

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

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОТЫ
СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ
ФУНГИСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 422 группы
направления подготовки 06.03.01 Биология
биологического факультета
Марковой Влады Игоревны

Научный руководитель

д-р биол. наук, доц.

_____ Д. В. Уткин

подпись, дата

Зав. кафедрой

д-р биол. наук, доц.

_____ Д. В. Уткин

подпись, дата

Саратов 2026

Введение. Пшеница — одна из ведущих сельскохозяйственных культур, обеспечивающая продовольственную безопасность и являющаяся основным источником питания для значительной части населения Земли [1]. Однако ее возделывание сопряжено с многочисленными фитопатологическими проблемами, связанными с поражением растений различными возбудителями заболеваний. Грибковые и бактериальные инфекции, поражающие пшеницу, способны не только снижать урожайность, но и ухудшать качество зерна, делая его непригодным для пищевого и кормового использования.

В последние десятилетия наблюдается усиление фитопатогенного давления на сельскохозяйственные культуры, что обусловлено рядом факторов, среди которых выделяются:

- Изменение климатических условий (повышение среднегодовых температур, изменение режима осадков), способствующее распространению фитопатогенов и изменению их ареала.
- Рост резистентности грибковых и бактериальных возбудителей к химическим препаратам из-за многолетнего их использования.
- Активное развитие международной торговли, что способствует распространению новых штаммов патогенов в ранее незатронутые регионы.
- Сокращение севооборотов и интенсификация земледелия, что приводит к накоплению патогенных организмов в почве и растительных остатках.

В связи с этим, изучение грибковых и бактериальных заболеваний пшеницы, а также разработка эффективных мер борьбы с ними, приобретают особую значимость. Классические химические средства защиты, несмотря на их эффективность, требуют осторожного применения из-за их потенциального негативного воздействия на окружающую среду и здоровье человека. В связи с этим возрастает интерес к биологическим и интегрированным методам защиты растений, включающим применение антагонистических микроорганизмов, бактериофагов, биопрепаратов и устойчивых сортов пшеницы [2].

Целью исследования является анализ биоразнообразия и антагонистической активности эндофитной и эпифитной микробиоты сортов саратовской селекции яровой мягкой пшеницы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Выделить и идентифицировать микроорганизмы эпи- и эндофитной микробиоты яровой мягкой пшеницы сортов саратовской селекции.
- 2) Выделить и идентифицировать микромицеты с зерновок пшеницы с видимыми признаками грибковых поражений.
- 3) Оценить антагонистическую активность бактерий по отношению к микромицетам, которые могут вызывать поражения пшеницы.
- 4) Определить фунгистатические факторы бактерий-антагонистов.
- 5) Проанализировать способность бактерий к образованию биопленок.
- 6) Определить патогенные свойства бактерий, которые являются антагонистами по отношению к микромицетам.

Для исследования были взяты зерновки четырех сортов яровой мягкой пшеницы: Юго-Восточная 2, Саратовская 68, Фаворит, Квартет без видимых признаков поражения фитопатогенами и зерновки сорта Саратовская 29 с признаками поражений после хранения, созданные специалистами ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Восток».

Работа изложена на 51 странице машинописного текста и включает Введение, 3 раздела литературного обзора (Фитопатология пшеницы: грибковые и бактериальные заболевания; Биоразнообразие возбудителей болезней пшеницы; Биологические методы борьбы с возбудителями болезней пшеницы), 2 раздела собственных исследований (Материалы и методы исследования; Результаты исследования), Заключение, Выводы и Список использованных источников, содержащий 32 наименований, из них 25 отечественных и 7 зарубежных. Работа имеет 4 иллюстрации, 11 таблиц.

Основное содержание работы. В первом разделе рассказывается о фитопатологии пшеницы, которая охватывает широкий спектр заболеваний,

вызываемых как грибковыми (альтернария, фузариум, головня и др.), так и бактериальными патогенами, что оказывает существенное влияние на агротехнические показатели и урожайность культуры. Второй раздел описывает более подробно возбудителей инфекций и их пути проникновения в растения (устьица, повреждения и др.). В третьем разделе рассмотрены биологические методы, как одно из направлений в системе борьбы с возбудителями болезней пшеницы.

В четвертом разделе «Материалы и методы» дается описание объектов исследования и использованных методов. Объектами исследования стали зерновки четырех сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., 1753): Юго-Восточная 2, Саратовская 68, Фаворит, Квартет без видимых признаков поражения фитопатогенами и сорта Саратовская 29 с признаками поражений после хранения, созданных специалистами Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока» (ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока»).

Выделение эпифитной микробиоты проводили методом отпечатка не стерильных зерновок, колосковых чешуек и колоса пшеницы на стерильной плотной питательной среде. Инкубировали при температуре плюс 28 °С в течение 2–3 суток.

При выделении эндофитных микроорганизмов проводили поверхностную стерилизацию семян пшеницы массой 1 г путём выдерживания исследуемых объектов в 96% растворе этилового спирта и 3% раствора перекиси водорода (в соотношении 1:1) в течение 15–20 мин для удаления эпифитной микробиоты [3]. Образцы трехкратно отмывали от перекиси и спирта в стерильном физиологическом растворе и помещали в стерильные керамические ступки. К растительному материалу добавляли 10 мл стерильного физраствора и перетирали пестиком до получения однородной массы и высевали на поверхность картофельно-глюкозного агара.

Посев образцов на твердые питательные среды производили в трех повторностях в объеме 0,1 мл, распределяли по всей поверхности питательной

среды шпателем Дригальского и инкубировали при температуре плюс 28 °С в течение 24–48 ч. После культивирования подсчитывали количество колониобразующих единиц (КОЕ) на чашке и пересчитывали КОЕ/мл.

Для идентификации бактериальных изолятов определяли культурально-морфологические и биохимические свойства. Определение микромицетов проводили с помощью культурально-морфологического описания скотч-препарата и Определителя грибов Д. Саттона, А. Фоторгилла, М. Ринальди и учебному определителю Е. Ю. Благовещенской [4, 5]. Верификацию и идентификацию микроорганизмов с неустановленным систематическим положением осуществляли с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Определение антагонистической активности бактерий проводили методом перпендикулярных штрихов (рисунок 1). Для этого гриб высевали в центре на картофельно-глюкозный агар, инкубировали в термостате при температуре плюс 28 °С до появления видимого роста, затем от края чашки к центру подсевали суточную культуру бактерии и культивировали 1-2 дня в термостате при температуре плюс 28 °С.

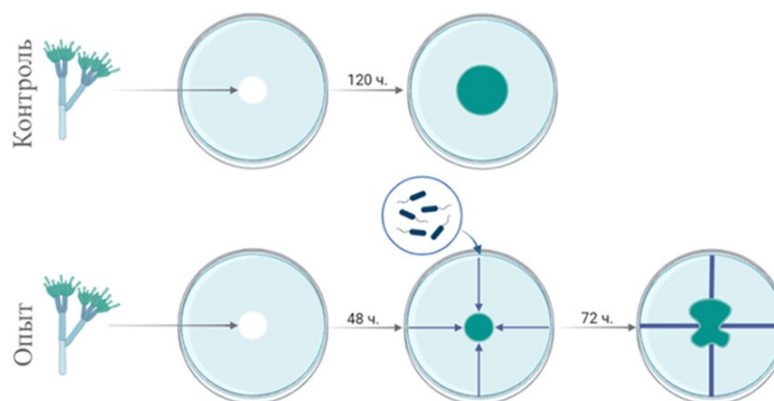


Рисунок 1 — Схема выявления антагонистической активности бактерий методом перпендикулярных штрихов

Выявление фунгистатических факторов у бактерий-антагонистов проводили с помощью определения гидролитических ферментов: хитиназы, липазы, протеиназы. Бактерии-антагонисты высевали на питательные среды

с добавлением Твина 80, вазелинового масла, обезжиренного молока, желатина и хитина [6, 7, 8].

Для определения способности к биоплёнкообразованию бактерии культивировали в 96-луночных планшетах в 200 мкл ГРМ-бульона (+37 °С, без встряхивания). После удаления планктонных клеток лунки промывали физиологическим раствором, высушивали 20 мин, затем вносили 200 мкл 0,1–0,2% раствора генцианвиолета в 96% спирте и инкубировали 10–15 мин. Краситель удаляли, несвязавшийся краситель смывали водой. Планшеты высушивали 30 мин, добавляли 200 мкл 95% этанола, переносили растворитель в чистые планшеты и измеряли оптическую плотность [9]. Контролем служили бесклеточные лунки с ГРМ-бульоном, обработанные аналогично.

Выявление патогенных свойств у бактерий-антагонистов основывалось на определении ферментов: целлюлазы, пектиназы, гемолизина, лецитиназы, ДНКазы и плазмокоагулазы. Для оценки фитопатогенности применяли мацерационный тест: бактериальную культуру наносили на растительные ткани и регистрировали их размягчение. Пектинолитическую и целлюлозолитическую активность определяли путём посева на среду с добавлением пектина или целлюлозы. Для оценки результата добавляли проявляющий реагент.

Для выявления факторов зоопатогенности у культур бактерий, проводили посев на плотную питательную среду, содержащую дефибрированную кровь барана, желток куриного яйца или ДНК. После инкубации для визуализации результатов на наличие ДНКазы был добавлен проявляющий реагент. Для обнаружения плазмокоагулазы культуру вносили в сыворотку плазмы крови кролика и по образованию или отсутствию сгустка в течение 18 часов учитывали результат.

Методы статистического анализа применяли для расчета степени ингибирования патогена, индекса общности видов, индекса встречаемости видов и индекса антагонизма.

В пятом разделе описываются результаты исследования. При изучении микробиоты здоровых зерен пшеницы было выделено 54 штамма бактерий, принадлежащих 5 видам и 3 родам типов: Bacillota, Pseudomanadota и Proteobacteria.

В ходе исследования микробиоты пораженных зерновок пшеницы, колосковых чешуек и колоса в целом было изолировано 24 штамма бактерий, принадлежащих 3 родам и 6 видам типов Bacillota, Pseudomanadota и Proteobacteria, а также 20 штаммов грибов отделов Zygomycota, Ascomycota.

При выявлении антагонистических свойств выделенных бактерий по отношению к выделенным грибам (*Alternaria alternata*, *Mucor* sp., *Cladosporium* sp.) с зараженных зерновок пшеницы положительные результаты показали штаммы рода *Bacillus*: *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. Наибольшей антагонистической активностью по отношению к грибам обладали виды: *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, от 62% до 66% первый вид и от 54% до 62% второй вид.

Индекс антагонизма для всех видов бактерий по отношению к грибам по шкале Джонсона и Карла составил 4 балла.

На этапе определения фунгистатических факторов было выявлено, что бактерии-антагонисты *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* росли на средах с добавлением: Твина 80, вазелинового масла, желатина и хитина, а значит обладали широким спектром ферментов: липазой, хитиназой и протеиназой, которые разрушают вещества, входящие в состав мембраны и клеточной стенки грибов, тем самым могут подавлять рост патогенных микромицетов. *B. licheniformis* показал рост лишь на средах с вазелиновым маслом и хитином, что говорит о наличии ферментов липазы и хитиназы.

По результатам оценки биоплёнкообразования, *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* характеризовались умеренной продукцией биоплёнок, тогда как *B. licheniformis* — слабой. Исходя из этого, выделенные изоляты могут закрепляться на субстрате и быть более устойчивы к внешним факторам, тем самым лучше защищать растения от фитопатогенных грибов.

При оценке фитопатогенных свойств бактерий-антагонистов выявлено, что все исследуемые штаммы не проявляли способности к мацерации растительных тканей, а также не разрушали пектин и целлюлозу. При выявлении зоопатогенных свойств *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* было определено, что изоляты не обладали ферментами: плазмокоагулазой, лецитиназой, ДНКазой и гемолизином, что свидетельствует об отсутствии у них зоопатогенного потенциала. Данные штаммы можно рассматривать как безопасные для животных и рекомендовать для дальнейшего практического использования.

Заключение. Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. Эпифитная и эндофитная микробиота яровой мягкой пшеницы разных сортов саратовской селекции включала 6 видов бактерий родов: *Bacillus*, *Pantoea* и *Enterobacter*. Среди бактерий виды *B. pumilus* и *P. agglomerans* показали наиболее высокую встречаемость (100%) и количественный показатель (10^4 КОЕ/мл).

2. Грибковая микробиота яровой мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 с видимыми поражениями зерновок включала микромицеты родов: *Alternaria*, *Rhizopus*, *Mucor* и *Cladosporium*. Среди микромицетов наибольший индекс встречаемости имел *R. stolonifer* (71%), его количественный показатель так же имел большое значение (10^4 КОЕ/мл).

3. Наибольшей антагонистической активностью по отношению к грибам обладали виды: *B. amyloliquefaciens* (от 62% до 66%) и *B. subtilis* (от 54% до 62%).

4. *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* обладали большим спектром ферментов для подавления роста микромицетов, которые вызывают заболевания зерновок яровой мягкой пшеницы.

5. Умеренное образование биопленок наблюдалось у бактерий *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, слабое — у *B. licheniformis*.

6. Все выделенные штаммы не обладали зоопатогенными и фитопатогенными свойствами, а значит не будут негативно сказываться на растениях и животных при их практическом использовании в качестве средств биоконтроля.

Список использованных источников

1 Тихомиров, К. Ю. Структура мирового рынка пшеницы: крупнейшие игроки и их риски, / К. Ю. Тихомиров // Мировая экономика и мировые финансы. – 2025. – Т. 4. № 4. – С. 32–39.

2 Создание биопрепаратов, перспективных для сельского хозяйства / Н. Г. Захарова И [Др.] // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2006. – Т. 148. – С.102–111.

3 Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий / А. А. Широких [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – №3. – С.73–80.

4 Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М.: Мир, 2001. – 486 с.

5 Благовещенская, Е. Ю. Фитопатогенные микромицеты. Учебный определитель / Е. Ю. Благовещенская. – М.: ЛЕНАНД, 2015. – 240 с.

6 Отбор стрептомицетов-хитинолитиков для биоконтроля грибных фитопатогенов, / И. Г. Широких и [др.] // Сельскохозяйственная микробиология и микология. – 2025. – №26 (3). – С. 595–607.

7 Нетрусова, А. И. Практикум по микробиологии, / А. И. Нетрусова. – Учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по направлению 510600 "Биология", спец. 012400 "Микробиология". – Москва: Академия, 2005. – С. 128–129.

8 Егоров, Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Практическое пособие / Н. С. Егоров. – М.: Московский государственный университет, 1983. – 251 с.

9 Марданова, А. М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования / А. М. Марданова, Д. А. Кабанов. – Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.