

УЗБЕКСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

На правах рукописи
УДК 615.33:632.937

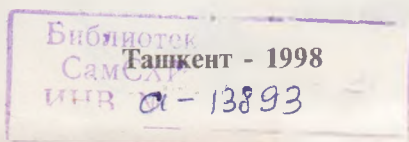
МАННАНОВ
Рустам Нигматович

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ
АНТАГОНИСТОВ НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ И РАЗВИТИЕ
РАСТЕНИЙ

06. 01. 11. - защита растений от вредителей
и болезней

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Работа выполнена на кафедре фитопатологии и физиологии растений Ташкентского Государственного Аграрного Университета и в лаборатории Коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

САТТАРОВА Р. К.

Официальные оппоненты:

Академик АН РУз, доктор биологических наук
доктор сельскохозяйственных наук, профессор

**МАВЛАНИ М. Э.
ХАКИМОВ А. Х.**

Ведущая организация – Ташкентский Государственный Университет им. М.Улугбека, биолого-почвенный факультет.

Защита состоится "28" октябре 1998 г. в. 10 ч.
на заседании Специализированного Совета Д.020.50.01 при
Узбекском научно-исследовательском институте защиты растений
по адресу: 700140, г. Ташкент 140, УзНИИЗР.

го

К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Бактериальные, грибные и вирусные заболевания сельскохозяйственных растений значительно снижают урожайность и наносят большой ущерб экономике сельского хозяйства нашей Республики. Поэтому вопросы разработки эффективных средств борьбы с фитопатогенными микроорганизмами постоянно находятся в центре внимания науки и производства.

В последнее время сильно возросла озабоченность по поводу чрезмерного наличия синтетических химических веществ в пищевых продуктах и в самой окружающей среде. Одним из источников накопления химикатов в почве является использование последних в качестве минеральных удобрений, а также в защите растений. Поэтому, в связи с опасностью отрицательного воздействия применяемых химикатов на здоровье человека и животных, в настоящее время внимание ученых направлено на поиск биологических средств борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.

Оценка последних результатов по использованию биологических агентов для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами показывает, что биологический метод имеет большое будущее в сельском хозяйстве, как разумная с точки зрения охраны окружающей среды замена ядохимикатов, применяющихся в настоящее время для воздействия на сельскохозяйственные культуры.

Исследования в области использования микробов-антагонистов и продуктов их метаболизма в качестве биологической борьбы с фитопатогенными микроорганизмами свидетельствуют об актуальности и перспективности проведения поисков антагонистических микроорганизмов и изучения их действия на фитопатогенные микроорганизмы и продуктивность сельскохозяйственных культур.

Цель работы. Изучить действие некоторых наиболее активных бактерий - антагонистов на фитопатогены, вызывающие основные болезни хлопчатника для создания, в будущем, комплексного биопрепарата для защиты растений от болезней.

Задачи исследования.

- 1) Изучить антагонистический спектр действия бактерий - антагонистов к возбудителям основных болезней хлопчатника;
- 2) установить влияние различных концентраций культуральной жидкости бактерий - антагонистов на всхожесть и развитие семян некоторых сельскохозяйственных культур;

3) установить влияние клеточной суспензии бактерий - антагонистов на всхожесть, развитие семян некоторых сельскохозяйственных культур и их поражаемость фитопатогенами;

4) определить биологическую эффективность использования антагонистов для предпосевной обработки семян хлопчатника;

5) определить влияние антагонистов на полезную почвенную микрофлору - представителей азотфиксирующих бактерий родов *Azotobacter* и *Rhizobium*;

6) выделить и изучить природу антибиотических веществ, продуцируемых *B. subtilis* 23;

7) изучить характер действия антибиотических веществ, продуцируемых *B. subtilis* на клетки фитопатогенов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum*.

Научная новизна. Впервые изучена антагонистическая активность некоторых активных бактерий - антагонистов к фитопатогенным микроорганизмам, вызывающим основные болезни хлопчатника (*Xanthomonas malvacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum*). Выделены и очищены антибиотические вещества, продуцируемые штаммом *B. subtilis* 23, установлены природа и характер их токсического действия. Составлена сравнительная характеристика почвенного и эндофитного штаммов антагонистов *B. subtilis*. Показано стимулирующее действие метаболитов антагонистов на всхожесть семян хлопчатника и некоторых других сельскохозяйственных растений, их развитие, урожайность, а также снижение поражаемости фитопатогенами. Обоснована целесообразность использования штамма *B. subtilis* 23 и продуктов метаболизма при разработке эффективных, экологически безвредных биопрепаратов для защиты растений.

Практическая ценность. Результаты лабораторных и мелко-деляночных опытов научно обосновывают целесообразность использования изученных антагонистов и продуктов их метаболизма при разработке эффективных средств защиты растений и могут служить основой для биотехнологии повышения урожайности хлопчатника и других сельскохозяйственных культур, что имеет существенное значение для дальнейшего развития сельскохозяйственной отрасли в Республике Узбекистан.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и опубликованы в виде тезисов на II Европ. конфер. "Молекулярная

биология клеточных взаимодействий" (Германия, 1995); Республиканской конфер. "Экологические проблемы приамударьинского региона Средней Азии" (Бухара, 1995); XIII Междунар. конгр. по защите растений (Нидерланды, 1995); научной конференции, посвященной 5-летию Независимости Республики Узбекистан и 660-летнему юбилею Амира Тимура (Ташкент, 1996); научно-практической конфер. "Экологические аспекты рационального использования почв" (Ташкент, 1997); 17-том Междунар. конгр. по биохимии и молекулярной биологии (США, 1997).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 10 печатных работ, из которых 6 журнальных статей и 4 тезиса докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследований, изложения полученных результатов, обсуждения результатов, выводов, рекомендаций науке и списка использованной литературы. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 18 рисунков. Список литературы включает 139 источников, опубликованных в республиканских и зарубежных изданиях.

Автор выражает глубокую благодарность проф. Ж.С. Сафязову за руководство и помощь при выполнении микробиологических исследований.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе приведен анализ современного состояния проблемы по разработке биологических методов защиты растений с использованием природных микроорганизмов-антагонистов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили наиболее активные бактерии - антагонисты *Pseudomonas fluorescens* 41, *Bacillus subtilis* 23, *B. megaterium* 26, ранее изученные к 7 видам фитопатогенных бактерий аспирантом кафедры Фитопатологии ТашГУ Шукри Мохамед Эль Греми (1990). *B. subtilis* N была выделена из биопрепарата Хлоркоспорин (Менликиев и др., 1992).

Фитопатогенные микроорганизмы *Xanthomonas malvacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *vastinctum*, *Verticillium dahliae* были любезно предоставлены лабораторией Кол-

лекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз и кафедрой Фитопатологии ТашГАУ. Клубеньковые бактерии: *Rhizobium japonicum* 966, *R. japonicum* 1141, *R. trifolii* 329, *R. meliloti* Д и свободноживущие азотфиксирующие бактерии: *Azotobacter chroococcum* 19, *A. chroococcum* 17, *A. chroococcum* 514, *A. agila* 7, были также любезно предоставлены лабораторией Коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

Бактерии-антагонисты в зависимости от эксперимента культивировали на пептонном бульоне или на пептонном агаре. Возбудитель гоммоза хлопчатника *X. malvacearum* культивировали на картофельном агаре, а грибные фитопатогены культивировали на среде Чапека. Азотфиксирующие клубеньковые и свободноживущие бактерии культивировались на среде Эшби.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов изучали по общепринятым методам, описанным в руководствах по микробиологии (Егоров, 1976; Скворцова, 1984; Bergey's manual of det. bacteriology, 1974).

Антагонистическое действие бактерий-антагонистов изучали методом агаровых блочков, описанным Cooksey D.A. и Moore L.W. (1980). Для изучения влияния культуральной жидкости бактерий-антагонистов на всхожесть, развитие и продуктивность сельскохозяйственных культур использовали семена средневолокнистых сортов 108 - Ф и Киргизский - 3 со средней массой каждого 100-120 мг, а также семена фасоли, кукурузы, пшеницы и огурца. Статистическую обработку данных проводили по Доспехову В.А. (1985). С целью изучения культуральной жидкости антагонистов на всхожесть, и урожайность хлопчатника, а также его поражаемость фитопатогенными микроорганизмами был заложен мелко-деляночный опыт (междурядье - 60 см) на опытном участке кафедры фитопатологии и физиологии растений ТашГАУ. Посев обработанных в зависимости от варианта опыта семян хлопчатника производили в первой декаде мая, а сбор урожая в третьей декаде сентября. Полив производили 6 раз. Подсчет процента пораженности корневой гнилью хлопчатника проводили по количеству пораженных всходов, а пораженность растений гоммозом производили по Schihata Z.A. (1974). Биологическую эффективность определяли по методике, описанной Дементьевой М.И. (1997).

С целью изучения сравнительных физиолого-биохимических

особенностей *B. subtilis*, штаммы культивировались в 2-х литровых колбах Эрленмейера, содержащих 1 л пептонного бульона на круговой качалке (170 об/мин) при 27°C. Для экстракции антибиотических веществ из 2х-литровой колбы брали 100 мл культуральной жидкости через каждые 5 ч, измеряли ее значение pH, затем измеряли оптическую плотность (ОП-550 нм) культуральной жидкости на спектрометре (UNICAM 8625 UV/VIS spectrometer, England), проводили экстракцию антибиотических веществ из надосадочной жидкости хлороформом, который упаривали под вакуумом на роторном испарителе (BUCHI 011 RE 111, с водяной баней BUCHI 461, Switzerland). Антибиотические вещества элюировали из полученного осадка 80%-ным этаном, фракционировали методом ТСХ на 20 X 20см силика гелевых пластинках (Silica gel 60 F-254 [fluorescing indicator] Curtin-Matheson Scientific, Inc., Houston, TX), и использовали для проведения масс-спектрометрического анализа на масс-спектрометре МХ-1310.

Фазово-контрастное микроскопирование и микрофотографирование проводили с использованием микроскопов МБИ-3, МБИ-6, Nikon UFX-DX с флюоресцентным фильтром И-2А, фотонасадки МФН-15.

Единицы биологической активности выделенных антибиотических веществ определяли по Егорову Н.С. (1986). Построение графиков и статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ CA-Cricket Graph III и Excel V.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Антагонистические свойства исследуемых бактерий

Настоящая работа является продолжением исследований, начатых Шукри М. Эль-Греми (1990), который изучил антагонистическую активность более 40 штаммов спорозоносных и неспорозоносных бактерий к семи видам фитопатогенных бактерий - *Xanthomonas malvacearum*, *X. campestris*, *X. phaseoli*, *X. vesicatoria*, *Ervinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lachrymans*, и отметил высокую антибактериальную активность штаммов *P. fluorescens*, *B. subtilis* 23 и *B. megaterium* 26.

Нам было интересно изучить влияние этих наиболее активных бактерий - антагонистов к возбудителям основных болезней хлопчатника (*Xanthomonas malvacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae*). В качестве

контроля мы использовали бактерию *B. subtilis*, которая была выделена нами из биопрепарата Хлопкоспорин и поименована как штамм N.

Изучение антимикробного действия исследуемых микроорганизмов показало, что наиболее активными антагонистами по отношению к возбудителям болезней хлопчатника оказались штаммы *B. subtilis* (табл. 3.1.1.).

Таблица 3.1.1.
Влияние бактерий-антагонистов на фитопатогенные микроорганизмы

Бактерии - антагонисты	Диаметры зон угнетения фитопатогенов, мм			
	<i>X. malvacearum</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>F. vasinfectum</i>	<i>R. solani</i>
<i>P. fluores-</i> <i>cens</i> 41	26.25 ± 2.8	20.25 ± 1.4	23.25 ± 2.8	22.0 ± 4.1
<i>B. subtilis</i> 23	35.0 ± 2.4	32.5 ± 1.4	19.25 ± 2.8	31.25 ± 2.9
<i>B. subtilis</i> N	34.8 ± 2.1	18.7 ± 4.26	28.4 ± 2.7	28.5 ± 7.3
<i>B. megaterium</i> 26	23.0 ± 2.4	24.25 ± 2.8	15.25 ± 2.7	18.75 ± 2.8

3.2. Сравнительное изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штаммов *Bacillus subtilis*

Нам было интересно выяснить, имеются ли существенные культурально - морфологические и физиолого - биохимические различия между относящимися к одному виду *B. subtilis* штаммами 23 и N, которые могут влиять на антимикробную активность.

В результате исследований установлены незначительные различия по морфологии микроорганизмов, скорости клеточного деления и антибиотикообразования, интенсивности гидролиза крахмала и желатины, пептонизации молока, каталазной и уреазной активностей. Данные процессы протекали более интенсивно у штамма *B. subtilis* N, по сравнению со штаммом 23.

В целом, сравнительное изучение культурально - морфологических и физиолого - биохимических свойств штаммов *B. subtilis* не выявило существенных различий.

3.3. Влияние метаболитов микробов - антагонистов на всхожесть семян хлопчатника и других сельскохозяйственных культур, их рост и развитие

Следующим этапом наших исследований было изучение влияния различных концентраций культуральной жидкости взятых в опыт антагонистов на всхожесть семян хлопчатника и развитие проростков. Полученные результаты показали, что по мере увеличения концентрации культуральной жидкости процент всхожести семян снижается, что находится в соответствии с данными Шукри М. (1990) и других исследователей, отмечавших, что эффект стимуляции обычно проявляется при низких концентрациях метаболитов антагонистов и исчезает по мере их увеличения.

Из полученных результатов видно, что культуральная жидкость испытанных нами микробов - антагонистов в 10%-ной концентрации оказывала стимулирующее действие на всхожесть семян, длину и массу проростков хлопчатника, а с увеличением концентрации культуральной жидкости наблюдалось ее ингибирующее действие (табл. 3.3.1.).

Результаты наших исследований показали, что культуральные жидкости антагонистов в 10%-ной концентрации оказывали стимулирующий эффект на всхожесть семян хлопчатника сортов 108-Ф и Киргиский-3. Причем, наибольшим стимулирующим действием обладала 10%-ная культуральная жидкость антагониста *B. subtilis* 23.

В связи с тем, что в культуральной жидкости антагонистов, кроме клеток микроорганизма и продуктов его метаболизма, содержатся также элементы питательной среды, которые могут стимулировать всхожесть и развитие растений мы изучали влияние питательной среды на выше указанные параметры.

Установлено, что питательная среда оказывает стимулирующий эффект на всхожесть семян хлопчатника, длину и массу проростка (табл. 3.3.2.). Однако, в вариантах с использованием культуральных жидкостей антагонистов данные параметры были выше, что указывает на положительный эффект метаболитов бактерий-антагонистов. Аналогичные результаты были получены нами также при использовании семян фасоли, кукурузы, пшеницы, огур-

Таблица 3.3.1.

Влияние различных концентраций культуральной жидкости антагонистов на всхожесть, рост и развитие хлопчатника

Разведение	10 %	25 %	50 %	100 %
<u>Сорт хлопчатника 108-Ф</u>				
Всхожесть (%)				
Контроль (вода)	68+16.4			
<i>P. fluorescens</i> 41	83.3+16.4	60.0+27.8	45.0+27.8	21.6+16.5
<i>B. subtilis</i> 23	86.6+16.4	51.6+16.5	45.0+16.6	18.3+16.5
<i>B. megaterium</i> 26	63.3+16.4	43.6+16.4	26.6+16.5	13.3+16.4
Длина проростка (см)				
Контроль (вода)	4.7+0.9			
<i>P. fluorescens</i> 41	6.06+0.3	4.8+0.8	3.5+0.8	2.3+1.0
<i>B. subtilis</i> 23	6.2+0.6	4.9+0.8	3.8+0.9	2.6+0.4
<i>B. megaterium</i> 26	5.9+0.5	4.7+0.5	3.2+0.4	2.2+0.3
Масса проростка (мг)				
Контроль (вода)	516+59			
<i>P. fluorescens</i> 41	588+71	471+59	311+43	176+86
<i>B. subtilis</i> 23	651+79	500+57	375+111	194+71
<i>B. megaterium</i> 26	704+71	481+79	311+59	166+139
<u>Сорт хлопчатника Киргизский-3</u>				
Всхожесть (%)				
Контроль (вода)	82.0+16.5			
<i>P. fluorescens</i> 41	91.6+16.5	81.6+16.5	53.3+16.5	36.6+16.5
<i>B. subtilis</i> 23	98.3+16.5	88.3+16.4	58.3+16.4	33.3+16.4
<i>B. megaterium</i> 26	91.6+16.4	80.0+16.5	63.3+16.4	21.6+16.5
Длина проростка (см)				
Контроль (вода)	6.5+0.5			
<i>P. fluorescens</i> 41	7.7+1.0	5.6+0.4	3.9+0.7	2.3+0.3
<i>B. subtilis</i> 23	8.2+0.4	5.9+0.3	4.2+0.6	2.4+0.6
<i>B. megaterium</i> 26	7.4+0.3	5.2+0.5	3.7+0.7	1.9+0.7
Масса проростка (мг)				
Контроль (вода)	655+79			
<i>P. fluorescens</i> 41	765+168	541+79	423+93	242+71
<i>B. subtilis</i> 23	790+57	571+71	465+69	245+79
<i>B. megaterium</i> 26	704+71	524+170	422+96	213+69

Таблица 3.3.2.

Влияние 10 %-ной культуральной жидкости антагонистов
на всхожесть семян различных сельскохозяйственных культур,
их рост и развитие

Варианты опыта	Сельскохозяйственные культуры				
	хлопчатник	фасоль	кукуруза	пшеница	огурец
	Всхожесть (%)				
Контроль (вода)	80.0 \pm 16.5	100	68.0 \pm 16.4	98.3 \pm 16.5	68.0 \pm 16.4
Пит. среда (ПБ)	81.0 \pm 16.4	100	73.3 \pm 16.5	100	73.3 \pm 16.4
<i>B. subtilis</i> 23	83.3 \pm 16.4	100	86.6 \pm 16.4	100	82.3 \pm 16.5
<i>B. subtilis</i> N	83.3 \pm 16.4	100	83.3 \pm 16.4	100	86.6 \pm 16.4
<i>B. megate-</i> <i>rium</i> 26	82.3 \pm 16.5	100	79.3 \pm 16.4	100	78.0 \pm 16.5
	Длина проростка (см)				
Контроль (вода)	4.6 \pm 0.6	4.2 \pm 1.2	2.1 \pm 0.6	1.0 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2
Пит. среда (ПБ)	5.1 \pm 1.0	4.4 \pm 0.6	2.1 \pm 0.7	1.2 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2
<i>B. subtilis</i> 23	6.2 \pm 0.6	5.0 \pm 1.0	2.2 \pm 0.7	1.6 \pm 0.6	1.0 \pm 0.4
<i>B. subtilis</i> N	6.1 \pm 0.8	4.8 \pm 1.4	2.2 \pm 0.8	1.7 \pm 0.7	1.0 \pm 0.4
<i>B. megate-</i> <i>rium</i> 26	5.6 \pm 1.2	4.6 \pm 1.1	2.1 \pm 0.6	1.3 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3
	Масса проростка (мг)				
Контроль (вода)	578 \pm 147	593 \pm 68	600 \pm 126	90 \pm 35	65 \pm 14
Пит. среда (ПБ)	599 \pm 162	605 \pm 79	740 \pm 200	105 \pm 35	71 \pm 21
<i>B. subtilis</i> 23	663 \pm 201	770 \pm 92	820 \pm 161	138 \pm 49	91 \pm 28
<i>B. subtilis</i> N	667 \pm 201	771 \pm 107	844 \pm 205	140 \pm 57	87 \pm 28
<i>B. megate-</i> <i>rium</i> 26	620 \pm 197	692 \pm 129	778 \pm 201	126 \pm 49	80 \pm 22

3.4. Влияние клеточной суспензии антагонистов на всхожесть семян хлопчатника, развитие всходов и их поражаемость корневой гнилью и гоммозом

Чтобы определить действие бактерий антагонистов на всхожесть и развитие хлопчатника исключив влияние элементов питательной среды, мы изучали влияние клеточной суспензии бактерий.

Результаты наших исследований показали положительное действие клеточной суспензии антагонистов. Так, поражаемость всходов хлопчатника корневой гнилью снижалась с 80.0% до 40.0%, гоммозом - с 35.4% до 10.0%. Клеточные суспензии антагонистов также стимулировали всхожесть семян и высоту проростков. Наибольший положительный эффект показали культуры *B. subtilis* 23 и *B. subtilis* N. (табл. 3.4.1.)

Результаты опытов показали, что изучаемая нами культура *B. subtilis* 23 обладала высокой стимулирующей и биоконтролирующей активностями, и не уступала выделенному из биопрепарата Хлопкоспорин бактериальному штамму *B. subtilis* N.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований указывают на целесообразность использования культуры *B. subtilis* 23 как потенциального агента при разработки биопрепарата для предпосевной обработки семян в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами.

3.5. Действие 10%-ной культуральной жидкости антагонистов на урожайность хлопчатника и его поражаемость корневой гнилью и гоммозом

С целью изучения влияния продуктов метаболизма взятых в опыт антагонистов на всхожесть семян, урожайность хлопчатника а также его поражаемость наиболее вредоносными в условиях Узбекистана болезнями - возбудителями корневой гнили и гоммоза, мы закладывали мелко-деляночный опыт.

Результаты опыта подтвердили стимулирующее действие исследуемых бактерий-антагонистов на всхожесть семян, что совпадает с проведенными нами ранее лабораторными исследованиями.

Наибольший процент всхожести семян наблюдался при использовании 10 % - ной культуральной жидкости *B. subtilis* 23. Так, например, в 1995 году данный показатель составил сорта Киргизский-3 - 94.0 %, а у сорта 108 - Ф 90.0 % против 78.5 % и 75.4 % соответственно в контроле (3, 5. 1.).

Таблица 3.4.1.

Влияние клеточной суспензии антагонистов *B. subtilis* 23 и *B. subtilis* N на всхожесть семян хлопчатника (сорт Киргизский-3), длину проростка и его поражаемость гоммозом и корневой гнилью

Варианты опыта	Всхожесть, %	Высота проростка, см	Поражаемость, %
Контроль	100	8.0	-
<i>B. subtilis</i> 23	100	9.1	-
<i>B. subtilis</i> N	100	9.1	-
<i>B. megaterium</i> 26	100	8.9	-
<i>X. malvacearum</i>	60	6.5	35.4
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. subtilis</i> 23	100	7.2	10.0
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. subtilis</i> N	100	7.1	10.25
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. megaterium</i> 26	80	6.9	30.3
<i>R. solani</i>	20	3.2	80.0
<i>R. solani</i> + <i>B. subtilis</i> 23	80	4.9	40.0
<i>R. solani</i> + <i>B. subtilis</i> N	80	4.6	40.0
<i>R. solani</i> + <i>B. megaterium</i> 26	60	3.4	60.0
НСР (0.05)	20.0	0.64	13.5

Таблица 3.5.1.

Влияние 10 %-ной культуральной жидкости антагонистов на всхожесть семян хлопчатника сортов 108-Ф и Киргизский-3

Варианты опыта	Всхожесть, %					
	108 - Ф			Киргизский - 3		
	1993	1994	1995	1993	1994	1995
Контроль	76.6	75.0	75.4	80.0	78.5	78.5
<i>P. fluorescens</i> 41	89.0	88.3	89.1	94.0	94.0	94.8
<i>B. subtilis</i> 23	91.0	90.0	90.8	94.3	93.3	94.0
<i>B. megaterium</i> 26	86.6	84.4	85.9	89.0	88.6	89.0
Хлопкоспорин	95.3	90.3	93.1	98.0	98.0	96.3
Триходермин	86.6	83.4	85.2	90.0	89.3	88.5
<i>X. malvacearum</i>	50.0	50.0	49.6	55.0	56.0	56.3
<i>X. malvacearum</i>						
+ <i>P. fluorescens</i> 41	66.6	64.0	65.1	63.3	63.0	62.7
+ <i>B. subtilis</i> 23	75.3	75.3	75.6	78.0	76.5	77.1
+ <i>B. megaterium</i> 26	60.0	55.4	58.9	65.0	64.9	65.0
+ Хлопкоспорин	78.4	76.6	76.9	80.4	80.0	80.7
+ Триходермин	63.3	60.0	62.7	65.0	62.0	64.7
<i>R. solani</i>	00.0	00.0	00.0	1.5	1.5	1.0
<i>R. solani</i>						
+ <i>P. fluorescens</i> 41	50.0	50.0	50.0	56.6	52.9	54.0
+ <i>B. subtilis</i> 23	55.0	56.3	55.4	61.3	60.3	61.0
+ <i>B. megaterium</i> 26	48.3	47.3	50.0	59.0	57.3	58.1
+ Хлопкоспорин	57.3	55.0	56.7	60.0	60.0	61.2
+ Триходермин	50.0	50.5	50.0	55.0	50.9	49.8

Изучение влияния 10%-ной культуральной жидкости антагонистов на поражаемость хлопчатника корневой гнилью и гоммозом показало положительный эффект на снижение поражаемости фитопатогенами. Так, штамм *B. subtilis* 23 оказывал наилучший эффект в вариантах с семенами, предварительно инфицированными возбудителем гоммоза хлопчатника, и на инфекционном фоне *R. solani* (3.5.2.).

Анализ 3-х летних полученных данных по пораженности растений хлопчатника семядольной и листовой формами гоммоза, указывает на то, что эффект от использования антагонистов для предпосевной обработки инфицированных семян особенно ярко проявляется в фазе семядолей.

Так, если пораженность гоммозом в варианте опыта с инфицированными и обработанными в культуральной жидкости *B. subtilis* 23 семенами, пораженность семядольной формой составила 35.3 % и 31.7 % у сортов 108-Ф и Киргизский соответственно, то пораженность листовой формой в этом же варианте была 77.9 % и 75.1 % соответственно.

Полученные результаты показали, что предварительная обработка семян хлопчатника оказывала положительный эффект на повышение урожайности растений по сравнению с соответствующими контрольными вариантами (3.5.3.).

Так, например, в 1995 году в контроле, где семена не подвергались обработке урожай составил 34.0 ц/га и 34.3 ц/га на сортах 108 - Ф и Киргизский - 3 соответственно, тогда как в опыте с предпосевной обработкой семян 10 %-ной культуральной жидкостью *B. subtilis* 23, урожайность составила 39.8 и 40.0 ц/га соответственно. Урожайность обоих сортов хлопчатника в вариантах опыта с зараженными и обработанными в 10%-ной культуральной жидкости антагонистов была также выше, чем в контроле с инфицированными семенами. Так, в 1995 году в варианте опыта с предварительно инфицированными *X. malvacearum* и обработанными в культуральной жидкости *B. subtilis* 23 семенами, урожайность составила 30.0 ц/га и 30.6 ц/га у сортов 108-Ф и Киргизский-3 соответственно, а в варианте опыта без обработки культуральной жидкостью антагониста, этот показатель был 22.1 ц/га и 22.5 ц/га соответственно.

Таблица 3.5.2.

Влияние 10 %-ной культуральной жидкости антагонистов на поражаемость хлопчатника сортов 108-Ф и Киргизский-3 гоммозом и корневой гнилью

Варианты опыта	108 - Ф			Киргизский - 3		
	1993	1994	1995	1993	1994	1995
	Процент поражаемости всходов гоммозом семядольной формы, %					
Контроль	90.8	88.6	89.0	75.9	74.3	74.7
<i>P. fluorescens</i> 41	40.0	42.1	41.8	33.3	34.8	32.9
<i>B. subtilis</i> 23	35.1	36.6	34.3	31.0	32.2	31.8
<i>B. megaterium</i> 26	55.4	57.0	54.9	53.3	55.3	56.0
Хлопкоспорин	34.9	37.6	34.9	31.9	31.7	32.0
Триходермин	50.8	51.0	50.1	57.0	56.6	58.9
	Процент поражаемости всходов корневой гнилью, %					
Контроль	92.1	90.0	90.5	85.0	90.0	86.7
<i>P. fluorescens</i> 41	31.6	31.8	30.9	30.1	31.9	27.0
<i>B. subtilis</i> 23	30.6	30.8	30.3	30.5	30.0	25.0
<i>B. megaterium</i> 26	50.9	51.4	51.9	49.4	50.4	50.0
Хлопкоспорин	30.6	32.0	29.2	29.9	27.0	27.0
Триходермин	31.2	31.9	33.3	31.0	30.3	29.8

Таблица 3.5.3.

Урожай хлопка - сырца в пересчете на га в центнерах по мелко - деляночному опыту на опытном участке ТашГАУ

Варианты опыта	У р о ж а й н о с т ь, ц/га					
	108 - Ф			Киргизский - 3		
	1993	1994	1995	1993	1994	1995
Контроль	35.2	33.7	34.0	35.7	33.8	34.3
<i>P. fluorescens</i> 41	38.7	36.7	37.6	38.3	36.9	37.9
<i>B. subtilis</i> 23	40.1	39.0	39.8	40.4	39.4	40.0
<i>B. megaterium</i> 26	37.2	35.3	36.4	37.8	35.7	36.9
Хлопкоспорин	39.9	38.1	38.8	40.2	38.6	39.1
Триходермин	36.4	34.1	37.8	36.7	34.5	38.3
<i>X. malvacearum</i>	23.0	20.6	22.1	23.9	20.9	22.5
<i>X. malvacearum</i>						
+ <i>P. fluorescens</i> 41	28.3	27.1	27.2	28.5	27.6	27.5
+ <i>B. subtilis</i> 23	30.7	27.9	30.0	30.9	28.2	30.6
+ <i>B. megaterium</i> 26	24.8	22.1	23.1	25.0	22.4	23.5
+ Хлопкоспорин	28.2	26.3	27.2	28.8	26.7	27.6
+ Триходермин	24.0	21.9	23.0	24.7	22.4	23.3
<i>R. solani</i>	16.4	13.8	15.7	16.9	14.1	16.1
<i>R. solani</i>						
+ <i>P. fluorescens</i> 41	24.0	22.3	23.9	24.7	22.7	24.1
+ <i>B. subtilis</i> 23	27.1	25.4	26.2	27.6	25.8	26.8
+ <i>B. megaterium</i> 26	19.9	17.6	18.3	20.3	17.9	18.8
+ Хлопкоспорин	26.8	24.7	25.5	27.1	25.0	25.9
+ Триходермин	27.9	24.8	26.3	28.2	25.3	26.8

Таким образом, результаты мелко-деляночного опыта показали, что 10%-ная культуральная жидкость *B. subtilis* 23 оказывала наилучший эффект на всхожесть семян хлопчатника сортов 108-Ф и Киргизский-3, их урожайность, а также на снижение поражаемости растений возбудителями гоммоза хлопчатника и корневой гнили.

3.6. Биологическая эффективность предпосевной обработки
семян хлопчатника 10%-ной культуральной
жидкостью бактерий - антагонистов

При определении биологической эффективности использования 10%-ной культуральной жидкости взятых в опыт антагонистов для предпосевной обработки семян хлопчатника сортов 108-Ф и Киргизский-3 установлено, что самая высокая биологическая эффективность проявлялась при использовании штамма *B. subtilis* 23 (табл. 3.6.1.).

Таблица 3.6.1.
Биологическая эффективность предпосевной обработки семян
хлопчатника 10 %-ной культуральной жидкостью антагонистов
Среднее за 1993-1995 гг.

Варианты опыта	Пораженность %	Биологическая эффективность, %
		<u>сорт 108-Ф</u>
Контроль (<i>X. malvacearum</i>)	89.5	
<i>X. malvacearum</i> + <i>P. fluorescens</i> 41	41.3	53.8
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. subtilis</i> 23	35.3	60.5
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. megaterium</i> 26	55.8	37.6
<i>X. malvacearum</i> + Хлопкоспорин	35.8	60.0
<i>X. malvacearum</i> + Триходермин	50.6	43.4
Контроль (<i>R. solani</i>)	90.9	
<i>R. solani</i> + <i>P. fluorescens</i> 41	31.4	65.4
<i>R. solani</i> + <i>B. subtilis</i> 23	30.5	66.5
<i>R. solani</i> + <i>B. megaterium</i> 26	51.4	43.4
<i>R. solani</i> + Хлопкоспорин	30.6	66.3
<i>R. solani</i> + Триходермин	32.1	64.6
		<u>сорт Киргизский-3</u>
Контроль (<i>X. malvacearum</i>)	75.0	
<i>X. malvacearum</i> + <i>P. fluorescens</i> 41	33.7	55.1
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. subtilis</i> 23	31.7	57.7
<i>X. malvacearum</i> + <i>B. megaterium</i> 26	54.9	26.8
<i>X. malvacearum</i> + Хлопкоспорин	31.9	57.4
<i>X. malvacearum</i> + Триходермин	57.5	23.3
Контроль (<i>R. solani</i>)	87.2	
<i>R. solani</i> + <i>P. fluorescens</i> 41	29.6	66.0
<i>R. solani</i> + <i>B. subtilis</i> 23	28.5	67.3
<i>R. solani</i> + <i>B. megaterium</i> 26	49.9	42.7
<i>R. solani</i> + Хлопкоспорин	28.0	67.8
<i>R. solani</i> + Триходермин	30.3	65.2

3.7. Влияние бактерий - антагонистов на представителей полезной почвенной микрофлоры

В связи с тем, что после предпосевной обработки семян бактерии - антагонисты попадают вместе с семенами в почву, нам было интересно узнать, какое влияние они могут оказывать на представителей полезной почвенной микрофлоры, в частности, на азотфиксирующие микроорганизмы.

В результате исследований установлено, что антагонисты лишь в некоторых вариантах оказывают слабый ингибирующий эффект и, следовательно, не представляют опасности для фототоксирующих клубеньковых и свободноживущих микроорганизмов (табл. 3.7.1.).

Таблица 3.7.1.

Влияние бактерий - антагонистов на азотфиксирующие бактерии

Азотфиксирующие бактерии	Диаметры зон угнетения, мм			
	<i>P. fluorescens</i> 41	<i>B. subtilis</i> 23	<i>B. subtilis</i> N	<i>B. megaterium</i> 26
<u>Клубеньковые бактерии:</u>				
<i>Rhizobium japonicum</i> 966	-	-	-	8 ± 1.3
<i>R. japonicum</i> 1141	-	-	-	-
<i>R. trifolii</i> 329	-	9 ± 4.2	8 ± 2.1	-
<i>R. meliloti</i> Д	11 ± 3.1	-	-	12 ± 4.2
<u>Свободноживущие азотфиксирующие бактерии:</u>				
<i>Azotobacter</i>				
<i>chroococcum</i> 19	8 ± 2.5	-	-	-
<i>A. chroococcum</i> 17	-	-	-	-
<i>A. chroococcum</i> 514	-	-	-	-
<i>A. agila</i> 7	-	-	-	-

3.8. Природа антибиотических веществ, продуцируемых штаммами *B. subtilis*

Для выяснения механизма антагонистической активности изучаемых штаммов *B. subtilis* мы выделяли биологически активные

САМСХИ
ИТВ № 13893

вещества из культуральных жидкостей антагонистов.

Выделенные нами нингидрин-позитивные биологически активные вещества штаммов 23 и N обладали растворимостью в этаноле, изопропаноле, и не растворялись в этил ацетате, ацетоне и воде, а полученный спиртовой экстракт, хранившийся при температуре +4°C, не терял антибиотической активности в течении одного года. В экспериментах по выделению антибиотических веществ, было получено около 850 мг биологически активных веществ на литр 3 - суточных культуральных жидкостей штаммов 23 и N.

Результаты ТСХ показали, что обе культуры являются продуцентами идентичных антибиотических веществ, так как фракция содержащая биологически активное вещество у обоих штаммов имело одно и то же значение R_f 0.72.

Полученный масс-спектр выделенных и разделенных методом ТСХ биологически активных веществ, продуцируемых штаммом 23 позволил нам предположить, что изучаемая нами культура *B. subtilis* 23 является продуцентом сурфактин - подобного полипептидного антибиотика.

3.9. Характер биологического действия антибиотических веществ, продуцируемых штаммами *B. subtilis* на клетки фитопатогенов

Последним этапом нашей работы было изучение характера антибиотической активности выделенных биологически активных веществ из штаммов *B. subtilis*. Установлено, что продуцируемые антибиотические вещества оказывают литическое действие на клетки фитопатогена, вызывая дезорганизацию клеточных стенок *R. solani*. В частности, клеточные стенки *R. solani* в зоне действия антибиотика имели многочисленные повреждения и разрывы, приведшие к потере внутреннего содержимого клетки и, в конечном счете, ее гибели.

В связи с тем, что конидиальное спороношение у фитопатогена *R. solani* встречается очень редко (Шаабдурахманова, Сафиязов, 1976; Hillocks, 1992), данный факт затрудняет детальное изучение характера действия антибиотических веществ на индивидуальные клетки фитопатогена. В связи с этим, нами было решено для дальнейших исследований использовать клетки возбудителя фузариозного вилта хлопчатника, гриб *F. oxysporum* var. *vasin-*

fectum.

Использование метода фазово-контрастной микроскопии позволило установить, что микроконидии в зоне действия антибиотических веществ, в зависимости от степени диффузии антибиотика в питательный агар в направлении от лунки к краям чашки Петри, через одни сутки были не жизнеспособными, не прорастали, либо прорастали и погибали.

Для более детального анализа характера антимикробного эффекта мы изучали сравнительное действие различных разведений полученных экстрактов 23 и N штаммов *B. subtilis*, обладавших биологической активностью.

Результаты исследований позволили нам установить, что клетки фитопатогена по характеру антимикробного действия антибиотическими веществами 23 и N штаммов *B. subtilis* разделяются на 4 условные группы жизнеспособности. Показан идентичный характер биологического действия антибиотических веществ, продуцируемых штаммами 23 и N, а также установлено, что единица антибиотической активности (по Егорову, 1996) биологически активных экстрактов штаммов 23 и N эквивалентна 85 мкг выделенных антибиотических веществ, а 1 мл экстракта содержал 11.8 единиц антибиотической активности.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *B. subtilis* обладают высокой антагонистической активностью по отношению к возбудителям основных болезней хлопчатника - фитопатогенным микроорганизмам *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum* и *Xanthomonas malvacearum*.

2. Культуральные жидкости антагонистов в 10%-ной концентрации оказывают стимулирующий эффект на всхожесть семян хлопчатника, их рост и развитие.

3. Метаболиты антагониста *B. subtilis* 23 обладают наилучшим стимулирующим действием на всхожесть семян, рост, развитие хлопчатника и других сельскохозяйственных растений, урожайность хлопчатника, а также снижает поражаемость хлопчатника наиболее вредоносными в условиях Узбекистана возбудителями болезней - *Rhizoctonia solani* и *Xanthomonas malvacearum*.

4. Самая высокая биологическая эффективность установлена при использовании штамма *B. subtilis* 23 и составляет: против гоммоза хлопчатника - 60.5% и 57.7% на сортах 108-Ф и Киргизский - 3 соответственно; против корневой гнили 66.5% и 67.3% на сортах 108-Ф и Киргизский - 3 соответственно.

5. Установлено, что почвенный антагонист *B. subtilis* 23 и эндофит *B. subtilis* N не различаются существенно по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам.

6. Штаммы *B. subtilis* не оказывают существенного ингибирующего эффекта на представителей полезной почвенной микрофлоры.

7. Штаммы *B. subtilis* 23 и N являются продуцентами идентичных по природе сурфактин-подобных антибиотических веществ. Единица антибиотической активности биологически активных экстрактов штаммов 23 и N, эквивалентна 85 мкг выделенных антибиотических веществ, а 1 мл экстракта содержит 11.8 единиц антибиотической активности.

8. По характеру ингибирования антибиотические вещества штаммов *B. subtilis* вызывают дезорганизацию клеток фитопатогенов *R. solani* и *F. oxysporum* var. *vasinfectum*. Характер биологического действия антибиотических веществ, продуцируемых штаммами 23 и N *B. subtilis* идентичен.

9. Полученные результаты обосновывают перспективность использования изученной культуры *B. subtilis* 23 и ее метаболитов при разработке комплексного биопрепарата для предпосевной обработки семян хлопчатника против фитопатогенных микроорганизмов.

Рекомендации науке

Для эффективной защиты хлопчатника от возбудителей корневой гнили и гоммоза рекомендуем начать производственные испытания 10%-ной культуральной жидкости штамма *Bacillus subtilis* 23 в качестве предпосевной обработки семян.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сафиязов Ж.С., Маннанов Р.Н., Саттарова Р.К. Влияние бактерий - антагонистов на фитопатогенные микроорганизмы и рост хлопчатника. // Узбекский биологический журнал. Ташкент, "ФАН", 1993, - N 1, с. 79-81.

2. Саттарова Р.К., Маннанов Р.Н., Сафиязов Ж.С. Влияние бак-

терий - антагонистов на урожайность хлопчатника и поражаемость корневой гнилью и гоммозом. // Узбекский биологический журнал. Ташкент, "ФАН", 1994, - N 2, с.67-68.

3. R.N. Mannanov, J.S. Safiyazov, R.K. Sattarova, D.U. Akhmedova. Morphological, physiological and biochemical study of *Bacillus subtilis* - an agent of biological control of plants. // European J. of Plant Pathology, XIII International Plant Protection Congress, The Hague, 2-7 July, 1995, - Abstracts, - p.599.

4. J.S. Safiyazov, R.N. Mannanov, R.K. Sattarova. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. // Field Crops Research, Elsevier Science, Amsterdam, 1995, - v.43, pp.51-54.

5. Сафиязов Ж.С., Ахмедова Д.У., Маннанов Р.Н. Сравнительное изучение антагонистических и стимулирующих свойств эндофитных микроорганизмов. // Респ. конфер. "Экологические проблемы приамударьинского региона Средней Азии", Бухара, 26-28 октября, 1995, сб. тезисов, - с.16-17.

6. Сафиязов Ж.С., Маннанов Р.Н., Ахмедова Д.У. Морфологические и антагонистические особенности эндофитных бактерий. // ДАН РУз, Ташкент, 1995, - N9-10, с.62-64.

7. Саттарова Р.К., Маннанов Р.Н., Сафиязов Ж.С. Тупрок антагонистларини кишлок хужалик экинларининг уругини унувчанлигига таъсири. // Усимлик зараркунандалари, касалликлар ва бегона ултарга карши кураш. ТошДАУ, Тошкент, 1995, - б.47-51.

8. Mannanov R.N., Safiyazov J.S. Antibiotic substances produced by endophytic and soilborne strains of *Bacillus subtilis*. // Karadeniz Journal of Medical Sciences, Turkey, 1996, - v.9, N4, pp.132-134.

9. Саттарова Р.К., Хакимова Н., Сафиязов Ж.С., Маннанов Р.Н. Отбор почвенных антагонистов с целью создания экологически безвредных биопрепаратов для сельского хозяйства. // Научно-прак. конфер. "Экологические аспекты рационального использования почв", ТашГАУ, Ташкент, 18-20 июня, 1997, сб.тезисов, - с.185-186.

10. Safiyazov J.S., Mannanov R.N. Biochemical analysis of antibiotic production by endophytic and soilborne strains of *Bacillus subtilis*. // The FASEB Journal, 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, San-Francisco, August 24-29, 1997, - Abstracts, - 2101.

Маннанов Рустам Нигматович

АЙРИМ АНТАГОНИСТЛАРИНИНГ ФИТОПАТОГЕН
МИКРООРГАНИЗМЛАРГА ВА ЎСИМЛИКЛАРНИ
РИВОЖЛАНИШИГА ТАЪСИРИНИ ЎРГАНИШ

ҚИСҚАЧА МАЗМУНИ

Антагонистларнинг антимикроб хусусиятларини ўрганиш натижасида *B. subtilis* штамлари ғўзанинг асосий касалликларини қўзғатувчи фитопатогенлар - *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum* ва *Xanthomonas malvacearum* кабиларга нисбатан юқори антагонистик фаолликка эгалиги аниқланди.

Уруғликка экишдан олдин ишлов бериш борасида қилинган лаборатория ва кичик бўлмали тажрибалар *B. subtilis* 23 антагонист - бактериясининг 10%-ли культурал суюқлиги ва ҳужайра суспензияси чигит ва баъзи бир бошқа қишлоқ хўжалик экинларининг уруғи униб чиқиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигига ижобий таъсир қилиб, уларнинг фитопатоген микроорганизмлар билан зарарланиш даржаси камайишини кўрсатди.

B. subtilis 23 ва *B. subtilis* N штамлар баъзи бир морфологик - культурал хусусиятлари ва ҳужайра булиниши тезлиги билан бир - биридан фарқ қилиши аниқланди, лекин бу икки штамм ҳам табиатан бир хил сурфактин-каби антибиотик моддалар ишлаб чиқаради. *R. solani* ва *F. oxysporum* var. *vasinfectum* ҳужайралари *B. subtilis*-нинг 23 ва N штамлари антибиотик моддалари билан ингибирланиши характери кўсатилди.

Олинган натижалар илмий асосланган равишда ўрганилган *B. subtilis* 23 штамни ғўза ва бошқа қишлоқ хўжалик экинларини касаллик келтириб чиқарувчиларга қарши экишдан олдин уругга ишлов бериладиган комплекс биопрепаратларни яратилишида фойдалилигини билдиради.

Rustam Nigmatovich Mannanov

STUDY OF THE ACTION OF SOME ANTAGONISTS ON
PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS AND
GROWTH OF PLANTS

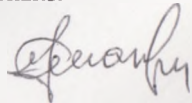
SUMMARY

Analysis of anti-microbial properties of some bacterial antagonists allowed to reveal high inhibitory activity of *Bacillus subtilis* strains against phytopathogens of cotton plants: *Xanthomonas malvacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum*, *Verticillium dahliae*.

Laboratory and small-plot trials using antagonists as means of pre-sowing seed treatment had shown highest biological efficacy in case application of with 10% cultural liquid of antagonist *B. subtilis* 23 by improving seed germination, growth and productivity of cotton plants, as well as decreasing affection by major cotton phytopathogens.

Comparative cultural-morphological and physiological-biochemical studies of 23 and N strains of *B. subtilis* had discovered certain non-significant differences. However, further investigation of anti-microbial properties of extracted from both strains surfactin-like biologically active substances on cells of phytopathogens *R. solani* and *F. oxysporum* var. *vasinfectum* had shown identical features of antibiotic action.

Obtained results prove scientifically the prospective from the use of strain *B. subtilis* 23 for working out complex, ecologically non - hazardous products for biological control of cotton and other agricultural plants.



Заказ № 264

Подписано в печать 22.09.98 г.

Печатный лист 1,5 Тираж 80

Отпечатано в типографии ГФНТИ