

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
СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ (*PRUNUS DOMESTICA* L., 1753)
НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
И ВЛИЯНИЕ НА НЕЁ ХИМИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

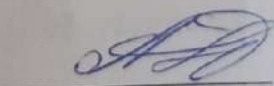
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Тимашовой Анастасии Александровны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук



А.М. Петерсон

08.06.2023

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук



С.А. Степанов

08.06.2023

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы. Слива домашняя – растение южного и центрального региона, занимающая третье место по выращиванию среди плодовых культур, уступая лишь яблоне и вишне. Объёмы сбора сливы и других косточковых культур (абрикос, персик, вишня, черешня) в период с 2014 года по 2019 год выросли на 20,8 %. В Саратовской области ее в основном выращивают в приусадебных садах. В настоящее время численность сливовых деревьев в специализированных хозяйствах и садах сокращается. Безусловно, на сокращение оказывают влияние такие факторы, как высокая (в летний период) и низкая (в зимний период) температура, засуха [1]. Колоссальный ущерб наносят деревьям и насекомые-вредители. Вследствие этого в сельском хозяйстве используют различные инсектициды химического происхождения для защиты деревьев сливы [2]. Однако их применение может не только защитить растения от насекомых-вредителей, но и нанести вред микробиоте обрабатываемых побегов. В результате растения лишаются полноценной микробиоты и становятся более восприимчивыми к фитопатогенным бактериям и грибам.

Микрофлора сливы домашней и близких ей видов изучалась в Краснодаре, Ставрополе, республике Адыгея, Узбекистане [3,4,5,6]. На территории Саратовской области аналогичные исследования не проводились.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стало выявление особенностей эпифитной микробиоты сливы домашней (*Prunus domestica L.*) 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 сливы в условиях Саратовской области.
2. Проследить сезонную динамику качественных и количественных характеристик микробиоты.

3. Установить пищевые потребности бактерий-доминантов эпифитной микробиоты сливы.

4. Изучить влияние химических инсектицидов на микробиоту сливы в условиях *in vitro* и *in vivo*.

5. Выявить химические инсектициды, наносящие минимальный вред нормальной микробиоте этой культуры.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования послужили побеги сливы домашней.

На основании данных научных статей, а также интернет-ресурсов были отобраны инсектициды, наиболее широко применяемые для обработки сливы от насекомых-вредителей: Кинмикс, Алатар, Фуфанон-нова, Би-58, Биокилл, Танрек.

Фрагмент листовой пластинки размером 2x2 см засеивали отпечатком на картофельную среду (картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, вода – 1 л) для выделения бактерий и среду PDA (картофель – 200 г, агар-агар – 15 г, глюкоза – 20 г, вода – 1 л) 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 картофельную среду и на среду PDA.

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

Идентификацию бактерий проводили с помощью определителей Берги и программы ABIS. Для идентификации грибов использовали определители Д. Саттона и Е.Ю. Благовещенской.

Для выявления целлюлолитической активности использовали среду Хетчинсона и Клейтона (целлюлоза – кусочки фильтровальной бумаги (10 г/л),

NaNO_3 – 2,5 г, K_2HPO_4 – 1,0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г, NaCl – 0,1 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, вода дистиллированная – 1000 мл).

Пектолитическую активность определяли по способности к мацерации тканей листьев капусты, клубней картофеля, корнеплодов моркови, редиса и свёклы.

Для определения фитотоксичности из суточных культур по стандарту мутности делали взвесь концентрацией 10^6 м.к./мл. Полученной взвесью обрабатывали семена редиса (15 штук) и пшеницы (15 штук), которые затем проращивали в чашках Петри. Контролем служили семена, обработанные стерильным физиологическим раствором.

Для выявления устойчивости микробиоты листьев сливы домашней к действию инсектицидов в условиях *in vitro* в подготовленные чашки Петри помещали листовые пластинки сливы и смачивали их растворами инсектицидов, приготовленными согласно инструкциям производителей. Контрольные образцы обрабатывали стерильной водой. Эксперимент осуществляли при комнатной температуре (+24-27°C). Через 2 и 7 дней после обработки производили посев листовых пластинок на питательные среды (КС и PDA) методом отпечатка. Культивировали при +28° С. Затем проводили количественный учёт ассоциантов.

Для выявления устойчивости микробиоты листьев сливы домашней к действию инсектицидов в условиях *in vivo* растения, которые до этого ничем не обрабатывались, опрыскивали препаратами в утренние часы. Контрольные растения обработке не подвергались. Спустя неделю после обработки производили посев листовых пластинок на питательные среды (КС и PDA) методом отпечатка и количественный учёт ассоциантов.

Структура и объём работы. Работа изложена на 56 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа проиллюстрирована 14 таблицами и 19 рисунками. Список использованных источников включает в себя 58 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена информация о систематическом положении сливы домашней, её ботаническом описании, особенностях культивирования, основных болезнях и вредителях. Также представлена информация о инсектицидах, используемых для сливы, и эпифитной микрофлоре и её роли в колонизационной резистентности.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты экспериментов по выделению микробиоты с побегов сливы домашней и влиянию на неё химических инсектицидов.

С поверхности побегов сливы в Саратовской области было изолировано 36 штаммов бактерий 7 видов и 30 штаммов грибов 15 видов.

В составе эпифитной микробиоты сливы доминировали грибы, в то время как эндофитная микробиота этих же побегов включала лишь бактерий.

Бактериальная составляющая эпифитной микробиоты сливы в основном была представлена родом *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. soli*, *B. bataviensis*, *B. halodurans*). Рода *Paenibacillus*, *Cellulomonas*, *Lactococcus* были представлены единичными видами. Бактериальная биота внутренней среды побегов была значительно беднее и включала такие виды как *B. subtilis*, *B. soli* и *Paenibacillus alvei*.

Грибная микробиота наружной поверхности побегов сливы оказалась очень разнообразна. Наиболее широко были представлены роды *Aspergillus* и *Fusarium*.

Бактериальная микробиота, выделенная с поверхности побегов сливы домашней, представлена бактериями, относящимися к филумам *Actinomycetota* и *Firmicutes*. Большинство видов принадлежат классу *Bacilli*, в то время как один из изолированных видов (*C. cellulans*) относится к классу *Actinomycetia*. В нормальной микрофлоре сливы домашней преобладают бактерии, относящиеся к семейству *Bacillaceae*.

Выделенные виды относятся к двум филумам: *Ascomycota*, к которому принадлежат 14 из 15 изолированных видов, и *Mucoromycota* (*Rhizopus arrhirus*). В микробиоте сливы домашней на территории Саратовской области преобладают грибы, относящиеся к классам *Eurotiomycetes* и *Sordariomycetes*. К классам

Chaetothyriomycetes и *Zygomycetes* относятся *Exophiala jeanselmei var jeanselmei* и *Rhizopus arrhirus* соответственно. Наибольшее количество изолированных штаммов принадлежит семействам *Trichosomaceae* и *Nectriaceae*.

Большая часть исследуемых штаммов не обладала липолитической активностью: лишь *B. subtilis* 26 использовал подсолнечное масло. В среде выделения данных бактерий низкое содержание липидов, поэтому большинство штаммов не могут использовать жиры в качестве источника углерода. Сахаролитическая активность штаммов была значительно выше. Это может быть связано с тем, что на поверхности побегов сливы часто присутствуют колонии тлей, выделяющих сахаристые пади, которые могут служить источником углерода для эпифитной микробиоты [7]. 100 % штаммов были способны использовать в качестве источника углерода глюкозу, 71 % использовали сахарозу, штаммы 2, 7, 33 – маннит, сорбит и мальтозу. Все исследуемые штаммы не использовали в качестве источника углерода лактозу и арабинозу. Наиболее востребованными источниками азота оказались белки (желатин), пептон и соли аммония, которые использовали все штаммы. Нитраты метаболизировали 86 % штаммов. 57% исследуемых штаммов были способны использовать атмосферный азот. Больше всего азотфиксаторов находится в почве, откуда они могли быть занесены на поверхность сливы с помощью ветра или насекомыми.

В отобранных пробах сливы домашней наиболее часто встречались грибы *Alternaria alternata* (47%), *Rhizopus arrhirus* (17,18%), *Ulocladium conidiophores* (17,18%). Количественные показатели были также наиболее высокими ($10 \cdot 10^3$ КОЕ/см²). Данные грибы вызывают альтернариозы, фузариозы, гнили и пятнистости растений.

В результате проведённых исследований было выявлено, что целлюлитической активностью обладает 71% выделенных штаммов, а пектолитической – 57% штаммов.

Было проведено исследование на выявление токсичности продуктов метаболизма исследуемых штаммов бактерий для однодольных (пшеница) и двудольных (редис) растений. Было обнаружено, что наибольшей

фитотоксичностью обладал штамм *Bacillus bataviensis* 7, наименьшей фитотоксичностью из исследуемых штаммов – *B. soli* 3.

Наши исследования свидетельствуют о потенциальной фитопатогенности сапрофитических штаммов бактерий, изолированных с побегов сливы домашней.

Эпифитная микробиота растений характеризуется большой вариабельностью как по численности, так и по составу, в зависимости от сезонного развития растений и вегетационного периода. В связи с этим были проведены исследования сезонной динамики бактериальной микробиоты и грибного микокомплекса. Для определения сезонной динамики качественных и количественных характеристик микробиоты сливы домашней отбор проб проводился весной, летом и осенью.

В течение сезона бактериальная микробиота листьев сливы домашней значительно менялась. Среди бактерий в течение трёх сезонов встречались виды *B. subtilis* (индексы встречаемости в пробах от 98 до 100 %), *L. plantarum* и *C. cellulans* (индексы встречаемости в пробах от 7 до 40 %). *B. soli*, *B. bataviensis*, *B. halodurans* встречались только весной, *P. alvei* присутствовал почти во всех весенних и летних пробах, однако весной данный вид не выделялся. Таким образом, единственным видом, который стабильно присутствовал на побегах сливы, оказался *B. subtilis*.

A. alternata является самым часто встречаемым грибом на поверхности сливы домашней, данный вид присутствовал в каждом сезонном исследовании в 40-100 % проб. *C. cladosporioides* также встречался весной, летом и осенью и присутствовал в 19-100 % проб, причём численность этого вида существенно увеличивалась к осени.

На использованных в экспериментах по изучению влияния инсектицидов на побег сливы домашней в условиях *in vitro* доминировали бактерии *B. subtilis* и *C. cellulans*. *B. subtilis* обладает высокими антагонистическими свойствами, в связи с чем имеет большое значение в защите сливы домашней от фитопатогенов [8].

Посев листьев *in vitro* проводился на 2 и 7 сутки после обработки для того, чтобы отследить динамику изменения бактериальной биоты. Анализ общей

численности бактерий на 2 день показал, что Кинмикс, Фуфанон-нова, Би-58 и Танрек стимулировали их рост, остальные препараты подавляли рост бактерий. При изучении действия инсектицидов на отдельные таксоны, было выявлено, что использование Фуфанон-нова и Танрек на 2 сутки стимулировало рост споровых бактерий. Численность неспоровых бактерий оставалась стабильной. На 7 сутки общая численность бактерий при действии инсектицидов Алатар и Танрек была сопоставима с контролем. Остальные препараты значительно снижали численность по сравнению с контролем. Снижение численности бактерий произошло за счёт угнетения роста *B. subtilis*.

Таким образом, в условиях *in vitro* наиболее безопасным для бактериальной микробиоты на протяжении всего эксперимента оказался препарат Танрек.

На листьях сливы, использованных в экспериментах, встречались грибы *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum* и *Rhizopus arrhirus*. Проанализировав содержание грибов на второй день после обработки, было выявлено, что препараты Фуфанон-нова и Танрек простимулировали рост грибов, общая численность микокомплекса после обработки остальными инсектицидами была сопоставима с контролем. Алатар был единственным из препаратов, который полностью подавил рост *C. cladosporioides*. Кроме того, Кинмикс полностью подавил рост *R. arrhirus*, Фуфанон нова и Танрек простимулировали рост данного гриба, остальные препараты не оказали достоверного влияния. Численность остальных видов была сопоставима с контролем. Разные инсектициды оказывали разное действие на те или иные виды грибов. К 7 суткам анализ содержания общего количества грибов выявил, что лишь Кинмикс, Би-58 и Танрек не вызывали рост численности грибной микробиоты, остальные же препараты повышали ее численность. Действие на отдельные виды грибов было схоже со 2 днем. Численность *Alternaria* по-прежнему оставалась стабильной во всех вариантах эксперимента. Препараты Алатар и Фуфанон-нова простимулировали рост *R. Arrhirus*, а Би-58 - *C. cladosporioides*. Алатар также подавлял рост *C. cladosporioides*, а Кинмикс - рост *R. arrhirus*.

В условиях *in vitro* препараты в основном подавляли рост бактериальной биоты и стимулировали рост грибной.

На использованных в экспериментах *in vivo* листьях сливы домашней доминировали бактерии *B. subtilis*, *P. alvei*, *L. plantarum*. Через 7 дней после обработки общее количество бактериальной микробиоты снизилось при использовании препаратов Кинмикс, Алатар, Фуфанон-нова и Биокилл. Наиболее сильное воздействие оказал препарат Фуфанон-нова. Стабильной эпифитная микробиота оставалась при действии препаратов Би-58 и Танрек. Воздействие препаратов на споровые и неспоровые виды бактерий различалось. Наиболее чувствительным к действию инсектицидов оказался *P. alvei*, рост которого подавлялся препаратами Кинмикс, Алатар, Фуфанон-нова и Биокилл. При действии препаратов Би-58 и Танрек его численность была сопоставима с контролем. Препарат Биокилл полностью подавил рост единственного неспорового доминанта *L. plantarum*. Инсектициды Алатар, Фуфанон-нова и Би-58 также существенно подавляли его рост. При действии других препаратов численность вида была сопоставима с контролем. Наиболее стабильным видом оказался *B. subtilis*. Это связано с высокой антагонистической активностью вида, а также со способностью образовывать споры при неблагоприятных условиях. Среди грибов в условиях *in vivo* были выделены *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *A. niger*. Грибы оказались также неустойчивы к действию инсектицидов. Препараты Кинмикс, Алатар, Биокилл и Танрек снижали численность микокомплекса. Анализ влияния инсектицидов на отдельные таксоны грибов показал, что Алатар подавлял рост *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *A. niger*, а препараты Биокилл и Танрек – *C. cladosporioides*, *A. niger*. В условиях *in vivo* рост бактерий в наибольшей степени подавлялся препаратами Кинмикс, Алатар, Фуфанон-нова и Биокилл, при этом Алатар, Биокилл и Танрек угнетали рост грибов.

Таким образом, наиболее безопасным для микробиоты растений является Би-58, с практической точки зрения целесообразнее применять препарат Танрек, который не подавляет рост бактерий, но снижает численность грибов на обработанных растениях.

Выводы

1. Бактериальная составляющая эпифитной микробиоты сливы в основном была представлена родом *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. soli*, *B. bataviensis*, *B. halodurans*). Рода *Paenibacillus*, *Cellulomonas*, *Lactococcus* были представлены единичными видами. Наиболее широко среди грибов были представлены роды *Aspergillus* и *Fusarium* (по 3 вида).
2. Основными доминантами эпифитной микробиоты сливы являются *B. subtilis* (индекс встречаемости 98-100%), *A. alternata* (40-100%), *C. cladosporioides* (19-100%), которые стабильно встречались в течение всего вегетационного сезона.
3. Наиболее востребованными источниками углерода для бактерий-ассоциантов сливы домашней являлись белки, пептон глюкоза, источником азота – белки, пептон и соли аммония.
4. В условиях *in vitro* инсектициды Кинмикс, Фуфанон, Би-58 и Биокилл подавляли рост бактериальной биоты, препараты Алатар, Фуфанон-нова и Биокилл стимулировали рост грибной микробиоты.
5. В условиях *in vivo* большая часть препаратов подавляла рост как бактериальной, так и грибной микробиоты. Препараты Би-58 и Танрек не влияли на численность бактериальной микробиоты, Кинмикс и Би-58 – на численность грибной микробиоты. Стимуляции роста микроорганизмов в условиях *in vivo* не происходило.
6. Наиболее безопасным для микробиоты растений является препарат Би-58, с практической точки зрения целесообразнее применять препарат Танрек, который не подавляет рост бактерий, но снижал численность грибов на обработанных растениях.

Список использованных источников

1. Осипов, Г. Е. Биологические особенности сливы и селекционное решение проблемы сортимента Нижнего Поволжья: автореф. дис.....канд. с.-х. наук / Г. Е. Осипов. – Мичуринск, 2011. – 47 с.
2. Оберемок, В. В. Современные инсектициды: их преимущества, недостатки и предпосылки к созданию ДНК-инсектицидов / В. В. Оберемок, А. С Зайцев //

- Учёные записки таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Серия: биология, химия. – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 112-126.
3. Якуба, Г. В. Особенности формирования функциональной структуры микопаатокомплексов яблони и сливы в условиях усиления абиотического и антропогенного воздействий / Г. В. Якуба, И. Г. Мищенко // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2022. – №2. – С. 160 -165.
 4. Алейникова, М. В. Количественные и качественные показатели эпифитной микрофлоры карпосферы некоторых плодовых культур / М. В. Алейникова // Наука и современность. – 2011. – №12. – С. 10-11.
 5. Идентификация эпифитной микрофлоры плодовых культур республики Адыгея / И. Е. Бойко [и др.] // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2006. – №5. – С. 15-16.
 6. Тилакова, Ш. Х. Доминирующие бактерии природных ниш Андижанской области / Ш. Х. Тилакова, Ш. Ю. Агзамова // Multidisciplinary scientific journal. – 2022. – №1. – С. 215-225.
 7. Коноплёва, М. М. Продукты жизнедеятельности медоносной пчелы / М. М. Коноплёва // Вестник фармации. – 2011. – №1. – С. 76-86.
 8. Орлова, Т. Н. Антагонистическая активность *V. subtilis* / Т. Н. Орлова, А. Н. Иркитова, А. В. Гребенщеква // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2018. – №5. – С. 141-145.

Мищенко