

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

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ
С ПОБЕГАМИ ЯБЛОНИ (*MALUS DOMESTICA* BORKH., 1803)

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ


Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 06 04 01 Биология
биологического факультета
Латиф Исраа Надим

Научный руководитель
к.б.н., доцент


26.06.2017

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор


26.06.2017

С. А. Степанов

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Яблоня является одной из наиболее широко возделываемых плодовых культур во многих странах мира, в том числе и в России. Существенный урон этой культуре наносят такие заболевания как бактериальный рак плодовых деревьев, бактериальная гниль яблони, бактериальный ожог, парша яблони [1, 2]. Помимо хорошо известных фитопатогенных видов в последнее время многие сапрофиты постепенно переходят в разряд условно патогенных и патогенных. Поэтому для составления грамотного прогноза развития инфекционных патологий этой культуры необходимо иметь представление не только о видовом составе микроорганизмов, ассоциированных с поверхностью и внутренними тканями яблонь, но и знать, какими практически значимыми биологическими свойствами они обладают [3].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стало изучение биологических свойств бактерий, ассоциированных с побегами яблонь. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Проанализировать видовой состав бактерий-ассоциантов побегов яблонь.
2. Установить наличие у бактерий-ассоциантов факторов фитопатогенности: целлюлолитической и пектолитической активности.
3. Выявить у ассоциативных бактерий антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным и сапрофитическим грибам, встречающимся на поверхности побегов яблонь в Саратовской области.

Материал и методы исследования.

Исследования проводились в 2015-2017 гг. Материалом для исследования послужили штаммы бактерий и грибов, изолированные ранее в Саратовской области с поверхности и из внутренних тканей побегов яблонь сортов Беркутовское, Голден Делишес и Уэлси с признаками поражения микозами. Всего было исследовано 19 штаммов, выделенных с поверхности побегов и 14 штаммов, изолированных из внутренних тканей тех же яблонь. Антагонистическая активность изучалась в отношении пяти штаммов фитопатогенных грибов, изолированных в Саратовской области с поверхности тех же побегов яблонь с признаками микозного усыхания: *Alternaria alternata*, *Aspergillus tubiengensis*, *Fusarium equiseti*, *F. tricinctum* и *Phoma fungicola*.

При выявлении факторов фитопатогенности выделенные штаммы исследовались на наличие у них мацерирующей способности и целлюлолитической активности. Эксперименты проводили по стандартным методикам [4]. Со штаммами, имеющими наибольшее количество факторов фитопатогенности, проводили биопробы на листьях яблони сорта Уэлси. Из суточных культур штаммов бактерий-антагонистов по стандарту мутности готовили взвесь в физиологическом растворе концентрацией 10^9 м.к./мл. На нижней стороне листьев яблонь сорта Уэлси делали надрез центральной жилки длиной 2-3 мм и в него бактериологической петлёй вносили приготовленную взвесь.

Для выявления антагонистической активности культуры бактерий засевали газоном на ГРМ-агар, культивировали при $+28^{\circ}\text{C}$ в течение суток. Культуры грибов засевали аналогичным образом на среду PDA, культивировали при $+28^{\circ}\text{C}$ в течение пяти суток. Затем из полученных газонов вырезали диски диаметром 5 мм и накладывали их на чашку Петри

со средой PDA. В центр чашки накладывали диск с культурой тестируемого гриба, а по периферии 4 диска с культурами бактерий. Чашки с дисками культивировали при +28°C в течение семи суток. Микробные взаимодействия оценивали по наличию зоны ингибирования роста гриба.

Научная новизна. Впервые проведено выявление факторов фитопатогенности у бактерий-ассоциантов побегов яблонь с признаками микозного усыхания; показано, что бактерии-ассоцианты побегов яблонь могут проявлять антагонистическую активность как по отношению к фитопатогенным грибам, доминирующим на поражённых побегах, так и к сапрофитическим, участвующим в колонизационной резистентности растений.

Практическая значимость. Полученные данные могут быть использованы специалистами в области защиты растений при разработке и использовании биологических средств защиты яблонь от фитопатогенов. Выявлены штаммы с широким спектром фунгистатической активности, которые могут послужить основой для создания нового биофунгицидного препарата.

Апробация работы. Результаты исследований опубликованы в 1 работе.

Положения, выносимые на защиту:

1. Большая часть бактерий-ассоциантов побегов яблонь является представителями рода *Bacillus*.

2. Некоторые ассоциативные бактерии обладают факторами фитопатогенности, но их присутствие на поверхности или во внутренних тканях яблонь не вызывает каких-либо патологических изменений в растительном организме.

3. Многие бактерии-ассоцианты обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным и сапрофитическим грибам, присутствующим на поверхности побегов яблонь.

Структура и объём работы. Работа изложена на 60 страницах, включает введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 6 таблицами и 11 рисунками. Список использованных источников включает 128 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о нормальной микрофлоре побегов яблонь, фитопатогенных микроорганизмах, поражающих яблони, факторах фитопатогенности микроорганизмов, использовании микроорганизмов для защиты растений от фитопатогенов.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о структуре микробных ассоциаций побегов яблонь, наличия у бактерий-ассоциантов факторов фитопатогенности, антагонистической активности по отношению к фитопатогенным и сапрофитическим видам грибов.

Бактерии-ассоцианты побегов яблонь относились к 18 видам 8 родов. Большая часть изолятов относилась к семейству Bacillaceae (10 видов). Семейства Staphylococcaceae и Enterobacteriaceae были представлены менее разнообразно: в нашей выборке присутствовало по 3 вида каждого из этих семейств. Среди исследованных штаммов было также по 1 представителю семейств Microbacteriaceae и Listeriaceae.

Соотношение представителей различных семейств в выборке штаммов, изолированных с поверхности и из внутренних тканей поражённых побегов яблонь было примерно одинаковое. Единственное отличие состояло в том, что с поверхности был выделен представитель семейства Microbacteriaceae, а из внутренних тканей – представитель семейства Listeriaceae.

Таким образом, в видовом отношении выборки бактериальных изолятов с поверхности и из внутренней среды побегов яблонь отличались мало.

Учитывая, что в последнее время многие виды, ранее считавшиеся сапрофитическими, переходят в разряд условно-патогенных, представляло

интерес исследовать штаммы бактерий-ассоциантов побегов яблонь на наличие у них факторов фитопатогенности.

У бактерий-ассоциантов поверхности побегов целлюлолитическая активность была выявлена только у 1 штамма - *B. amyloliquefaciens* 140. При исследовании мацерирующей активности 1 штамм – *Serratia proteamaculans* 173 – давал положительную реакцию на всех использованных тест-растениях. *B. amyloliquefacien* 188 мацерировал ткани картофеля и моркови, *B. pumilus* 172 – ткани картофеля и свёклы, *B. amyloliquefaciens* 140 – только ткани картофеля.

Среди штаммов бактерий-ассоциантов внутренних тканей побегов бактерий с целлюлолитической активностью выявлено не было. Способность к мацерации тканей картофеля и свёклы была выявлена у *Bacillus coagulans* 182 и *B. drentensis* 49. Три штамма (*B. megaterium* 110, *B. methylotrophicus* 99, *B. subtilis* 181) мацерировали только ткани картофеля. Также как и у ассоциантов поверхности побегов, все изоляты с факторами фитопатогенности относились к роду *Bacillus*.

Таким образом, среди штаммов бактерий-ассоциантов не было обнаружено ни одного штамма, обладающего всеми выявляемыми факторами фитопатогенности. Большая часть штаммов, обладающих единичными факторами фитопатогенности, относилась к роду *Bacillus*.

Была проведена оценка способности штаммов с целлюлолитической и пектолитической активностью вызывать какие-либо патологические изменения в тканях листьев яблонь *in vivo*. Введение в надрез жилки взвесей в концентрации 10^9 м.к./мл не приводило к видимым патологиям растительных тканей. Через неделю в месте надреза наблюдалась незначительная зона некроза, не отличающаяся от контроля (введение

стерильного физраствора). Через месяц наблюдений никаких дополнительных патологий на листовых пластинках не наблюдалось.

На поражённых побегах постоянно присутствуют бактерии, обладающие антагонистической активностью по отношению к паразитирующим там видам грибов. Такие свойства были выявлены у 78,9% эпифитных штаммов, и 78,6% эндофитных штаммов. 80,8% изолятов с антагонистической активностью являлись представителями рода *Bacillus*. Среди бактерий, выделенных с поверхности побегов наиболее широким спектром фунгицидной активности обладали *B. methylotrophicus* 63, который подавлял рост четырёх из пяти тестируемых грибов, *B. amyloliquefaciens* 95, *B. amyloliquefaciens* 188, *B. funiculus* 79, *B. methylotrophicus* 112, *B. methylotrophicus* 170, *B. subtilis* 66, *B. subtilis* 187, которые задерживали рост трёх видов грибов, в том числе двух видов (*A. alternata* и *F. equiseti*), доминирующих на поверхности поражённых побегов. Наиболее активные антагонисты являлись представителями трёх видов: *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* и *B. subtilis*.

Наиболее чувствительными к воздействию бактерий-антагонистов оказались грибы-доминанты *A. alternata* (их рост подавляли 52,6% бактериальных изолятов), *F. equiseti* (73,7%), *F. tricinctum* (52,6%). Практически не чувствительными к воздействию исследованных штаммов бактерий оказались грибы *As. tubiengensis* и *P. fungicola*, которые на поверхности поражённых побегов также встречались редко.

Среди бактерий, изолированных из внутренних тканей поражённых побегов, наиболее широким спектром фунгицидной активности обладали *B. methylotrophicus* 78 подавлявший рост четырёх видов грибов и *B. subtilis* 137, который задерживал размножение трёх видов грибов, в том числе обоих доминирующих видов. Наиболее чувствительными к действию эндофитов

побегов яблонь оказались *F. equiseti* (его рост подавляли 57,1% бактериальных изолятов), в меньшей степени *As. tubiengensis* (35,7%), *A. alternata* (28,6%) и *F. tricinctum* (28,6%).

Большинство грибов оказались более чувствительны к воздействию микроорганизмов, обитающих на поверхности повреждённых побегов. Исключение составил *As. tubiengensis*, на который практически не влияли представители эпифитной бактериальной микрофлоры, но который был чувствителен к воздействию многих эндофитов. *P. fungicola* оказался в равной степени устойчив к действию и эпифитных, и эндофитных бактерий. Наиболее высокую чувствительность к воздействию как эндофитных, так и эпифитных бактерий показал один из доминирующих видов – *F. equiseti*. Второй грибковый доминант оказался умеренно чувствительным к воздействию бактериальной микрофлоры.

Однако антагонистическая активность бактерий может проявляться не только в отношении фитопатогенных грибов, но и в отношении сапрофитических грибов, участвующих в колонизационной резистентности растений. С поверхности побегов яблонь с признаками поражения микозами был выделен сапрофитический гриб *Trichoderma harziaum*. По литературным данным некоторые штаммы этого вида обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Cladosporium* и *Alternaria* [5]. Наши исследования показали, что бактерии-ассоцианты могут активно подавлять рост и этого гриба. Антагонистическую активность в отношении *Trichoderma harziaum* проявили 47,4% эпифитных и 21,4% эндофитных штаммов.

Таким образом, фунгистатическая и фунгицидная активность бактерий-ассоциантов может играть неоднозначную роль в жизни растения-хозяина. Подавляя развитие фитопатогенных грибов, они участвуют в

колониционной резистентности, а подавляя сапрофитические грибы, напротив, ослабляют колониционную резистентность растения.

ВЫВОДЫ

1. Исследованная выборка штаммов бактерий-ассоциантов побегов яблонь включала представителей семейств Bacillaceae (10 видов), Staphylococcaceae (3 вида), Enterobacteriaceae (3 вида), Microbacteriaceae (1 вид) и Listeriaceae (1 вид).

2. Целлюлолитической активностью обладали 5,3% штаммов эпифитных бактерий-ассоциантов, пектолитической активностью – 21,1% эпифитных и 35,7% эндофитных штаммов.

3. Присутствие на поверхности или во внутренних тканях яблонь ассоциативных бактерий с факторами фитопатогенности не вызывало каких-либо патологических изменений в растительном организме.

4. Антагонистическая активность по отношению к фитопатогенным грибам выявлена у 78,9% эпифитных и 78,6% эндофитных штаммов. Антагонистическую активность в отношении сапрофитического гриба *Trichoderma harziaum*, участвующего в колониционной резистентности растений, проявили 47,4% эпифитных и 21,4% эндофитных штаммов. Наиболее активные антагонисты являлись представителями трёх видов: *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* и *B. subtilis*.

Список использованных источников

1. Барсукова, О. Н. Изучение устойчивости коллекции яблони к заболеваниям / О. Н. Барсукова // Фитопатология. 2013. № 5. С. 388-392.

2. Абакова, А. С. Главнейшие болезни плодово-ягодных культур в Приморском крае и меры борьбы с ними / А. С. Абакова. Владивосток: Приморское изд-во, 2016. 143 с.

3. Заикина И. А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений / Дисс. канд. биол. наук // Ставрополь, 2008. 150 с.

4. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.- метод. комплекс для студентов / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин // Минск: БГУ, 2006. 116 с.

5. Viterbo, A. Mycoparasitism. In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi / A. Viterbo, B. A. Horwitz, K. A. Borkovich, D. J. Ebbole // American Society for Microbiology. 2010. Vol. 42. P. 676-693.