изобретение иллюстрируется следующими примерами .

Изучение антагонизма активности штамма *Clonostachys rosea* f. *catenulata* ВКнМ-F1324 сравнивалось с изученными штаммами *Gliocladium* в чашках Петри и на газонах фитопатогенных грибов *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum*. Активность оценивали по диаметру зоны отсутствия роста тест -объекта вокруг блока антагониста и по интенсивности воздействия антагониста на газон - степени просветления газона , что отмечено плюсами .

Таблица 1

Антагонистическая активность штаммов <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> ВКПМ-F1324 и <i>Gliocladium</i> по характеру взаимодействия с фитопатогенным грибом <i>Verticillium dahliae</i> на среде Чапека			
Грибы-антагонисты	Радиус антагонистического воздействия, см	Степень антагонистического воздействия	Примечания
<i>Gliocladium roseum</i> 1-27	2	+	+ слабая
<i>Gliocladium catenulatum</i> 3	2,5	++	++ средняя
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> ВКПМ-F1324	3	+++	+++ сильная

Оценка защитного действия штаммов грибов -антагонистов проводилась на сероземной почве +2 т/га лигнина в микровеgetационном опыте , где в почву совместно с антагонистами были внесены микросклероции *Verticillium dahliae* 0,15 г/кг. Для сравнения в опыт был включен штамма - *Trichoderma harzianum* 18 VIZR. Действие антагонистов на *Verticillium dahliae* в почве и на заражение хлопчатника вертициллезом представлено в таблице 2.

Таблица 2

Количество зачатков <i>Verticillium dahliae</i> в почве и заболеваемость хлопчатника вертициллезным вилтом при внесении грибов-антагонистов в сероземную почву с добавкой 2 т/га лигнина				
Варианты опыта	Количество зачатков <i>V. dahliae</i> в почве, ед./1 г.п.		Заболеваемость хлопчатника, %	Техническая эффективность, %
	4 суток	10 суток		
Контроль, почва без антагониста	4200	2100	40	-
<i>Gliocladium roseum</i> 1-27	3800	600	10	75
<i>Gliocladium catenulatum</i> 3	500	100	10	75
<i>Trichoderma harzianum</i> 18 VIZR	2900	730	23	42
<i>Clonostachys rosea f. catenulata</i> ВКПМ-F1324	1000	100	5	85

Защитный эффект ***Clonostachys rosea f. catenulata* ВКПМ-F1324** оказался сильнее других штаммов *Gliocladium catenulatum* и *Trichoderma*.

Оценка фитотоксичности культуральной жидкости штамма проводилась по методике Берестецкого на семенах огурца и томата в сравнении с другими *Gliocladium catenulatum* 3, *Trichoderma harzianum* 18 VIZR, *Fusarium oxysporum* и *Verticillium dahliae*.

Таблица 3.

Действие фильтратов грибов -антагонистов и фитопатогенов на семена (размер корешков , см)

Название среды	Чистая среда	<i>Clonostachys rosea f. catenulata</i> ВКПМ - F1324	<i>Gliocladium catenulatum</i> 3	<i>Gliocladium roseum</i> 27	<i>Trichoderma harzianum</i> 18 VIZR	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
		2	3	4	5	6	7
Огурец							
Чапек	3,2	4,6	4,2	3,5	4	2,9	2,8
Ричарда	4	6,5	5,1	3,8	4,3	3	2,7
НСР _{0,95}	0,23						

Томат							
Чапека	1,5	2,4	2,1	1,8	2,0	1,4	1,4
Ричарда	1,5	2,8	2,3	1,8	2,1	1,2	1,3
НСР _{0,95}	0,15						

Результат сравнения свидетельствует о значительном стимулирующем действии на прорастание семян при их замачивании в культуральной жидкости штамма ВКИМ-F1324 .

Штамм *Clonostachys rosea f. catenulata* ВКИМ-F1324 способен также проявлять антибактериальные свойства . Оценка антибактериального действия штамма штамма *Clonostachys rosea f. catenulata* ВКПМ - F1324 проводилась на чашках Петри методом противоположных колоний со штаммом бактерии *Ralstonia solanacearum*. Активность оценивали по воздействию микроорганизмов друг на друга .

Через 3 дня после начала эксперимента произошло соприкосновение зон роста штамма *Clonostachys rosea f. catenulata* ВКИМ-F1324 и бактерии *Ralstonia solanacearum*. Рост бактерии прекратился и началось подавление *Ralstonia solanacearum*. Через 14 дней штамм бактерии *Ralstonia solanacearum* был полностью подавлен штаммом *Clonostachys rosea f. catenulata* ВКПМ - F1324.

Таким образом , штамм *Clonostachys roseaf. catenulata* депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИГенетика » 18 мая 2016 года под регистрационным номером ВКПМ - **F1324** может быть успешно и эффективно использован против возбудителей

грибных и бактериальных болезней растений, а также для стимуляции роста растений.

Анализ фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты) в культуральной жидкости гриба.

Для экстракции ауксинов, гиббереллинов и абсцизовой кислоты брали 20 мл культуральной жидкости или стерильной питательной среды (контроль). Растворы доводили до pH=3,0 4н соляной кислотой и экстрагировали эквивалентными объемами этилацетата. Полученные экстракты выпаривали досуха под вакуумом при 350С и растворяли в 350 мкл 18% ацетонитрила. Анализ ауксинов в полученных пробах проводили методом Ультра Производительной жидкостной хроматографии (UPLC) на системе Waters ACQUITY UPLC H-класса (Waters, США). Анализ содержания ауксинов проводили с использованием флуоресцентного детектора при длинах волн: $E_x=280$ нм, $E_m=350$ нм. Анализ проводили на хроматографической колонке Waters ACQUITY UPLC VEN RP18 Shield 1,7 мкм x 50 мм в 18% растворе ацетонитрила с добавлением 0,1% уксусной кислоты при скорости потока 0,3 мл/мин. После анализа каждого образца колонку промывали 3 минуты 80% ацетонитрилом. Анализ абсцизовой и гибберелловой кислот проводился по той же методике, но с обнаружением целевого метаболита на ультрафиолетовом диодноматричном детекторе при длине волны 265 нм (абсцизовая кислота) и 208 нм (гиббереллины).

Результаты анализа представлены в таблице 4

Таблица 4. Биосинтез ауксинов, абсцизовой и гибберелловой кислот, нг/мл
Индолилмолочная кислота - 32,0
Индолилкарбоновая кислота —4,1
ИУК -103,4

Абсцизовая кислота -69,5

Гибберелловая кислота -322,4

Анализ содержания аминокислот в культуральных жидкостях .

Равные объемы культуральных жидкостей (по 50 мл) концентрировали под вакуумом на ротационном испарителе до объема 3 мл. Для определения состава аминокислот использовался современный высокочувствительный метод AccQ-Tag (Waters, США), основанный на применении дериватизационного реагента ACQ - 6-aminoquinoly-N-hydrozysuccinimidyl carbamate, превращающего аминокислоты в стабильные флуоресцирующие производные . Полученные производные разделялись методом обращеннофазовой хроматографии на колонке C 18 Waters AccQ-Tag с обнаружением на флуоресцентном детекторе согласно стандартной методике Waters. Определение содержания L-триптофана проводилось в тех же концентрированных образцах , но без обработки реактивом ACQ с обнаружением на флуоресцентном детекторе (длина волны возбуждения флуоресценции - 280 нм, длина эмиссионной волны - 350 нм).

Количество обнаруженных аминокислот представлено в таблице 5. Показано , что культуральная жидкость гриба отличается повышенным количеством глутаминовой кислоты и глицина .

Таблица 5 Содержание аминокислот , мкг /мл.

Аминокислота	Стерильная среда	Гриб
Аспарагиновая	1,24	0,19
Серин	2,82	1,00
Глутаминовая	1,33	3,30
Глицин	0	2,44
Гистидин	3,76	0,49
Аргинин	0	0,33
Треонин	13,10	0,71
Аланин	2,52	1,42
Пролин	0,41	0,52

GABA	2,45	0,16
Цистеин	0,04	0,25
Тирозин	4,61	1,16
Валин	1,82	1,02
Метионин	0,10	0,13
Орнитин	0,01	0,14
Лизин	0,14	0,92
Изолейцин	3,34	0,87
Лейцин	3,01	1,36
Фенилаланин	0,80	1,16
Триптофан	0,18	0,03

Контроль - стерильная питательная среда.

GABA - гамма -аминомасляная кислота

Формула изобретения .

1. Штамм *Clonostachys rosea* f. *catenulata* ВКІ1М-F1324 , используемый для защиты растений от различных заболеваний , вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями , а также в качестве стимулятора роста растений и продуцента метаболитов , таких как фитогормоны и аминокислоты .

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 201 7/000357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/14 (2006.01); A01 H 17/00 (2006.01); A01 N 63/04 (2006.01); A01 N 25/22 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/14, A01 H 17/00 A01 N 63/04, 25/22 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PAJ, Esp@cent, PCTonline, USPTODB, WIPO, RUPTO, EAPATIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	WO 2015/035504 (BEE VECTORING TECHNOLOGY INC) 19.03.2015, the abstract	1
D, A	RU 241 591 7 S 1 (LEGONKOVA OLGA ALEKSANDROVA et al.) 10.04.201 1, the abstract	1
A	RU 2154381 C2 (KEMIRA AGRO OI) 20.08.2000, the claims	1
D, A	WO 201 1/1 17271 A2 (BASF CORP et al.) 29.09.201 1, the claims	1
<p>II Further documents are listed in the continuation of Box C. D See patent family annex.</p> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 January 201 8 (10.01 .2018)		Date of mailing of the international search report 18 January 201 8 (18.01 .201 8)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ		C12N 1/14 (2006.01) A 01N 17/00 (2006.01) A01N 63/04 (2006.01) A01N 25/22 (2006.01)	
Согласно Международной патентной классификации МПК			
В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА			
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)			
C12N 1/14, A 01N 17/00 A01N 63/04, 25/22			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки			
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)			
PAJ, Esp@cent, PCTonline, USPTODB, WIPO, RUPTO, EAPATIS			
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :			
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	
D,A	WO 2015/035504 (BEE VECTORING TECHNOLOGY INC) 19.03. 2015 , реферат	1	
D,A	RU 2415917 CI (ЛЕГОНЬКОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВА и др.) 10.04.201 1 , реферат	1	
A	RU 215438 1 C 2 (КЕМИРА АГРО ОЙ) 20.08.2000 , формула	1	
D,A	WO 201 1/1 17271 A 2 (BASF CORP et al.) 29.09.201 1 , формула	1	
<input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении			
* "А"	Особые категории ссылочных документов : документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"Т"	более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
"Е"	более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"Х"	документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
"L"	документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"γ"	документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда
"O"	документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	"&"	документ, взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
"P"	документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета		документ, являющийся патенте м-аналогом
Дата действительного завершения международного поиска		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске	
10 января 2018 (10.01.2018)		18 января 2018 (18.01.2018)	
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс : (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Уполномоченное лицо : Е.Смирнова Телефон № 495 531 65 15	