

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

**МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ БЕЛОКРЫЛКИ ОРАНЖЕРЕЙНОЙ
(*TRIALEURODES VAPORARIORUM* WESTWOOD, 1856),
ПАЗАТИРУЮЩЕЙ НА ОВОЩНЫХ КУЛЬТУРАХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Борисенко Натали Викторовны

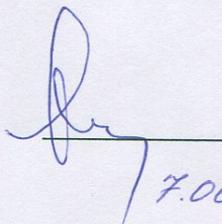
Научный руководитель
доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к.б.н., доцент



А.М. Петерсон

7.06.18

Зав. кафедрой микробиологии
и физиологии растений, д.б.н., профессор



С.А. Степанов

7.06.18

Саратов 2018

Введение

Овощеводство является существенной частью агрокомплекса Российской Федерации. Особенно актуальна эта отрасль сельского хозяйства в Саратовской области [1]. Существенный урон овощным культурам наносят белокрылки. Из овощных культур эти вредители больше всего повреждают растения с рыхлыми (крупноклеточными) тканями: томаты, огурцы, кабачки и многие другие растения. Эти сосущие насекомые также являются известными переносчиками вирусных инфекций растений. В организме насекомых фитопатоген сталкивается с компонентами его нормальной микрофлоры, которая в значительной степени определяет возможность его сохранения и размножения в организме переносчика. Микрофлора оранжерейной белокрылки, паразитирующей на овощных культурах, до настоящего времени остаётся практически неизученной.

Цель и задачи исследования. В связи с этим, целью данной работы явилось изучение микробной ассоциации белокрылки оранжерейной (*Trialeurodes vaporariorum*) в Саратовской области. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Выявить структуру микробной ассоциации белокрылки оранжерейной.
2. Изучить динамику микробной ассоциации *Trialeurodes vaporariorum* в разные годы и в разные периоды вегетационного сезона.
3. Установить влияние микрофлоры кормовых растений на структуру микробной ассоциации белокрылки оранжерейной.
4. Изучить биологические свойства микроорганизмов-ассоциантов.
5. Изучить антагонистическую активность бактерий-ассоциантов по отношению к фитопатогенным грибам, поражающим кормовые растения этих насекомых.

Материал и методы исследований. Материалом для микробиологических исследований послужили особи белокрылки оранжерейной (*Trialeurodes vaporariorum*), собранные с различных кормовых растений в открытом грунте в черте г. Энгельса. Всего было исследовано 500 особей. Насекомые исследовались в летний (июнь) и в осенний период (сентябрь). Была изучена микробная ассоциация 10 растений огурца, баклажана и кабачка, с которых отбирались белокрылки для микробиологических исследований.

Методы исследований. Выделение чистых культур микроорганизмов проводили согласно стандартной методике. При изучении выделенных культур определяли их культуральные, морфологические и биохимические свойства. Идентификацию выделенных ассоциантов проводили по определителям [2, 3]. Для определения антагонистической активности культуры бактерий засекали газоном на ГРМ-агар, культивировали при +28 °С в течение двух суток. Культуры грибов засекали аналогичным образом на среду PDA, культивировали при +28 °С в течение пяти суток. Затем из полученных газонов вырезали диски диаметром 5 мм и накладывали их на чашку Петри со средой PDA. На каждую чашку накладывали один диск с культурой бактерии-антагониста и один диск с культурой тестируемого гриба. Чашки с дисками культивировали при +28 °С в течение семи суток. Микробные взаимодействия оценивали по наличию зоны ингибирования роста гриба [4].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Статистика 6.0. При анализе количественных показателей рассчитывали медиану и межквартильный размах.

Структура и объем работы. Диплом изложен на 50 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа включает 8 рисунков и 15 таблиц. Список использованных источников включает в себя 50 наименований.

Основное содержание работы

В результате микробиологических исследований были выделены 31 вид бактерий 16 родов и 4 вида грибов.

Грамположительные бактерии, входящие в состав исследованной микробной ассоциации, являлись представителями филумов Actinobacteria (семейства Dermacossaceae, Microbacteriaceae, Microcossaceae, Nocardiodaceae) и Firmicutes (семейства Bacillaceae, Listeriaceae, Planocossaceae, Staphylocossaceae). Все изолированные грамотрицательные бактерии принадлежали к филуму Proteobacteria (семейства Comamonadaceae, Enterobacteriaceae и Xanthomonadaceae) [6].

Грибы, изолированные из белокрылки оранжерейной, относились к филуму Ascomycota, семействам Pleosporaceae, Nectriaceae, Trichosomaceae и Dematiaceae.

В течение двух лет из насекомых стабильно изолировались бактерии *Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *E. nimipressuralis*, *M. lacticum*, *P. facilis*, *S. ficaria* и грибы *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium oxysporum*. Следует отметить, что все перечисленные бактериальные виды в течение двух сезонов имели и высокие количественные показатели, что позволяет считать их наиболее типичными представителями микробных ассоциаций белокрылок оранжерейных. Что касается грибных изолятов, то в течение двух летних периодов их встречаемость и количественные показатели присутствия в организмах насекомых были относительно низкими (встречаемость не более 20%, содержание в пробах 10^3 КОЕ).

Важной отличительной особенностью микробоценозов белокрылок в осенний период является резкое увеличение видового разнообразия и количественных показателей грибов. Увеличивается встречаемость грибов, которые присутствовали и в летний период, и дополнительно появляются виды (*Stachybotrys altmans*, *Ulocladium conidiophores*), которые не изолировались летом.

Во время питания белокрылки контактируют как с поверхностью, так и с внутренней средой кормового растения. Мы сравнили микробные ассоциации поверхности и внутренней среды трёх кормовых растений, наиболее активно посещаемых белокрылками: огурца, кабачка и баклажана.

Самым ярким отличием микробоценозов этих двух биотопов оказалось существенное преобладание грибов на поверхности всех кормовых растений. Следует отметить, что микробные ассоциации всех трёх исследованных кормовых растений были очень схожи, на всех растениях массово присутствовали *B. subtilis* и *Erwinia uredovora*. На наиболее близких в таксономическом отношении огурце и кабачке обнаруживались *Erwinia carotovora*, *Pantoea dispersa*, *S. ficaria*. Независимо от вида кормовых растений, на которых питаются насекомые, из их организмов выделяются бактерии *B. halodurans*, *B. subtilis*, *E. nimipressuralis*, *M. lacticum*, *S. ficaria* и грибы *A. tubingensis*, *F. oxysporum*, что позволяет говорить о них как о наиболее типичных ассоциантах белокрылки оранжевой. Индексы общности микробоценозов белокрылок, питающихся на разных растениях составил от 19,4 до 22,6%.

Белокрылка питается клеточным соком. Состав его достаточно специфичен практически для каждого вида. Из-за высоких концентраций углеводов белокрылки подвергаются постоянному осмотическому стрессу. Дополнительным осморегуляторным механизмом может служить способность бактериальных ассоциантов к использованию сахаров в качестве источника углерода и энергии [5]. Действительно, 78% штаммов были способны использовать те или иные углеводы.

Важным ресурсом-ограничителем для любого биологического вида является азот. Наши исследования впервые показали, что в организме белокрылки оранжевой присутствует большое количество азотфиксирующих бактерий. Способностью к фиксации молекулярного азота обладали от 76,2% изолятов.

Известно, что в пищеварительном канале растительноядных насекомых поддерживается щелочная реакция среды. Поэтому, алкалотолерантные микроорганизмы лучше всего приспособлены к подобным условиям. Действительно, 97,7% исследованных штаммов оказались способны к росту при pH10.

В ходе проведённых исследований из организмов белокрылки оранжерейной нами впервые были выделены фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus tubingensis*. Однако в организмах этих насекомых данные фитопатогены встречались в незначительном количестве. Одной из причин, вероятно, является щелочная реакция среды пищеварительного тракта растительноядных насекомых. Помимо этого, на размножение фитопатогенных грибов в организмах белокрылок могут влиять их ассоциативные бактерии, среди которых лидирующее положение занимают представители рода *Bacillus*. Уже на первичных посевах обнаруживались колонии бактерий, которые подавляли развитие грибов. Нами было выделено 10 таких изолятов. Все они были отнесены к роду *Bacillus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что микробная ассоциация белокрылки оранжерейной включает 31 вид бактерий 16 родов. Большая часть выделенных бактерий и грибов – это широко распространённые обитатели окружающей среды. При сравнении микробных ассоциаций белокрылок оранжерейных из одной и той же популяции в летние периоды 2016 и 2017 годов, а также в летний и осенний период 2017 года были выделены наиболее типичные представители микроорганизмов-ассоциантов: бактерии *B. halodurans*, *B. subtilis*, *E. nimipressuralis*, *M. lacticum*, *P. facilis*, *S. Ficaria* и грибы *A. tubingensis*, *F. oxysporum*. Эти же виды выделялись из белокрылок, питающихся на различных кормовых растениях в пределах одного и того же агроценоза.

Бактерии, которые используют организм насекомого в качестве среды обитания, должны быть способны к адаптации в специфических условиях внутренней среды хозяина. При изучении биологических свойств бактерий – ассоциантов белокрылки оранжерейной, было установлено, что 78% штаммов были способны использовать те или иные углеводы, 76,2% способны к фиксации молекулярного азота, 97,7% проявляли рост при pH 10 и 100% обладали протеолитической активностью. Таким образом, часть бактерий, попавших в организм белокрылки из окружающей среды неизбежно погибнет, а часть сможет адаптироваться к этой специфической экологической нише.

В ходе проведённых исследований из организмов белокрылки оранжерейной нами впервые были выделены фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus tubingensis*. Размножению этих грибов в организмах белокрылок в значительной степени препятствуют ассоциативные бактерии рода *Bacillus*, обладающие по отношению к ним высокой фунгицидной активностью. Таким образом, нормальная микрофлора будет оказывать существенное влияние на сохранение фитопатогенных грибов в организмах белокрылок.

ВЫВОДЫ

1. Микробная ассоциация белокрылки оранжерейной в Саратовской области включает 31 вид бактерий 16 родов и 5 видов грибов. Наиболее разнообразно представлены роды *Bacillus* (11 видов), *Microbacterium*, *Staphylococcus* (по 3 вида).

2. Впервые установлено, что белокрылка оранжерейная способна сохранять в своем организме фитопатогенные бактерии *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* и фитопатогенные грибы *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium oxysporum*.

3. Выявлен комплекс видов бактерий (*Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Microbacterium lacticum*, *Serratia ficaria*) и

грибов (*Aspergillus tubingensis*, *Fusarium oxysporum*), которые стабильно доминируют в микробной ассоциации белокрылки оранжевой в разные годы и в разные периоды вегетационного сезона.

4. Индекс общности видового состава микрофлоры кормовых растений и питающихся на них *Trialeurodes vaporariorum* варьировал от 9,1% до 25%.

5. Большая часть бактерий-ассоциантов белокрылки оранжевой были способные активно использовать белки (100%); сахара: глюкозу (64,3%), сахарозу (50%) и фруктозу (69%). 76,2 % штаммов были способны к фиксации молекулярного азота, 73,8% использовали нитраты.

6. Микроорганизмы-ассоцианты были активны в широком диапазоне физико-химических факторов среды: 69,5% штаммов были активны при 10 °С, 21,4% – при 43° С. Большая часть изолятов (97,7%) были алкалотолерантными, 57,2% - ацидофильными.

7. В микробной ассоциации белокрылки оранжевой были выявлены бактерии рода *Bacillus*, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus tubingensis*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ганичкина, О. А. Все о томатах и огурцах / О. А. Ганичкина. М.: Э, 2016. 16-17 с.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. USA.: Springer, 2007. Vol. 2. 1136 p.
3. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса: В 2 т. М.: Мир, 1997. Т. 2. 368 с.
4. Lahlali, R. Isolation and evaluation of bacteria and fungi as biological control agents / R. Lahlali, M. Bajii, M.H. Jijakli // Communications in agricultural and applied biological sciences. 2007. Vol. 72. P. 973–982.
5. 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, Douglas A.E. // Journal of Insect Physiology. 2000. Vol. 46. №3. P. 335–341.
6. Garrity, G. M. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition/ G. M. Garrity, J. A. Bell, T. G. Lilburn. USA.: Springer, 2004. 399 p.

Gleef