

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

ПРАКТИКУМ
по выполнению лабораторных работ



Дмитрий Павлов

**Биотехнология в защите
растений. Практикум по
выполнению лабораторных работ**

«АГРУС»

2013

УДК 632.9
ББК 44

Павлов Д. А.

Биотехнология в защите растений. Практикум по выполнению лабораторных работ / Д. А. Павлов — «АГРУС», 2013

<p id="___GoBack">Рассматриваются технологии производства микробиологических препаратов – грибных, бактериальных и вирусных, применяемых при микробиологической защите растений. Описаны биологические особенности и методы разведения основных энтомофагов – паразитов и хищников, используемых для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур открытого и защищенного грунта. Приведены методики получения безвирусных растений картофеля, овощных культур и винограда, биотехнологические методы борьбы с болезнями растений, сорной растительностью. Отражены методы использования дождевых червей, синантропных мух и бактерий для повышения плодородия почвы и переработки органических отходов. Для студентов бакалавриата и магистратуры, обучающихся на агрономических специальностях, научных сотрудников, аспирантов.

УДК 632.9
ББК 44

© Павлов Д. А., 2013
© АГРУС, 2013

Содержание

Введение	6
Лабораторная работа № 1. Определение титра грибных препаратов	7
Лабораторная работа № 2. Технология получения и применения биопрепаратов для защиты растений от вредителей	9
2.1. Получение бактериальных препаратов	10
2.2. Получение и применение грибных энтомопатогенных препаратов	13
2.3. Технология получения вирусных энтомопатогенных препаратов	16
Конец ознакомительного фрагмента.	19

**Д. А. Павлов, М. В.
Добронравова, Е. В. Ченикалова
Биотехнология в защите
растений. Практикум по
выполнению лабораторных работ**

© ФГБОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет, 2013

Введение

Научной основой биотехнологии являются принципы биохимии и микробиологии, молекулярной (клеточной) биологии и генетики, а также других смежных биологических дисциплин: растениеводства и селекции, энтомологии и фитопатологии, зоологии и экологии, охраны окружающей среды.

Практическое значение и конечный итог деятельности сельскохозяйственной биотехнологии как научно-практической отрасли биологии заключается в промышленном получении ценных продуктов сельскохозяйственного производства для медицины, питания, промышленности, поддержания гомеостаза среды существования человечества.

В результате изучения дисциплины студенты агрономического факультета должны знать теоретические основы сельскохозяйственной биотехнологии – принципы генной инженерии, культивирования «*in vitro*» органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, использования гормонов растений и животных; методы диагностики фитопатогенных вирусов; технологию получения микробиологических препаратов для борьбы с вредными организмами; принципы использования полезных макро- и микроорганизмов в области защиты растений и охраны окружающей среды.

Студенты должны ознакомиться с технологией мелкотоннажного производства микробиопрепаратов для защиты растений от вредителей и болезней; технологиями массового разведения трихограммы, габробракона, энкарзии, хищной галлицы афидимизы, фитосейулюса и других энтомофагов; использованием дождевых червей и комнатных мух для переработки органических отходов и производства биогумуса.

Лабораторная работа № 1. Определение титра грибных препаратов

Цель работы: освоить методику определения титра биопрепаратов.

Материалы и оборудование: сухой или смачивающийся порошок боверина или жидкий препарат из биолaborатории. Набор пробирок для разведения препаратов, стеклянные палочки, мерные пипетки, колбы, камера Горяева, микроскопы, фильтровальная бумага.

При применении грибных и бактериальных биологических препаратов для защиты растений от вредителей и болезней важно следить за тем, чтобы титр рабочей суспензии соответствовал рекомендуемому (рис. 1).

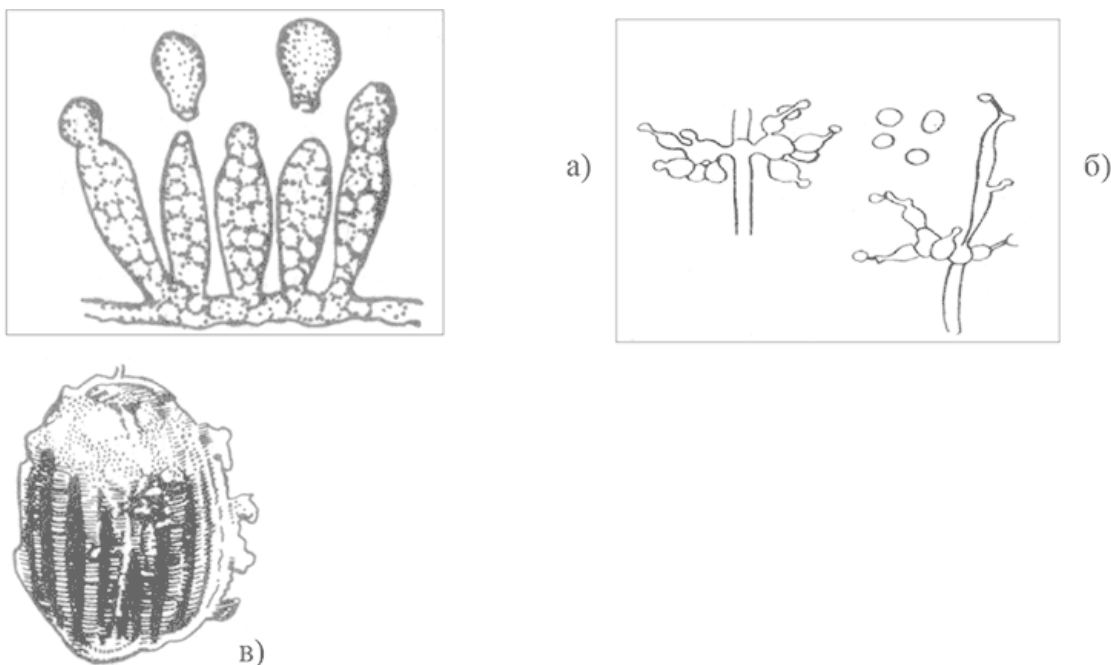


Рис. 1. Энтومопатогенные грибы:

- а) конидиеносцы гриба рода энтомофтора (*Entomophthora* sp.);
- б) конидиеносцы и конидии гриба боверия (*Beauveria* sp.);
- в) колорадский жук, пораженный мускардином

Титром называют количество спор гриба, находящегося в 1 мл суспензии или в 1 г сухого порошка (Бондаренко, 1983).

Особенно важно контролировать титр препарата при его изготовлении мелкими партиями в условиях производственных биолaborаторий станции защиты растений.

Определение титра препарата, приготовленного на жидкой среде. Полученную из биолaborатории культуру гриба (жидкий препарат) предварительно просматривают под микроскопом для визуального определения степени насыщения конидиоспорами. При обильном спороношении полученную суспензию разбавляют в 10 и 100 раз, для чего в мерные колбы берут пипеткой по 1 мл хорошо перемешанной суспензии и доводят водой до объема 10 и 100 мл соответственно. Затем содержимое исследуемой суспензии еще раз встряхивают, стеклянной палочкой по капле наносят на две площадки камеры Горяева, покрывают покровным стеклом и

хорошо притирают. Излишки жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Камеру помещают на предметный столик, при окуляре 10х и объективе 10х находят средний ряд квадратов сетки, переводят объектив на увеличение 40х и подсчитывают число конидий. Подсчет проводят в 10 больших квадратах камеры, расположенных в среднем ряду сетки, пропустив при этом 2 первых и 2 последних квадрата. Если число конидий в большом квадрате превышает 50, для анализа берут суспензию с более высоким разведением или разбавляют в 10 раз последний вариант разбавленной суспензии.

Вычислив среднее арифметическое числа конидий в одном большом квадрате, подставляют его в формулу для определения титра (T) маточной культуры по формуле

$$T = 25 \times 10^4 \times A \times P,$$

где A – среднеарифметическое число конидий в большом квадрате;

P – разведение (10, 100 и т. д.).

Определение титра суспензии сухого препарата. Исходя из рекомендуемой нормы применения сухого препарата, например, 1 кг/га при разведении 300 л рабочего раствора, готовят суспензию 3,3 г препарата в 1 л воды в колбе, тщательно перемешивают, фильтруют через 2 слоя марли. Полученную суспензию препарата, аналогичную применяемой в производственных условиях, подвергают анализу. Определение титра препарата проводим как в предыдущем случае.

Контрольные вопросы и задания:

1. С какой целью определяют титр грибных препаратов?
2. Опишите устройство камеры Горяева и работу с ней.
3. Расскажите о порядке работы при разведении препаратов и определении разведения.
4. По какой формуле определяется титр препарата? Что означают члены уравнения?

Лабораторная работа № 2. Технология получения и применения биопрепаратов для защиты растений от вредителей

Цель работы: ознакомиться с технологией производства и зарисовать блок-схемы получения бактериальных, грибных и вирусных препаратов, записать технологию их получения и применения.

Материалы и оборудование: образцы микробиологических препаратов, применяемых в защите растений. Насекомые, пораженные грибами, вирусными и бактериальными болезнями. Блок-схемы технологий получения препаратов.

2.1. Получение бактериальных препаратов

Промышленное производство биопрепаратов бактериального происхождения заключается в глубинном культивировании энтомопатогенных бактерий с целью получения максимального титра клеток в культуральной жидкости и накопления токсинов. Промышленные штаммы бактерий должны отвечать следующим требованиям: относиться к определенному серотипу (одному из 12 серотипов и 15 вариантов Δ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis* Berl.), иметь высокую вирулентность и репродуктивность, среднюю чувствительность к комплексу бактериофагов, обеспечивать высокую эффективность биопрепарата. Технология производства всех бактериальных препаратов на основе *B. thuringiensis* Berl. включает следующие стадии:

- 1) выращивание посевного материала в лаборатории и посевном аппарате;
- 2) культивирование в промышленном ферментере;
- 3) концентрирование культуральной жидкости;
- 4) сушка, стандартизация и фасовка готового препарата.

Бактерии для создания препарата выращивают сначала в 3-литровых колбах (банках) с искусственной питательной средой (ИПС), а затем в посевном аппарате в условиях аэрации (0,2 л воздуха на 1 л среды в 1 мин).

Посевной материал должен содержать не менее $1,7 \times 10^9$ спор в 1 мл. В посевной аппарат культура добавляется в количестве 0,05 % от объема питательной среды аппарата. Температура культивирования – 28–30 °С, продолжительность культивирования – 35–40 ч.

Состав искусственной питательной среды в посевном аппарате и промышленном ферментере следующий: кормовые дрожжи (2–3 %), кукурузная мука (1–1,5 %), кашалотовый (рыбий) жир (1 %). При этом культуру доводят до стадии споруляции (образования спор у 90–95 % бактериальных клеток) (рис. 2). Если споры не требуются, то среда составляется из глюкозы технической (0,7 %), кукурузного экстракта (4 %), хлорида натрия (2 %). Состав среды влияет на соотношение спор и кристаллов эндотоксина бактерии в культуральной жидкости.

Процесс культивирования заканчивают при степени споруляции 90–95 % и титре спор в 1 мг не менее 1×10^9 .

Готовую культуральную жидкость перекачивают в стерильный сборник, передают на сепарацию и получают пасту влажностью 85 % с выходом около 100 кг из 1 м³ культуральной жидкости и титром 20×10^9 спор в 1 г пасты.

Пасту собирают в отдельном сборнике. Отцентрифугированную питательную среду при необходимости используют еще 1–2 раза (многократное повторное использование его невозможно, так как в культуральной жидкости накапливаются вещества, тормозящие развитие бактерий). В дальнейшем фугат используют для производства кормовых дрожжей (цикл производства замкнутый, что важно с точки зрения экономичности и охраны окружающей среды).

Пасту направляют на приготовление стабилизированной пасты или сухого смачивающегося порошка – конечных препаративных форм биопрепарата.

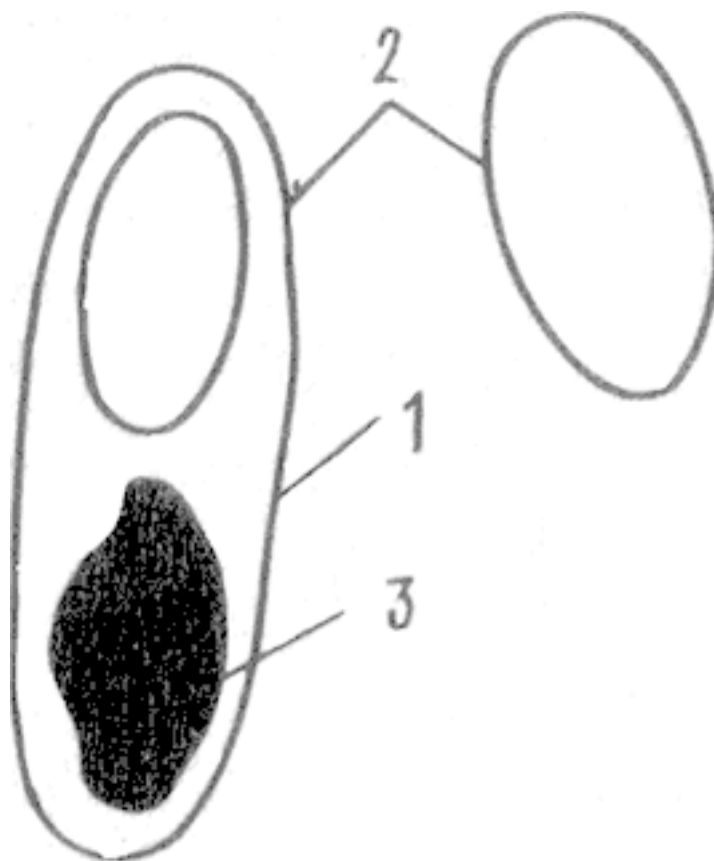


Рис. 2. Энтомопатогенная бактерия *Bacillus thuringiensis* Berl.:

1 – бактериальная клетка в фазе созревания; 2 – спора бактерии; 3 – Δ -эндотоксин в форме кристаллического включения в бактериальной клетке

Для получения смачивающегося порошка пасту высушивают на распылительной сушилке до остаточной влажности 10 %, смешивают с каолином до стандарта – 30×10^9 спор в 1 г препарата. Порошок фасуют в 4-слойные герметичные мешки по 20 кг.

Стабилизированную пасту готовят, смешивая ее после сепарации с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ). Молекулы КМЦ, имеющие положительный заряд, за счет электростатических сил собирают на себе кристаллы и споры, заряжая их отрицательно, что способствует равномерному распределению активного начала во всем объеме пасты. Добавляют также консерванты, распределяющиеся равномерно между частицами (рис. 3).

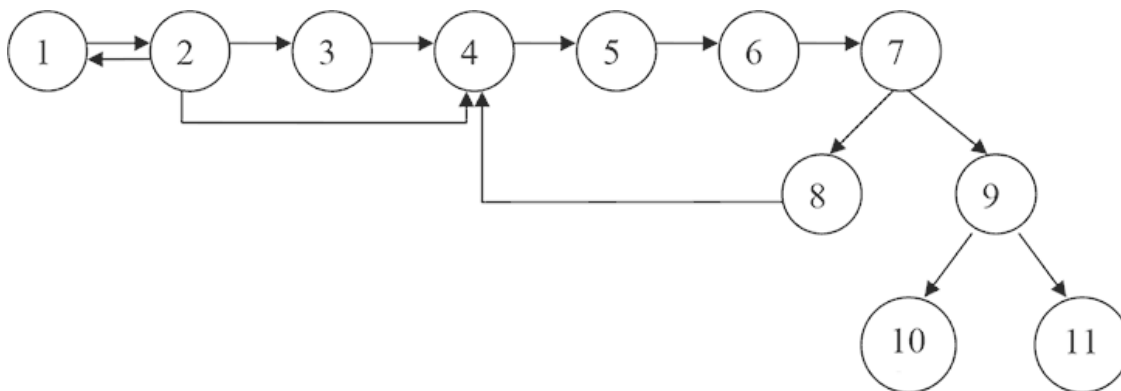


Рис. 3. Блок-схема производства бактериальных препаратов:

1 – хранение маточного материала; 2 – выращивание посевного материала в лаборатории в качалочных колбах; 3 – выращивание маточной культуры в посевном аппарате; 4 – культивирование в промышленном ферментере; 5 – контроль на наличие свободного фага; 6 – определение степени споруляции; 7 – концентрирование культуры; 8 – повторное использование фугата (питательной среды); 9 – получение пасты; 10 – изготовление стабилизированной пасты; 11 – изготовление сухого или смачивающегося порошка

Паста не подвержена гниению и брожению, не замерзает при хранении, ей не опасно увлажнение. Это вязкая жидкость кремового цвета без запаха. Производство стабилизированной пасты экономически более выгодно. В препарат можно вводить добавки: антииспарители, смачиватели, прилипатели, приманочные вещества (аттрактанты), а также вещества, защищающие бактерий от влияния солнечной радиации. Применяются бактериальные биопрепараты (лепидоцид, дедробациллин, энтобактерин, дипел, БИП и другие) на овощных культурах с нормой расхода 1–3 кг/га, на древесных культурах с нормой 3–5 кг/га против листогрызущих вредителей (гусениц чешуекрылых, ложногусениц пилильщиков, личинок жуков-листоедов и др.). Гибель вредителей наступает на 2-10-й день.

2.2. Получение и применение грибных энтомопатогенных препаратов

Грибные препараты получают на основе представителей родов боверия (возбудитель белой мускардины), метарризиум (возбудитель зеленой мускардины), энтомофтора и ашерсония.

Промышленно культивируют в нашей стране 2 вида боверии – *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, *B. tenella* (Delacr.) Siem., используемых против жесткокрылых. Освоено получение боверина – белого порошка, содержащего в 1 г от 1,5 до 6 млрд конидиоспор в 1 г. Кроме спор активным началом препарата является токсин боверцин, продуцируемый этим грибом-гифомицетом.

Получение боверина осуществляется двумя способами: глубинным и поверхностным культивированием. Производство глубинным способом более экономично, но при этом конидии гриба отличаются от образующихся на воздухе тонкими покровами, плохо отчлениаются от вегетативного тела. Их называют гифальными тельцами или гонидиями. Они не устойчивы к высушиванию и солнечной радиации. Для устранения этого недостатка разработана более дорогостоящая ИПС (искусственная питательная среда) (рис. 4).

Технология получения боверина глубинным способом. Хранение исходного материала (штамма) проводят в лабораториях на агаризированной среде Сабуро, периодически обновляя маточную культуру. Перед началом промышленного цикла исходный штамм культивируют 3–4 суток в качалочных колбах на жидкой ИПС при 25–28 °С. Полученные конидиоспоры можно высушить и хранить до 1 года.

Приступая к промышленному получению препарата, культуру гриба выращивают в инокуляторе на ИПС. Среда состоит из кормовых дрожжей – 2 %, крахмала – 1 %, хлорида натрия – 0,2 %, хлорида марганца – 0,01 % и хлорида кальция – 0,05 %, который усиливает устойчивость конидиоспор к неблагоприятным факторам.

Культивирование в промышленном ферментере ведут 3–4 суток, при 25–28 °С и постоянном перемешивании, с обязательной принудительной аэрацией до 2,5 объема воздуха на 1 объем среды в минуту.

В течение 1–1,5 суток дрожжи лизируются, а гриб проходит стадии роста мицелия, гонидиальную и конидиальную. К концу полного созревания культуры идет лизис мицелия и накопление в питательной среде конидий.

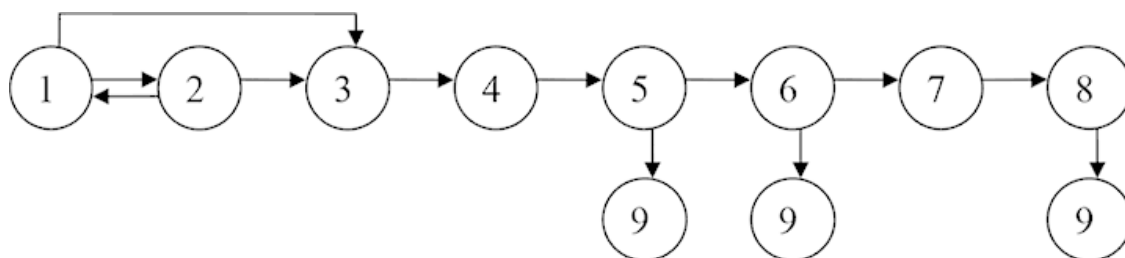


Рис. 4. Блок-схема получения боверина глубинным методом:

1 – хранение маточного материала; 2 – культивирование исходного штамма в качалочных колбах; 3 – получение культуры в инокуляторе; 4 – культивация в промышленном ферментере; 5 – контроль титра препарата; 6 – сепарация и фильтрация, получение пасты; 7 – высушивание пасты; 8 – стандартизация каолином до ГОСТ; 9 – применение жидкого препарата, пасты или сухого препарата

В это время проводят контроль титра культуральной жидкости. Она должна содержать от 0,3 до 1,3 млрд конидий в 1 мл. Количество гонидий – не более 3–5 %. При достижении такого титра можно приступать к применению или сепарации и фильтрации культуральной жидкости. Полученную пасту, состоящую из конидий гриба, высушивают на распылительной сушилке, получая сухой препарат. Его стандартизируют до ГОСТ, добавляя каолин (белую глину).

Технология получения боверина методом поверхностного культивирования. Более дешевым является поверхностное культивирование гриба боверии. Оно производится на жидких или твердых средах (рис. 5).

А. На жидких средах. В состав ИПС входят отвары отходов сельскохозяйственной продукции – картофеля, сахарной свеклы, тыквы, зерна, муки и т. п. с содержанием сахаров около 7 %. При этом необходима стерилизация среды в течение 20 мин в автоклаве при 110 °С с последующим розливом по кюветам.

После охлаждения до 40 °С кюветы со средой засевают сухими спорами гриба или их суспензией. Среду перемешивают и укрывают полиэтиленовой пленкой для создания благоприятных условий для роста и развития гриба. Через 7–10 суток на поверхности среды образуется белая пленка мицелия с конидиями. Ее снимают, высушивают на стекле, размалывают на шаровых мельницах. Полученные конидиоспоры смешивают с наполнителем – торфом, тальком и др.

Б. На твердых средах. В этом случае питательной средой для гриба служит сусло-агаровая среда или отходы овощей, кукурузы, зерновых.

Твердый субстрат (овощи, зерно) подвергают стерилизации в течение 40 мин перегретым паром при 112 °С. Затем охлаждают и проводят засев спорами боверии, укрывают пленкой. Экспозиция культуры составляет 12–15 суток. После получения обильного белого конидиального налета (спороношения) высушивают культуру с остатками субстрата и размалывают до мелкодисперсного порошка.

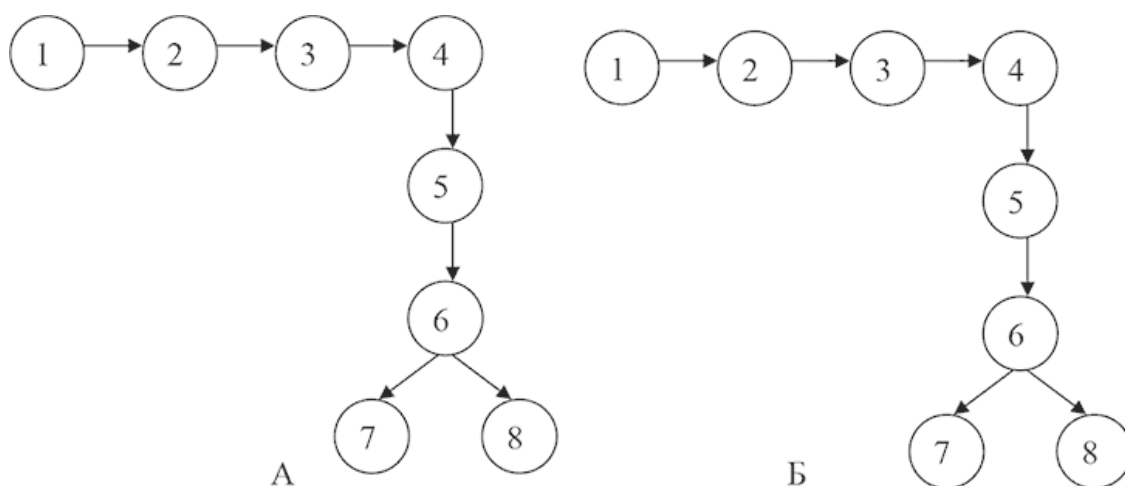


Рис. 5. Блок-схема получения боверина на жидких (А) и твердых (Б) питательных средах методом поверхностного культивирования:

1 – приготовление питательной среды; 2 – стерилизация ИПС; 3 – засев ИПС спорами боверии; 4 – экспозиция культуры; 5(А) – высушивание пленки с конидиями; 5(Б) – высушивание среды с конидиями; 6 – разведение высушенного субстрата с конидиями; 7 – хранение сухого препарата; 8 – применение

Оба способа имеют низкую производительность и применяются в местных условиях (в хозяйствах, районных биолaborаториях).

Технология комбинированного получения боверина. Для ускоренного культивирования и получения конидий применяют также комбинированный способ культивации. При этом часть процесса ведут глубинным способом на жидкой ИПС до образования гонидиальной стадии гриба. Выращивание и накопление вегетативной культуры (гонидий) производят в ферментаторах с принудительной аэрацией и перемешиванием в течение 22–28 часов. Полученную культуральную жидкость разливают по кюветам и выращивают спороносные пленки методом поверхностного культивирования 4–5 суток и еще 2–3 суток для созревания спор. Высушивают пленки, размалывают их и стандартизируют препарат каолином, как при предыдущем способе.

При комбинированном способе производственный цикл составляет 11–12 суток. Применяют боверин против листогрызущих вредителей сада и леса (ложногусениц пилильщиков, личинок колорадского жука и других листоедов) с нормой расхода 1–2 кг/га и сублетальными дозами инсектицидов.

2.3. Технология получения вирусных энтомопатогенных препаратов

Вирусные препараты поражают обычно только 1 вид-мишень вредителей. Вирусные частицы в покоей форме устойчивы к неблагоприятным условиям окружающей среды и в виде полиэдров сохраняют активность вне насекомого до 10–15 лет. Заражение происходит только при попадании вирусных полиэдров в кишечник насекомого, где в щелочной среде оболочка полиэдра растворяется и частицы вируса проникают в клетки организма насекомого (рис. 6, 7). Размножаться вирусы могут только в живой ткани, поэтому производство препаратов требует поддержания культуры насекомых. Технология производства вирусов состоит из следующих этапов: разведение насекомого-хозяина на естественном корме или питательной среде, заражение гусениц суспензией вирусных частиц (из больных особей), сбор погибших гусениц (через 7–9 дней) и подсушивание при 33–35 °С, измельчение гусениц механически с добавлением физиологического раствора или дистиллированной воды, фильтрация взвеси, высушивание фильтрата или применение в жидком виде (рис. 8, 9).

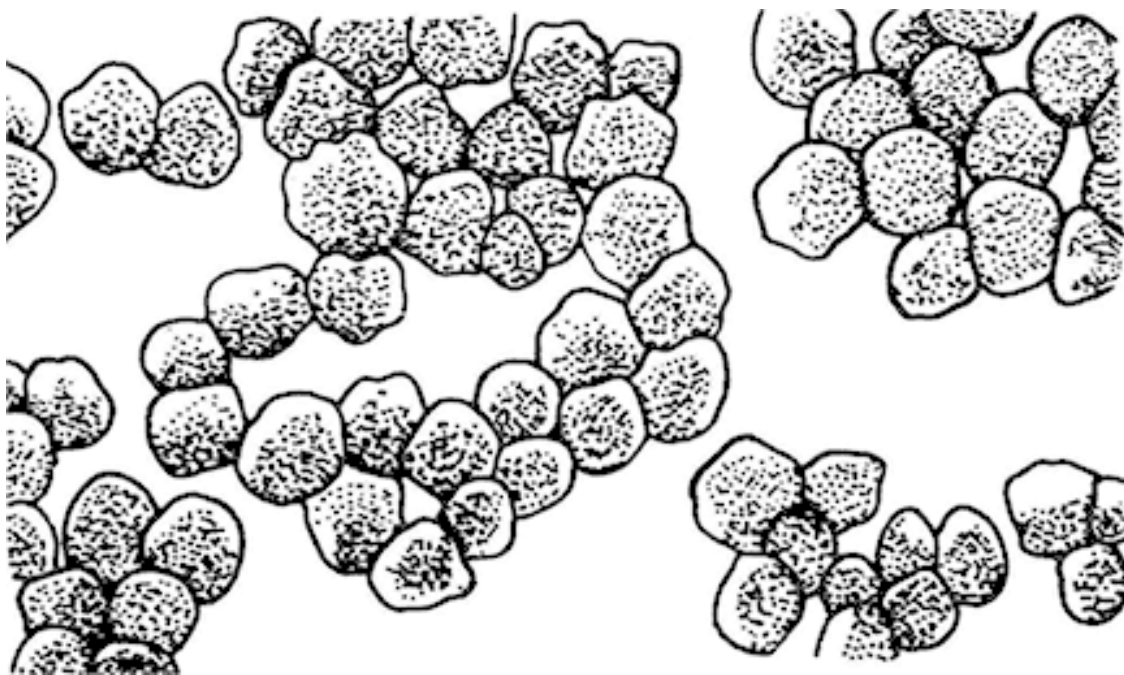


Рис. 6. Полиэдры тополевого пилильщика (x15000)



Рис. 7. Гусеницы непарного шелкопряда, пораженные вирусом ядерного поли-эдроза

Выход вирусных частиц составляет до 30 % от сухой массы гусениц.

При производстве вирина-ЭКС полиэдры осаждают центрифугированием, из осадка готовят суспензию в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют стерильный глицерин до титра 1 млрд. полиэдров в 1 мл. Препарат разливают по флаконам, в объемах, кратных гектарной норме применения.

Формы выпуска виринов – сухой порошок или масляная эмульсия на солярном масле. Титр – 1 млрд полиэдров/г. Применяют для смазывания яйцекладок непарного шелкопряда на штамбах деревьев и для опрыскивания лесов и садов.

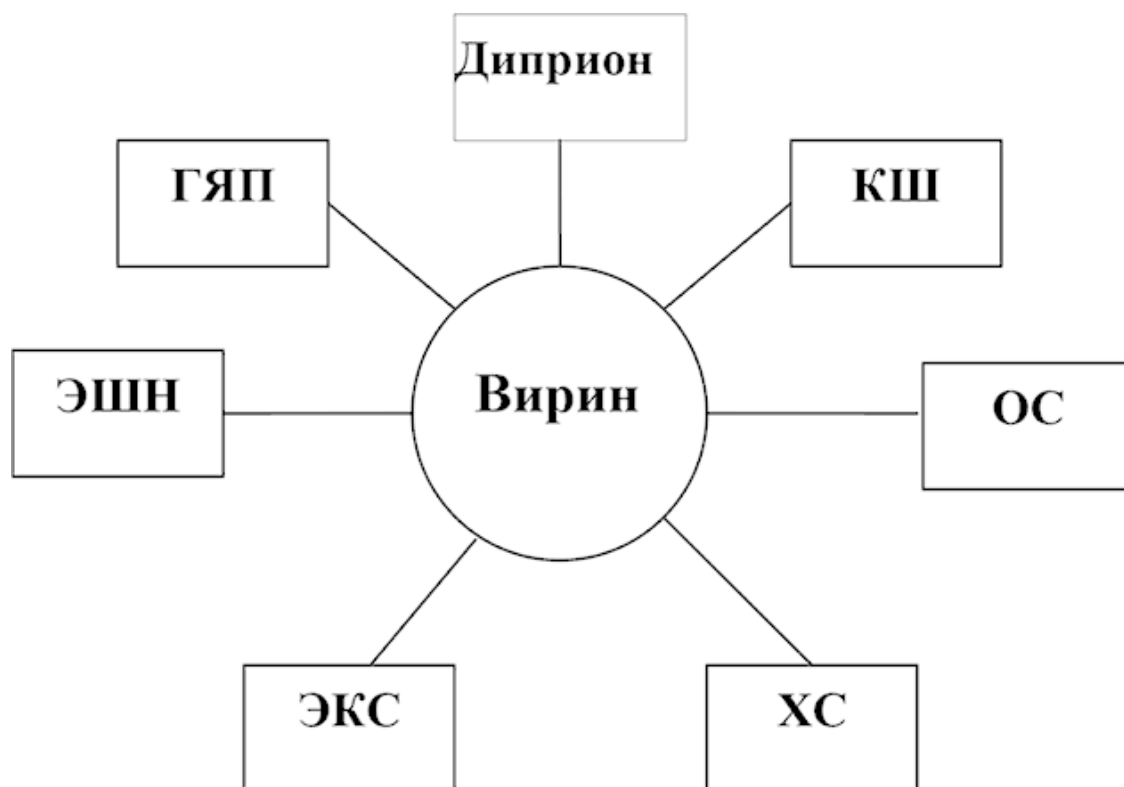


Рис. 8. Марки виринов, применяемые в защите растений

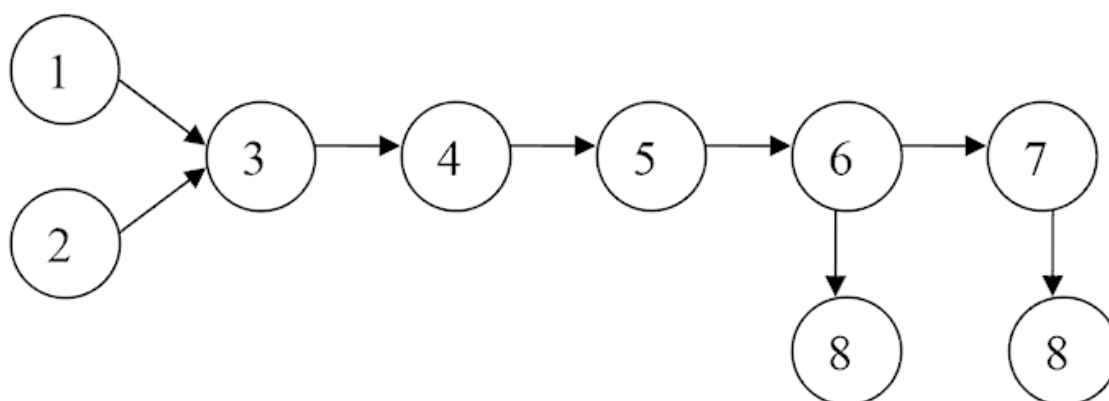


Рис. 9. Блок-схема производства вирусных препаратов:

1 – выращивание кормовых растений для гусениц; 2 – приготовление питательной среды для фитофага; 3 – выращивание гусениц; 4 – заражение гусениц вирусом; 5 – экспозиция и высушивание погибших гусениц; 6 – приготовление жидкого вирина; 7 – высушивание препарата; 8 – применение

Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.