

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

ВЫЯВЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ПОРАЖАЮЩИХ  
ПОБЕГИ ЯБЛОНЬ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ, И РАЗРАБОТКА  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕР БОРЬБЫ С НИМИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы  
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Ткаченко Галины Сергеевны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_

С. А. Степанов

Саратов 2016

## Введение

**Актуальность темы.** Яблоня является одним из самых важных сельскохозяйственных объектов. Одной из проблем, с которыми сталкиваются садоводы, является подверженность яблонь бактериальным и грибковым инфекциям [1]. В последние годы и профессиональные агрономы, и садоводы-любители отмечают появление в садах деревьев с растрескавшейся и как бы обуглившейся корой. Согласно литературным данным это заболевание – чёрный рак яблонь – вызывает гриб *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) [2]. Однако выделение возбудителя на территории нашей области никем не проводилось.

Широкое распространение возбудителей болезней яблонь делает необходимым разработку всё новых мер по защите плодовых деревьев [3]. С химическими методами защиты может успешно конкурировать биологический метод, основанный на применении микроорганизмов-антагонистов [4]. Это делает актуальным поиск новых штаммов бактерий-антагонистов фитопатогенов, поражающих побеги яблонь.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы стало выявление спектра грибов, встречающихся на поражённых побегах яблонь в Саратовской области, и разработка биологических методов борьбы с ними. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить спектр грибов, встречающихся на поражённых побегах яблонь, установить доминирующие виды.
2. Изучить антагонистическую активность бактерий-ассоциантов побегов яблонь в отношении выделенного комплекса фитопатогенных грибов.
3. Выявить наличие у бактерий-антагонистов факторов патогенности и фитопатогенности.
4. Установить, какие штаммы бактерий-антагонистов наиболее целесообразно использовать при создании противогрибкового биопрепарата.

**Материал и методы исследования.** Материалом послужили одно- и двухлетние побеги яблонь сортов Беркутовское, Уэлси и Голден Делишес с

признаками поражения микозами: растрескиванием и почернением коры. Всего было исследовано 200 побегов яблонь.

Материал отбирали в Саратовском, Энгельском, Аткарском, Базарно-Карабулакском, Пугачевском, Дергаческом и Перелюбском районах Саратовской области. Посевы побегов осуществляли методом отпечатка на среду PDA. Видовую принадлежность грибов определяли с помощью определителя И.И. Минкевича, Т.Б. Дорофеевой, В.Ф. Ковязина «Фитопатология. Болезни древесных и кустарниковых пород» [5]. Видовую принадлежность доминирующих штаммов грибов подтверждали путем выявления видоспецифичных участков рибосомальных РНК методом ПЦР в институте фармацевтической биологии и биотехнологии (г. Дюсельдорф, Германия) и в лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского института защиты растений (г. Санкт-Петербург, Россия).

В ходе предыдущих работ, проведенных на кафедре, с пораженных побегов яблонь были выделены бактерии, обладающие антагонистической активностью по отношению ко многим видам грибов: *Brevibacterium halotolerans* (SA87), *Bacillus pumilis* (SA171), *Bacillus amyloliquefaciens* (SA77), *Bacillus methyloprophicus* (SA94). Изучение антагонистической активности данных штаммов в отношении наших грибных изолятов проводили методом нанесения агаровых блоков с исследуемыми культурами на питательную среду PDA. В случае антагонизма бактерий рост культуры грибов затормаживался или прекращался совсем.

В связи с тем, что данные штаммы бактерий-ассоциантов в перспективе могут быть использованы как основа для создания микробного фунгицида, представляло интерес определение у них факторов патогенности для растений, животных и человека. Из факторов патогенности определялась лецитиназная, плазмокоагулазная, гемолитическая активность, из факторов фитопатогенности – целлюлолитическая и пектолитическая активность, а также ставили биопробы на листьях яблони *in vivo*. Все исследования проводили по стандартным методикам [6].

**Структура и объём работы.** Работа изложена на 44 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников.

Работа проиллюстрирована 7 таблицами и 5 рисунками. Список использованных источников включает 68 наименований.

### Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об инфекционных заболеваниях растений, о микроорганизмах-ассоциантах растений, о фитопатогенных микроорганизмах, поражающих яблони, о перспективах использования микроорганизмов-антагонистов фитопатогенов для защиты растений от болезней.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные об обсемененности грибами поверхности побегов яблонь с признаками поражения микозами. Всего было выделено 552 штамма грибов 13 видов, из которых 9 относится к фитопатогенам (*Alternaria alternata* – возбудитель альтернариозов, *Aspergillus tubiengensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*- возбудители аспергиллеза, *Cladosporium sp.*- возбудитель кладоспориозов, *Fusarium incarnatum-equiseti*- возбудитель фузариозов, *Trichoderma sp.*, *Ulocladium sp.*), а 4 – к сапрофитам (*Rhizopus sp.*, *Saccharomices sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*). Ни в одной из исследуемых проб не выявлен возбудитель черного рака *Botryosphaeria obtusa*. Наиболее часто встречались грибы *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum-equiseti*. Остальные таксоны грибов изолировались реже. Встречаемость сапрофитных видов сильно варьировала в разных районах. Таким образом, можно предположить, что основной причиной наблюдаемых повреждений побегов яблонь являются грибы *Alternaria alternata* и *Fusarium incarnatum-equiseti*.

При изучении антагонистической активности бактерий-ассоциантов побегов яблонь установлено, что они подавляют рост многих выделенных нами фитопатогенных грибов. Так, *Bacillus amyloliquefaciens* (SA77) подавлял рост *Alternaria alternate*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Trichoderma sp.*

*Brevibacterium halotolerans*(SA87) проявлял антагонистическую активность по отношению к *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium incarnatum-equiseti*.

*Bacillus methyloprophicus* (SA94) задерживал рост *Alternaria alternate*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Trichoderma sp.*

*Bacillus pumilus* (SA171) проявлял антагонистическую активность по отношению к *Alternaria alternate*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Trichoderma sp.*

Особый интерес представляло подавление роста доминирующих видов грибов *Alternaria alternata* и *Fusarium incarnatum-equiseti*. Более чувствительным к продуктам метаболизма бактерий оказался *Alternaria alternata*, рост которого подавляли *Bacillus amyloliquefaciens* (SA77), *Bacillus methyloprophicus* (SA94) и *Bacillus pumilus* (SA171). Следует отметить, что этот вид проявил чувствительность только к воздействию бактерий рода *Bacillus*. Более устойчивым оказался второй доминирующий вид грибов – *Fusarium incarnatum-equiseti*. Рост этого гриба подавлял только один вид бактерий-ассоциантов- *Brevibacterium halotolerans* (SA87).

При создании биопрепарата для борьбы с данным комплексом фитопатогенных грибов целесообразно будет сочетать один из исследованных видов рода *Bacillus*, который будет подавлять рост *Alternaria alternata*, и *Brevibacterium halotolerans*, который способен тормозить рост *Fusarium incarnatum-equiseti*.

Для выявления механизма антагонистической активности данные штаммы были переданы в Институт фармацевтической биологии и биотехнологии (г. Дюссельдорф, Германия) для выделения и идентификации основных продуктов их метаболизма.

При исследовании факторов патогенности у бактерий-антагонистов выяснилось, что лецитиназной и плазмокоагулазной активностью данные штаммы не обладали, гемолитической активностью обладали штаммы *Bacillus methyloprophicus* и *Bacillus pumilus*. При определении факторов фитопатогенности установлено, что способностью к мацерации растительных тканей обладали

штаммы *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Brevibacterium halotolerans*; штамм *Bacillus methyloprophicus* не обладал такой активностью. Целлюлолитических ферментов у исследуемых штаммов не оказалось (роста на среде с целлюлозой не было). При нанесении на листовую пластинку яблонь сорта Уэлси бактериальных взвесей ( $10^9$  м.к./мл) через неделю в месте надреза жилки регистрировалась небольшая зона некроза, не отличающаяся от контроля.

Таким образом, ни один из штаммов бактерий-антагонистов не проявил фитопатогенных свойств по отношению к заражённому растению.

### Выводы

1. На побегах яблонь с признаками микозов (растрескивание и почернение коры) формируется комплекс фитопатогенных грибов, в котором доминировали *Alternaria alternata* и *Fusarium incarnatum -equiseti*. В качестве сопутствующих видов встречались грибы *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Ulocladium sp.* *Botryosphaeria obtusa* (возбудитель чёрного рака яблонь) ни в одной пробе не выявлен.

2. Бактерии-ассоцианты побегов яблонь проявили антагонистическую активность по отношению к 7 видам фитопатогенных грибов. Рост доминирующих на побегах видов *Alternaria alternata* подавляли штаммы *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methyloprophicus*, *Bacillus pumilus*, *Fusarium incarnatum-equiseti* – штамм *Brevibacterium halotolerans*.

3. Все исследованные штаммы бактерий-антагонистов не обладали целлюлолитической активностью, штаммы *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium halotolerans* обладали способностью к мацерации растительных тканей. При нанесении бактерий-антагонистов на листовые пластинки яблонь ни один из штаммов не оказал на растения негативного воздействия.

4. Штаммы бактерий-антагонистов не обладали лецитиназной и плазмокоагулазной активностью, штаммы *Bacillus pumilus* и *Bacillus methyloprophicus* были способны гемолизировать эритроциты.

5. При разработке биопрепарата для борьбы с данным комплексом фитопатогенных грибов целесообразно сочетать один из штаммов *Bacillus* (подавляют рост *Alternaria alternata*) с *Brevibacterium halotolerans* (подавляет рост *Fusarium incarnatum-equiseti*).

#### Список использованных источников

1. Фатьянов, В.И. Яблоня / В.И.Фатьянов. М: Вече, 2005. 70 с.
2. Дьяков, Ю.Т. Фитофтороз – глобальные и внутрисоссийские проблемы / Ю.Т. Дьяков // Журнал Всероссийского общества фитопатологов. 2002. Вып. 14. С. 14-25.
3. Болдаков, В.Л. Фитопатология / В.Л. Болдаков, Г.И. Кисляков. М.: Колос, 1992. 224 с.
4. Самусенко, Н.В. Научное обоснование применения бактерий-антагонистов при длительном холодильном хранении корнеплодов моркови / Н.В. Самусенко. Санкт-Петербург: ООО «Копи-Р Групп», 2001. С.15.
5. Минкевич, И.И. Фитопатология. Болезни древесных и кустарниковых пород / И.И. Минкевич, Т.Б. Дорофеева, В.Ф. Ковязин. Спб.: Лань, 2011. 160 с.
6. Желдакова, Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин // Учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета специальности 310101 «Биология». Минск: БГУ, 2006.116 с.