

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО"

Кафедра микробиологии и физиологии растений

МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ
БАХЧЕВОЙ ТЛИ (*APHIS GOSSYPII* GLOVER, 1877),
ПАРАЗИТИРУЮЩЕЙ НА РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА ОБЫКНОВЕННОГО
НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата

06.03.01 Биология

Биологического факультета

Шьуровой Арины Александровны

Научный руководитель:

кандидат биол. наук, доцент _____ А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Тли являются широко распространёнными вредителями многих сельскохозяйственных растений. Помимо того, что питание этих насекомых ослабляет растение и снижает тем самым его урожайность, тли являются переносчиками многих фитопатогенных микроорганизмов. В литературе большое внимание уделяется роли тлей как переносчиков фитопатогенных вирусов. Среди возбудителей бактериозов растений лишь для *Pseudomonas syringae* [1], *Dickeya dadantii*, *Erwinia aphidicola*, *Pantoea stewartii* [2] доказана способность выживать и размножаться в организмах этих насекомых. Детальное изучение спонтанной микробной обсеменённости тлей поможет выявить более широкий спектр фитопатогенов, способных сохраняться в организмах этих вредителей.

Из сапрофитических бактерий до настоящего времени внимание исследователей привлекали, в основном, облигатные симбионты тлей – бактерии рода *Buchnera* [3]. Из факультативных бактериальных симбионтов тлей в мировой литературе описано лишь небольшое количество видов, ассоциированных с гороховой тлёй [4], относительно хорошо изучены факультативные симбионты тлей, паразитирующих на плодовых деревьях и кустарниках [5]. Присутствие этих симбионтов защищает их хозяев от наездников и энтомопатогенных грибов, придает насекомым защитную пигментацию, способствует синтезу некоторых аминокислот, улучшает азотное питание насекомых-хозяев.

Вопросы о том, насколько разнообразны микробные ассоцианты других видов тлей, откуда они попадают в организмы насекомых остаются открытыми.

На растениях огурца в условиях Саратовской области наибольший вред приносит бахчевая тля [6]. Однако сведения о видовом составе микробной ассоциации этих насекомых в литературе практически отсутствуют.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стало выявление микробной ассоциации бахчевой тли, паразитирующей на растениях огурца

обыкновенного на территории Саратовской области. Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Выявить видовой состав и количественные показатели микроорганизмов, обитающих во внутренней среде бахчевой тли, питающейся на растениях огурца.

3. Определить способность бахчевой тли сохранять в своём организме фитопатогенные бактерии и грибы.

4. Выявить взаимосвязь микрофлоры кормовых растений и паразитирующих на них тлей.

5. Установить взаимосвязь микрофлоры тлей и микрофлоры трофически связанных с ними муравьёв.

Материал и методы исследования. Материалом для микробиологических исследований послужили бескрылые самки тли, трофически связанные с ними муравьи и кормовые растения, собранные в агроценозе в черте г. Энгельса Саратовской области. Колонии тлей на листьях кормовых растений, муравьёв помещали в стеклянные контейнеры и доставляли в лабораторию в течение 1–3 ч. Видовая принадлежность насекомых определялась с помощью определителей [7, 8].

Всего было исследовано 200 особей бахчевой тли (*Aphis gossypii* Glov.), 20 рабочих особей черного садового муравья (*Lasius niger*) и 10 побегов кормового растения.

В микробиологических исследованиях насекомых и растений использовали питательные среды PDA (картофель – 200 г, глюкоза – 20 г, агар-агар – 15 г, вода – 1000 мл) и картофельную среду (картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, вода – 1000 мл). При изучении микрофлоры поверхностей растений и муравьёв проводили посев отпечатком, при изучении микробной обсеменённости внутренней среды использовали метод последовательных разведений. Все посеvy инкубировали при температуре +28°C в течение 3-х суток для выделения бактерий и 5–7 суток для выявления штаммов грибов. В дальнейшем проводился количественный учет выросших колоний

микроорганизмов и отсеб выделенных штаммов на скошенные питательные среды.

Далее были изучены морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенных штаммов бактерий. Идентификацию выделенных ассоциантов проводили по фенотипическим признакам. Для идентификации выделенных штаммов грибов были изучены их морфологические и культуральные свойства: строение мицелия, наличие полового способа размножения, особенности морфологии спор.

При статистической обработке полученных результатов рассчитывали индекс встречаемости, индекс общности видового состава (коэффициент Жаккарда). При оценке количественного содержания тех или иных микроорганизмов в пробах рассчитывали медиану и межквартильный размах. При статистической обработке результатов использовали программы Excel и Statistica 6.

Структура и объём работы. Работа изложена на 48 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 7 таблицами и 8 рисунками. Список использованных источников включает 71 наименование.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных об организме тлей как среде обитания микроорганизмов, симбиотических микроорганизмах тлей, фитопатогенных микроорганизмах, передаваемых тлями, видах тлей, паразитирующих на растениях огурца на территории Российской Федерации.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о микробных ассоциациях бахчевой тли, питающейся на растениях огурца в условиях Саратовской области, о факторах, влияющих на её формирование.

В результате проведенных исследований из организмов тлей было выделено 35 штаммов бактерий. Количественные показатели содержания бактерий в организмах тлей варьировали от 10^2 до 10^5 КОЕ в пробе.

Основная часть выделенных штаммов относилась к группе грамположительных споровых палочек. Пятая часть штаммов представляла собой грамотрицательные неспоровые палочки. В результате изучения фенотипических и генотипических свойств изолятов, выделенные штаммы бактерий были отнесены к 5 видам 2 родов.

При анализе общей структуры микробоценозов выявлено, что наиболее разнообразно в микробной ассоциации бахчевой тли представлен род *Bacillus* – 4 вида, род *Erwinia* включал одного представителя.

Среди грамположительных споровых палочек наиболее часто встречаемым видом оказался *B. soli*, часто из организма тли также выделялся *B. clausii*. *B. halodurans* и *B. psychrodurans* встречались в пробах значительно реже. Количественные показатели данных видов достигали 10^5 КОЕ в пробе.

Из грамотрицательных палочек встречался только один вид *Erwinia carotovora* (индекс встречаемости составил 10%). Количественные показатели этого вида варьировали в разных пробах от 10^2 до 10^4 КОЕ.

Таким образом, наиболее распространёнными ассоциантами бахчевой тли оказались *B. soli* и *B. clausii*, индексы встречаемости которых в организмах бахчевой тли составили выше 70%. Эти же виды были способны достигать высокой концентрации в организмах насекомых (до 10^5 КОЕ), что говорит о их хорошей адаптации к обитанию в организмах этих насекомых.

Помимо бактерий, из внутренней среды насекомых были выделены грибы *Fusarium sp.* и *Penicillium chrysogenum*, индексы встречаемости которых составили по 5%. Данные представители единично встречались в двух разных пробах.

Многие виды тли, в том числе и бахчевая тля, имеют тесные трофические связи с муравьями, которые постоянно посещают их колонии. В условиях Саратовской области в агроценозах наиболее часто с колониями

тлей контактируют чёрные садовые муравьи. Мы предположили, что эти два вида могут обмениваться своими факультативными ассоциантами бактериальной и грибной природы, а также фитопатогенными микроорганизмами. В связи с этим было проведено изучение микробных ассоциаций чёрных садовых муравьёв, отобранных на тех же кормовых растениях, что и изучаемые особи бахчевой тли.

В ходе исследований из организмов муравьёв было выделено 24 штамма бактерий. Количественные показатели содержания бактерий в организмах муравьёв варьировали: от 10^2 до 10^5 КОЕ в пробах внутренней среды, и от 10 до 10^3 КОЕ в пробах с внешних покровов. Выделенные бактерии были представлены грамотрицательными палочками и грамположительными споровыми палочками. В результате изучения фенотипических и генотипических свойств изолятов, выделенные штаммы бактерий были отнесены к 4 видам 2 родов.

При анализе общей структуры микробоценозов выявлено, что наиболее разнообразно в микробной ассоциации черного садового муравья представлен род *Bacillus* – 3 вида, род *Serratia* включал одного представителя.

Количественные показатели данных видов достигали 10^5 КОЕ в пробе. Среди грамположительных споровых палочек наиболее часто встречаемым видом оказался *B. soli*, часто из организмов муравьёв выделялся *B. psychrodurans*.

Из грамотрицательных палочек встречался только один вид – *Serratia plymuthica* (индекс встречаемости составил 40%). Количественные показатели этого вида варьировали в разных пробах от 10 до 10^5 КОЕ.

Таким образом, наиболее распространёнными ассоциантами муравьёв оказались *B. soli* и *B. psychrodurans*, индексы встречаемости которых составили свыше 60%. Данные виды были способны достигать высокой концентрации в организмах муравьёв (до 10^5 КОЕ), что говорит о их хорошей адаптации к обитанию в организмах этих насекомых.

Изолирован лишь один штамм грибов – *Fusarium sp.*, который находился во внутренней среде насекомых.

В процессе питания бахчевые тли неизбежно контактируют с кормовыми растениями, причём не только с поверхностью их побегов, но и с внутренними тканями во время питания флоэмным соком. Поэтому мы предположили, что на микрофлору тлей будет влиять пул микроорганизмов, обитающий на поверхности и во внутренних тканях их кормовых растений.

В результате проведенных исследований из кормовых растений было выделено 16 штаммов бактерий. Количественные показатели содержания бактерий варьировали от 1 до 10^5 КОЕ в пробе.

Более половины выделенных штаммов относились к группе грамположительных споровых палочек. Треть штаммов представляла собой грамотрицательные неспоровые палочки. В результате изучения фенотипических и генотипических свойств изолятов, выделенные штаммы бактерий были отнесены к 6 видам 3 родов.

При анализе общей структуры микробоценозов выявлено, что наиболее разнообразно в микробной ассоциации бахчевой тли представлен род *Bacillus* – 4 вида, род *Erwinia* и *Serratia* включали по одному представителю.

Среди грамположительных споровых палочек наиболее часто встречаемыми видами оказались *B. soli* и *B. clausii*. *B. halodurans* и *B. micoides* встречались в пробах реже. Количественные показатели данных видов не превышали 10^5 КОЕ в пробе.

Из грамотрицательных палочек выделены два вида: *Erwinia carotovora* и *Serratia plymthica*, который оказался наиболее встречаемым. Количественные показатели видов варьировали в разных пробах от 1 до 10^4 КОЕ. Индекс встречаемости данных представителей составил от 33% во внутренней среде растений до 67 и 100% на поверхностях соответственно.

Помимо бактерий, из внутренней среды *Cucumis sativus* были выделены 10 видов грибов родов: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Trichoderma*.

На одних и тех же кормовых растениях имелись здоровые листья и листья с пожелтением и зонами некроза, причём бахчевые тли питались на обоих вариантах листьев. При сравнении микробной обсеменённости здоровых и поражённых листьев выяснилось, что их бактериальная микрофлора не имела существенных различий, а в микокомплексах поражённых листовых пластинок значительно увеличилось содержание грибов, расширилось их видовое разнообразие.

Мы предположили, что существует взаимосвязь в системе передачи микроорганизмов, основанной на способах питания, факторах агрессивности внутренней среды и защитных функциях внешних покровов участников системы кормовое растение - тли – муравьи.

С поверхности растения микроорганизмы попадают во внутреннюю среду насекомых через ротовой аппарат при поиске места для прокола растительных покровов, из внутренней среды растений – через флоэмный сок, которым питаются тли. Пройдя пищеварительную систему тли, микроорганизмы могут вновь попадать во внешнюю среду с падями, которые используют в качестве источника углеродного питания муравьи. Вместе с падями муравьи могут получать и микроорганизмы, ассоциированные с тлями.

Однако, проведённый анализ показал, что далеко не все микроорганизмы, обитающие на кормовых растениях, способны проникать в организм бахчевой тли и далее размножаться там. Поверхность листа кормового растения имеет весьма разнообразную микрофлору. Во внутреннюю среду растения попадает значительно меньше микроорганизмов, а во внутренней среде насекомых успешно размножаются лишь единичные виды. Таким образом, микрофлора кормовых растений намного разнообразнее, чем микрофлора питающихся на них тлей.

Большее влияние на видовой состав микробоценоза тлей оказывает микробная ассоциация внутренней среды кормового растения (индекс общности видового состава 57,1% и 60%). Меньший индекс общности

видового состава (41,7% и 54,6%) оказался характерен для микробных ассоциаций, населяющих внутреннюю среду тлей и поверхность кормовых растений.

Часть выделенных видов не встречалась на кормовом растении, а была обнаружена только у насекомых. Существовала и обратная ситуация, когда некоторые из штаммов были обнаружены только у пораженных растений и не изолировались из трофически связанных с ними насекомых.

Из сапрофитических видов наибольшей экологической пластичностью обладали *B. soli* и *B. clausii*. Обнаружение этих видов во всех исследованных биологических объектах говорит о возможностях обмена микроорганизмами между ними.

Но больший практический интерес представляло выявление циркуляции в этой системе фитопатогенных микроорганизмов. Оказалось, что все фитопатогены, изолированные из бахчевой тли, встречаются на их кормовых растениях. Однако, помимо этих видов на поверхности и во внутренних тканях растений было немало и других фитопатогенных грибов, которые не обнаруживались в организмах питающихся на них насекомых.

В целом содержание фитопатогенов на кормовых растениях было значительно выше, чем в организмах тлей и муравьев.

Следует отметить, что большая часть выделенных нами фитопатогенных микроорганизмов относилась к Fungi, которые в большинстве своём предпочитают развиваться в кислой среде, а в пищеварительном канале растительноядных насекомых поддерживается щелочная реакция среды. Поэтому не случайно грибы рода *Fusarium* обнаруживались в организмах тлей в единичном количестве, а бактериальный патоген *Erwinia carotovora* хотя и имел низкий индекс встречаемости в бахчевой тле, но в тех пробах, где он обнаруживался его численность достигала 10^4 КОЕ в пробе. Это говорит о том, что данный микроорганизм не просто сохранил жизнеспособность в организме бахчевой

тли, а смог адаптироваться к новой экологической нише и начал там размножаться.

Таким образом, наши исследования показали, что потенциально в организм бахчевой тли могут попадать любые микроорганизмы из окружающей среды, однако выживают там и хорошо адаптируются прежде всего бактерии, в том числе и фитопатогенные. Роль бахчевой тли как резервуара и переносчика фитопатогенных грибов незначительна.

Выводы

1. Микробная ассоциация бахчевой тли включала 5 видов бактерий и 2 вида грибов. Наиболее типичными ассоциантами бахчевой тли в исследуемом агроценозе являлись *B. clausii* и *B. soli*.

2. Количественные показатели содержания бактерий в организмах тлей варьировали от 10^2 до 10^5 КОЕ в пробе.

3. Бахчевая тля была способна сохранять в своём организме фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora* и фитопатогенные грибы *Fusarium sp.*

4. Наибольшее влияние на видовой состав микробоценоза тлей оказывала микробная обсеменённость внутренней среды кормовых растений (индекс общности видового состава 57,1 - 60%). Влияние микробных ассоциаций поверхности кормовых растений было несколько меньше (индексы общности видового состава 41,7 - 54,6%).

5. Микробные ассоциации бахчевой тли и трофически связанных с ними чёрных садовых муравьёв оказались во многом схожи (индекс общности видового состава 57,1%). Общими ассоциантами являлись *Bacillus clausii*, *B. psychrodurans*, *B. soli* и *Fusarium sp.*

Список использованных источников

- 1 Stavrinides, J. Pea aphid as both host and vector for the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* / J. Stavrinides, J.K. McCloskey, H. Ochman // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 75, № 7. – P. 2230–2235.
- 2 Nadarasah, G. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria / G. Nadarasah, J. Stavrinides // *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 35. – P. 555–575.
- 3 Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color / T. Tsuchida [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 330, № 6007. – P. 1102–1104.
- 4 Mandrioli, M. Evolving aphids: one genome-one organism insects or holobionts? / M. Mandrioli, G.C. Manicardi // *Invertebrate Survival Journal*. – 2013. – № 10. – P. 1–6.
- 5 Малышена, М.С. Динамика видового состава и эколого-физиологические особенности микробоценозов тлей (*Homoptera: Aphididae*), паразитирующих на древесных и кустарниковых растениях: автореф. дис.....канд. биол. наук / М.С. Малышена. – Саратов, 2013. – с.
- 6 Бабкова, О. Богатый урожай на вашем участке / О. Бабкова. – М: Рипол Классик, 2011. – 608 с.
- 7 Плавильщиков, Н.Н. Определитель насекомых: Краткий определитель наиболее распространенных насекомых европейской части России / Н.Н. Плавильщиков. – М.: Топикал, 1994. – 544 с.
- 8 Трейвас, Л. Ю. Болезни и вредители овощных культур. Атлас-определитель / Л.Ю. Трейвас – М.: Фитон, 2019. – 192 с.