

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА
ОБЫКНОВЕННОГО (*CUCUMIS SATIVUS* L., 1753), КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В
ОТКРЫТОМ И ЗАЩИЩЁННОМ ГРУНТЕ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Альфараг Карим Мохаммед Кадхим

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Естественная микробная ассоциация любого растения играет важную роль в защите своего хозяина от фитопатогенов, обеспечивая его колонизационную резистентность [1, 2]. При культивировании растений в открытом грунте, основным источником микроорганизмов, заселяющих в дальнейшем различные его части, служит почва [3]. При культивировании в условиях защищённого грунта контакт растений с почвой полностью исключён [4], и источниками микроорганизмов становятся объекты окружающей его среды: минеральный субстрат, система орошения и используемый минеральный раствор, воздух и др. В связи с этим, можно предположить, что микробные ассоцианты растений огурца, выращенные в условиях открытого и защищённого грунта, будут существенно различаться. Однако в литературе отсутствуют сравнительные данные по этому вопросу.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы явилось сравнение биологических свойств бактерий, доминирующих на поверхности и во внутренних тканях растений огурца обыкновенного, культивируемых в условиях открытого и защищённого грунта. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Проанализировать видовой состав выборок штаммов бактерий, доминирующих на растениях огурца обыкновенного в условиях открытого и защищённого грунта.
2. Выявить наличие у них факторов фитопатогенности.
3. Изучить способность этих штаммов вызывать патологические изменения тканей плодов и листьев растений огурца.
4. Сравнить их антагонистическую активность по отношению к грибам – возбудителям болезней растений огурца.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в 2019-2020 гг. на базе кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н.Г. Чернышевского. Объектами исследований послужили штаммы бактерий, выделенные на кафедре в ходе предыдущих исследований с поверхности растений огурца, культивируемых в открытом и защищённом грунте. Все штаммы являлись представителями видов, наиболее часто встречающихся на поверхности растений в период исследований.

Для определения антагонистической активности исследуемых бактерий использовали штаммы фитопатогенных грибов *Alternaria cucumerina* (возбудитель альтернариоза), *Aspergillus flavus* (возбудитель аспергиллёза), *Fusarium oxysporum* (возбудитель фузариозного увядания), *Rhizopus stolonifer* (возбудитель мокрой гнили).

Антагонистическую активность изучали методом наложения агарового диска с культурой бактерии-антагониста на газон фитопатогенного гриба.

Для проверки целлюлолитической активности производили посев на среду с целлюлозой в качестве единственного источника углерода.

Пектолитическую активность определяли по способности к мацерации растительных тканей стандартных тест-объектов [5].

Определение способности исследуемых штаммов вызывать какие-либо патологические изменения различных частей растений огурца проводили *in vitro* в двух направлениях: определение способности поражать листья растений и определение способности поражать плоды.

Для этого в стерильные чашки Петри заливали голодный агар, и на его поверхности раскладывали исследуемые объекты.

При исследованиях листовых пластинок вырезали из них фрагменты 2x2 см, в жилке фрагмента листа стерильным лезвием делали надрез длиной 1 см и бактериологической петлёй вносили туда суточную культуру тестируемого микроорганизма. Чашки с листовыми пластинками помещали во влажную камеру при комнатной температуре (+20-23°C).

При исследованиях плодов из них вырезали бруски площадью 2x2 см и толщиной 1 см так, чтобы каждый брусок содержал фрагмент эпидермиса плода. На эпидермисе делали надрез и также наносили бактериологической петлёй суточную культуру тестируемого микроорганизма. Учёт результатов проводили через 14 дней. Все эксперименты проводили в трёх повторностях. В качестве контроля в аналогичные надрезы жилок листа и эпидермиса плода вносили стерильный физиологический раствор. В ходе эксперимента регистрировали наличие мацерации или некроза растительных тканей.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программ Excel и Статистика 10.

Структура и объём работы. Работа изложена на 51 странице, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 8 таблицами и 10 рисунками. Список использованных источников включает 55 наименований.

Научная новизна. Впервые проведено сравнение биологических свойств бактерий-ассоциантов растений огурца, культивируемых в условиях открытого и защищённого грунта. Впервые проведена сравнительная оценка колонизационной резистентности этих растений к фитопатогенным грибам в зависимости от условий их культивирования.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления о микробных ассоциациях растений огурца и их влиянии на физиологическое состояние растений. Выявленные особенности позволяют скорректировать мероприятия по защите этой овощной культуры от возбудителей микозов в условиях открытого и защищённого грунта.

Положения, выносимые на защиту:

1. На растениях огурца, культивируемых в условиях открытого грунта, бактерии с факторами фитопатогенности встречаются чаще, чем на растениях защищённого грунта.

2. На растениях открытого грунта присутствует значительно больше бактерий с фунгистатической активностью, способных поддерживать колонизационную резистентность своих хозяев.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о растениях огурца как среде обитания микроорганизмов, нормальной микрофлоре растений огурца, механизмах её формирования в условиях открытого и защищённого грунта, фитопатогенных бактериях и грибах, поражающих растения огурца, биологических методах борьбы с болезнями растений огурца.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о видовом составе бактерий-доминантов, изолированных с растений огурца обыкновенного, культивируемых в условиях открытого и защищённого грунта, наличии у них факторов фитопатогенности, способности вызывать поражения тканей плодов и листовых пластинок растений огурца, антагонистической активности бактерий-ассоциантов в отношении фитопатогенных грибов.

Штаммы, предоставленные нам для исследования, являлись представителями видов, наиболее часто и в наибольшем количестве встречающихся на растениях огурца в исследованных агроценозах. Поэтому на первом этапе работы представляло интерес проведение сравнительного анализа видового состава этих бактерий-доминантов.

Видовой состав доминантов был более разнообразен на растениях защищённого грунта. В этой группе штаммов присутствовали грамотрицательные палочки (*Cellulomonas flavigena*), грамположительные неспоровые палочки (*Listeria seeligeri* и *Microbacterium barkeri*), грамположительные споровые палочки рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. halodurans*, *B. drentensis*), а также грамположительные кокки (*Staphylococcus warneri*).

В условиях открытого грунта видовое разнообразие доминантов было ниже, они были представлены преимущественно бактериями рода *Bacillus* (*B. bataviensis*, *B. benzoovorans*, *B. decolorations*, *B. halodurans*, *B. psychrotolerans* и *B. simplex*). Также среди доминантов открытого грунта присутствовали грамотрицательные палочки (*Agromonas oligotrophica* и *Azomonas agilis*).

Единственным видом, который был представлен в обеих сравниваемых группах, был *B. halodurans*.

Важным условием для проникновения микроорганизма в растительные ткани является наличие у него ферментов, участвующих в деградации полимеров растительных клеток [5].

Среди доминантов растений огурца открытого грунта 40% штаммов обладали целлюлолитической активностью. Это связано, вероятно, с тем, что основным источником микроорганизмов, обитающих на поверхностях растений в открытом грунте, является почва, где наличие целлюлолитических ферментов даёт бактериям существенные преимущества. 7 штаммов были способны мацерировать ткани тех или иных тест-растений: 5 штаммов мацерировали ткани картофеля, 6 штаммов – моркови и 3 штамма – свёклы. Два штамма (*B. decolorations* 8 и *B. psychrotolerans* 17) обладали наибольшим количеством факторов фитопатогенности: имели целлюлолитическую активность и мацерировали ткани всех использованных тест-растений. Штаммы *B. bataviensis* 22 и *B. benzoovorans* 25 обладали целлюлолитической активностью и мацерировали ткани двух тест-растений. У трёх штаммов факторы фитопатогенности выявлены не были.

Среди штаммов, доминирующих на растениях огурца в условиях защищённого грунта, целлюлолитической активностью обладали только два штамма: *B. subtilis* 18 и *C. flavigena* 20. К мацерации тканей каких-либо тест-растений были способны 3 штамма: *B. subtilis* 18, *B. drentensis* 42 и *C. flavigena* 20. Наибольшим количеством факторов фитопатогенности обладал штамм *C. flavigena* 20, он проявлял целлюлолитическую активность и

мацерировал ткани всех использованных тест-растений. 7 штаммов, изолированных в защищённом грунте, не имели факторов фитопатогенности.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что на растениях огурца, культивируемых в условиях открытого грунта, бактерии с факторами фитопатогенности встречаются чаще, чем на растениях защищённого грунта.

Это связано с большим влиянием почвы на видовой состав эпифитной микрофлоры [6]. Почвенные микроорганизмы в большинстве случаев имеют обширный ферментативный аппарат, позволяющий им выживать в постоянно изменяющихся условиях. Среди многочисленных ферментов почвенных бактерий имеются и те, которые можно использовать для проникновения в растительные ткани. В условиях защищённого грунта контакт растений с почвой исключён, и их микрофлора формируется за счёт микроорганизмов, попадающих на растения из воздуха, системы орошения и других окружающих объектов.

Помимо определения способности исследуемых штаммов вызывать разрушение тканей классических тест-объектов, представляло интерес выяснить, могут ли штаммы-доминанты вызывать какие-либо патологические изменения на листовых пластинках и плодах растений огурца в условиях *in vitro*.

Среди доминантов растений открытого грунта 4 штамма (*B. bataviensis* 22, *B. benzoovorans* 25, *B. decolorations* 8 и *B. psychrotolerans* 17) мацерировали ткани плодов огурца. Первые признаки мацерации отмечались на 5-е сутки после инфицирования, к концу эксперимента (на 14-е сутки) зона мацерации не превышала 0,5 см².

Поражения листовых пластинок были двух видов. Штаммы *B. bataviensis* 22, *B. benzoovorans* 25, *B. decolorations* 8 и *B. decolorations* 8 вызывали мацерацию тканей листа вокруг фрагмента жилки, на который была нанесена культура бактерий. Штамм *B. psychrotolerans* 17 не вызывал мацерацию, но вокруг надреза жилки формировалась зона некроза площадью

около 0,5 см². Формирование такой зоны является одной из защитных реакций растения против проникновения микроорганизмов в его внутреннюю среду. Её образование не позволяет микроорганизму проникнуть в остальные ткани растения.

4 штамма (*B. bataviensis* 22, *B. benzoavorans* 25, *B. decolorations* 8 и *B. psychrotolerans* 17) были способны вызывать поражения и плодов, и листовых пластинок. 5 штаммов не вызывали никаких поражений тканей растений огурца.

Среди доминантов защищённого грунта 2 штамма (*B. subtilis* 18 и *C. flavigena* 20) мацерировали ткани плодов огурца. Степень и скорость мацерации не отличались от показателей доминантов открытого грунта.

Мацерацию тканей листовых пластинок осуществляли штаммы *B. subtilis* 18, *B. drentensis* 42, *C. flavigena* 20. Некротических поражений листовых пластинок после нанесения доминантов защищённого грунта не наблюдалось.

Способностью мацерировать ткани и плодов, и листьев обладали два штамма: *B. subtilis* 18, *C. flavigena* 20. *B. subtilis* в литературе обычно указывается как антагонист фитопатогенов [7], многие штаммы этого вида являются основой биопрепаратов для борьбы с болезнями растений [8]. Исследованный нами штамм, напротив, проявил себя как потенциальный фитопатоген.

Таким образом, способностью вызывать какие-либо поражения тканей растений огурца обладало 50% изолятов, выделенных с растений открытого грунта и 30% изолятов, выделенных с растений, культивируемых в защищённом грунте.

Несмотря на высокий процент штаммов, способных вызывать какие-либо поражения тканей огурца, в естественных условиях эти штаммы могут не причинять растениям какого-либо вреда, поскольку в наших экспериментах мы наносили культуры на повреждённый эпидермис. Однако, при механических повреждениях растений (в результате питания

растительных насекомых, обрезки и др.) эти виды могут вызывать повреждения растительных тканей.

Нормальная микрофлора играет существенную роль в поддержании колонизационной резистентности растений. Одни виды вытесняют другие своим обильным и очень быстрым размножением. Другие виды выделяют неспецифические и специфические вещества, которые подавляют рост конкурирующих с ними микроорганизмов, в том числе и патогенных [9].

В связи с этим мы изучили антагонистическую активность штаммов доминирующих видов бактерий по отношению к некоторым видам фитопатогенных грибов, выделенных с растений огурца в ходе предыдущих исследований.

Среди доминантов растений огурца открытого грунта было выявлено несколько штаммов, способных подавлять рост некоторых из тестируемых видов фитопатогенных грибов. Четыре штамма (*A. oligotrophica* 34, *Bacillus bataviensis* 22, *B. decolorations* 8 и *B. simplex* 14) подавляли рост возбудителя альтернариоза огурцов *Alternaria cucumerina*, три из этих штаммов оказывали ингибирующее действие на рост *Rhizopus stolonifer* – возбудителя гнили огурцов. Степень подавления разных видов грибов не имела статистически значимых различий. Рост двух других тестируемых фитопатогенных грибов *Aspergillus flavus* и *Fusarium oxysporum* не смог подавить ни один из исследуемых штаммов. Большая часть выявленных антагонистов принадлежала к роду *Bacillus*, что вполне закономерно, т.к. бактерии этого рода способны к синтезу большого количества метаболитов с самой разнообразной активностью, в том числе и фунгистатической.

Среди бактерий-ассоциантов, изолированных с растений в защищённом грунте, лишь один штамм *B. subtilis* 18 проявил антагонистическую активность по отношению к двум тестируемым грибам: *Alternaria cucumerina* и *Rhizopus stolonifer*. Бактерии этого вида хорошо известны своей антагонистической активностью, однако по отношению к двум другим видам грибов даже этот штамм не оказал фунгистатического действия.

Сравнительный анализ антагонистической активности штаммов, изолированных с растений огурца в открытом и защищённом грунте, показал, что на растениях открытого грунта присутствует значительно больше бактерий с фунгистатической активностью, способных поддержать колонизационную резистентность своих хозяев.

На тепличных растениях бактерии-антагонисты практически отсутствуют. Не случайно в промышленных теплицах ООО «Совхоз Весна» при выращивании этой овощной культуры применяются биопрепараты на основе гриба *Trichoderma harzianum*, обладающего мощной антагонистической активностью в отношении многих фитопатогенных грибов [10]. Внесение в субстрат этого микроорганизма компенсирует практически отсутствующую у тепличных растений естественную колонизационную резистентность к фитопатогенам.

Однако, следует отметить, что и доминирующие виды бактерий, изолированные в открытом грунте, обладали слабой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам, вызывающим заболевания огурцов. Рост грибов *Fusarium oxysporum* и *Aspergillus flavus* не был подавлен ни одним из доминирующих видов бактерий. Аспергиллёз огурцов не имеет широкого распространения, и в большинстве случаев эти грибы не наносят растениям существенного урона. Фузариозное увядание огурцов, вызываемое *Fusarium oxysporum*, напротив, является широко распространённым заболеванием, которое может привести к существенным потерям урожая этой овощной культуры. Вероятно, одной из причин повсеместного распространения фузариоза является и выявленная нами устойчивость этого гриба к воздействию компонентов нормальной микрофлоры растений.

Таким образом, было установлено, что бактериальные ассоцианты растений огурца не могут полноценно защищать своих хозяев от фитопатогенных грибов ни в условиях открытого грунта, ни в условиях теплиц. Это делает необходимым поиск бактерий, хорошо адаптированных к

обитанию на поверхности вегетативных частей растений огурца и обладающих высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам. Интродукция таких штаммов в микробную ассоциацию растений огурца существенно повысит колонизационную резистентность растений и, как следствие, их продуктивность.

ВЫВОДЫ

1. Бактерии-доминанты растений огурца, культивируемых в открытом грунте, являлись преимущественно представителями рода *Bacillus*. На растениях защищённого грунта видовой состав доминантов был более разнообразен и, помимо *Bacillus*, включал представителей родов *Cellulomonas*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*.
2. Целлюлолитической активностью обладали 40% штаммов, изолированных в условиях открытого грунта, и 20% штаммов, изолированных в условиях теплицы, мацерировать ткани тех или иных тест-растений были способны 70% и 30% изолятов соответственно.
3. Способностью вызывать какие-либо поражения тканей растений огурца обладало 50% изолятов, выделенных с растений открытого грунта и 30% изолятов, выделенных с растений, культивируемых в защищённом грунте.
4. Наиболее сильное повреждающее действие на ткани растений огурца оказывали *Bacillus bataviensis* 22, *B. benzoevorans* 25, *B. decolorations* 8 и *B. psychrotolerans* 17, изолированные в открытом грунте и *B. subtilis* 18, *Cellulomonas flavigena* 20, изолированные в условиях теплицы.
5. 40% изолятов, выделенных с растений открытого грунта, подавляли рост возбудителя альтернариоза огурцов *Alternaria cucumerina*, 30% штаммов оказывали ингибирующее действие на рост *Rhizopus stolonifer* – возбудителя гнили огурцов. Среди бактерий-ассоциантов, изолированных с растений в защищённом грунте, лишь один штамм *B. subtilis* 18 проявил антагонистическую активность по отношению к этим же видам грибов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Матвеев, В.П. Овощеводство/ В.П. Матвеев, М.И. Рубцов - М.: Агропромиздат, 2012. - 431 с.
2. Блинков, Е.А. Оптимизация применения «ассоциативных» бактериальных удобрений в выращивании огурцов/ Е.А. Блинков.- Ломоносов 2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных; секция «Биология». - М.: МАКС Пресс, 2011. - С. 175-176.
3. Осипова, Г. С. Овощеводство защищенного грунта/ Г. С. Осипова - М.: Проспект Науки, 2017. - 288 с.
4. Изучение эпифитной микрофлоры некоторых овощных культур / А. А. Сиротин [и др.]. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2016. - № 7. - С. 230-232.
5. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин - Минск: БГУ , 2006.- 246 с.
6. Кожемяков, А.П. Биопрепараты для земледелия / А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь // В сб.: Биопрепараты в сельском хозяйстве. - М., 2005.- С. 18-54.
7. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry / Н. Ngugi [at al.] // Biological Control - 2007.- Vol. 33, №1. - P. 32-38.
8. Санкина, Е.М. Защита растений. Фитопатология. Учебное пособие для самостоятельного изучения дисциплины / Е.М. Санкина - Нижний Новгород: НГСХА, 2005. - 162 с.
9. Сорока, С.В. Интегрированные системы защиты растений от болезней, вредителей и сорняков / С.В. Сорока - Минск: Белорусская наука, 2005.- 463 с.
10. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma* / J.L. Reino [et al.] // Phytochem. Rev. - 2008. - № 7. - P.89–123.