

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии
и физиологии растений

**МИКРОБОЦЕНОЗ СМОРОДИНОВОЙ ТЛИ
(*APHIS SCHNEIDERI* C.B.) В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Гамидовой Фиданы Эльхановны

Научный руководитель
к.б.н., доцент

дата, подпись

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

дата, подпись

С. А. Степанов

Саратов 2016

Введение

Актуальность темы. Смородиновая тля является вредителем черной, красной, белой смородины во многих регионах нашей страны, в том числе и в Саратовской области [1]. В результате массового размножения этих насекомых на верхней части листовой пластинки образуются вздутия, происходит деформация молодых побегов. Кроме того, тли известны как переносчики и резервуары возбудителей болезней растений вирусной, грибной и бактериальной природы. В последние годы внимание исследователей привлекают симбиотические и ассоциативные микроорганизмы тли. Влияние на симбиотические микроорганизмы рассматривается как один из механизмов регуляции численности насекомых-вредителей. Наиболее изученными облигатными симбионтами тлей являются бактерии рода *Buchnera* [2]. Сведения о спонтанных микробоценозах большинства видов тли, в том числе и смородиновой, крайне скудны.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы стало выявление микробоценоза смородиновой тли (*Aphis schneideri* С.В.) на территории Саратовской области. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить структуру микробоценоза смородиновой тли.
2. Сравнить видовой состав микробоценозов смородиновой тли в Саратовском, Энгельском и Балашовском районах Саратовской области.
3. Выявить динамику качественного и количественного состава микробоценоза смородиновой тли в разные годы и в течение сезона.
4. Сравнить видовой состав микробоценозов смородиновой тли и кормовых растений этих насекомых.
5. Изучить биологические свойства бактерий, выделенных из организмов смородиновой тли.
6. Определить наличие генов, кодирующих синтез ферментов эндоглюканазы и нитрогеназы, у микроорганизмов - ассоциантов смородиновой тли.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в 2012-2015 гг. Материалом для микробиологических исследований послужили бескрылые самки смородиновой тли, собранные с их основного кормового растения – чёрной

смородины. Всего было исследовано 1370 особей *Aphis schneideri*, собранных в Энгельском, Саратовском и Балашовском районах Саратовской области.

Проводились бактериологические посевы смородиновой тли, поверхности и внутренней среды кормового растения. В дальнейшем были изучены морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенных изолятов, проведена фенотипическая и генотипическая идентификация выделенных ассоциантов [3-7]. Выявление генов *nifH* и *celY* проводили методом ПЦР.

Структура и объём работы. Работа изложена на 59 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников, приложение. Работа проиллюстрирована 11 таблицами и 11 рисунками. Список использованных источников включает 114 наименований.

Научная новизна. Впервые установлен видовой состав, доминирующие виды микробоценоза смородиновой тли, их биологические свойства, показано влияние микрофлоры кормового растения на структуру микробоценоза смородиновой тли.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления о роли тлей в циркуляции бактерий в природе. Выявленная способность некоторых фитопатогенных бактерий сохраняться в организме тли позволит фитопатологам более точно прогнозировать распространение вызываемых ими бактериозов растений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Микробоценоз смородиновой тли включает 24 вида бактерий, среди которых преобладают бактерии рода *Bacillus*.
2. Наиболее распространёнными ассоциантами смородиновой тли являются *B. pumilus*, *B. simplex* и *S. maltophila*.
3. Для микробоценоза смородиновой тли характерна смена доминирующих видов, имеющих высокие количественные показатели и индексы встречаемости.
4. Успешность выживания бактерий в организмах насекомых зависит от их способности адаптироваться к специфическим условиям этих биотопов: щелочной реакции среды, высокой концентрации сахарозы и недостатку азотных соединений.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об особенностях биологии смородиновой тли, о систематическом положении и морфологии, о жизненном цикле, об особенностях питания, о симбиотических микроорганизмах этих насекомых, об участии тлей в сохранении и распространении фитопатогенных микроорганизмов.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о структуре микробоценоза смородиновой тли, его динамике, влиянии на него микрофлоры кормового растения, о биологических свойствах бактерий-ассоциантов.

Из организмов тлей было выделено 108 штаммов бактерий. Количественные показатели содержания бактерий в организмах тлей варьировали от 10^2 до 10^7 КОЕ в пробе. Выделенные бактерии были представлены грамотрицательными палочками, грамположительными споровыми и неспоровыми палочками.

Более половины выделенных штаммов относились к группе грамположительных споровых палочек. Около трети штаммов представляли собой грамотрицательные палочки, 13% относилось к грамположительным неспоровым палочкам.

В результате изучения фенотипических и генотипических свойств изолятов, выделенные штаммы бактерий были отнесены к 24 видам 10 родов.

При анализе общей структуры микробоценозов выявлено, что наиболее разнообразно в микробной ассоциации смородиновой тли представлен род *Bacillus* – 14 видов, роды *Microbacterium* и *Pseudomonas* включали по 2 представителя, остальные роды были представлены единичными видами.

Среди грамположительных споровых палочек наиболее часто встречаемым видом оказался *B. pumilus*, регулярно из организма тли выделялись *B. clausii*, *B. horti*, *B. simplex*, *B. soli* и *B. thuringiensis*. Интересно, что большинство этих бацилл могло успешно размножиться в организме насекомого, достигая очень высоких показателей численности (10^7). Исключение составляет *B. thuringiensis*, количественные показатели которого не превышали 10^5 КОЕ в пробе. Этот вид

используется для борьбы с широким кругом насекомых-вредителей. По литературным данным известно, что тли устойчивы к экзотоксинам *B. thuringiensis* и неоднократное обнаружение данного вида в активных особях смородиновой тли еще раз подтверждает этот факт.

Среди грамположительных неспоровых палочек чаще всего выделялся *Listeria murray*, причем количественные показатели данного вида не опускались ниже 10^6 КОЕ в пробе.

Из грамотрицательных палочек наиболее распространённым видом оказался *Stenotrophomonas maltophila* (индекс встречаемости составил 21%). Количественные показатели этого вида варьировали в разных пробах от 10^3 до 10^7 КОЕ. Достаточно часто в микробоценозе смородиновой тли встречались такие виды как *Aeromonas hydrophila*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas saccharophyla*, *Serratia plymthica* (индексы встречаемости 10-14%). Их количественное содержание в организмах насекомых также было непостоянно и в разных пробах колебалось от 10^3 до 10^7 КОЕ.

Таким образом, наиболее распространёнными ассоциантами смородиновой тли оказались *B. pumilus*, *B. simplex* и *S. maltophila*, индексы встречаемости которых в организмах смородиновой тли составили 20% и выше. Эти же виды были способны достигать высокой концентрации в организмах насекомых (до 10^7 КОЕ), что говорит об их хорошей адаптации к обитанию в организмах этих насекомых.

Большая часть выделенных видов является обитателями окружающей среды. 3 вида (*Microbacterium imperyale*, *M. flavum*, *Serratia plymthica*) по литературным данным ассоциированы с насекомыми. Помимо сапрофитов, в состав микробоценоза смородиновой тли входят и фитопатогенные виды. *Pectobacterium carotovorum* является возбудителем черной ножки, мягкой гнили у культуральных и сорных растений. *Bacillus mycooides* – возбудитель бактериальной пятнистости листьев свеклы. *B. pumilus* – вызывает пятнистость незрелых плодов [8].

При сравнении видового состава микробоценозов смородиновой тли в разных районах Саратовской области было установлено, что некоторые виды

изолировались из насекомых в разных районах области, но большая часть ассоциантов изолировалась лишь в каком-либо одном районе.

Наиболее схожи оказались микробные ассоциации смородиновой тли в Энгельсском и Саратовском, а также в Энгельсском и Балашовском районах. Индексы общности видового состава микробоценозов насекомых, собранных в этих районах составили по 20%. Крайне мало общих видов оказалось в тлях, собранных в Саратовском и Балашовском районах (индекс общности 5%).

В двух районах из трёх исследованных встречались *Bacillus pumilus*, *B. clausii*, *B. thuringiensis*, *Microbacterium imperiale*, *Pantoea agglomerans*, *Pectobacterium carotovorum*.

Во всех исследованных районах встречался вид *Stenotrophomonas maltophila*.

Динамика микробоценоза смородиновой тли в 2012, 2013 и 2015 гг. была исследована нами на примере тлей, собранных в Энгельсском районе.

Установлено, что в течение этих лет из организмов смородиновой тли в Энгельсском районе выделялся один и тот же спектр видов.

Однако встречаемость бактерий-ассоциантов в насекомых существенно различалась. Так, в 2012 г. наибольший индекс встречаемости (50%) имел *Stenotrophomonas maltophila*. Высокие показатели встречаемости были характерны также для *Bacillus horikoshii* (30%) и *B. subtilis* (25%). В 2013 г. наибольшая встречаемость была отмечена у *P. carotovorum* (55%). Высокая встречаемость была также у *S. maltophila* (35%) и *P. pseudomallei* (20%). В 2015 году наибольший индекс встречаемости (45%) имел *S. maltophila*. Высокие показатели встречаемости были отмечены у *P. carotovorum* (30%). Таким образом, в течение трех лет стабильно высокие показатели встречаемости в организмах смородиновой тли имел лишь *S. maltophila*. У других видов высокие показатели встречаемости в течение одного года сочетались с их низкими значениями в следующий год.

Следует отметить, что все виды-ассоцианты были способны достигать высоких количественных показателей содержания в организмах насекомых.

Мы проанализировали динамику видового состава микроорганизмов-ассоциантов смородиновой тли, собранной в Саратовском районе в одном и том же

биотопе, с одних и тех же кормовых растений в мае, июне и июле 2012 г. В каждом месяце выделялось приблизительно одинаковое количество видов микроорганизмов-ассоциантов. В течение всего сезона в микробоценозе смородиновой тли преобладали бактерии рода *Bacillus*, и также в течение всего сезона изолировались единичные виды грамотрицательных палочек. Однако наблюдалась тенденция к увеличению в течение сезона видов группы спорных палочек, при снижении количества видов других морфологических групп бактерий-ассоциантов.

Видовой состав микробоценоза смородиновой тли существенно изменялся в течение сезона. Индекс его общности в мае и в июне составил 27%, в июне и июле – 18%. Насекомые, исследованные в мае и июле, общих видов бактерий не содержали.

Особый интерес представляет смена видов, имевших наиболее высокие показатели встречаемости. В мае наиболее часто встречающимися ассоциантами тли были *S. plymuthica*, *B. soli*, *B. horti* и *B. pumilus*. В июне доминировали *B. thuringiensis* и *B. pumilus*. В июле наиболее высокие индексы встречаемости имели *B. thuringiensis*, *S. maltophila* и *B. horikoshii*.

Таким образом, было показано, что микробоценоз тлей подвержен существенным изменениям в течение сезона. Изменялся не только общий видовой состав микробоценоза, но и происходила замена одних доминирующих видов другими. Вид, доминировавший в предыдущие месяцы, в последующие либо не выделялся совсем, либо выделялся в значительно меньшем количестве.

Ежемесячные микробиологические исследования тлей не позволили уловить период смены доминанта. С этой целью была проведена серия ежедневных исследований микробоценозов тлей, снимаемой с одного и того же кормового растения. Исследования первых проб выявили доминирование в микробоценозе смородиновой тли вида *B. pumilus*. Стабильность доминанта сохранялась в течение первых шести дней, но, уже начиная с пятого дня, в большинстве проб преобладающими видами становились *B. horikoshii* и *S. maltophila*, которые постепенно становились доминирующими видами. В результате тот или иной вид бактерий доминировал в микробоценозах тлей из одной колонии не менее шести

дней, после чего происходила смена доминирующего вида. Смена доминанта может быть связана с появлением нового партеногенетического поколения тли. Отродившиеся личинки начинали питаться, и их пищеварительный канал заселяли микроорганизмы, находившиеся в этот период на поверхности и во внутренней среде кормового растения.

Таким образом, в микробценозах исследованных видов тлей происходила ежемесячная смена доминирующих микроорганизмов. Периодичность смены доминанта совпадала с продолжительностью жизни одного партеногенетического поколения этих насекомых (в среднем 20–40 дней). Изменения, произошедшие за этот период в микробном сообществе почвы, кормового растения, находили отражение и в структуре микробценозов обитающих на нем тлей.

Для изучения влияния микрофлоры кормового растения на микробную ассоциацию смородиновой тли было проведено параллельное исследование микрофлоры 100 насекомых и микрофлоры их кормовых растений.

Поверхность листа кормового растения имеет весьма разнообразную микрофлору. Так, с поверхности растений было выделено 8 видов бактерий, из внутренней среды кормовых растений – 7 видов, а из организмов тлей лишь 5 видов.

Во внутреннюю среду растения попадает значительно меньше микроорганизмов, а во внутренней среде насекомых успешно размножаются уже лишь единичные виды. Таким образом, микрофлора кормовых растений намного разнообразнее, чем микрофлора питающихся на них тлей.

Эту закономерность подтвердило и более детальное изучение микрофлоры кормовых растений смородиновой тли.

Все выделенные виды имели высокие показатели встречаемости (от 70 до 100%). Во всех исследованных эконишах преобладали бактерии рода *Bacillus*. *B. badius* и *B. halmapalus* были изолированы только из внутренней среды растения; *B. flexus* и *Staphilococcus auricularis* – только с поверхности растений; *B. barbaricus*, *B. pumilus* и *Pantoea ananatis* были выделены из поверхности и внутренней среды растения, но отсутствовали в организмах тлей. *B. mycoides* и *Pseudomonas diminuta*

изолировались с поверхности растений и из внутренней среды насекомых, *S. maltophila* – из внутренней среды кормовых растений и из внутренней среды тлей.

Наибольшей экологической пластичностью обладали *B. horikoshii* и *B. pumilus*, которые были выделены как из организмов тлей, так и с поверхности и из внутренней среды кормовых растений. Таким образом, бактерии могут попадать в организм тли как с поверхности, так и из внутренней среды кормовых растений.

Большее влияние на видовой состав микробоценоза тлей оказывает микробная ассоциация поверхности кормового растения (индекс общности видового состава 44,5%). Меньший индекс общности видового состава (33,4%) оказался характерен для микробных ассоциаций, населяющих внутреннюю среду тлей и внутреннюю среду кормовых растений.

Учитывая, что многие выделенные штаммы бактерий содержались в насекомых в очень больших количествах, можно предположить, что они будут оказывать определенное влияние на своего хозяина.

Тли питаются флоэмным соком, содержащим высокие концентрации углеводов, прежде всего сахарозы, в связи с чем подвергаются постоянному осмотическому стрессу. Известно несколько механизмов, позволяющих насекомым избегать обезвоживания [9].

Одним из механизмов осморегуляции может служить потребление сахаров в качестве источника углерода и энергии бактериями, обитающими в пищеварительном канале тли. Показано, что сахароза входит в число углеводов, наиболее активно используемых бактериями-ассоциантами.

Другая проблема, с которой сталкиваются тли, питаясь исключительно растительными соками, это недостаточность азотного питания. Известно, что *Buchnera* дополняют рацион насекомых незаменимыми аминокислотами [10]. Азотфиксация факультативных внеклеточных симбионтов может также вносить определённый вклад в азотное питание насекомых-хозяев: 54,2% выделенных штаммов обладали способностью расти за счет молекулярного азота.

Устойчивость тлей к неблагоприятным факторам среды также связывают с симбиотическими бактериями этих насекомых.

Среди выделенных нами изолятов встречались преимущественно психротолерантные штаммы, их количество было высоко среди грамположительных неспоровых палочек и грамотрицательных палочек. Термотолерантностью обладали лишь несколько штаммов грамположительных споровых палочек. Таким образом, ассоцианты смородиновой тли будут сохранять активность при понижении температуры, но прекратят активную жизнедеятельность при повышенных температурах.

Диапазон рН, в котором росли все исследованные штаммы, колебался от 5 до 9. Можно предположить, что ассоциативные микроорганизмы смородиновой тли будут активны при колебаниях рН внутренней среды насекомого от слабокислой до щелочной.

Наши исследования показали, что организм смородиновой тли является средой обитания как для широкого круга сапрофитических бактерий, так и для фитопатогенных. Насекомое обеспечивает этих бактерий пищевым субстратом, сглаживают негативные влияния факторов внешней среды.

Ассоциативные бактерии же, в свою очередь, могут участвовать в решении ряда физиологических проблем тли, связанных с питанием растительными соками.

Молекулярно-генетические исследования бактерий ассоциантов смородиновой тли показали наличие у некоторых из них искомым генов *celY* и *nifH*.

По данным GenBank размер гена *nifH* составляет 842 п.н., *celY* – 739 п.н. Электрофореграмма продуктов ПЦР показала наличие *nifH* у видов *P. carotovorum* 566 и *E. mallotivora* 574 (дорожка №4 и №6). Для *B. pumilus*42 (дорожка №2) ген *nifH* выявлен не был. Таким образом можно сделать вывод, что ген *nifH* является высоко консервативным и присутствует у бактерий различных таксономических групп.

Гены, отвечающие за целлюлолитическую активность были выявлены у штаммов *P. carotovorum* 566 и *E. mallotivora* 574 (дорожка №5 и №7). У *B. pumilus* (дорожка №3) *celY* выявлен не был, что говорит о неспособности данного штамма расщеплять оболочки растительных клеток и разрушать ткани растений.

Выводы

1. Микробоценоз смородиновой тли включает 24 вида бактерий, принадлежащих к 10 родам. В микробной ассоциации смородиновой тли преобладали бактерии рода *Bacillus* (13 родов).
2. Наиболее распространёнными ассоциантами смородиновой тли оказались *B. pumilus*, *B. simplex* и *S. maltophila*, индексы встречаемости которых в организмах смородиновой тли составили 20% и выше. Эти же виды были способны достигать высокой концентрации в организмах насекомых (до 10^7 КОЕ).
3. Индексы общности микробной ассоциации смородиновой тли в Саратовском, Энгельском и Балашовском районах составили от 5 до 20%.
4. Для микробоценоза смородиновых тлей, обитающих в одном и том же биотопе, характерна высокая вариабельность как в разные сезоны, так и в течение одного сезона. В течение всего периода исследований наблюдалась смена доминирующих видов, имевших высокие количественные показатели (10^5 - 10^6) и индексы встречаемости (70-100%).
5. Успешность выживания бактерий в организмах насекомых зависит от их способности адаптироваться к специфическим условиям этих биотопов: щелочной реакции среды, высокой концентрации сахарозы и недостатку азотных соединений. Показано, что алкалотолерантными являются 91,7% выделенных из тлей штаммов, использовать сахарозу были способны 87,5%, процесс азотфиксации могли осуществлять 54,2% изолятов.
6. У доминирующих видов *Erwinia mallotivora* и *Pectobacterium carotovorum* выявлены гены азотфиксации *nifH*, у *Erwinia mallotivora* и *Pectobacterium carotovorum* - *celY* гены, кодирующие синтез фермента эндоглюканазы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Щеголев, В. Н. Сельскохозяйственная энтомология / В. Н. Щеголев. М.: Сельхозгиз, 1980. 450 с.
2. Tsuchida, T. Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color / T. Tsuchida, R. Koga, M. Horikawa et al. Science. 2010. Vol. 330, № 6007. P. 1102-1104.
3. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. М.: Мир, 1997. Т.1. 432 с.
4. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. М.: Мир, 1997. Т.2. 368 с.
5. Brenner, D. J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / D. J. Brenner, J. T. Staley, D. R. Boone. USA: Springer, 2001. Vol. 1. 1450 p.
6. Brenner, D. J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / D. J. Brenner, J. T. Staley, D. R. Boone. USA: Springer, 2005. Vol. 2. 1106 p.
7. Brenner, D. J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / D. J. Brenner, J. T. Staley, D. R. Boone. USA: Springer, 2007. Vol. 3. 1136 p.
8. Пивоваров, Ю. П. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация) / Ю. П. Пивоваров, В. В. Королик. М.: ИКАР, 2000. 268 с.
9. Ashford, D. A. Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* / D. A. Ashford, W. A. Smith, A.E. Douglas. Journal of Insect Physiology. 2000. Vol. 46, № 3. P. 335-341.
10. Macdonald, S. J. The central role of the host cell in symbiotic nitrogen metabolism / S. J. Macdonald, G. G. Lin, C. W. Russell, G. H. Thomas. Biological Sciences. 2012. Vol. 279, № 1740. P. 2965-2973.