

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 МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ ГРИБА
ALTERNARIA ALTERNATA – ВОЗБУДИТЕЛЯ АЛЬТЕРНАРИОЗА ЯБЛОНЬ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

направления подготовки магистратуры 06.04.01 Общая биология

биологического факультета

Ткаченко Галины Сергеевны

Научный руководитель

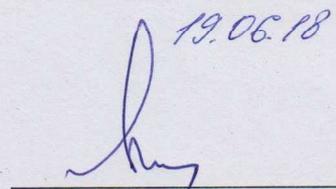
к.б.н., доцент



А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор



19.06.18

С. А. Степанов

19.06.18

Саратов 2018

Актуальность темы. Яблоня является одним из самых важных сельскохозяйственных объектов. В плодах яблонь содержится множество необходимых для человека биологически активных веществ: витаминов, органических кислот, минеральных солей и пектинов [1]. Саратовская область издавна славится своими яблоневыми садами. Многие новые сорта, такие как Саратовский анис, Мальт Багаевский, Ртищевская красавица, Первенец Ртищева, Беркутовское были выведены в нашей области [2].

Одной из проблем, с которыми сталкиваются садоводы, является подверженность яблонь бактериальным и грибковым инфекциям [3].

В последние годы и профессиональные агрономы, и садоводы-любители отмечают появление в садах деревьев с растрескавшейся и как бы обуглившейся корой. Согласно литературным данным такая клиническая картина может наблюдаться при паразитировании на побегах различных видов грибов [4]. Какие виды вызывают данные патологии яблонь на территории Саратовской области, до недавнего времени было неизвестно.

Широкое распространение возбудителей болезней яблонь делает необходимым комплекс мероприятий по защите садов от фитопатогенов. В настоящее время ведущее место в агрономической практике занимает химический метод [5]. С химическими методами защиты может успешно конкурировать биологический метод, который лишён многих их недостатков. Сравнительно новым направлением в развитии биоконтроля является применение биопрепаратов на основе активных штаммов-антагонистов при выращивании и хранении растительной продукции [6]. В нашей стране проводились исследования по применению биологических средств защиты от инфекционных заболеваний при выращивании и хранении яблок, таких как «Здоровый сад», «Экстрасол», «Триходермин», «Планриз», «Алирин Б» и др. [7]. Однако имеющийся набор биопрепаратов не позволяет полностью защитить деревья от фитопатогенов, и это делает актуальным поиск новых, более эффективных бактерий-антагонистов.

В связи с этим, целью данной работы стало выявление доминантов микокомплекса побегов яблонь с признаками микозного усыхания в Саратовской области, и разработка биологических средств контроля их численности. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить виды грибов, доминирующие на поражённых побегах яблонь.
2. Установить способность доминирующих видов сохраняться на поражённых побегах в межвегетационные периоды.
3. Изучить антагонистическую активность бактерий-ассоциантов побегов яблонь в отношении выделенного комплекса фитопатогенных грибов.
4. Выявить наличие у бактерий-ассоциантов факторов патогенности и фитопатогенности.
5. Изучить фунгицидную активность исследуемых штаммов ассоциативных бактерий по отношению к грибу *Alternaria alternata in planto*.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в 2015-2018 годах на базе кафедры микробиологии и физиологии растений. Материалом послужили 500 побегов яблонь сортов Беркутовское, Уэлси и Голден Делишес с признаками поражения микозами: растрескиванием и почернением коры. Материал отбирали в Саратовском, Энгельском, Аткарском, Базарно-Карабулакском, Пугачевском, Дергаческом и Перелюбском районах Саратовской области. В работе были использованы штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* №94, *B. pumilus* №171, *B. methylotrophicus* №77, *B. halotolerans* №87, выделенные в ходе предыдущих исследований. Видовая принадлежность штаммов подтверждена выявлением видоспецифичных участков 16S рРНК методом ПЦР в институте фармацевтической биологии и биотехнологии (г. Дюсельдорф, Германия).

Выделение грибов с поверхности побегов осуществляли методом отпечатка на среду PDA. Посевы на PDA культивировались в течение 5-7 суток при 28°C. Для идентификации выделенных грибов были изучены их

морфологические и культуральные свойства (цвет и запах колоний, строение спорангий, конидий, конидиеносцев). 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).

Выявление антагонистической активности бактерий по отношению к фитопатогенным грибам осуществляли методом агаровых блоков. В случае антагонизма бактерий рост культуры грибов затормаживался или прекращался совсем.

У бактерий-антагонистов выявляли лецитиназную, плазмокоагулазную, гемолитическую, целлюлолитическую и пектолитическую активность, ставили биопробы на листьях яблони *in vivo*.

Фунгицидная активность бактерий-антагонистов по отношению к грибу *Alternaria alternata* была изучена *in planto*. На опытные побеги наносили взвесь пятисуточной культуры гриба и взвесь антагониста в концентрации 5×10^6 м.к./мл. Контролем служили побеги, обработанные только взвесью пятисуточной культуры гриба *A. alternata*. Смыв с поверхностей опытных и контрольных побегов проводили через 1 месяц и 7 месяцев после нанесения взвесей штаммов гриба и антагонистов. Все эксперименты проводили в трёх повторностях.

Структура и объём работы. Работа изложена на 66 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 12 таблицами и 19 рисунками. Список использованных источников включает 81 наименование.

Научная новизна. Впервые исследован микокомплекс побегов яблонь с признаками микозного усыхания, впервые изучена его динамика в течение года. Впервые показано антагонистическое влияние бактерий-ассоциантов побегов яблонь на доминирующие виды фитопатогенных грибов и изучена

фунгицидная активность штаммов по отношению к грибу *Alternaria alternata* *in planto*.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления об использовании бактерий-антагонистов в качестве фунгицидного агента. Выявленная активность изученных штаммов позволит создавать более эффективные антигрибковые препараты на их основе.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выявление микокомплекса побегов яблонь с признаками микозного усыхания с доминированием гриба *Alternaria alternata*.
2. Изучение фунгицидной активности штаммов-ассоциантов побегов яблонь по отношению к грибу *Alternaria alternata*.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о развитии представлений об инфекционных заболеваниях растений, сапрофитных, условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмах, ассоциированных с растениями, о фитопатогенных микроорганизмах, поражающих побеги яблонь, о характеристике гриба *Alternaria alternata* как возбудителя альтернариозов яблонь, о микроорганизмах, используемых для борьбы с возбудителями болезней растений, о механизмах антагонистического действия.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о выделенном микокомплексе побегов яблонь с признаками микозного усыхания. Всего с поверхности побегов яблонь с признаками поражения микозами было выделено 552 штамма грибов 13 видов, из которых 9 относится к фитопатогенам. Среди них *Alternaria alternata* – возбудитель альтернариоза яблонь, *Aspergillus tubiengensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus* – возбудители аспергиллеза, *Cladosporium sp.* – возбудитель кладоспориозов, *Fusarium incarnatum-equiseti* – возбудитель фузариозов. Наиболее высокая

встречаемость была отмечена у гриба *Alternaria alternata* – 83%. В разных районах области показатели встречаемости этого вида варьировали от 65 до 100%. Остальные таксоны грибов изолировались реже.

Было изолировано также 4 вида сапрофитических грибов: *Rhizopus sp.*, *Saccharomices sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* Встречаемость сапрофитных видов сильно варьировала в разных районах. Так, в Дергачевском районе *Rhizopus sp.* встречался во всех взятых пробах, в то время как в остальных либо не встречался вовсе, либо в единичных пробах. Аналогичная ситуация наблюдалась и с остальными сапрофитами.

Таким образом, можно предположить, что основной причиной наблюдаемых повреждений побегов яблонь является гриб *A. alternata*. Остальные виды выделенных фитопатогенных грибов могут осложнять клиническую картину заболевания, но при их отсутствии на поверхности побега внешние проявления микоза сохраняются при наличии на побегах *A. alternata*.

Все предыдущие исследования проводились в летний период. Поэтому на следующем этапе работы представляло интерес выяснить, сохраняются ли выявленные нами доминирующие грибы на поверхности поражённых деревьев в межвегетационные периоды. Модельными объектами послужили поражённые деревья сорта Уэлси из садов Саратовского ОПХ. В течение года ежемесячно исследовалось по 10 деревьев.

В результате проведенных исследований выяснилось, что поверхность яблонь обсеменена разнообразными видами грибов и в зимний период. В течение всего года изолировались грибы родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*. Остальные роды грибов (*Cladosporium*, *Trichoderma*) встречались лишь в определённые периоды года. На поверхности побегов Уэлси стабильно сохранял доминирующее положение *A. alternata*.

Таким образом, основной доминирующий вид сохранялся на поверхности поражённых побегов яблонь стабильно в течение года. Для большинства грибов было характерно повышение встречаемости и

количественных показателей присутствия на поражённых побегах в летне-осенний период.

В зимний период также были выделены штаммы бактерий, проявивших антагонизм по отношению к грибной микрофлоре.

При изучении антагонистической активности бактерий-ассоциантов побегов яблонь установлено, что они подавляют рост многих выделенных нами фитопатогенных грибов.

Так, *Bacillus amyloliquefaciens* №77 подавлял рост *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*.

Brevibacterium halotolerans №87 проявлял антагонистическую активность по отношению к *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Fusarium incarnatum-equiseti*.

Bacillus methyloprophicus №94 задерживал рост *Alternaria alternate*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*.

Bacillus pumilus №171 проявлял антагонистическую активность по отношению к *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*.

Таким образом, все исследованные нами штаммы бактерий-ассоциантов проявили активность по отношению к 5-6 видам выделенных фитопатогенных грибов.

Особый интерес представляло подавление роста доминирующего вида гриба *A. alternata*. активность этого вида подавляли *Bacillus amyloliquefaciens* №77, *Bacillus methyloprophicus* №94, *Bacillus pumilus* №171 и *Brevibacterium halotolerans* №87.

Подавление роста грибов происходило либо за счет более быстрого захвата среды, либо за счет выделения метаболитов с фунгицидным эффектом.

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.

При исследовании факторов патогенности у бактерий-антагонистов выяснилось, что лецитиназной и плазмокоагулазной активностью данные штаммы не обладали, гемолитической активностью обладали штаммы *Bacillus methyloprophicus* №94 и *Bacillus pumilus* №171.

При определении факторов фитопатогенности установлено, что способностью к мацерации растительных тканей обладали штаммы *Bacillus pumilus* №171, *Bacillus amyloliquefaciens* №77 и *Brevibacterium halotolerans* №87; штамм *Bacillus methyloprophicus* №94 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.

Для изучения фунгицидной активности штаммов по отношению к грибу *Alternaria alternata in planto* на пораженные побеги были нанесены взвеси бактерий – антагонистов. Через месяц после обработки были отмечены кардинальные изменения в микробной обсемененности опытных побегов, которые касались преимущественно количественного содержания грибов.

Нас, прежде всего, интересовала возможность подавления исследуемыми антагонистами активности гриба *A. alternata*. Оказалось, что количественное содержание грибов этого вида на пораженных побегах уменьшилось при обработке *Bacillus amyloliquefaciens* №77 на 96 %, *Bacillus methyloprophicus* №94 – на 95 %, *Bacillus pumilus* №171 – на 97 %,

Brevibacterium halotolerans №87 – на 92 %. Достоверно значимых изменений численности гриба на контрольных побегах не происходило.

Учитывая, что период защитного действия химических фунгицидов колеблется от нескольких недель до нескольких месяцев, представляло интерес проследить, насколько продолжительно будет защитное действие нанесенных нами антагонистов. Для выяснения этого были проведены контрольные смывы с побегов, обработанных *Bacillus amyloliquefaciens* №77 через 7 месяцев после нанесения взвесей бактерий.

Оказалось, что даже через такой большой промежуток времени антагонист продолжал оказывать защитное действие, и количество колоний в смывах с обработанных 7 месяцев назад побегов было значительно меньше, чем в контрольных смывах с необработанных побегов на тех же деревьях. Среднее количество колоний *A. alternata* на обработанных побегах составило $1,6 \pm 0,5$, а на необработанных побегах - 30 ± 5 .

Таким образом, в результате проведенных исследований была выявлена антагонистическая активность штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* №77, *Brevibacterium halotolerans* №87, *Bacillus pumilis* №171, *Bacillus methyloprophicus* №94 по отношению к грибу *Alternaria alternata in planto*.

ВЫВОДЫ

1. На побегах яблонь с признаками микозного усыхания (растрескивание и почернение коры) выявлен комплекс фитопатогенных грибов, в котором доминировал *Alternaria alternata*. В качестве сопутствующих видов встречались грибы *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubiengensis*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Ulocladium sp.*

2. В межвегетационный период также изолировались грибы родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*. Доминирующее положение в течение всего года сохранял гриб *Alternaria alternata* – возбудитель альтернариоза яблонь.

3. Бактерии-ассоцианты побегов яблонь проявили антагонистическую активность по отношению к выделенным доминантам фитопатогенных грибов. Рост доминирующих на побегах видов *Alternaria alternata* подавляли штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* №77, *Bacillus methyloprophicus* №94, *Bacillus pumilus* №171 и *Brevibacterium halotolerans* №87.

4. Все исследованные штаммы бактерий-антагонистов не обладали целлюлолитической активностью, штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* №77, *Bacillus pumilus* №171, *Brevibacterium halotolerans* №87 обладали способностью к мацерации растительных тканей. При нанесении бактерий-антагонистов на листовые пластинки яблонь ни один из штаммов не оказал на растения негативного воздействия. Штаммы бактерий-антагонистов не обладали лецитиназной и плазмокоагулазной активностью, штаммы *Bacillus pumilus* №171 и *Bacillus methyloprophicus* №94 были способны гемолизировать эритроциты.

5. Фунгицидная активность штаммов по отношению к грибу *Alternaria alternata in planto* уже через месяц после обработки кардинально изменяет количественное содержание грибов на пораженных побегах. Содержание доминанта микокомплекса – гриба *A. alternata* – на пораженных побегах

уменьшилось при обработке *Bacillus amyloliquefaciens* №77 на 96 %, *Bacillus methyloprophicus* №94 – 95 %, *Bacillus pumilis* №171 – 97 %, *Brevibacterium halotolerans* №87 – 92 %.

6. Через 7 месяцев после нанесения взвесей бактерий, антагонист *Bacillus amyloliquefaciens* №77 продолжал оказывать защитное действие, значительно снижая количественное содержание гриба *Alternaria alternata* – возбудителя альтернариоза яблонь.

Список использованных источников

1. Фатьянов, В.И Яблоня/ В.И.Фатьянов. М: Вече, 2005. 70 с.
2. Кондратьева, Г.В. Новые сорта яблони саратовской селекции для Нижнего Поволжья/ Г.В. Кондратьева, И.К. Сорокина// Проблемы агроэкологии и адаптивность сортов в современном садоводстве России. Конференция, НПП «Опытная станция садоводства», г. Саратов. 2008г.
3. URL: www.moyadacha.temaretik.com (дата обращения: 21.12.2017 г.)
4. Муханин, И.В. Интегрированная защита яблоневых садов от болезней/ И.В. Муханин, Ю.А. Жолобицкая// Научные основы садоводства: Труды Всероссийского научно-исследовательского института садоводства им. И.В. Мичурина. Мичуринск, 2005. С. 207-221.
5. 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.
6. Слепченко, Л.Г. Учебное пособие для студентов по специальностям: 1740205 «Агрохимия и почвоведение» и 1740201 «Агрономия» / Л.Г. Слепченко. Гродно: Аверсэв, 2006. С. 26.
7. URL: [http:// biopreparaty.ru/ dlya-sada-ogoroda](http://biopreparaty.ru/dlya-sada-ogoroda) (дата обращения: 10.02.2018 г.)

Ткаченко