

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

дата, подпись

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

дата, подпись

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 грибок *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 внутривососсийские 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.