

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045371**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(51) Int. Cl. *A01N 63/04* (2006.01)
A01P 5/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202190525

(22) Дата подачи заявки
2019.09.11

(54) ШТАММ DOMINIKIA SP., КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО, И ВАРИАНТЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 18382653.6

(32) 2018.09.12

(33) EP

(43) 2021.07.27

(86) PCT/IB2019/057647

(87) WO 2020/053780 2020.03.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИМБОРГ, СЛ (ES)

(72) Изобретатель:
**Хуарес Молина Хесус, Фернандес
Феликс (ES)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) FÉLIX FERNÁNDEZ MARTÍN ET AL.: "Application of Arbuscular Mycorrhizae *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. *nova* in Intensive Agriculture: A Study Case", JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY B, vol. 7, № 4, 28 April 2017 (2017-04-28), XP055520245, ISSN: 2161-6264, DOI: 10.17265/2161-6264/2017.04.001, the whole document

F. FERNÁNDEZ ET AL.: "Physiological and growth responses of young tomato seedlings to drip-irrigation containing two low doses of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* sp. *nova*", JOURNAL OF HORTICULTURAL SCIENCE & BIOTECHNOLOGY, vol. 89, № 6, 1 January 2014 (2014-01-01), p. 679-685, XP055520249, the whole document

E. NICOLÁS ET AL.: "INOCULACIÓN Y PERSISTENCIA DEL HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*", AGRICULTURA, 1 October 2013 (2013-10-01), p. 674-678, XP055520253, the whole document

WO-A1-2015000612

WO-A1-2015000613

(57) Объектом изобретения является штамм гриба *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, который может быть включен в композиции, причем указанная композиция подходит для применения в качестве биостимулятора и бионематоцида для растений, предпочтительно зерновых. Объектом изобретения также является способ получения указанных композиций.

B1

045371

045371 B1

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к агрономической сфере. В частности, оно касается штамма *Dominikia* sp, композиций, содержащих его, и применения этих композиций в качестве биостимулятора и бионематоцида. Было обнаружено, что композиции, содержащие штамм *Dominikia* sp., особенно полезны для зерновых культур.

Уровень техники

В настоящее время в классе *Glomeromycota* описано около 300 видов из 30 родов. Тем не менее исследования биоразнообразия на основе нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК) указывают на гораздо более высокое разнообразие в *Glomeromycota* и недавно были описаны несколько новых видов и родов.

Большинство *Glomeromycota* являются арбускулярными микоризными грибами (АМГ), которые являются мутуалистическими симбионтами примерно 80% всех сосудистых растений. Поглощение питательных веществ (нутриентов) растениями, колонизируемыми АМГ, происходит непосредственно через эпидермис корней и корневые волоски, а также через взаимодействие гриб-корень, которое имеет характерную форму арбускул или интракордиальных клубков гиф. Помимо их роли в повышении поглощения нутриентов хозяином, АМГ играют важную роль в агрегации почвы и защите растений от стресса, вызываемого засухой, и почвенных патогенов. Из-за этой чрезвычайно полезной особенности в технике известны несколько микоризных композиций, которые были разработаны, чтобы обеспечить благотворное воздействие на сельскохозяйственные культуры, которыми их обрабатывают.

В WO 2015/000612 и WO 2015/000613 раскрыты композиции, содержащие штамм *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. и их применение.

В частности, в WO 2015/000612 раскрыта композиция, содержащая штамм *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. и смектитовые глины в соотношении 2:1. Раскрыто, что композиция WO 2015/000612 оказывает положительное влияние на урожайность сельскохозяйственных культур, т.е. композиция может применяться в качестве биостимулятора культур салата.

Аналогичным образом в WO 2015/000613 раскрыта композиция, содержащая штамм *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. и смектитовые глины в соотношении 2:1, ионы металлов и хитин. В WO 2015/000613 раскрыто, что эта композиция действует как бионематоцид для культур томатов.

Однако ранее раскрытые композиции не обеспечивают приемлемого положительного воздействия на зерновые культуры как в качестве биостимуляторов, так и в отношении бионематоцидного эффекта.

Краткое описание изобретения

Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение штамма гриба, который подходит для включения в композиции, а именно композиции, подходящие для обеспечения положительного воздействия на сельскохозяйственные культуры, в частности на зерновые культуры.

Другой целью изобретения является обеспечение композиции, которая эффективна в качестве биостимулятора для зерновых культур.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение композиции, которая эффективна в качестве бионематоцида для зерновых культур.

Другая цель настоящего изобретения - предложить способ получения композиций.

Подробное описание

Таким образом, объектом настоящего изобретения является штамм *Glomeromycota*, а именно штамм *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072. Штамм согласно изобретению был выделен из очень гидроморфного, сильно уплотненного натрий-засоленного типа почв (солонцовый глей) с большим количеством отложений соли на поверхности, в области Фортуна, Мурсия (Испания).

Штамм *Dominikia* sp. согласно изобретению депонирован 21.03.2018 в Международный депозитарный орган "Бельгийские скоординированные коллекции микроорганизмов" (BCCM), Католический университет Лувена, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL), Croix du Sud 2, box L7.05.06, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium, by Symborg S.L., по адресу Campus de Espinardo, 7, edificio CEEIM, 30100 Murcia, Spain.

Штамму *Dominikia* sp. согласно изобретению депозитором был присвоен идентифицирующий референс SMB01, а международным депозитарием был присвоен депозитный номер MUCL 57072.

Спорокарпы штамма изобретения неизвестны. У штамма изобретения споры в почве встречаются рыхлыми скоплениями и могут быть терминальными или интеркалярными; споры могут также образовываться в корнях. Споры от прозрачных до светло-охряных, от округлого до шаровидного строения (редко неправильные), относительно маленькие, т.е. от 24,0 до 42 мкм в диаметре, в среднем $30,7 \pm 3,7$ мкм в диаметре. Споры имеют сложную трехслойную споровую стенку (толщиной 1-4 мкм). В частности, можно распознать внешний слой, средний слой и внутренний слой.

Внешний слой стенки споры довольно слизистый и недолговечный; это придает молодым спорам шероховатый внешний вид, в то время как более старые споры кажутся немного лохматыми. Внешний слой стенки споры при окрашивании реагентом Мельцера демонстрирует декстриноидную реакцию, придавая молодым спорам коричнево-красный цвет. Средний слой стенки споры довольно постоянный и имеет толщину 0,5-2,0 мкм.

Внутренний слой стенки споры по существу ламинарный, толщиной 0,5-1,5 мкм. Содержимое спор имеет бледный, пятнистый вид. Гифы, удерживающие споры, от прозрачных до бледно-охряного цвета, прямые или волнистые, диаметром 2,5-4,5 мкм (в среднем 3,0 мкм). Гифа имеет цилиндрическую или слегка воронкообразную форму, которая соединяется с открыто-пористыми слоями стенки споры, по меньшей мере в зрелых спорах. Прорастающая структура содержит ростовую трубку, которая растет и развивается через место прикрепления гифы к споре. Она образует везикулярную арбускулярную микоризу.

Экстрарадикальный мицелий образует обширную сеть.

Заявитель был произведен филогенетический анализ последовательностей 134 18S рДНК, включая последовательности образцов из окружающей среды и референсных последовательностей. Для большинства видов *Dominikia* не было доступно совсем или были доступны относительно короткие частичные последовательности 18S. Последовательности *Dominikia indica* и *D. iranica* могут быть включены в этот филогенетический анализ. Последовательности этих двух видов были короче, чем остальные последовательности в наборе данных. Обрезка набора данных до длины этих последовательностей привела к довольно неполно разрешенным деревьям. Использование последовательности полной длины сделало возможным получение деревьев с ветвями, представляющими более высокие таксономические уровни. Однако с этим набором данных не удалось создать надежную монофилетическую кладу, состоящую из последовательностей *Dominikia* spp. *Dominikia* sp. образует одну, хорошо подкрепленную кладу вместе с *Dominikia iranica* и анонимными последовательностями Glomerales из окружающей среды, из различных растений хозяев из различных мест.

Филогенетический анализ набора данных SSU-ITS1, включающего последовательности большинства описанных видов *Dominikia*, указывает на то, что ветвь *Dominikia* sp. близка к *D. aurea*.

Для рода *Dominikia* характерны небольшие споры (до 65-70 мкм в диаметре), обычно агрегированные в рыхлые или компактные кластеры. Стенка спор представителей рода *Dominikia* состоит из двух или трех слоев. Внешний слой, образующий поверхность спор, является слизистым, недолговечным, окрашивается реагентом Мельцера или является цельным (не разделенным на подслои), постоянным и не реагирует с реагентом Мельцера. Гифы, удерживающие споры, цилиндрические или воронкообразные с порой, которая может быть открыта или перегороджена перегородкой. *Dominikia minuta* (Basidionum: *Glomus minutum*) была выбрана как типовой вид. Штамм согласно изобретению, т.е. *Dominikia* sp. имеет прозрачные споры примерно такого же размера, как у *Dominikia minuta*, но в отличие от *Dominikia* sp. пора *G. minutum* (т.е. *Dominikia minuta*) перекрывается перегородкой. *D. sp.* также отличается от *Dominikia minuta* трехслойной стенкой споры в отличие от двухслойной стенки споры у *D. minuta*, а также наличием декстриноидной реакции, которая отсутствует у *Dominikia minuta*.

Dominikia sp. также отличается от других описанных видов и штаммов *Dominikia*. Внешний и внутренний слой спор *Dominikia achra* окрашиваются в глубоко красный в реагенте Мельцера, в то время как у *Dominikia* sp. только внешний слой демонстрирует декстриноидную реакцию. *Dominikia indica* отличается от *Dominikia* sp. образованием небольших прозрачных спор в гипогезных агрегатах. Стенка спор *D. indica* состоит из двух гиалиновых слоев: тонкого, короткоживущего слизистого внешнего слоя, окрашиваемого в реагенте Мельцера в розовый или розовый цвет, и ламинарного, гладкого, постоянного внутреннего слоя, более толстого по сравнению с тремя слоями в *Dominikia* sp.

Основываясь на филогенетике 18S-ITS1, *Dominikia aurea* является ближайшим родственником штамма *Dominikia* sp. Согласно изобретению два вида различаются по многим морфологическим характеристикам (см. табл. 1), наиболее очевидное различие заключается в преимущественно яйцевидных спорах *Dominikia aurea*, которые агрегированы в неправильные спорокарпы.

Таблица 1

	<i>Dominikia aurea</i> (Oehl и др. 2003)	<i>Dominikia</i> sp.
агрегация спор	неправильные спорокарпы без перидиума	рыхлые скопления
интрадикальные споры	не описаны	присутствуют
интеркалярные споры	не описаны	присутствуют
цвет	светло оранжевые или оранжевые	охряные
форма	яйцевидная, редко округлая	округлая или шарообразная

размер	яйцевидные споры: (36-) 55–65 х (30) 45-52 мкм округлые споры: (27-) 40-60 мкм	(24,0) 30,7±3,7 (42) мкм
стенка споры	двухслойная	трехслойная
внешний слой	недолговечный, прозрачный до 1,5 мкм, вырожденный в зрелых спорах, декстриноидный	слизистый, шероховатый, вырожденный (0,4-) 1,0 (1,5) мкм, вырожденный в зрелых спорах, декстриноидный
средний слой		постоянный слегка шероховатый толщиной 0,5– 2,0 мкм
внутренний слой	ламинарный, светло- оранжевый, 1,5-3 (-4) мкм	ламинарный, гладкий (0,5-1,5 мкм)
связывающие гифы	от светло-оранжевого до оранжевого цвета, прямые или изогнутые, цилиндрические или слегка воронкообразные; 6-10 мкм	прозрачные или бледно- охряные, прямые или волнистые, 2,5–5 мкм
прорастание	неизвестно	через связывающую гифу

Много последовательностей с высокой степенью близости на последовательности изобретения *Dominikia* sp. может быть обнаружено с использованием поиска BLAST по банку генов (е-значение 0,00, идентичность 99%). Эти последовательности происходят из широкого круга различных хозяев (например, печеночники, однодольные) из разных стран и континентов, что свидетельствует об их всемирном распространении. Эти результаты показывают, что *Dominikia* sp. широко распространен.

Как упоминалось выше, было обнаружено, что особенно полезно включать *Dominikia* sp. в композиции, в частности в композиции, применяемые для зерновых культур.

Как упоминалось выше, другим объектом изобретения является композиция, содержащая *Dominikia* sp., депонированный 21/03/2018 под регистрационным номером MUCL 57072.

Без привязки к конкретному научному объяснению было неожиданно обнаружено, что *Dominikia* sp. и композиция, содержащая его, особенно эффективны в обеспечении благотворного воздействия на сельскохозяйственные культуры, в частности на зерновые культуры.

В частности, было обнаружено, что применение композиции, содержащей *Dominikia* sp., для зерновой культуры (например, кукурузы, пшеницы, ячменя или риса), позволяет получить увеличение поглощения нутриентов и повышение урожайности зерновых культур по сравнению с культурами, которые не были обработаны *Dominikia* sp.

Предпочтительно, чтобы концентрация *Dominikia* sp. в композиции была от 4,0 до 1,0% по весу, предпочтительно от 3,0 до 2,0% по весу, еще более предпочтительно от 2,5 до 2,3% по весу.

В соответствии с вариантами осуществления композиция по изобретению представляет собой жидкую, твердую или гелевую композицию.

Предпочтительно композиция согласно изобретению является твердой композицией.

В соответствии с вариантами осуществления композиция по изобретению может быть в форме порошка, эмульгируемого концентрата, гранул или микрогранул.

Композиция по изобретению является твердой, и концентрация пропагул *Dominikia* sp. в композиции измеряется в соответствии с "методом наиболее вероятного числа" (Porter, Aust. J. Soil Res., 1979, 17, 515-19) от 180 до 120 пропагул на грамм композиции, предпочтительно от 150 до 120 пропагул на грамм композиции, еще более предпочтительно от 125 до 120 пропагул на грамм композиции.

Концентрация пропагул означает концентрацию пропагул в конечном продукте.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция по изобретению выполнена в виде микрогранул.

В соответствии с вариантами осуществления указанные микрогранулы имеют размер от 500 до 2000 мкм, предпочтительно от 800 до 1500 мкм, еще более предпочтительно от 900 до 1200 мкм.

Полезно, что концентрация *Dominikia* sp. в композиции по изобретению, а также форма, в которой представлена композиция, например микрогранулы, могут быть выбраны в соответствии с predetermined конечным применением.

В соответствии с вариантами осуществления композиция по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один фунгицид, и/или по меньшей мере один биофунгицид, и/или по меньшей мере один инсектицид, и/или по меньшей мере один биоинсектицид, и/или по крайней мере один нематоцид, и/или по меньшей мере один биостимулятор.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция по изобретению выполнена в форме для покрытия для семян.

Например, указанный фунгицид выбран из группы, состоящей из Манеба, Манкоцеба, Металаксила-Ридомила, Миклобутанила, Олпизана, Пропамокарба, Квинтозена, Стрептомицина, Сульфур, Тиофанат-метила, Тирама, Трифорина, Винклозолина, Цинковых белил, Цинеба, Цирама, Бенорада, связанной меди, Хлороталонила, Каптана, Хлоронеба, Ципроконазола, Цинка этилена бисдитиокарбамата, этиридазола, фенаминосулфа, фенаримола, флутоланила, фолпета, фосэтил-AL и Ипродиона.

Примерами биофунгицидов являются: *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* и *Pythium oligandrum*.

В соответствии с вариантами осуществления инсектицид выбирают из группы, состоящей из органофосфатов, карбаматов и неоникотиноидов.

В соответствии с вариантами осуществления указанный биоинсектицид выбирают из группы, состоящей из *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. и *Metarhizium* sp.

В соответствии с вариантами осуществления указанный нематоцид является органофосфатом или карбаматом.

В соответствии с вариантами осуществления указанный бионематоцид представляет собой *Pasteuria* sp.

Другим объектом настоящего изобретения является способ получения композиции, содержащей штамм изобретения *Dominikia* sp.

Способ согласно изобретению композиции включает следующие этапы:

- a) обеспечение субстрата;
- b) введение в указанный субстрат семян растения-хозяина и штамма *Dominikia* sp., депонированного под регистрационным номером MUCL 57072;
- c) культивирование указанного растения-хозяина и полив для поддержания уровня влажности указанного субстрата не менее 75% от естественной влагоемкости;
- d) прекращение полива на срок не менее 7 дней;
- e) удаление надземной части растения-хозяина и субстрата;
- f) сушка удаленного субстрата;
- g) измельчение высушенного субстрата с получением гранул с размером частиц менее 100 мкм.

Предпочтительно, чтобы субстрат содержал глину.

В соответствии с вариантами осуществления *Dominikia* sp. вводимый на этапе b), представляет собой инокулят, содержащий пропагулы *Dominikia* sp. В предпочтительном варианте указанный инокулят получают путем обеспечения в корневой системе растения-хозяина практически чистого *Dominikia* sp, культивирования указанного растения-хозяина на субстрате, предпочтительно содержащем глину (предпочтительно стерильную смектитовую глину), предпочтительно на протяжении жизненного цикла и затем извлечения корневой системы с получением инокулята. В этом случае инокулят содержит некоторое количество субстрата, корешков и пропагул *Dominikia* sp.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает этап микрогрануляции h1).

Предпочтительно в результате грануляции получают композицию, содержащую штамм *Dominikia* sp согласно изобретению, в форме микрогранул.

Как упоминалось выше, указанные микрогранулы имеют размер от 500 до 2000 мкм, предпочтительно от 800 до 1500 мкм, еще более предпочтительно от 900 до 1200 мкм.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает этап h2) приготовления концентрированного биологического инокулята для покрытия семян зерновых культур, а именно концентрированного биологического инокулята для покрытия семян зерновых культур из измельченного продукта, полученного в соответствии с этапом g). Следует отметить, что в этом контексте этап h2) концентрирования биологического инокулята для покрытия семян зерновых культур означает этап, на котором повышают концентрацию *Dominikia* sp. (например, пропагул *Dominikia* sp.) в композиции.

Например, указанный этап концентрирования h2) можно осуществлять путем просеивания измель-

ченного продукта, полученного в соответствии с этапом g), для отделения гранул, имеющих размер частиц выше заданного значения, например выше 35 мкм.

Полезно, что этап концентрирования h2) позволяет увеличить концентрацию *Dominikia* sp. (например, пропагул *Dominikia* sp.) до 10-кратной начальной концентрации, предпочтительно до 50-кратной начальной концентрации (т.е. концентрации *Dominikia* sp. в продукте перед этапом h2.), еще более предпочтительно до 100-кратной начальной концентрации, т.е. в 100 раз относительно концентрации композиции перед этапом h2).

В соответствии с вариантами осуществления возможно увеличение концентрации *Dominikia* sp. (например, пропагул *Dominikia* sp.) более чем в 100 раз относительно исходной концентрации (т.е. концентрации *Dominikia* sp. в продукте до этапа h2).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способ согласно изобретению дополнительно включает этап покрытия семян i), а именно покрытия семян концентрированным продуктом, полученным в соответствии с этапом h2).

Указанный этап покрытия семян i) включает следующие этапы:

- i1) покрытие семян адгезивным веществом;
- i2) добавление указанного концентрированного биологического инокулята;
- i3) опциональное проведение одной или более совместимых обработок:
 - i3.1) обработка фунгицидами, инсектицидами и/или гербицидами, совместимыми с грибами, образующими микоризу;
 - i3.2) обработка полезными микроорганизмами,
 - i3.3) обработка макро- и/или микронутриентами,
 - i3.4) обработка стимуляторами,
 - i3.5) обработка красящими пигментами, совместимыми с микоризными грибами;
- i4) сушка семян.

Другим объектом настоящего изобретения является применение композиции, содержащей *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, в качестве биостимулятора.

Используемый здесь термин "биостимуляция" относится к стимуляции, которую композиция согласно настоящему изобретению оказывает на растения, которое обрабатывают указанной композицией.

Без привязки к конкретному научному объяснению можно предположить, что штамм изобретения *Dominikia* sp. выполняет функцию перемещения нутриентов, забирая их из почвы или субстрата и используя в своей метаболической системе. Он перемещает указанные нутриенты из сети своего мицелия и впоследствии обменивает их в клетках корня.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композицию по настоящему изобретению применяют в качестве биостимулятора для зерновых культур.

Другим объектом настоящего изобретения является применение композиции, содержащей *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, в качестве бионематоцида.

Другими словами, композицию по настоящему изобретению можно применять для защиты растений от нематод.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композицию согласно настоящему изобретению применяют в качестве бионематоцидного средства для зерновых культур.

Полезно, что композиция по композиции можно обрабатывать растения, т.е. культуру, например зерновую культуру, несколькими способами.

В соответствии с вариантами осуществления композицией по настоящему изобретению можно обрабатывать растение путем обработки семян (т.е. покрытия семян), обработки корней, погружения корней в эмульсию, добавления в воду для ирригации, путем ирригации, нанесения порошка на корневую систему или применения путем впрыскивания эмульсии в корневую систему.

Предпочтительно, в частности, что, когда ею необходимо обработать зерновые культуры, композицию по изобретению применяют путем покрытия семян, или объединения с семенами во время посева, или в форме микрогранулята и объединения с семенами во время посева.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана динамика образования спор и заселения грибом у растений, выражающегося в виде высокой оптической плотности (%), обработанных *Dominikia* sp.

На фиг. 2 показано поведение арбускулярного внешнего мицелия и арбускулярного эндофита при обработке *Dominikia* sp.

На фиг. 3 показана взаимосвязь между внешним арбускулярным мицелием и арбускулярным эндофитом при обработке *Dominikia* sp.

Экспериментальная часть

Пример 1. Молекулярный анализ.

Экстракция ДНК.

Выделенные гифы и споры переносили в 1,5 мл пробирки Эппендорф с 0,2 г стеклянных гранул (диаметром 2 мм) и 100 мкл ЦТАБ-буфера (2% ЦТАБ=цетилтриметиламмонийбромид, 1,4 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 7,5, 0,2 М Na-ЭДТА). Эту смесь гомогенизировали с использованием шаровой мельницы

Retsch MM 301 при 50 Гц в течение 30 с. Добавляли еще 400 мкл ЦТАБ-буфера, смесь инкубировали при 65°C в течение 1 ч. К суспензии добавляли 400 мкл смеси холроформ-изоамилол (24:1) и перемешивали, переворачивая реакционные пробирки, а затем центрифугировали в течение 5 мин при 15000×g и верхний слой собирали в чистую пробирку Эппендорф. Этот этап повторяли дважды. К этой суспензии добавляли 200 мкл 5 М ацетата аммония; смесь инкубировали при 4°C в течение по меньшей мере 30 мин с последующим 20-минутным центрифугированием при 4°C и 15000×g. ДНК осаждали 700 мкл изопропанола при - 20°C в течение ночи. Осадок ДНК, полученный после осаждения изопропанолом, промывали ледяным 70% этанолом, сушили на воздухе и повторно растворяли в 50 мкл буфера TE (10 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА, pH 8)+4,5 ед. РНКазы/мл.

Условия ПЦР.

18S рДНК амплифицировали с использованием праймеров GEOA2, GEO11 (Schwarzott D., Schüssler A. (2001), A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores, *Mycorrhiza*, 10:203-207). Праймерами, используемыми для ПЦР-амплификации и для секвенирования внутренней транскрибируемой спейсерной области 18S рДНК, были Glom1310 и ITS4i (Redecker D. (2000), Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots, *Mycorrhiza*, 10:73-80). Амплификацию проводили в 0,2 мМ dNTP-смеси, 1 мМ каждого праймера, 10% реакционного буфера для ПЦР и стерильной воды молекулярной степени чистоты. ДНК-полимеразу GoTaq® (Promega, Mannheim, Germany) добавляли в количестве 4 ед./100 мкл реакционной смеси; 2 мкл матрицы геномной ДНК использовали на каждые 20 мкл реакции. Амплификацию проводили в термоциклере Primus 96 advanced (peqLab Biotechnology) в реакционных пробирках по 200 мкл с использованием следующих условий ПЦР: 96°C, начальная денатурация 180 с; с последующими 35 циклами: 96°C - 30 с, 58°C - 30 с, 72°C - 90 с; и окончательное удлинение при 72°C в течение 10 мин.

Данные о последовательностях и таксономия *Glomeromycota*.

В качестве основы для филогении 18S было использовано референсное выравнивание, опубликованное Krüger et al. (Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H., Schüßler A. (2012), Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level, *New Phytol.*, 193:970-984; downloadable at [www. amf-phylogeny.com](http://www.amf-phylogeny.com)). Для идентификации сходных последовательностей образцов из окружающей среды последовательность *Dominikia* sp. анализировали через поиск BLAST в GenBank, и очень похожие последовательности включали в выравнивание, составляющее основу 18S-дерева. Для филогении *Dominikia* применяли опубликованные частичные 18S-ITS1 - частичные 5.8S последовательности.

Анализ данных.

Первоначальные выравнивания были выполнены Clustal W. Филогенетический анализ максимального правдоподобия был проведен через веб-портал CIPRES (Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. (2010), Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, с. 1-8, <http://www.phylo.org/>) с RAxML версия 8.0 (Stamatakis и др., 2014) с использованием 100 реплик начальной загрузки и модель GTRGAMMA. Байесовское консенсусное дерево было построено с использованием MrBayes версии 2.0.5. Два отдельных прогона MC3 со случайно сгенерированными стартовыми деревьями были выполнены для 2 М поколений, каждое с одной холодной и тремя горячими цепями, с использованием модели GTR+I. Все параметры оценивались по данным. Деревья отбирались каждые 1000 поколений. 200000 поколений были отброшены как "burn-in" и консенсусные деревья, конструировались на основе возвращаемой выборки.

Пример 2. Методика получения варианта композиции по изобретению - концентрированной композиции для покрытия семян.

Первая фаза - тепличные условия.

Субстрат. В качестве субстрата выбраны смектитовые глины с pH от 7,8 до 8, и перед применением их стерилизуют чередующимися циклами по 3 дня.

Штамм АМГ. В качестве исходного инокулята используют пропагулы *Dominikia* sp. в чистых условиях. Этот тип инокулята всегда находится в непрерывном воспроизведении циклами по 90-180 дней либо в камере для выращивания, либо в теплицах с контролируемыми условиями для растений-хозяев. Различные растения используются для воспроизводства инокулята в последовательных циклах, чтобы избежать передачи болезни в одном и том же хозяине.

Лето-осень. *Sorghum vulgare* и *Ocimum* sp.

Зима-весна: *Lolium perenne*.

Культуральные горшки. Используются горшки объемом 15 л.

Условия выращивания растений-хозяев.

Выращивание в камере для выращивания или в теплице начинается с прямой инокуляции корневой системы растения-хозяина чистым инокулятом отобранного штамма арбускулярно-микоризного гриба (*Dominikia* sp.) в стерильном субстрате смектитовой глины. Растения выращивают на протяжении полного жизненного цикла в соответствии с типом растения, который занимает от 90 до 180 дней. Растения

всегда поддерживают в хорошо увлажненном состоянии с ежедневным орошением (стерильной водой) при температуре от 25 до 28°C и относительной влажности 65%. После завершения корневую систему, содержащую смектитовый субстрат, корешки и чистые отростки АМГ, извлекают, и впоследствии применяют для масштабирования на втором этапе.

Для определения качества инокулята используются следующие минимальные спецификации:

общее количество спор: 50-225 спор/г;

экстраметрический мицелий: >70 мг/кг субстрата;

процент колонизации корней: Sorghum >50%, Lolium >45%, Ocimum >40%;

концентрация MPN: >1×10⁴ пропагул на 100 мл субстрата.

Вторая фаза - увеличение масштаба.

Этап 1: подготовка грядок.

Грядки делают с прокладочным материалом из пластика, так что грядка изолирована от окружающей почвы; грядки делают предпочтительно с пластиковым покрытием таким образом, чтобы происходил дренаж и предотвращался рост нежелательной растительности.

Грядки следует заполнить отобранной смектитовой глиной (Arcilla Roja Galve). Влажность глины должна составлять примерно 15%, чтобы облегчить работу с ней при заполнении грядки. После заполнения следует обеспечить полив до насыщения для улучшения структуры.

Грядки располагаются на хорошо дренированных участках.

Грядки могут иметь любые размеры с учетом доступа, необходимого для облегчения передвижения людей и оборудования, необходимого для ухода.

Грядки имеют систему орошения в соответствии с местными потребностями. Предпочтительной системой может быть капельное орошение или разбрызгиватель, которые должны быть автоматизированы, и обеспечивать независимый полив выбранных участков грядки.

Этап 2: виды растений-хозяев.

Определение видов растений-хозяев и микоризных грибов, которые могут использоваться в системе: выбор и идентификация растения-хозяина и видов грибов будут соответствовать конкретным условиям участка и целям производства. Используют райграсс (Lolium perenne) и АМГ, ранее произведенные на первом этапе.

Этап 3: посев растения-хозяина и инокуляция.

Перед посадкой растения-хозяина проверяют всхожесть семян. По результатам этого теста определяют подходящую норму высева. В случае многолетнего райграсса семена высевают в разброс из расчета 80 кг/га с использованием предварительно проверенных дражированных семян. Также вместе с семенами непосредственно на смектитовую глину наносятся 20 г инокулята АМГ на м² грядки.

Сразу после посева применяют орошение в виде мелкодисперсного распыления для предотвращения перераспределения посевного материала и инокулята.

Вода, используемая для полива, предпочтительно должна иметь следующие характеристики:

значения pH от ≥6 до ≤7,5;

электропроводность: <1,6 мСм/м;

общее количество растворимых солей: <1000 ppm;

содержание обменного натрия (SAR) <10;

без тяжелых элементов и патогенов; предпочтительно, чтобы вода, используемая для орошения, была питьевой.

Этап 4: культивирование и ирригация.

Применяемого орошения должно хватить для достижения 100% естественной влагоемкости, но нужно избегать полива слишком большим количеством воды с ее накоплением или застаиванием. Грядки следует снова поливать, когда влажность глины упадет до 75-80% от естественной влагоемкости.

Этап 5: управление установлением микоризного симбиоза и исследование динамики развития колонизации микоризного гриба.

Во время роста и развития растения-хозяина происходит колонизация корней АМГ и устанавливается симбиоз между растением и грибом. Чтобы оценить развитие этих отношений, проводят периодический отбор образцов корневой системы для оценки развития микоризы. Методы, используемые для оценки колонизации, включают Gerdeman & Nicolson (1963) (Gerdemann J.W., Nicolson T.H., 1963, Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting, Transactions of the British Mycological Society, 46(2):235-44); McGonigle (1990) (McGonigle, T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A., 1990, A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi, New Phytologist, 115(3):495-501); и Phillips & Hayman (1970) (Phillips, J.M., Hayman D.S., 1970, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, Transactions of the British Mycological Society, 55:158-161).

Отбор проб начинаются через два месяца после посадки и продолжаются ежемесячно до конца вегетационного периода. По информации, полученной по этим образцам, можно определить динамику развития микоризного симбиоза внутри инокулята.

Оценка производственного способа основана на колонизации корней микоризой, экстраметрической концентрации мицелия и периодическом отборе образцов глины, содержащих споры.

Знание динамики развития продукции микоризы позволяет определить оптимальное время сбора урожая и максимально использовать процесс симбиоза растения-хозяина и микоризного гриба.

Этап 6: сбор урожая.

Если в качестве растения-хозяина используется многолетний *Lolium*, то оптимальное время сбора урожая обычно наступает между 6 и 7 месяцами после посева, потому что в этот период растения созревают, завершают свой жизненный цикл, проявляют тенденцию к потере жизнеспособности и желтеют.

За пятнадцать дней до запланированной даты сбора урожая прекращают полив, а опавшую листву сохраняют, чтобы глина медленно теряла влагу, обеспечивая завершение процесса инокуляции. Если это операция совпадает с сезоном дождей, будет необходимо защитить грядку от дождя, чтобы она могла своевременно высохнуть, накрыв ее водонепроницаемым пластиком.

Сначала вручную удаляют надземную листву с растений-хозяев. Сбор урожая производят путем удаления глины с грядки. Субстрат удаляют путем разделения массы глины на как можно более тонкие части, чтобы облегчить перемешивание их содержимого по всей глубине профиля, и помещают в мешки для транспортировки.

Этап 7: сушка и измельчение инокулята

Сушка. Собранный субстрат и пропагулы микоризы подвергают воздействию солнечных лучей и термической дезинфекции в течение 30 дней при 50°C. Период сушки может быть увеличен до содержания влаги ниже 5% для облегчения измельчения.

Измельчение. Продукт измельчают в промышленной мельнице, охлаждают до 2°C, чтобы предотвратить перегрев микоризных пропагул. Измельчение продолжают до размера частиц менее 100 микрон.

Третья фаза - концентрирование.

После этапа 7 измельченную биомассу доводят до концентрации продукта с помощью сита в 35 микрон. Частицы ниже этого значения (60-70% исходного продукта) выбрасывают, а 25-30% ультраконцентрированного продукта не проходит через этот размер и в конечном итоге будет концентрированным продуктом. С использованием этой технологии мы перешли от $1,2 \times 10^4$ пропагул на 100 мл до $1,2 \times 10^6$ пропагул на 100 мл.

Относительная влажность продукта на выходе ниже 5%.

Контроль качества. Чистоту и концентрацию конечного продукта определяют с помощью метода наиболее вероятных чисел Портера (1979) (Porter, W.M., 1979, The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soils, Aust. J. Soil Res., 17:515-519).

Упаковка. Готовую продукцию упаковывают и маркируют для транспортировки. Конечная концентрация концентратной композиции составляет: Концентрация MPN: $>1,2 \times 10^6$ пропагул на 100 мл продукта.

Четвертая фаза - покрытие семян.

Покрытие семян инокулятом микоризы можно производить в специальной машине для покрытия семян, в обычной бетономешалке или вручную в смесителе. Указанное покрытие требует различных этапов, которые описаны ниже в порядке их выполнения.

1. На начальном этапе семена покрывают адгезивным веществом. Адгезивные вещества, которые можно использовать в дополнение к воде, включают органические адгезивы (желатин, этилцеллюлозу, пропиленгликоль и т.д.) и неорганические адгезивы (минеральные масла, поливинилы, пластичные полимеры и т.д.). Предпочтительно используемые адгезивы являются полимерами или сополимерами поливинилового группы, такими как поливинилпирролидон и поливинилацетат. Адгезив добавляют к водному или спиртовому раствору до его оптимальной растворимости, варьируя количество используемого адгезива от 0,1 до 15%, предпочтительно от 0,5 до 10% и еще более предпочтительно от 1,0 до 5% от общей массы покрываемых семян. Количество используемого адгезива будет зависеть от его химических свойств, а также от типа обрабатываемых семян. Время обработки семян адгезивом может варьировать от 1 до 60 с, предпочтительно от 5 до 50 с и еще более предпочтительно от 10 до 40 с на 100 кг используемых семян.

2. После нанесения адгезива добавляется инокулят микоризы. Доля инокулята, добавляемого к семенам, может быть выбрана в диапазоне от 0,1 до 15%, предпочтительно от 0,5 до 10% и еще более предпочтительно от 1 до 5% от веса семян, что будет зависеть от типа и разновидности. Время обработки семян инокулятом микоризы может варьировать от 1 до 50 с, предпочтительно от 5 до 40 с и еще более предпочтительно от 10 до 30 с на 100 кг используемых семян.

Обработку микоризой можно комбинировать с другими видами обработки, которые описаны в разделах 2а-2е. Эти обработки также можно выполнять независимо от обработки инокулятом микоризы с получением многослойного покрытия. Этапы, которые необходимо выполнить при нанесении каждого слоя покрытия, такие же, как и в случае инокулята микоризы. Эти слои можно разделить, покрывая семена безвредными веществами известкового происхождения (карбонат кальция и тому подобное), глиной или полимером. Гранулирующее или образующее корку вещество не должно превышать 50%, пред-

почтительно 40% и еще более предпочтительно 30% от веса семян, и его добавляют к семенам вместе с адгезивным веществом, как указано в разделе 1.

2а. Обработка фунгицидами, инсектицидами и/или гербицидами, совместимыми с микоризными грибами. В целом, все коммерческие гербициды и инсектициды совместимы с грибами, образующими микоризу. Однако не все фунгициды совместимы с выживаемостью микоризных грибов. Основные используемые фунгициды включают азоксистробин, карбоксин, ципроконазол, хлороталонил, металаксил, миклобутанил и прогиоконазол. Количество используемого пестицида будет зависеть от рекомендаций производителя, разнообразие используемых пестицидов зависит от потребностей.

2b. Обработка полезными микроорганизмами, включая *Trichoderma* spp., Бактерии *Rhizobium* и/или комбинацию микроорганизмов, полезных для ризосферы, таких как *Aspergillus*, *Penicillium* и азотфиксирующие бактерии.

2с. Обработка макро- и/или микронутриентами, в которых азот (N), фосфор (P), калий (K), кальций (Ca), магний (Mg) и сера (S) являются основными макронутриентами, а железо (Fe), цинк (Zn), марганец (Mn), бор (B), медь (Cu), молибден (Mo) и хлор (Cl) являются основными микронутриентами. Доза нутриентов для покрытия может варьироваться от 0,01 до 15%, предпочтительно от 0,05 до 10% и еще более предпочтительно от 0,1 до 5% от общей массы семян, на которые наносится покрытие.

2d. Обработка стимуляторами. Покрытие семян стимуляторами, которые индуцируют прорастание и рост семян, а также защиту растений, споруляцию и рост микоризных грибов. Стимуляторами могут быть фитогормоны (абсцизовая кислота, стриголактоны, brassinosteroids и др.) и их индукторы и производные, вторичные метаболиты (флавоноиды, терпеноиды и др.), кофакторы (ионы металлов и др.).

2е. Обработка красящими пигментами: эти пигменты должны быть совместимы с выживанием микоризного гриба и делать четко различимыми обработанные и необработанные семена.

3. Этапы 1 и 2 означают, что полное покрытие микоризным инокулятом посредством адгезива выполняется за время от 1 до 40 с, предпочтительно от 5 до 30 с и еще более предпочтительно от 10 до 20 с, выполняя полное покрытие микоризным инокулятом посредством адгезивного вещества.

4. После проведения обработки микоризой семена сушат в течение времени, которое может варьироваться от 1 до 50 с, предпочтительно от 5 до 40 с, а еще более предпочтительно от 10 до 30 с. Этот этап можно выполнить после этапа 5.

5. Наконец покрытые семена погружают в контейнеры из компонента покрытия. Продолжительность погружки может варьироваться от 5 до 30 с, предпочтительно от 10 до 25 с и еще более предпочтительно от 15 до 20 с.

Пример 3. Методика получения варианта композиции по изобретению микрогранулированной композиции.

Первая фаза - тепличные условия.

Субстрат. В качестве субстрата выбирают смектитовые глины с pH от 7,8 до 8 и перед использованием стерилизуют чередующимися циклами по 3 дня.

Штамм АМГ. В качестве исходного инокулята используют пропагулы *Dominikia* sp. в чистых условиях. Этот тип инокулята всегда находится в непрерывном воспроизведении циклами по 90-180 дней либо в камере для выращивания, либо в теплицах с контролируемыми условиями для растений-хозяев. Различные растения используют для воспроизводства инокулята в последовательных циклах, чтобы избежать передачи болезни в одном и том же хозяине.

Лето-осень. *Sorghum vulgare* и *Ocimum* sp.

Зима-весна. *Lolium perenne*.

Культуральные горшки. Используют горшки объемом 15 л.

Условия выращивания растений-хозяев.

Выращивание в камере для выращивания или в теплице начинают с прямой инокуляции корневой системы растения-хозяина чистым инокулятом отобранного штамма арбускулярно-микоризного гриба (*Dominikia* sp.) в стерильном субстрате смектитовой глины. Растения выращивают на протяжении полного жизненного цикла, в соответствии с типом растения, который занимает от 90 до 180 дней. Растения всегда поддерживают в хорошо увлажненном состоянии, с ежедневным орошением (стерильной водой) при температуре от 25 до 28°C и относительной влажности 65%. После завершения корневая система, содержащая смектитовый субстрат, корешки и чистые отростки АМГ, извлекаются впоследствии и используют для масштабирования на втором этапе.

Для определения качества инокулята используют следующие минимальные спецификации:

общее количество спор: 50-225 спор/г;

экстраметрический мицелий: >70 мг/кг субстрата;

процент колонизации корней: *Sorghum* >50%, *Lolium* >45%, *Ocimum* >40%;

концентрация MPN: >1×10⁴ пропагул на 100 мл субстрата.

Вторая фаза - увеличение масштаба.

Этап 1: подготовка грядок.

Грядки делают с прокладочным материалом из пластика, так что грядка изолирована от окружаю-

шей почвы; грядки сконструированы предпочтительно с пластиковым покрытием таким образом, чтобы происходил дренаж и предотвращался рост нежелательной растительности.

Грядки следует заполнить выбранной смектитовой глиной (Arcilla Roja Galve). Влажность глины должна составлять примерно 15%, чтобы облегчить работу с ней при заполнении грядки. После заполнения следует обеспечить полив до насыщения для улучшения структуры.

Грядки располагают на хорошо дренированных участках.

Грядки могут иметь любые размеры с учетом доступа, необходимого для облегчения передвижения людей и оборудования, необходимого для ухода.

Грядки имеют систему орошения в соответствии с местными потребностями. Предпочтительной системой может быть капельное орошение или разбрызгиватель, которые должны быть автоматизированы, и обеспечивать независимый полив выбранных участков грядки.

Этап 2: виды растений-хозяев.

Определение видов растений-хозяев и микоризных грибов, которые можно использовать в системе: выбор и идентификация растения-хозяина и видов грибов будут соответствовать конкретным условиям участка и целям производства. Использовался райграсс (*Lolium perenne*) и АМГ, ранее произведенные на первом этапе.

Этап 3: посев растения-хозяина и инокуляция.

Перед посадкой растения-хозяина проверяют всхожесть семян. По результатам этого теста определяется подходящая норма высева. В случае многолетнего райграсса семена высевают в разброс из расчета 80 кг/га с использованием предварительно проверенных дражированных семян. Также вместе с семенами непосредственно на смектитовую глину наносят 20 г инокулята АМГ на м² грядки.

Сразу после посева применяют орошение в виде мелкодисперсного распыления для предотвращения перераспределения посевного материала и инокулята.

Вода, используемая для полива, предпочтительно должна иметь следующие характеристики:

значения pH от ≥ 6 до $\leq 7,5$;

электропроводность: $< 1,6$ мСм/м;

общее количество растворимых солей: < 1000 ppm;

содержание обменного натрия (SAR) < 10 ;

без тяжелых элементов и патогенов; предпочтительно, чтобы вода, используемая для орошения, была питьевой.

Этап 4: культивирование и ирригация.

Применяемого орошения должно хватить для достижения 100% естественной влагоемкости, но нужно избегать полива слишком большим количеством воды с ее накоплением или застаиванием. Грядки следует снова поливать, когда влажность глины упадет до 75-80% от естественной влагоемкости.

Этап 5: управление установлением микоризного симбиоза и изучение динамики развития колонизации микоризного гриба.

Во время роста и развития растения-хозяина происходит колонизация корней АМГ и устанавливается симбиоз между растением и грибом. Чтобы оценить развитие этих отношений, проводят периодический отбор образцов корневой системы для оценки развития микоризы. Методы, используемые для оценки колонизации, включают Gerdeman & Nicolson (1963) (Gerdemann J.W., Nicolson T.H., 1963, Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting, Transactions of the British Mycological Society, 46(2):235-44.); McGonigle (1990) (McGonigle, T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A., 1990, A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi, New Phytologist, 115(3):495-501); и Phillips & Hayman (1970) (Phillips, J.M., Hayman D.S., 1970, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, Transactions of the British Mycological Society, 55:158-161).

Отбор проб начинают через два месяца после посадки и продолжают ежемесячно до конца вегетационного периода. По информации, полученной по этим образцам, можно определить динамику развития микоризного симбиоза внутри инокулята.

Оценка производственного способа основывается на колонизации корней микоризой, экстраметрической концентрации мицелия и периодическом отборе образцов глины, содержащих споры.

Знание динамики развития продукции микоризы позволяет определить оптимальное время сбора урожая и максимально использовать процесс симбиоза растения-хозяина и микоризного гриба.

Этап 6: сбор урожая.

Сбор урожая - это наиболее критический этап в производственном процессе. Если в качестве растения-хозяина используют многолетний *Lolium*, то оптимальное время сбора урожая обычно наступает между 6 и 7 месяцами после посева, потому что в этот период растения созревают, завершают свой жизненный цикл, проявляют тенденцию к потере жизнеспособности и желтеют.

За пятнадцать дней до запланированной даты сбора урожая прекращается полив, а опавшую листву сохраняют, чтобы глина медленно теряла влагу, обеспечивая завершение способа инокуляции. Если это мероприятие совпадает с сезоном дождей, будет необходимо защитить грядку от дождя, чтобы она могла своевременно высохнуть, накрыв ее водонепроницаемым пластиком.

Сначала вручную удаляют надземную листву с растений-хозяев. Сбор урожая производят путем удаления глины с грядки. Субстрат удаляется путем разделения массы глины на как можно более тонкие порции, чтобы облегчить перемешивание их содержимого по всей глубине профиля, и помещают в мешки для транспортировки.

Этап 7: сушка и измельчение инокулята.

Сушка. Собранный субстрат и спорангии микоризы подвергают воздействию солнечных лучей и термической дезинфекции в течение 30 дней при 50°C. Период сушки может быть увеличен до содержания влаги ниже 5% для облегчения измельчения.

Измельчение. Продукт измельчают в промышленной мельнице, охлаждают до 2°C, чтобы предотвратить перегрев микоризных спорангий. Измельчение продолжается до размера частиц менее 100 микрон.

Третья фаза - микрогрануляция.

Способ микрогранулирования делится на три этапа.

Добавление зернистого носителя во вращающийся биконический смеситель. Для изготовления носителя использовали смесь слюды, аттапульгита и известняка в диапазоне от 40 до 90 мас.%, более предпочтительно от 50 до 80 мас.%, еще более предпочтительно от 60 до 70 мас.%.

Добавление микоризы (арбускулярный микоризный гриб) внутрь вращающегося биконического смесителя: АМГ дозируют в пределах от 10 до 60 мас.%, более предпочтительно от 20 до 50 мас.%, еще более предпочтительно от 30 до 40 мас.% ранее произведенной *Dominikia* sp. (этап 7) вместе со связующим (воск, льняное масло, гуммиарабик, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, поливиниловый спирт, тапиоковая мука, лактоза, сахароза, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, порошок лактозы, порошок сахарозы, крахмал тапиоки (мука из маниоки) и микрокристаллическая целлюлоза, камеди или белок, такой как яичный белок или казеин) в диапазоне от 1 до 25% по весу, более предпочтительно от 5 до 20% по весу, более предпочтительно от 10 до 15% по весу. Во время этой операции смеситель продолжает двигаться до полной гомогенизации гранул.

Упаковка. После полной гомогенизации приготовленный продукт выгружают на сито для удаления комков и образовавшейся пыли. Наконец, продукт собирают в упаковочный бункер, из которого он автоматически переходит к наполнению соответствующих контейнеров.

Контроль качества и упаковка.

Контроль качества. Чистоту и концентрацию конечного продукта определяют с помощью метода наиболее вероятных чисел Портера (1979) (Porter, W.M., 1979, The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soils, Aust. J. Soil Res., 17:515-519).

Упаковка. Готовую продукцию упаковывают и маркируют для транспортировки.

Конечная концентрация микрогранулированной композиции составляет

концентрация MPN: $>1 \times 10^4$ спорангий на 100 мл продукта.

Пример 4. Влияние композиции по изобретению на развитие пшеницы (*Triticum durum*).

Чтобы продемонстрировать эффективность композиции по настоящему изобретению, которая включает арбускулярный микоризный гриб (АМГ) *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072 на пшенице, было проведено испытание на экспериментальном поле "Tres caminos", принадлежащем СЕВАС-СИС в Мурсии.

План эксперимента представлял собой рандомизированный блок с четырьмя повторами. Опытные участки имели длину 3 м и ширину 4,2 м.

Применяли следующие методы обработки.

Контроль: без применения химических удобрений и грибов.

Композиция по изобретению. Предлагается в микрогранулированной форме с нормой 10 кг/га в сочетании с химическим удобрением (Guerra, В.Е., Micorriza arbuscular. Recurso microbiologico en la Agricultura sostenible, Tecnologia en Marcha, 2008, т. 21, № 1, с. 191-201).

Стандартный продукт: химическое удобрение (Guerra, В.Е., Micorriza arbuscular. Recurso microbiologico en la Agricultura sostenible, Tecnologia en Marcha, 2008, т. 21, № 1, с. 191-201): 150 кг/га азота, 54 кг фосфора/га, калия 100 кг/га, кальция 15 кг/га, магния 15 кг/га, серы 23 кг/га и других микроэлементов.

Посадку осуществляли 1 ноября 2013 г., а сбор урожая - 1 июня 2014 г., в общей сложности 240 дней. Используемый тип посева и инокуляции был механическим и производился прохождением зерновой сеялки, а композицию микрогранулята по изобретению вносили в дозе 10 кг/га вместе с семенами.

Используемая почва была классифицирована как Нитисоли (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources, 2006, World Soil Resources Reports, Rome: FAO, 2006). Для химической характеристики почвы использовали следующие аналитические методы:

pH: отношение почвы к раствору 1: 2,5;

органические вещества (ОВ): Уокли и Блэк.

P₂O₅: Ониани;

обменные катионы: экстракция NH₄⁺ АС, 1 моль/л, pH 7 и комплексометрическое титрование (Са и Mg) и пламенная фотометрия (Na и K).

Эти методы описаны в руководстве по аналитическим методам анализа почвы, листвы, органических удобрений и химических удобрений (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Manual de técnicas Analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y Fertilizantes químicos: La Habana, 1989).

Результаты химических характеристик почвы (табл. 2) показывают плодородие от среднего до высокого, отмечая среднее содержание органических веществ, которое соответствует описанному для этого типа почвы (Hernández, A., Morell, F., Ascanio, M.O., Borges, Y., Morales, M., y Yong, A., Cambios globales de los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados (Nitisoles Ródicos Éutricos) de la provincia La Habana, Cultivos Tropicales, 2006, том 27, № 2, с. 41- 50).

Таблица 2

Химические характеристики почвы	
Органические вещества (%)	3,21
pH	7,02
P ₂ O ₅	397,25
K (смоль / кг почвы)	0,96
Ca (смоль / кг почвы)	14,26
Mg (смоль / кг почвы)	3,70
Na (смоль / кг почвы)	0,11

Штамм гриба изобретения *Dominikia* sp. был выделен из засоленной почвы, гриб устойчив к высоким концентрациям солей.

Анализируемыми параметрами были: количество спор АМГ на грамм ризосферы (Gederman, J.W., y Trappe, J.M., The endogonaceae in the pacific northwest, Mycologia Memoir, № 5, The New York Botanic Garden, 1974, № 5), процент колонизации микоризой с помощью техники окрашивания корней (Phillips, J.M., y Hayman, D.S., Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, Tranfer. Britanic: Mycology Society, 1970, т. 55, с. 158-161) процент визуальной плотности с помощью метода отрезков (Giovannetti, M., y Mosse, B., An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots, New Phytology, 1980, т. 84, с. 489-500) и общее содержание гломалина (гликопротеина), которое было получено методом варки под давлением (Wright, S.E., Nichols, K.A., y Schmidt, W.F., Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil, Chemosphere, 2006, т. 64, № 7, с. 1219-1224).

Содержание нутриентов в листьях (% N, P и K) и общее содержание белка определяли методами, описанными в лабораторном руководстве по аналитическим методам INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Manual de técnicas Analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana, 1989).

Урожайность оценивали следующим образом: оценивали количество зерен на колосе; количество колосьев на м²; массу на 1000 зерен и урожайность (т/га).

Статистическая обработка экспериментальных результатов проводилась путем анализа однофакторного дисперсионного анализа, использования теста Дункана (Duncan, D.B., Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 1955, т. 11, № 1), а там, где были различия между обрабатываемыми значениями во всех случаях использовался статистический процессор SPSS 11,5.

Результаты и обсуждение.

В табл. 3 показаны результаты различных обработок параметров микоризы. Эти значения ясно показывают возрастание количества спор там, где применяли композицию по настоящему изобретению по сравнению с контролем (без химического удобрения) и стандартным продуктом.

Таблица 3

Влияние обработок на изучаемые параметры микоризы.

Способ обработки	Споры/грамм почвы	Колонизация (%)	ВП (%)	Гломалин (мг/г почвы)
Контроль	42 b	12,3 b	0,12 b	1,8 b
Композиция по изобретению	156 a	65,3 a	3,25 a	9,27 a
Стандартный продукт	36 b	11,2 b	0,11 b	1,78 b
P	0,014**	0,04***	0,021**	0,017**
F	8,5	9,2	7,1	6,5

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Вышеуказанное может быть связано с сильной колонизационной активностью, затрудняющей колонизацию корней другими видами арбускулярных микоризных грибов. С другой стороны, это показывает, что колонизация микоризой также была более эффективна при применении композиции по изобретению, что отражают более высокие значения по сравнению с другими видами обработки.

Следует отметить, что нативные штаммы в почве показали низкие значения колонизации. Наблюдение за значениями визуальной плотности (переменная, являющаяся мерой интенсивности микоризной колонизации) показывает, что самый высокий процент был получен с композицией по изобретению.

Другой переменной, которую следует выделить, было общее содержание гликопротеинов, которое было выше с композицией по изобретению. Это явление подтверждает больший симбиоз микоризы при применении композиции по изобретению и возможное влияние инокулята на усиление образования агрегатов в почве. Более того, обработки, при которых инокулят микоризы не применялся, имели низкие значения этого параметра, что может быть связано с низкой эффективностью нативной микоризы.

В табл. 4 показано содержание минеральных веществ в листьях при каждой обработке. Для азота и фосфора содержание было выше при применении композиции по изобретению, в то время как содержание натрия было выше при внесении химических удобрений.

Таблица 4

Листовой азот, фосфор, калий и общий белок

Способ обработки	% N	% P	% K	Общий белок, (%)
Контроль	1,25 b	0,26 b	1,12	8,04 b
Композиция по изобретению	1,45 a	0,40 a	1,18	10,1 a
Стандартный продукт	1,41 a	0,36 a	1,23	9,89 a
P	0,001**	0,023**	1,23 ns	0,013*
F	7,2	5,6	8,8	6,5

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Следует отметить, что заявленные значения (López-Bellido, L., Cultivos herbáceos. Cereales, ed. Mundi-Prensa, 1991. с. 151-158) для этого параметра (% N листы) выше критического индекса урожайности пшеницы между 4 и 5 т/га.

Аналогичные результаты (Cornejo, P., Borie, F., Rubio, R., y Azcon, R., Influence of nitrogen source on the viability, functionality and persistence of *Glomus etunicatum* fungal propagules in an Andisol, Applied Soil Ecology, 2007, т. 35, № 2, с. 423-431; Echeverría, E., y Stiddert, G.A., El contenido de nitrógeno en la hoja bandera del trigo como predictivo del incremento de proteína en el grano por aplicaciones de nitrógeno en la espigazón (The nitrogen content in the wheat flag leaf as predictive of the increase in protein in the grain by nitrogen applications to the ear), Revista de la Facultad de Agronomía, 1998, т. 103, № 1, с. 10) указывают на присутствие этого нутриента в ткани листа из-за процесса микоризного симбиоза, который позволяет абсорбировать и транспортировать нутриенты через мицелий. Не было показано значительных отличий в содержании фосфора ни для одной из обработок, что может быть связано с содержанием в почве этого элемента (табл. 4), который поглощается растениями из почвенного раствора в этом конкретном случае через корневую систему по механизму трехстороннего взаимодействия между растением, арбускулярной микоризой (микоризный симбиоз) и почвой, указано более высокое значение этого нутриента, чем критический индекс в листьях твердой пшеницы (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales., ed. Mundi-Prensa, 1991, с. 151-158) и отмечено хорошее развитие культуры. Кроме того, это значение отклонялось больше там, где применялась композиция по изобретению.

Другим важным параметром является содержание белка в листьях, которое выше при обработке композицией по изобретению (даже выше, чем при обработке химическим удобрением). Наконец, контрольная обработка имела значительно более низкое процентное содержание.

Результаты урожайности и ее компонентов (табл. 4) четко отражают реакцию твердой пшеницы на применение композиции по изобретению и стандартного продукта, в равной мере с высоким содержанием N°.

Таблица 5

Влияние обработок на урожайность и ее параметры

Обработка	Зерна/колос	№ колосьев/м ²	Масса 1000 зерен (г)	Урожайность (т/га)	Увеличение (%)
Контроль	25,00 б	576	29,0 б	3,25 б	----
Композиция по изобретению	33,00 а	641	33,4 а	5,22 а	8,8
Стандартный продукт	30,00 а	635	32,0 а	4,60 а	-----
P	0,02**	11,25 ns	0,015*	0,009**	
F	11,2	10,2	6,1	7,8	

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Обработка композицией по изобретению и стандартным продуктом дала наивысшие значения по каждому параметру по сравнению с контролем. Это можно объяснить большей эффективностью твердого инокулята и применением высоких доз азота.

Следует отметить, что выращивание пшеницы в комбинации с композицией по изобретению позволило достичь адекватной продуктивности с удовлетворительными показателями воздействия микоризы не только на улучшение биологической активности почвы, но и способствовало значительному увеличению урожайности на 8,8% по сравнению с контролем и стандартным продуктом.

Пример 5. Влияние композиции по изобретению на развитие кукурузы (*Zea mays*).

Чтобы продемонстрировать эффективность композиции по настоящему изобретению, которая включает арбускулярный микоризный гриб (АМГ) *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCCL 57072, на кукурузе, было проведено испытание на поле недалеко от города Эгеа-де-лос Кабальерос. Была протестирована микрогранулированная форма композиции по настоящему изобретению. Стандартный продукт использовали для сравнения влияния обоих продуктов на выращивание кукурузы, вар DKC 6717, Monsanto; на почвах группы Камбисоли.

Посадка была произведена 12 апреля, а сбор урожая - 14 декабря 2014 г., в общей сложности 230 дней. Используемый тип посева и инокуляции был механическим и осуществлялся прохождением зерновой сеялки, а композиция микрогранулята изобретения вносилась в дозе 10 кг/га вместе с семенами. Используемая распылительная система имела размер 18×18 м.

Проект эксперимента представлял собой рандомизированный блок с тремя повторами. Экспериментальные участки были 20 м в длину и 20 м в ширину.

Применялись следующие методы обработки.

Композиция по изобретению: вносили из расчета 10 кг/га и химическое удобрение (Guerra, В.Е., *Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la Agricultura sostenible, Tecnología en Marcha*, 2008, т. 21, № 1, с. 191-201).

Стандартный продукт: химическое удобрение (Guerra, В.Е., *Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la Agricultura sostenible, Tecnología en Marcha*, 2008, т. 21, № 1, с. 191-201): 325 кг/га азота, 80 кг фосфора/га и калия 200 кг/га, при первоначальном внесении органики в виде навозной жижи 10 т/га.

Используемая почва была классифицирована как Камбисоль (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources 2006. *World Soil Resources Reports*. Rome: FAO, 2006). Для химической характеристики почвы использовались следующие аналитические методы:

pH: отношение почвы к раствору 1:2,5;

органические вещества (ОВ): Уокли и Блэк;

P₂O₅: Ониани.

обменные катионы: экстракция NH₄ AC, 1 моль/л, pH 7 и комплексометрическое титрование (Ca и Mg) и пламенная фотометрия (Na и K).

Эти методы описаны в руководстве по аналитическим методам анализа почвы, листвы, органических и химических удобрений (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, *Manual de técnicas Analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y Ferizantes químicos: La Habana*, 1989).

Результаты химических характеристик почвы (табл. 6) показывают плодородие от среднего до высокого, отмечается среднее содержание органического вещества, которое соответствует описанному для этого типа почвы (Hernández, A., Morell, F., Ascanio, M.O., Borges, Y., Morales, M., y Yong, A., *Cambios globales de los suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados (Nitisoles Ródicos Éutricos) de la provincia La Habana, Cultivos Tropicales*, 2006, том 27, № 2, с. 41- 50).

Таблица 6

Химические характеристики почвы

Органические вещества (%)	2,51
pH	8,02
P ₂ O ₅	258,60
K (смоль / кг почвы)	1,40
Ca (смоль / кг почвы)	15,44
Mg (смоль / кг почвы)	2,90
Na (смоль / кг почвы)	0,30

Штамм гриба *Dominikia* sp. по изобретению выделяли из засоленной почвы; этот гриб устойчив к высоким концентрациям солей.

Анализируемыми параметрами были: процент колонизации микоризой с помощью техники окрашивания корней (Phillips, J.M., у Hayman, D.S., Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, *Transfer. Britanic: Mycology Society*, 1970, т. 55, с. 158-161) и процент визуальной плотности (ВП) с помощью метода отрезков (Giovannetti, M., у Mosse, B., An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots, *New Phytology*, 1980, т. 84, с. 489-500). Содержание нутриентов в листьях (% N, P и K) определяли методами, описанными в лабораторном руководстве по аналитическим методам (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, *Manual de técnicas Analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y Ferizantes químicos: La Habana*, 1989 г.).

Урожайность оценивали следующим образом: оценивали количество зерен на колос; количество колосьев на квадратный метр; масса на 1000 зерен и урожайность (т/га).

Статистическая обработка экспериментальных результатов проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Дункана (Duncan, D.B., *Multiple range and multi range and test of Duncan*), когда были различия между средствами обработки, во всех случаях использовался статистический процессор SPSS 11.5.

Результаты и обсуждение.

В табл. 7 показаны результаты развития микоризной активности через 45 и 120 дней после посадки. Эти значения четко показали повышенную активность там, где применялась композиция по изобретению, достижение не только большего процента колонизации микоризой, но также большей интенсивности колонизации, что отразилось через более высокую визуальную плотность.

Таблица 7

Влияние обработки на изученные параметры микоризы

	Колонизация (%)		ВП (%)	
	45 дней	120 дней	45 дней	120 дней
Композиция по изобретению	36,2 a	64,12 a	3,4 a	4,28 a
Стандартный продукт	10,1 b	11,36 b	0,3 b	0,85 b
P	0,011**	0,02***	0,01*	0,006*
F	7,2	8,2	8,1	9,4

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Этот анализ показал, что наиболее эффективным инокулятом была композиция по изобретению, на что указывают более высокие значения по сравнению с другими видами обработки.

Значения визуальной плотности (параметр, который измеряет интенсивность колонизации микоризой) показывают, что самый высокий процент также был связан с композицией по изобретению и тесно связан с эффективностью.

Измеряли минеральное содержимое листьев (табл. 8). Результаты не показали значимых различий между обеими обработками, композицией по изобретению и стандартным продуктом. Однако наблюдалась тенденция к увеличению запаса нутриентов, особенно в случае содержания азота в присутствии *Dominikia* sp. (композиция по изобретению).

Таблица 8

Азот листьев, фосфор, калий через 120 дней в кукурузе

Обработка	% N	% P	% K
Композиция по изобретению	1,48	0,41	1,81
Стандартный продукт	1,40	0,35	1,9
P	0,12 ns	0,1 ns	0,22 ns
F	8,5	8,2	7,9

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Следует отметить, что значения содержания азота, полученные при обработке композицией по изобретению, выше критического индекса пшеницы для урожайности между 4 до 5 т/га (López-Bellido, L., Cultivos herbáceos, Cereales, ed. Mundi-Prensa, 1991, с. 151-158).

Не было показано значимых отличий в содержании фосфора в листьях ни для одной из обработок, что может быть связано с содержанием в почве этого элемента (табл. 8), который поглощается растениями из почвенного раствора в этом конкретном случае через корневую систему с помощью трехстороннего взаимодействия между растением, арбускулярной микоризой (микоризный симбиоз) и почвой, указано более высокое значение этого нутриента, чем критический индекс в листьях твердой пшеницы (López-Bellido, L., Cultivos herbáceos, Cereales, ed. Mundi-Prensa, 1991, с. 151-158) и отмечено хорошее развитие культуры. Кроме того, это значение отклонялось больше там, где применялась композиция по изобретению.

Аналогичные результаты для пшеницы и кукурузы демонстрируют влияние минеральных удобрений на процент длины колонизированных корней там, где были внесены низкие дозы фосфора. Это подтверждает важность и полезность композиции по изобретению для кукурузы и пшеницы в отношении увеличения абсорбции фосфора из почвы как в присутствии, так и в отсутствие азота и фосфора, что позволяет минимизировать применяемые дозы удобрений.

Содержание калия в листьях было близким для разных исследованных обработок, показывая удовлетворительные уровни для этой культуры, которые сопоставимы с данными по зерновым об этом макроэлементе (López-Bellido, L., Cultivos herbáceos, Cereales, ed. Mundi-Prensa, 1991, с. 151-158). Более того, высокие концентрации этого элемента обнаружены как в растениях с микоризой, так и без нее (Bolleta, A., y Krugger, H., Fertilización e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en trigo, Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2004.; Saleque, M.A., Timsina, J., Panauallah, G.M., Ishaque, M., Pathan, D.J., Saha, P.K., Quayyum, M.A., Humphreys, E.ю y Meisner, C.A., Nutrient uptake and apparent balances for rice-wheat sequences. II. Phosphorus. Journal of Plant Nutrition, 2006, т. 29, № 1, с. 157-172), что может быть связано с тем, что этот элемент легче перемещается в почвенном растворе.

В таблице ниже собраны полученные результаты (табл. 9), которые четко отражают реакцию кукурузы на применение композиции по изобретению и стандартного продукта.

Таблица 9

Обработка	Урожайность (кг/га)	Влажность зерна (%)	Увеличение (%)
Композиция по изобретению	14700,2 a	22	9,18
Стандартный продукт	13500,3 b	20	-----
P	0,042**		
F	29,40		

* Различные буквы в одном столбце значимо различаются при $p < 0,05$.

Растения, обработанные композицией по изобретению, достигли наивысших значений по сравнению со стандартным продуктом, что можно объяснить большей эффективностью твердого инокулята для установления симбиоза с растением и, таким образом, лучшего усвоения высоких доз азота.

Наконец, в заключение следует отметить, что выращивание кукурузы, в комбинации с композицией по изобретению, позволило достичь положительного влияния на продуктивность с точки зрения эффек-

тивности, достигнув увеличения урожайности на 9,18% по сравнению с внесением минеральных удобрений. Кроме того, показатели нутриентов показали более высокую динамику, а использование арбускулярного микоризного гриба по изобретению не только улучшило биологическую активность почвы, но и способствовало значительному росту продуктивности на основе более устойчивого управления.

Пример 6. Эффективность покрытия семян кукурузы *Dominikia* sp. и адгезивным веществом для микоризной активности.

Цель: исследовать эффективность покрытия кукурузы *Dominikia* sp. и адгезивным веществом для активности микоризы.

Для достижения этой цели три горшка (каждый считался повтором) были засеяны семенами кукурузы, покрытыми *Dominikia* sp. депонированным под регистрационным номером MUCL 57072 и адгезивным веществом.

Семена были посажены 3 августа 2016 г., и через 21 и 35 дней после посадки были проведены тесты на колонизацию микоризой корня с использованием метода окрашивания Филиппа и Хеймана (Phillips and Hayman, 1970).

Таблица 10

Процент колонизации микоризой (% КМ) корешков семян кукурузы из зерна покрытого комбинацией *Dominikia* sp. и адгезивного вещества через 21 и 35 дней после посадки (дпп) соответственно

Дата оценки	Горшок 1 (% КМ)	Горшок 2 (% КМ)	Горшок 3 (% КМ)	Среднее (X)
28/3/2016 (21 дпп)	7	9	10	8,6
10/4/2016 (35 дпп)	12	11	15	12,6

Табл. 10 показывает, что в каждом из исследованных образцов был положительный процент колонизации микоризой, который увеличивался по мере роста растений. На этом этапе были обнаружены только начальные точки колонизации кукурузы, образованные сетью экстратрикулярного мицелия, который только начал формироваться.

Выводы.

Покрытие семян кукурузы концентратом инокулята, содержащим *Dominikia* sp. и адгезивное вещество было эффективным, потому что оно создавало микоризные структуры в корне в виде экстратрикулярного мицелия на первых стадиях развития растения. Были обнаружены проросшие споры, которые образовали внутреннюю сеть прорастания и колонизации. Также показаны значения колонизации в зависимости от времени роста кукурузы.

Пример 7. Результаты, полученные в полевых условиях с применением композиции по изобретению в микрогранулированной форме на пшенице и ячмене.

Результаты, полученные в полевых условиях с применением композиции по изобретению, содержащей *Dominikia* sp. депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, в микрогранулированной форме на пшенице и ячмене, представлены в следующей табл. 11.

Таблица 11

Культура	Сорт	Орошение	Обработанная (кг. га ⁻¹)	Не обработанная (кг. га ⁻¹)	Улучшение (%)
Ячмень	Волей	Дождевое земледелие	2600	3000	15
Ячмень	Синьоро	Орошаемое земледелие	7100	7700	8,5
Пшеница	Бонифацио	Орошаемое земледелие	6350	7000	10,2
Пшеница	Бадра	Орошаемое земледелие	4981	5463	9,7
Пшеница	Чамбо	Дождевое земледелие	3350	3700	10,4
Пшеница	твердый	Дождевое земледелие	4300	4900	14

Пшеница	твердый	Дождевое земледелие	4570	5110	11,8
Пшеница	твердый	Орошаемое земледелие	6345	7135	12

Пример 8. Результаты, полученные в полевых условиях при применении композиции по изобретению в микрогранулированной форме на кукурузе.

Результаты, полученные в полевых условиях с применением композиции по изобретению, содержащей *Dominikia* sp. депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, в микрогранулированной форме на кукурузе, представлены в следующей табл. 12.

Таблица 12

	Разнообразие- Цикл	Орошение	Не обработанное (сухое вещество)	Обработанное (сухое вещество)	Улучшение (кг/га)
Зона 1	Lg 30369 - 365	Орошаемая	7,87	8,25	809,091
Зона 2	Lg 30369 - 365	Орошаемое	4,24	5,27	2408,655
Зона 3	Lg 30369 - 335	Орошаемое	4,85	5,26	963,080
Зона 4	Lg 30369 - 365	Орошаемое	6,84	7,89	2085,287
Зона 5	Майсадур -350	Орошаемое	7,40	8,09	1379,649

Пример 9. Микоризная активность *Dominikia* sp. при выращивании риса (*Oriza sativa*) на пойменной почве.

Был проведен эксперимент для определения микоризной активности композиции по настоящему изобретению, содержащей *Dominikia* sp., депонированный под регистрационным номером MUCL 57072, в концентрированной форме, в условиях засоленной пойменной почвы. Используемая композиция имела концентрацию между $1-4 \times 10^6$ пропагул/г субстрата. С другой стороны, в соответствии с вариантами осуществления концентрация композиции может составлять $1-2 \times 10^4$, предпочтительно $1,2-1,8 \times 10^4$ пропагул/г субстрата.

Материалы и методы.

Эксперимент проводился на экспериментальной ферме "Трес Каминос", принадлежащей SEBAS-CSIC и расположенной в районе Матанса, муниципалитет Сантомера (Мурсия). Растения выращивали в однослойной экспериментальной теплице туннельного типа приблизительно площадью 60 м^2 , покрытой поликарбонатом с верхним окном, защищенным противоскользкой сеткой. Она была оборудована системой охлаждения и системой алюминированных притеняющих экранов. Испытание проводилось с растениями риса (*Oriza sativa*) сорта J 104, подвергнутыми двум обработкам микоризным инокулятом, и соответствующим контролем без обработки микоризой. Обработка микоризой осуществлялась композицией по изобретению, содержащей *Dominikia* sp., депонированной под регистрационным номером MUCL 57072, в форме концентрата в дозе 1 кг/га покрытием семян риса.

Когда была обеспечена инокуляция на отдельных побегах, через 15 дней после прорастания, растения были пересажены с густотой 10 растений на бетонный канал, площадью 2 м^2 , с использованием почвы Hidromórfico Gley Nodular Salinizado в соответствии с классификацией почв ЮНЕСКО (Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D., Rivero, L., Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba, Soil Institute, AGRINFOR, La Habana, 1999, с. 64) в качестве субстрата в обоих контейнерах. Основные характеристики показаны в табл. 1. Была проведена работа по выращиванию, слой воды был добавлен через 18 дней после посева семян во всех вариантах обработки.

Таблица 13

Некоторые химические свойства и количество спор в 50 г почвы⁻¹

ОВ (%)	pH	P (смоль. кг ⁻¹)	Ca	Mg	K	Na	С. Е (цС. см ⁻¹)	No спор. г почвы ⁻¹
			смоль. кг ⁻¹					
2,3	7,5	13,2	10,2	5,6	0,9	2,2	2876	1,2

⁻¹ В эксперименте использовалась почва Hidromórfico Gley Nodular Salinizado

Характеристики композиции по изобретению в концентрированной форме.

В данном примере композиция по изобретению в концентрированной форме с инокулятом микоризы содержит арбускулярный микоризный гриб *Dominikia* sp. депонирован под регистрационным номером MUCL 57072. Используемая композиция имела концентрацию между $1-4 \times 10^6$ пропагул/г субстрата.

Выполненные определения.

Определяли динамику роста в течение 90 дней после пересадки (дпп), где измеряли высоту растений и глубину корневой системы, а также урожайность и некоторые ее компоненты.

Активность микоризы определяли в процессе развития сельскохозяйственных культур путем измерения процента колонизации (%), визуальной плотности (%), арбускулярного экстрематриального мицелия и арбускулярных эндофитов с использованием стереомикроскопа (Zeiss, West Germany -5-) и биологического микроскопа AxioStar (Zeiss, West Germany -5-). Рассчитывали соотношение между арбускулярным внешним и эндофитным мицелием (МЭА:ЭА).

Микоризную оценку образцов проводили с использованием техники окрашивания корней (Phillips, D.M., Hayman, D.S., Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55, 158-161, 1970), а процент колонизации определяли методом отрезков (Giovannetti, M., Mosse, B. (1980), An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots, *New Phytology.*, 84:489-500). Математический расчет визуальной плотности, арбускулярных эндофитов и микоризной активности проводился в соответствии с предложенными протоколами (Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi Pearson, V. (1986), *Mesure du Taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle*, *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Dijón, 15 July, 1985. (eds. V. Gianinazzi Pearson and S. Gianinazzi). INRA, Paris, с. 217-222; Herrera-Peraza, R., Eduardo Furrázola, Roberto L. Ferrer, Rigel Fernández Valle and Yamir Torres Arias, 2004, Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, т. 35, № 2, 2004). Также определялась общая численность спор, г почвы⁻¹.

Статистический анализ.

Статистическую обработку результатов проводили путем простого дисперсионного анализа классификации и критерия Тьюки при наличии значимых различий между средними значениями с использованием программы Statgraphics® Plus, 4.1. Для построения графиков (т.е. рисунков 1, 2 и 3) использовалась программа SigmaPlot 4.

Процентные значения колонизации микоризой преобразовывали с использованием выражения $2 \arcsin \sqrt{x}$.

Результаты и обсуждение.

В приведенной выше табл. 13 показаны некоторые химические свойства почвы, использованной в эксперименте. Почва имела слабощелочной pH, средний уровень содержания органических веществ, P и Ca²⁺ порядка 10 смоль/кг. Что касается засоления, то содержание Na было высоким, была высокой и электропроводность, что указывало на сильное засоление, хотя плодородие было приемлемо для развития риса.

Количество спор, выявленных в этом субстрате, было очень низким, что характерно для интенсивно используемых сельскохозяйственных почв, где разнообразие и интенсивность арбускулярных микоризных грибов (АМГ) снижены из-за интенсивной обработки почвы, чрезмерной эксплуатации и типичных процессов химизации и засоления etc. (Rao, D.L.N., 1998, *Biological amelioration of salt-affected soils*, in: *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*, vol. 1, Science Publishers, Enfield, USA, с. 21-238).

Анализ динамики роста риса в этих условиях показал отличное поведение изучаемых параметров при обработке. Высота растений постоянно увеличивалась, ускоряя развитие после 27-го дня (табл. 14).

Таблица 14

Высота (см), глубина корневой системы (см) и микоризная колонизация (% МК) у растений, обработанных *Dominikia* sp. (D. t) и контрольные (К) растения в течение 90 дней ДПО в условиях засоленной почвы

ДПО	1	7	10	13	18	20	23	27	32	39	60	90
Высота												
D. t	10,5 b	10,5 b	10,9 b	12,4 b	13,0 b	17,1 a	17,0 a	19,8	23,8 a	32,8 a	63,5 a	74,1 a
К	11,1 a	11,2 a	12,2 a	14,4 a	15,6 a	15,6 b	16,7 b	18,9	20,7 b	25,7 b	58,6 b	68,1 b
СО	0,2 ***	0,12 ***	0,1 ***	0,2 ***	0,3 ***	0,2 ***	0,4 ***	0,9 ns	0,1 ***	0,2 ***	0,6 ***	0,2 ***
ГКК												
D. t	0	0,6	1,4 b	2,6	4,3	6,18	6,48	6,82	7,9 a	7,08	13,9 a	16,9 a
К	0	0,6	2,1 a	2,1	4,7	6,29	6,32	6,4	6,4 b	7,23	10,4 b	13,1 b
СО	0,0 ns	0,3 ns	0,2 ***	0,6 n. s	0,8 ns	0,3 ns	0,5 ns	0,4 ns	0,2 ***	0,3 ns	0,1 ***	0,2 ***
(% ОБ)												
D. t	2 a	6 a	13 a	14 a	14 a	17 a	18 a	24 a	35 a	38 a	38 a	41 a
К	0 b	3 b	3 b	6 b	10 b	12 b	13 b	15 b	20 b	21 b	19 b	22 b
СО	0,3 ***	0,2 **	0,13 ***	0,4 ***	0,6 ***	0,1 ***	0,2 ***	0,1 ***	0,2 ***	0,3 ***	0,2 ***	0,4 ***

Обозначения.

ГКК: глубина корневой системы;

ДПО: дни после обработки;

СО: стандартное отклонение.

Одинаковые буквы в одном столбце не различаются достоверно при $p \leq 0,05$.

Оба метода обработки показывают значительную разницу в процессе роста. Наивысшие значения были получены при контрольной обработке до 18 дней, после чего произошло изменение поведения, и самые высокие значения для высоты растений были получены обработкой инокулятом грибом арбускулярной микоризы.

Анализ динамики роста растений риса в этих условиях выявил различное поведение переменных при обработке. Высота растений неуклонно увеличивалась, ускоряя их рост после 27-го дня.

Оба метода обработки показывают значительную разницу в процессе роста. Самые высокие значения были получены при контрольной обработке до 18 дней, после чего произошло изменение поведения, и самые высокие значения высоты растений были получены при инокуляции эффективным грибом арбускулярной микоризы.

Подобное поведение параметра высоты наблюдалось в глубине корневой системы, которая была

больше у обработанных, чем у контрольных растений, после 32 ДПО. В этом случае поведение было выделено, потому что это та часть растения, на которой развивается грибок.

Исследование микоризной колонизации показало поведение, отличное от того, которое было обнаружено при ранее проанализированных параметрах. В этом случае и в обоих вариантах обработки колонизация была прогрессивной и всегда достигала наивысших значений при инокуляционной обработке по сравнению с контрольной обработкой, которая, хотя и не была инокулирована, показывала естественные уровни микоризной колонизации, типичный результат экспериментов, проводимых в естественных условиях.

Развитие было хорошо выражено в случае инокуляционной обработки АМГ, достигая высоких значений, если учесть, что эксперимент проводился в условиях затопления или со слоем воды через 20 дней. В конце культивирования колонизация корня достигла значения 44%, что считается высоким по сравнению с другими исследованиями микоризы риса, где максимумы колонизации не превышают 25% при посеве на твердую основу (Fernández, F., Ortiz, R., Martínez, M.A., Costales, A., Llonín, D., The effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on rice (*Oryza sativa*) in different types of soils, *Cultivos Tropicales*, 18(1):5-9, 1997).

На фиг. 1 показано развитие двух очень важных параметров микоризной активности гриба при обработке инокулятом композицией по изобретению в концентрированной форме - популяции спор и заселения грибами, выраженных через процент визуальной плотности, который представляет собой не что иное, как интенсивность, с которой мицелий заселяет внутренность корня.

Визуальная плотность показывала типичное микробное поведение с четко определенной латентной фазой, когда грибок медленно колонизировал внутреннюю часть корня от 0 до 20 дней, а затем демонстрировал экспоненциальный рост до 40 дней, время, когда он достигал стационарной фазы и конца выращивания.

В случае популяции спор, они определялись в почве в первые дни с момента инокуляции (вплоть до 15 дней в стеблях), затем со временем постепенно исчезали; продукт прорастания в благоприятных условиях влажности и высокой температуры, детектировался до тех пор, пока популяция спор в почве не упала. Через 30 дней началось образование новых спор в результате развития внешней биомассы грибов и развития симбиоза с растением. В этом случае популяция продолжала расти до значений, близких к 12 спорам, г⁻¹ почвы.

Анализ арбускулярного внешнего мицелия и параметров арбускулярных эндофитов (фиг. 2) очень интересен, поскольку он показывает, как происходит внутреннее и внешнее поведение микоризного симбионта по мере развития симбиоза в ежегодных циклах культивирования.

В этом случае высокие значения внешнего мицелия наблюдались на первых этапах развития симбиоза, вызванного ростом грибов за счет роста растения, выразившись через несколько лет (Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Franson, R.L., Mihara, K.L., 1989, The glycine-glomus-bradyrhizobium symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological response of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus of *Glomus mosseae*, *Physiol. Plant.*, 76, 226-232), в явный паразитический процесс, возникающий в результате бурного роста мицелия на ранних стадиях микоризной колонизации растений (часы) в стадии низкого фотосинтеза и высоких метаболических затрат. В развитии арбускулярных эндофитов наблюдается обратная тенденция. В течение первых нескольких дней показатели были очень низкими, значительный рост наблюдался только через 25 дней роста, стадии, считающейся переходной в симбиозе арбускулярной микоризы.

Через 30 дней наблюдается уменьшение и стабилизация внешнего мицелия и постепенное увеличение эндофита, связанное с ростом растений и развитием симбиоза.

На фиг. 3 показана взаимосвязь, установленная между микоризными компонентами в посевах риса (соотношение между арбускулярным внешним мицелием и эндофитным мицелием (МЭА:ЭА)). Это соответствие между двумя основными компонентами симбиоза, внешним мицелием и эндофитом, выражает активность этой ассоциации, которая проходит разные стадии развития. (Hirrel, M.C., 1981, The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*, *Mycology*, 43, 610-617). Начальная стадия, когда высокие значения внешнего мицелия соответствуют очень низким значениям эндофитов, которая уравнивает явный паразитизм, выражающийся не только в этих параметрах, но также в снижении роста растений по сравнению с неинокулированным или неэффективно заселенным микоризой контролем, который не вызывает существенных изменений в развитии растений (табл. 2).

Промежуточная или переходная фаза, когда обе части начинают балансировать, и мутуалистическая фаза обмена, когда компоненты уравниваются со значением 1 и даже меньше, так что внутри корня наблюдается заметный рост, обеспечивающий надлежащий обмен нутриентов на уровне арбускул внутри клеток.

В частности, для этой культуры можно четко выделить две фазы; начальная фаза переходного периода, до 20-25 дней и мутуалистическая фаза после этого времени. Параллельно с этим анализ высоты растений показывает увеличение роста растений по сравнению с неинокулированным контролем через 27 дней посева, что совпадает с мутуалистической фазой микоризного симбиоза в этих условиях заселения.

Этот эффект может быть впоследствии показан в анализе урожайности и ее компонентов (табл. 15).

Таблица 15

Число метелок на растение (n), масса метелок (г), масса 100 зерен (г) и урожай (г. растение⁻¹) на растениях риса, обработанных *Dominikia* sp. (D. t) и контрольные необработанные растения (C) в засоленной почве

Обработка	NPP	PP	P 100 г	R
D. t	8,33 a	2,70 a	3,69 a	21,66 a
C	5,40 b	1,87 b	2,70 b	15,40 b
CO	0,12 ***	0,05***	0,001***	1,34***
C. V (%)	11,2	9,2	6,5	14,6

Обозначения.

NPP: количество метелок на растение (n);

PP: вес метелок (г);

P 100 г: вес 100 зерен (г);

R: урожай (г. растение⁻¹);

CO: стандартное отклонение.

Одинаковые буквы в одном столбце существенно не различаются при $p \leq 0,05$.

Наблюдалось увеличение всех компонентов урожайности, измеренной у растений, обработанных *Dominikia* sp. по сравнению с контрольными неинокулированными растениями. Это было особенно интересно в условиях засоления.

Таким образом, использование этого штамма микоризного гриба было эффективным в данных почвенных условиях. Это жизнеспособная и устойчивая альтернатива очень интересна в неблагоприятных условиях, вызванных с соевым стрессом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Dominikia tenuihyphara* для обеспечения положительного воздействия на сельскохозяйственные культуры, депонированный в бельгийской координированной коллекции микроорганизмов (BCCM) под регистрационным номером MUCL 57072.

2. Композиция для обеспечения положительного воздействия на сельскохозяйственные культуры, содержащая штамм *Dominikia tenuihyphara*, по п.1, причем концентрация *Dominikia tenuihyphara* в указанной композиции составляет от 4,0 до 1,0% по весу.

3. Композиция по п.2, причем концентрация *Dominikia tenuihyphara* в указанной композиции составляет от 3,0 до 2,0% по весу, предпочтительно от 2,5 до 2,3% по весу.

4. Композиция по п.2, причем указанная композиция представляет собой твердую композицию.

5. Композиция по п.4, причем указанная композиция представлена в форме порошка, эмульгируемого концентрата, гранул или микрогранул.

6. Композиция по п.5, причем указанная композиция представлена в форме микрогранул.

7. Композиция по п.6, отличающаяся тем, что указанные микрогранулы имеют размер от 500 до 2000 мкм, предпочтительно от 800 до 1500 мкм, более предпочтительно от 900 до 1200 мкм.

8. Композиция по любому из пп.2-7, дополнительно содержащая по меньшей мере один фунгицид, и/или по меньшей мере один биофунгицид, и/или по меньшей мере один инсектицид, и/или по меньшей мере один биоинсектицид, и/или по меньшей мере один нематоцид, и/или хотя бы один биостимулятор.

9. Способ приготовления композиции по п.2, содержащий следующие этапы:

a) обеспечение субстрата;

b) введение в указанный субстрат семян растения-хозяина и штамма *Dominikia tenuihyphara*, депонированного под регистрационным номером MUCL 57072;

c) культивирование указанного растения-хозяина и полив для поддержания уровня влажности указанного субстрата не менее 75% от естественной влагоемкости;

d) прекращение полива на срок не менее 7 дней;

e) удаление надземной части растения-хозяина и субстрата;

f) сушка удаленного субстрата;

g) измельчение высушенного субстрата с получением гранул с размером частиц менее 100 мкм.

10. Способ по п.9, в котором указанный штамм *Dominikia tenuihyphara* этапа b) представляет собой инокулят, содержащий propagулы штамма *Dominikia tenuihyphara*.

11. Способ по п.9 или 10, дополнительно включающий этап h1) микрогрануляции.

12. Способ по п.9 или 10, дополнительно включающий этап h2) приготовления концентрированного биологического инокулята для покрытия семян зерновых культур.

13. Способ по п.12, в котором упомянутый этап h2) приготовления концентрированного биологиче-

ского инокулята для покрытия семян зерновых культур осуществляют путем просеивания измельченного продукта, полученного на этапе г) для отделения гранул, имеющих размер частиц выше заданного значения.

14. Способ по п.12, дополнительно включающий этап i) покрытия семян.

15. Способ по п.14, в котором упомянутый этап i) покрытия семян включает

i1) покрытие семян адгезивным веществом;

i2) добавление указанного концентрированного биологического инокулята;

i3) опциональное обеспечение одной или более из следующих совместимых обработок:

i3.1) обработка фунгицидами, инсектицидами и/или гербицидами, совместимые с грибами, образующими микоризу,

i3.2) обработка полезными микроорганизмами,

i3.3) обработка макро- и/или микронутриентами,

i3.4) обработка стимуляторами,

i3.5) обработка красящими пигментами, совместимыми с микоризными грибами;

i4) сушку семян.

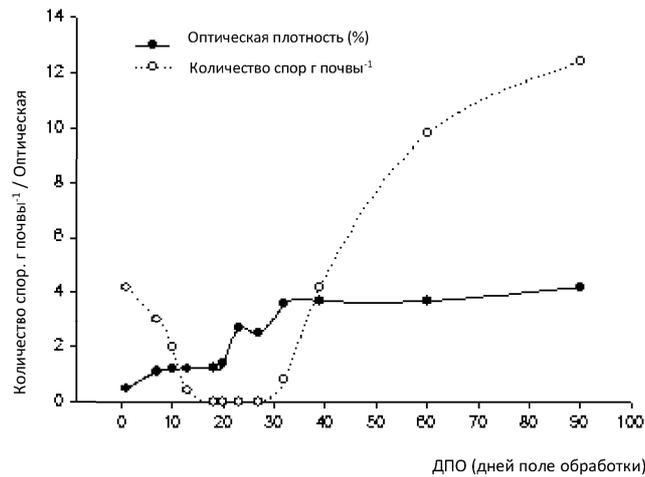
16. Применение композиции по п.2 в качестве биостимулятора для растений.

17. Применение композиции по п.2 в качестве бионематоцида для растений.

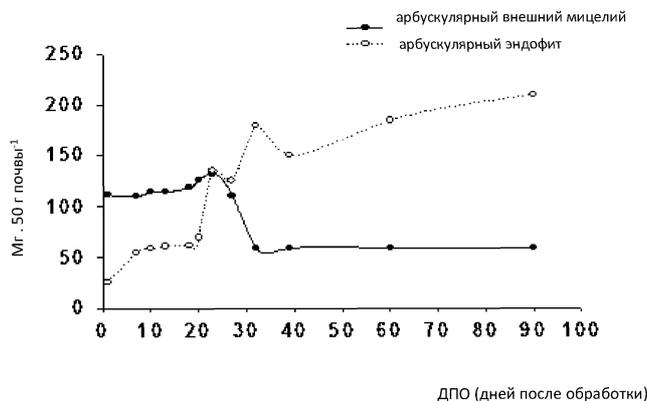
18. Применение по п.16 или 17, отличающееся тем, что указанные растения представляют собой зерновые культуры.

19. Композиция по п.2, используемая путем покрытия семян или совместно с семенами во время посева.

20. Семена зерновых культур, покрытые композицией по п.2.



Фиг. 1



Фиг. 2

