

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ЭПИФИТНАЯ МИКРОБИОТА
ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ (*RIBES NIGRUM* L, 1753)
НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
И ВЛИЯНИЕ НА НЕЁ ХИМИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Березюк Анны Денисовны

Научный руководитель
к.б.н., доцент


А.М. Петерсон
09.06.2023

Зав. кафедрой
д.б.н., профессор


С.А. Степанов
09.06.2023

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы. Смородина чёрная – растение умеренной зоны и большая часть территории России, за исключением районов крайнего севера, пригодна для её промышленного возделывания. Это скороплодная и урожайная культура. Её потенциальная продуктивность определяется в 60 т/га [1]. Чёрная смородина наиболее ценится за значительное содержание витамина С. Достаточно всего 20 граммов ягод для обеспечения суточной потребности взрослого человека в аскорбиновой кислоте.

В последнее десятилетие в отдельных регионах РФ и за рубежом наблюдаются массовые поражения чёрной смородины различными вредителями, что является серьезной проблемой для сельского хозяйства. Кусты чёрной смородины могут поражать более чем 70 видов насекомых, причем 30-70% производственных насаждений подвержены пагубному влиянию вредителей [2].

Серьезный урон растениям наносят листовая галловая тля (*Cryptomyzus ribis* L.) и листовертки (сем. *Tortricidae*), они чаще всего поражают чёрную смородину. Но особенно опасен для растений смородиновый почковый клещ (*Cecidophyes ribis* Westw.) [3]. Он значительно ослабляет и угнетает растение, делая его мишенью для других вредителей. Кроме того, он переносит возбудителей болезней (некоторых микоплазм), поэтому чаще всего поражение таким вредителем приводит к гибели всего куста.

Для защиты растений применяются преимущественно химические инсектициды. Однако входящие в их состав вещества могут также влиять на микробиоту поверхности растений, которая может включать как виды, принимающие участие в колонизационной резистентности, так и фитопатогенные микроорганизмы [4].

По литературным данным видовой состав эпифитной микробиоты чёрной смородины очень разнообразен и сильно варьирует в разных географических зонах. Поскольку в литературе отсутствовали актуальные данные по эпифитной микробиоте этой культуры в нашем регионе, то на первом этапе исследования было необходимо выявить виды, обитающие на поверхности листьев чёрной смородины в условиях Саратовской области.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стала выявление особенностей эпифитной микробиоты чёрной смородины (*Ribes nigrum* L, 1753) на территории Саратовской области и её устойчивости к действию химических инсектицидов.

Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Выявить качественный и количественный состав эпифитной микробиоты чёрной смородины в условиях Саратовской области.
2. Проследить сезонную динамику качественных и количественных характеристик микробиоты чёрной смородины.
3. Установить пищевые потребности бактерий-доминантов эпифитной микробиоты чёрной смородины.
4. Изучить влияние химических инсектицидов на микробиоту чёрной смородины в условиях *in vitro* и *in vivo*.
5. Выявить химические инсектициды, наносящие минимальный вред нормальной микробиоте этой культуры.

Материал и методы исследования. Объектом исследования послужили листья побегов растения чёрной смородины сортов Лидия, Рубен, Тамерлан, Добрыня собранные на территории Саратовской области. Все использованные сорта являются среднеспелыми по срокам созревания и достаточно устойчивыми к грибковым заболеваниям.

Материалы для исследования микробиоты смородины чёрной были отобраны в 6 районах Саратовской области: Екатериновском, Саратовском, Энгельском, Воскресенском, Лысогорском, Татищенском. Растительный материал помещали в стерильные контейнеры и доставляли в лабораторию для исследования.

При изучении влияния химических инсектицидов на естественную микробиоту чёрной смородины было использовано 6 инсектицидов: Алатар, Фуфанон-Нова, Би 58 Новый, Танрек, Кинмикс, Биокилл.

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

Фрагмент листовой пластинки размером 2x2 см засеивали отпечатком на КА для выделения бактерий и среду PDA для выделения грибов.

Для выделения микроорганизмов с внутренних тканей растения брали участок листовой пластинки, обрабатывали 70%-ным спиртом, затем промывали в физиологическом растворе и 0,1 г обработанной листовой пластинки гомогенизировали с 0,9 мл стерильного физиологического раствора. По 0,1 мл гомогенизата высевали на КА и на среду PDA. Среды готовили по стандартным рецептам.

Все посева инкубировали при температуре +28 °С в течении 2 (КА) и 7 (PDA) суток, затем проводили количественный учет выделенных микроорганизмов, а также отсеивали их на скошенные питательные среды для последующей идентификации.

Идентификацию выделенных штаммов бактерий проводили по фенотипическим признакам. Оценивали морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Эксперимент *in vitro*: В чашки Петри помещали диски с фильтровальной бумагой. После стерилизации смачивали диски стерильным физиологическим раствором. В подготовленные таким образом чашки помещали листовые пластинки, которые затем обрабатывали разведённым инсектицидом. Контрольные образцы обрабатывали стерильной водой. Через 2 и 7 дней после обработки производили посев на питательные среды

Эксперимент *in vivo*: проводился на агроценозе в черте города Энгельса в первой декаде июня. В этот период происходит активное размножение основного вредителя чёрной смородины – смородиновой тли (*Aphis schneideri* В.), и возникает необходимость в обработках растений инсектицидами. Растения в открытом грунте, которые до этого ничем не обрабатывались, опрыскивали препаратами в утренние часы. Контрольные растения обработке не подвергались. Спустя неделю после обработки производился посев на питательные среды.

При проведении статистической обработки результатов использовали программу STATISTICA 10. Для определения нормальности распределения данных применяли тест Шапиро-Уилка. При нормальном распределении рассчитывали t-критерий Стьюдента, при отсутствии нормального распределения

данных - тест Уилкоксона для попарного сравнение групп. В обоих тестах при значении $p < 0,05$ можно было говорить о статистически значимых различиях.

Структура и объем работы. Работа изложена на 55 страницах, включает в себя введение, обозначения и сокращения, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа проиллюстрирована 11 таблицами и 23 рисунками. Список использованных источников включает в себя 50 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена информация о биологической характеристике чёрной смородины, особенностях культивирования, основных вредителях и болезнях данной культуры, количественном и качественном составе эпифитной микробиоты, участие ассоциативных микроорганизмов в обеспечении колонизационной резистентности, а также обзор наиболее часто используемых химических инсектицидов для обработки чёрной смородины.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты экспериментов по выделению и идентификации микроорганизмов-доминантов чёрной смородины из разных районов Саратовской области, анализу изменения микробиоты в течении вегетационного периода, определению влияния химических инсектицидов на ассоциированные микроорганизмы в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В процессе исследования было выделено 54 штамма бактерий, относящихся к 7 видам и 44 штамма грибов, принадлежащих к 16 видам. На поверхности листьев преобладали грибы (16 видов), количество выделенных бактерий оказалось значительно ниже (7 видов). Во внутренних тканях были обнаружены исключительно бактерии (рисунки 6,7).

Доминирующим родом бактерий на поверхности и внутренней среде растений оказался род *Bacillus* (57% и 50% соответственно). Остальные роды были представлены единичными видами. Среди грибов наиболее разнообразными оказались роды *Aspergillus* и *Fusarium*.

Выделенные виды бактерий являлись представителями филумов Firmicutes (семейства Bacillaceae, Paenibacillaceae, Lactobacillaceae) и Actinomycetota (семейство Promicromonosporaceae). 86 % изолированных видов относились к

филуму Firmicutes.

Исследуемые грибы относились к филумам Ascomycota (семейства Pleosporaceae, Davidiellaceae, Nectriaceae, Herpotrichiellaceae, Trichosomaceae) и Mucoromycota (семейство Mucoraceae). Таким образом, наиболее широко был представлен филум Ascomycota.

Побеги чёрной смородины являются очень специфической экологической нишей, в которой бактериям могут быть доступны самые разнообразные источники углерода и азота. Для более детального изучения биохимической активности было отобрано 11 штаммов, которые являлись представителями доминирующих видов на листьях чёрной смородины.

Самым широким спектром используемых источников углерода обладал штамм *B. subtilis* 47, он был способен использовать почти все предложенные белки, сахара некоторые полисахариды, а также два вида растительных масел. Наименее узким спектром обладал штамм *B. halodurans* 14, он расщеплял некоторые белки, из простых сахаров использовал только глюкозу. Тесты на использование липидов и полисахаридов дали отрицательный результат.

Все изолированные штаммы использовали желатин, использование пептонов у 54,6% штаммов сопровождалось выделением сероводорода. Высокой липолитической активностью исследуемые штаммы обладали в отношении подсолнечного (27,3%), горчичного (18,2%), рыжикового (9,1%) масел. Из простых сахаров наиболее часто использовалась глюкоза (в анаэробных условиях – 100%, в аэробных – 63,6%), а также сахароза – 63,6%. Тесты на использование лактозы и арабинозы показали отрицательный результат у всех выделенных штаммов.

Наиболее широким спектром используемых источников азота характеризуются штаммы *P. alvei* 11, *C. cellulans* 5, *B. subtilis* 1, *B. subtilis* 25, *L. plantarum* 7. Наименьший результат показал штамм *B. soli* 8, способный включать в свои метаболические процессы только азот из пептона и солей аммония. Таким образом, наиболее востребованным источником органического азота является пептон (100%), неорганического – хлорид аммония (100%) и нитрат калия (90,1%). Молекулярный азот исследуемые микроорганизмы могли фиксировать в 45,5% случаев.

Следовательно, наиболее востребованным источником углерода являлись желатин и глюкоза, источником азота – пептон и хлорид аммония.

Условия обитания микроорганизмов на поверхности листьев чёрной смородины существенно меняются в течение вегетационного сезона [5]. Поэтому мы предположили, что качественный и количественный состав микробиоты этих растений также будет динамичен. В связи с этим, были проведены исследования сезонной динамики эпифитной микробиоты чёрной смородины.

Бактериальная составляющая микробиома поверхности листьев в течение сезона претерпевала существенные изменения. Наиболее стабильным ассоциантом оказался вид *B. subtilis*, его индекс встречаемости в пробах был выше 50% в течение всех трех сезонов. *B. soli* и *P. alvei* встречались только весной, *L. plantarum* присутствовал почти во всех летних и осенних пробах, однако весной данный вид не выделялся.

Микокомплекс поверхности листьев также оказался нестабилен. *A. alternata* оказался самым часто встречаемым грибом на поверхности чёрной смородины, данный вид присутствовал в каждом сезонном исследовании более чем в 50% проб. *A. versicolor*, *F. dimerum*, *P. chrusogenum*, *P. citrinum* встречались только весной, *A. flavus* – только летом, *A. niger*, *E. jeanselmei var jeanselmei*, *F. chlamyosporum* – только осенью.

Химические инсектициды, попадая на растения, способны влиять на живые клетки [6]. Кроме того, стойкие соединения сохраняются в почве до 10 лет и более. На протяжении первого года сохраняется подавляющая часть применяемых пестицидов [7]. Мы изучили влияние исследуемых препаратов против насекомых в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Эксперимент *in vitro*: Обработка препаратами практически не сказалась на частоте встречаемости различных видов бактерий и грибов в пробах. Лишь Кинмикс снизил встречаемость *B. subtilis*. Изменения коснулись количественных показателей микроорганизмов, обитающих на поверхности листьев смородины.

На использованных в экспериментах *in vitro* листьях чёрной смородины доминировали бактерии *B. subtilis* и *C. cellulans*, которые составляли основу бактериальной микробиоты поверхности листа.

При изучении действия инсектицидов на представителей доминирующих видов, было выявлено, что использование Кинмикс, Би-58 новый и Танрек на 2 сутки стимулировала рост споровых бактерий. Препараты Кинмикс, Би-58 новый и Биокилл снижали численность неспорообразующих бактерий, что объясняется их меньшей приспособленностью к негативным факторам среды.

Однако на 7 сутки общая численность бактерий во всех вариантах экспериментов уже не отличалась от контроля. Расчёт t-критерия Стьюдента показал отсутствие достоверных различий между контролем и всеми вариантами опытов. Стабильность *B. subtilis* является важным фактором обеспечения колонизационной резистентности, так как этот вид обладает высокой антагонистической активностью [8].

Микокомплекс листьев, использованных в эксперименте, включал грибы родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*.

Инсектициды вызвали стимуляцию роста грибов родов *Alternaria* и *Rhizopus*. Численность других грибов была сопоставима с контролем. Среди всех препаратов лишь Алатар не простимулировал рост ни одного из грибов. Он же оказался единственным препаратом, который подавил рост грибов рода *Rhizopus*.

К 7 суткам анализ содержания общего количества грибов выявил, что лишь Кинмикс не вызывал рост грибной микробиоты, остальные же препараты резко повышали ее численность.

Действие на отдельные виды грибов было схоже с предыдущим периодом. Таким образом, в условиях *in vitro* препараты стимулировали преимущественно рост грибов родов *Alternaria* и *Rhizopus*, бактериальная микробиота оставалась при этом достаточно стабильной.

На использованных в экспериментах *in vivo* листьях чёрной смородины доминировали бактерии *B. bataviensis*, *B. halodurans*, *B. subtilis* и *L. plantarum*.

Через 7 дней после обработки общее количество эпифитных бактерий снизилось при использовании всех препаратов. В наименьшей степени бактериальную микробиоту подавил препарат Алатар. Наиболее сильное воздействие оказали инсектициды Биокилл и Танрек.

Воздействие препаратов на разные виды бактерий различалось. Чувствительным к действию многих инсектицидов оказался *B. bataviensis*.

Кинмикс, Биокилл и Танрек полностью подавили рост единственного неспорowego доминанта *L. plantarum*, который обнаруживался после обработки другими инсектицидами. Данный вид способен продуцировать сразу несколько бактериоцинов–плантарицинов, обеспечивая тем самым колонизационную резистентность растения [9]. Поэтому уменьшение его численности может ослаблять защиту чёрной смородины. Самыми стабильными при обработке были *B. halodurans* и *B. subtilis*, что особенно важно, т.к. данные виды также синтезируют бактериоцины и проявляют сильные антагонистические свойства [8,10]. Их устойчивость, вероятно, связана со способностью образовывать споры в неблагоприятных условиях, а также с наличием ферментационных систем, обеспечивающих деградацию ксенобиотиков.

Микокомплекс листьев, использованных в эксперименте, включал грибы родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*.

Грибы оказались более устойчивы к действию инсектицидов. Более того, Кинмикс, Би-58 Новый и Танрек существенно стимулировали их рост. При обработке остальными препаратами численность грибов оставалась сопоставимой с контролем. Попарное сравнение с контролем в тесте Уилкоксона подтвердило, что действие препаратов Кинмикс, Би-58 Новый и Танрек достоверно отличалось от контроля в сторону увеличения численности грибов.

Анализ влияния инсектицидов на отдельные таксоны грибов показал, что Кинмикс стимулирует рост *Rhizopus*, а Би-58 Новый и Танрек – *Alternaria*.

Таким образом, в условиях *in vivo* рост бактерий в наибольшей степени подавлялся препаратами Биокилл и Танрек, при этом Кинмикс, Би 58 Новый и Танрек стимулировали рост грибов.

Так как эффект воздействия инсектицидов на микробиоту в разных вариантах эксперимента сильно варьировал, необходимо было провести общую статистическую обработку результатов всех экспериментов. Расчёт t-критерия Стьюдента (нормальное распределение данных) для бактерий и тест Уилкоксона (ненормальное распределение данных) для грибов показал, что статистически значимые отличия есть лишь в воздействии Алатара (коэффициент $p < 0,05$), который практически не снижал численность бактерий и не повышал количество грибов.

Широкое применение химических инсектицидов поднимает вопрос их влияния на компоненты бактериальной и грибной микробиоты обрабатываемых растений. В проведённых исследованиях действие препаратов на бактерии *in vitro* и *in vivo* различалось. При обработке листьев *in vitro* бактериальная микробиота оставалась стабильна. Вероятно, это связано с тем, что данные условия более благоприятны, на микроорганизмы не действуют негативные факторы окружающей среды. В условиях *in vivo* бактериальные ассоцианты под действием большинства инсектицидов снижали свою численность. Это может приводить к нарушению механизмов колонизационной резистентности, ослабляя защиту растений от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Рост грибов, в отличие от бактерий, стимулировался большинством препаратов. Увеличение численности грибов является крайне негативным фактором, т.к. большая часть заболеваний растений вызывается именно грибами. Такая стимуляция могла происходить из-за того, что в состав препаратов, помимо активных веществ, входят различные прилипатели и растекатели на основе желатины и других белков, крахмала, казеина [11,12]. Эти органические вещества могут являться дополнительным источником питания для грибов, способных выдерживать рабочую концентрацию активных веществ препаратов. Почему эти соединения не стимулируют рост бактериальной микробиоты ещё предстоит выяснить в дальнейшем. Наиболее безопасным для микробиоты растений чёрной смородины оказался препарат Алатар, который слабо подавлял рост бактерий и не стимулировал рост грибов.

Выводы

1. Доминирующим родом бактерий на поверхности и внутренней среде растений оказался *Bacillus* (57% и 50% всех выделенных видов соответственно). Остальные роды были представлены единичными видами. Среди грибов наиболее разнообразными оказались роды *Aspergillus* и *Fusarium*.
2. Среди бактерий наиболее стабильным ассоциантом листьев чёрной смородины оказался *B. subtilis*, его индекс встречаемости в пробах был выше 50% в течение всех трех сезонов. *B. soli* и *P. alvei* встречались только весной, *L. plantarum* - только летом и осенью. В микокомплексе

наибольшей стабильностью обладал *A. alternata*, который присутствовал в каждом сезонном исследовании более чем в 50% проб.

3. Наиболее востребованными источниками углерода для бактерий-ассоциантов чёрной смородины являлись желатин и глюкоза, источником азота – белки, пептон и хлорид аммония.

4. Наиболее безопасным для бактериальной микробиоты чёрной смородины оказался препарат Алатар, наибольшее подавление бактериальной микробиоты вызывали Биокилл и Танрек.

5. Препараты Алатар, Фуфанон-Нова и Биокилл не вызывали стимуляции роста грибов, стимулировали рост грибов инсектициды Кинмикс, Би 58 и Танрек.

6. Наиболее безопасным для микробиоты растений чёрной смородины оказался препарат Алатар, который слабо подавлял рост бактерий и не стимулировал рост грибов.

Список использованных источников

1. Сазонов, Ф. Ф. Селекционный потенциал смородины чёрной и возможности его реализации: автореф. дис... ..канд. биол. наук / Ф. Ф. Сазонов. – Брянск, 2014. – 38 с.
2. Козлова, Е. А. Комплекс болезней и вредителей на смородине чёрной и биологизированная защита насаждений / Е. А. Козлова // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. –2013. – №1. – 21-26 с.
3. Hara, H. Taxonomic and biological notes on *Pristiphora ribisi* Togashi, 1990, (Hymenoptera, Tenthredinidae) injurious to gooseberries and currants / H. Hara, A. Iwasaki, A. Shinohara // Zootaxa. – 2021. – V. 4903, № 3. – P. 393-404.
4. What can we learn from commercial insecticides? Efficacy, toxicity, environmental impacts, and future developments / Paula Rezende-Teixeira [et al.] // Environmental Pollution. – 2022. – V.300, №118983. – P. 210-219.
5. Distribution of apple and blackcurrant microbiota in Lithuania and the Czech Republic / I. Vepškaitė-Monstavičė [et al.] // Microbiological Research. – 2018. – V. 206. – P.1-8.
6. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids / P. Jeschke [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – V. 59, № 7. – P. 2897-2908.

7. Добровольский, В. В. География почв с основами почвоведения: Учеб. пособие для естеств.-географ. фак. пед. ин-тов / В. В. Добровольский. — Москва: Просвещение, 1988. — 350 с.
8. Механизмы устойчивости растений к инфекциям / Шарипова М. Р. [и др.] // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. — 2013. — Т.155, № 4. — С. 28-58.
9. Синтез бактериоциноподобного вещества штаммом *Lactobacillus plantarum* 42, выделенным из квашеной капусты / Ш. М. Миралимова [и др.] // Научные результаты биомедицинских исследований. — 2016. — Т. 2, № 3. — С. 6-13.
10. Prakash, J. Mechanism of biological control of plant diseases by endophytes / J. Prakash // Endophytic Association: What, Why and How. — 2023. — № 1. — P. 181-199.
11. Скрылёв, А. А. Применение смачивателя «атомик» в защите насаждений груши / А. А. Скрылёв // The Scientific Heritage. — 2021. — № 62. — С. 9-12.
12. Попова, Л. М. Химические средства защиты растений: Учеб. пособие для СПбГТУРП / Л. М. Попова. — Санкт-Петербург: ГОУВПО СПбГТУРП, 2009. — 96 с.

