

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 БЕЛОКРЫЛКИ ОРАНЖЕРЕЙНОЙ
(*TRIALEURODES VAPORARIORUM* WESTWOOD, 1856),
ПАРАЗИТИРУЮЩЕЙ НА ОВОЩНЫХ КУЛЬТУРАХ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
направления подготовки магистратуры 060401 Биология
биологического факультета
Борисенко Натали Викторовны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Степанов

Саратов 2020

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Овощеводство является существенной частью агрокомплекса Российской Федерации. Особенно актуальна эта отрасль сельского хозяйства в Саратовской области [1]. Существенный урон овощным культурам наносят насекомые-вредители, питающиеся растительными соками, в том числе и белокрылки. Помимо того, что массовое питание этих насекомых истощает растения, сосущие насекомые являются известными переносчиками вирусных инфекций растений, таких как мозаичная болезнь огурца, вирусный некроз огурца, мозаичная болезнь томата, желтая курчавость листьев томата и другие [2]. Роль белокрылок в распространении возбудителей болезней растений бактериальной и грибной природы остаётся неизвестной.

В организме насекомых фитопатоген сталкивается с компонентами его нормальной микрофлоры, которая в значительной степени определяет возможность его сохранения и размножения в организме переносчика. В литературе имеются сведения о нормальной микрофлоре некоторых видов тлей – бахчевой или хлопковой, а также черной, которые паразитируют на растениях огурца. Микрофлора оранжерейной белокрылки, паразитирующей на овощных культурах, до настоящего времени остаётся практически неизученной.

Цель и задачи исследования. 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 исследования. 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 600 особей, в том числе, питающихся на растениях огурца – 400, кабачка – 100, баклажана – 100 особей. Выбор данных кормовых растений обусловлен тем, что они в большей степени повреждались белокрылкой в исследуемом агроценозе.

Перед началом микробиологических исследований насекомых усыпляли хлороформом, обрабатывали в 75%-ном этаноле, дважды промывали в стерильном 0,9%-ном NaCl и гомогенизировали по 10 экземпляров с физиологическим раствором. В дальнейшем производили высев на картофельную среду (картофель – 200 г, агар-агар – 20 г, вода – 1 л) для выделения бактерий и на среду PDA(картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, глюкоза – 20 г, вода – 1 л) для выделения грибов. Посевы инкубировали при 28°C в течение 1-5 суток. Выделенные штаммы отсеивали на скошенные среды для последующих исследований.

Исследования кормовых растений проводили в двух направлениях: выявляли микрофлору поверхности листа и микрофлору внутренних тканей листовых пластинок.

Идентификацию грибов осуществляли по культуральным и морфологическим свойствам. Для изучения морфологических свойств готовили временные препараты 4-5 суточных культур и микроскопировали при увеличении в 1350 раз. Видовую принадлежность грибов устанавливали с помощью определителей [3, 4]. Также для выявления антагонистической активности использовался метод перпендикулярных штрихов [5].

Обработку полученных данных проводили с помощью программы Статистика 6.0. При анализе количественных показателей рассчитывали медиану и межквартильный размах.

Структура и объём работы. Диплом изложен на 52 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа включает 9 рисунков и 15 таблиц. Список использованных источников включает в себя 56 наименований.

Научная новизна. Впервые установлена структура микробоценоза белокрылки оранжерейной, питающейся на овощных культурах в условиях открытого грунта, показано влияние кормовых растений на видовой состав её бактерий-ассоциантов. Впервые были получены данные о способности белокрылки оранжерейной сохранять в своём организме фитопатогенные бактерии *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* и фитопатогенные грибы *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum*. Впервые установлена антагонистическая активность бактерий-ассоциантов белокрылки оранжерейной в отношении фитопатогенных грибов *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum*, попадающих в организм насекомых с кормовых растений.

Научная значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления о микробных ассоциациях сосущих насекомых-вредителей, создают теоретическую базу для разработок новых биологических мер борьбы с этими вредителями.

Положения, выносимые на защиту:

1. Микробная ассоциация белокрылки оранжерейной формируется преимущественно за счёт микроорганизмов, попадающих во внутреннюю среду насекомых из окружающей среды. Однако не все из них могут успешно адаптироваться к этой специфической экологической нише.
2. Во внутренней среде белокрылки оранжерейной размножение грибов, в том числе и фитопатогенных, существенно подавляется бактериями-антагонистами, которые входят в состав её микробной ассоциации.

3. Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о систематическом положении, особенностях морфологии и строении белокрылки

оранжерейной, о её симбиотических микроорганизмах и о вредоносности данного насекомого в отношении как самих растений, так и в переносе инфекций различной природы.

В главе «Результаты исследования» изложены полученные данные об особенностях микробоценоза белокрылки оранжерейной, о динамике микробной ассоциации в течение вегетационного сезона и на протяжении всех лет исследований, о влиянии кормовых растений на структуру микробоценоза белокрылки оранжерейной, о биологических свойствах выделенных изолятов и об антагонистической активности микроорганизмов-ассоциантов по отношению к фитопатогенным грибам.

В результате проведённых исследований было установлено, что в микробной ассоциации белокрылки оранжерейной преобладает бактериальная составляющая, которая включала 34 вида бактерий 18 родов.

Грамположительные бактерии, входящие в состав исследованной микробной ассоциации, являлись представителями филумов Actinobacteria (семейства Dermacossaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Nocardioideae) и Firmicutes (семейства Bacillaceae, Listeriaceae, Planococcaceae, Staphylococcaceae). Все изолированные грамотрицательные бактерии принадлежали к филуму Proteobacteria (семейства Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Morganellaceae, Xanthomonadaceae и Yersiniaceae). Грибы, изолированные из белокрылки оранжерейной, относились к филуму Ascomycota, семействам Pleosporaceae, Nectriaceae и Dematiaceae.

В течение трёх лет из насекомых стабильно изолировались бактерии *B. halodurans*, *B. subtilis*, *M. lacticum*, и грибы *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*. Следует отметить, что все перечисленные бактериальные виды в течение этих сезонов имели и высокие количественные показатели, что позволяет считать их наиболее типичными представителями микробных ассоциаций белокрылок оранжерейных. Что касается грибных изолятов, то в течение трёх 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 микроценозов 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 altemans*, *Ulocladium conidiophores*), которые не изолировались летом. Выявленные различия могут быть связаны с изменением микробной обсеменённости кормовых растений, с изменением химического состава растительных соков, которыми питаются насекомые, изменением среднесуточных температур и влажности.

Во время питания белокрылки контактируют как с поверхностью, так и со 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 микроценозов этих двух биотопов оказалось существенное преобладание грибов на поверхности всех кормовых растений. Во внутренних тканях растений плесневые грибы встречались реже и в меньшем количестве. В бактериальной составляющей микроценозов существенных различий между поверхностью и внутренней средой кормовых растений выявлено не было. Большая часть видов бактерий изолировалась как с поверхности, так и из внутренних тканей растений. Только некоторые отдельные виды выделялись лишь из какого-нибудь одного биотопа. 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*. Индексы общности микроценозов белокрылок, питающихся на разных растениях составил от 19,4 до 22,6%.

Белокрылка питается клеточным соком, состоящим из воды и различных веществ. Состав его достаточно специфичен практически для каждого вида и содержит углеводы (глюкозу, фруктозу, сахарозу), пектины, гликозиды, дубильные вещества, алкалоиды, аминокислоты, органические и неорганические кислоты [6]. Интересно, что помимо глюкозы – углевода, чаще всего

используемого бактериями, большое количество штаммов было способно расщеплять сахарозу, которая является основным компонентом флоэчного сока растений и фруктозу.

Важным ресурсом-ограничителем для любого биологического вида является азот. Наши исследования впервые показали, что в организме белокрылки оранжерейной также 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 рН10.

В ходе проведённых исследований из организмов белокрылки оранжерейной нами впервые были выделены фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum* и *Alternaria alternata*. Однако в организмах этих насекомых данные фитопатогены встречались в незначительном количестве. Одной из причин, вероятно, является щелочная реакция среды пищеварительного тракта растительноядных насекомых. Уже на первичных посевах обнаруживались колонии бактерий, которые подавляли развитие грибов. Нами было выделено 10 таких изолятов. Все они были отнесены к роду *Bacillus*. По фенотипическим признакам все изоляты были близки к *B. subtilis*, виду, который доминировал в организмах белокрылок, и который широко известен своей разноплановой антагонистической активностью [7, 8, 9].

ВЫВОДЫ

1. Микробная ассоциация белокрылки оранжерейной в Саратовской области включает 34 вида бактерий 18 родов и 4 вида 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 *Alternaria alternata* и *Fusarium oxysporum*.

3. Выявлен комплекс видов бактерий (*Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Microbacterium lacticum*, *Serratia ficaria*) и грибов (*Alternaria alternata*, *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°C, 21,4% – при 43°C. Большая часть изолятов (97,7%) были алкалотолерантными, 57,2% – ацидофильными.

7. В микробной ассоциации белокрылки оранжевой присутствуют бактерии рода *Bacillus*, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium oxysporum* и *Alternaria alternata*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ганичкина, О. А. Все о томатах и огурцах / О. А. Ганичкина. - М.: Э, 2016. - С. 16-17.

2. Торениязов, Е. Ш. Опасные вредители бахчевых культур / Е. Ш. Торениязов, А. М. Кутлымуратов, Р. З. Тохтабаев // Защита и карантин растений. - 2011. - № 8. - С. 49-50.

3. Miller, Jr. Guide to edible and inedible fungi / Jr. Miller, K. Orson, Jr. Miller // Pequot Press, Guilford. - 2006. - № 1. - 343 p.

4. Simmons, E. G. *Alternaria – an identification manual* / E. G. Simmons // CBS Biodiversity Series. - 2007. - № 6. - 775 p.

5. Практикум по микробиологии: учеб.пособие для студентов вузов / А. И. Нетрусов и др.; под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Академия, 2005. - 604с.
6. Ashford, D.A. Living on a high sugar diet: the fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid / D.A. Ashford, W.A. Smith, Douglas A.E. // *Journal of Insect Physiology*. - 2000. - Vol.46, №3. - P. 335–341.
7. Иркитова, А. Н, Яркулов А. Н. Оптимизация метода определения антагонистической активности пробиотических бактерий / А. Н. Иркитова, Е. С. Яркулов // *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания*. - 2017. - Т.19, № 5. - С. 113-117.
8. Особенности взаимодействия бактерий *Bacillus subtilis* с дерматофитными грибами / Г. Э. Актуганов, А. И. Мелентьев, Н. Ф Галимзянова и др. // *Вестник Башкирского университета*. - 2013. - Т.18, № 3. - С. 719-722.
9. Штаммы бактерий антагонистов *Pyrenophora tritici*, эффективные против желтой пятнистости листьев пшеницы в фазу всходов в вегетационном опыте / О. Ю. Кремнева, А. М. Асатурова, М. Д. Жарникова и др. // *Сельскохозяйственная биология*. - 2015. - Т.50, № 1. - С. 99-106.