

УДК 632.3.01/08.579.64

DOI: 10.25684/0513-1634-2024-150-50-57

ЭПИФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ РАСТЕНИЙ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ И ОЦЕНКА ИХ ФИТОПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ

Алина Равильевна Гальперина, Анна Николаевна Пархоменко,
Ольга Борисовна Сопрунова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет»,
414056, Россия, Астрахань, ул. Татищева, 16
E-mail: alina_r_s@rambler.ru

С целью изучения культурально-морфологических и фитопатогенных свойств с растений Астраханской области, обладающих явными признаками бактериального поражения, выделяли изоляты эпифитных микроорганизмов. В ходе экспериментальных исследований в чистые культуры выделено 52 изолята. У изолятов выявляли наличие таких факторов патогенности как мацерирующая активность по отношению к тканям клубней картофеля, корнеплодов моркови и свеклы, некротическая активность по отношению к проросткам кабачка белоплодного и фитотоксическая активность по отношению к семенам горчицы белой. Выявлено, что 25 изолятов обладают гидролитической активностью по отношению к растительным тканям картофеля, моркови и свеклы: 13 – высокой, 12 средней. 10 изолятов способны вызывать обширные некротические поражения проростков кабачка. Комплексным фитотоксическим действием на прорастание семян горчицы и морфометрические показатели проростков обладают 2 изолята. Для последующей идентификации отобраны все 25 изолятов с гидролитической активностью. Изоляты ФП17 и ФП18, обладающие всеми факторами патогенности, могут быть рекомендованы для апробирования агрохимических и биологических средств защиты растений.

Ключевые слова: *аридные экосистемы; эпифитные микроорганизмы; патогенные свойства; фитотоксичность; мацерирующая активность*

Введение

В настоящее время наблюдаются глобальные изменения в популяциях и видовом составе фитопатогенных микроорганизмов, вызванные изменениями климата, импортом семенного материала, применением новых, зачастую узконаправленных средств защиты растений. Меняются ареалы традиционных фитопатогенных видов, появляются новые виды, ранее не поражавшие те или иные культуры. Для разработки эффективных мер защиты растений необходим постоянный мониторинг происходящих изменений, отслеживание новых фитопатогенов и их свойств [1].

Несколько сотен видов бактерий, принадлежащих к Proteobacteria, Mollicutes и Actinomycetes, вызывают большое количество различных болезней растений. Некоторые из них губительны для сельскохозяйственных культур [2]. Симптомами бактериальных заболеваний являются пятна, ожоги, язвы, гниение тканей и/или дисбаланс гормонов, которые, среди прочего, приводят к чрезмерному росту растений, задержке роста, ветвлению корней и эпинастии листьев [3, 4].

Астраханская область, находясь в зоне аридного климата, является регионом с развитым агропромышленным комплексом, что определяет повсеместное использование современных агротехнологий, нацеленных на управление агроландшафтом через севообороты, системы обработки почвы, применение удобрений и средств защиты растений. При этом особое внимание получают меры защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей заболеваний [5-7]. Создание коллекции местных популяций фитопатогенных микроорганизмов необходимо для изучения

патогенного комплекса возбудителя, апробации средств защиты и отбора устойчивых форм растений.

Целью настоящей работы являлось выделение новых изолятов эпифитных микроорганизмов растений Астраханской области, изучение их культурально-морфологических признаков и факторов патогенности.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись фрагменты растений с явными признаками бактериального заражения (плоды груши (*Pyrus communis* L.), винограда (*Vitis vinifera* L.), кизила *Cornus mas* L.), томата (*Solanum lycopersicum* L.), клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.), листья дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) произрастающих на территории Астраханской области.

Навеску исследуемого материала в стерильных условиях измельчали и переносили в колбы с 50 мл стерильной воды. Из полученной суспензии проводили высев при помощи шпателя Дригальского на поверхность стерильных питательных сред [8] для выделения и культивирования фитопатогенных бактерий: свекольный агар, YDC-среда, TZCA-агар, YMA-среда, среда Кинг В [9].

Выросшие колонии пересевали в чистую культуру для изучения культурально-морфологических [10] и фитопатогенных свойств. Оценку фитопатогенных свойств проводили на основе определения мацерирующей способности по отношению к растительным тканям клубней картофеля, корнеплодов свеклы и моркови [8]; некротической активности по отношению к проросткам кабачка белоплодного (*Cucurbita pepo* var.) сорта Ванда [10], а также фитотоксической активности по отношению к семенам горчицы белой (*Alba sinapis* Alfken.) [11].

Результаты и обсуждение

В ходе исследований были выделены эпифитные микроорганизмы со всех объектов (рис.1).

Выявлено, что максимальная обсемененность эпифитами ($3,2 \cdot 10^5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ – $1,2 \cdot 10^5 \pm 0,1 \cdot 10^5$ КОЕ/г) отмечалась у плодов груши и винограда, а минимальная - у листьев дуба ($5,6 \cdot 10^2 \pm 0,2 \cdot 10^2$ - $1,3 \cdot 10^2 \pm 0,1 \cdot 10^2$ КОЕ/г).

Выросшие колонии пересевали в чистые культуры. Всего выделили 52 изолята эпифитных микроорганизмов, из которых 11 представлены дрожжевыми, а 41 – бактериальными культурами.

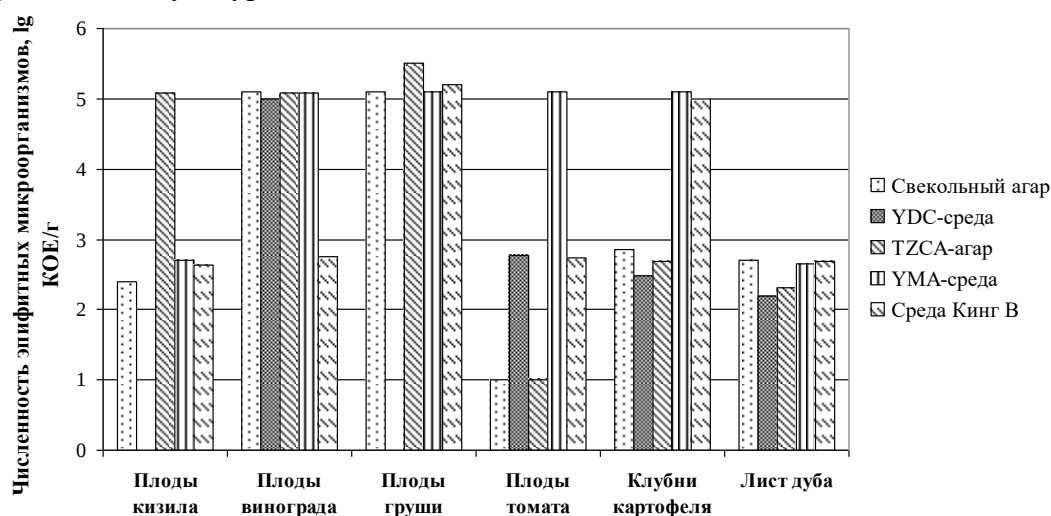


Рис. 1 Численность эпифитных микроорганизмов, выделенных из растительных объектов

Изучение морфологических свойств бактериальных изолятов показало, что все они представлены грамположительными палочками и кокками. Преобладали грамположительные неспоровые палочки (рис. 2).

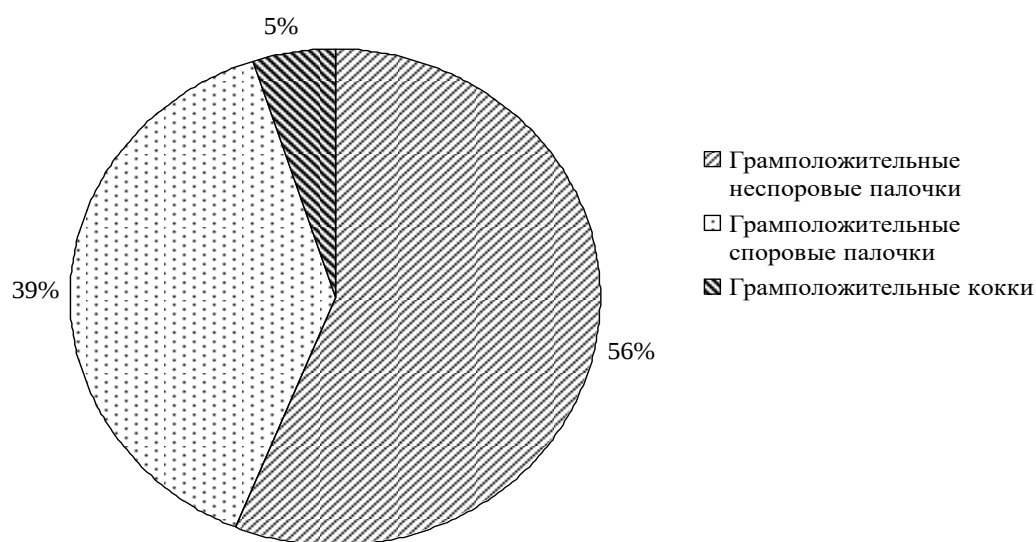


Рис. 2 Соотношение морфологических форм эпифитных бактериальных изолятов

На следующем этапе исследований оценивали фитопатогенные свойства полученных изолятов (табл. 1).

Таблица 1

Мацерирующая активность изолятов эпифитных микроорганизмов

Изоляты	Мацерирующая активность изолятов (% площади мацерации)		
	клубни картофеля	корнеплоды моркови	корнеплоды свеклы
<i>Изоляты с высокой гидролитической активностью</i>			
ФП1	100	40	40
ФП2	100	20	40
ФП6	100	60	40
ФП7	100	20	20
ФП9	40	40	100
ФП13	40	100	10
ФП14	100	20	40
ФП17	100	100	20
ФП18	100	20	20
ФП19	20	100	10
ФП20	20	100	20
ФП21	100	100	20
ФП25	60	60	60
<i>Изоляты со средней гидролитической активностью</i>			
ФП4	100	10	20
ФП5	60	10	20
ФП8	60	20	40
ФП10	60	10	60
ФП15	40	10	20
ФП23	20	60	10
ФП26	20	60	10
ФП27	40	20	10
ФП 30	100	10	10
ФП31	100	10	10
ФП32	100	10	10
ФП37	100	10	10

Мацерирующую активность изолятов определяли на тканях корнеплодов картофеля, моркови и свеклы, что позволило оценить способность к продуцированию амилолитических, пектолитических и целлюлолитических ферментов.

Выявлено, что из 52 изолятов мацерирующую активность по отношению к тканям клубней картофеля проявляют 20 изолятов; корнеплодов моркови – 12 изолятов; свеклы – 8 изолятов. Это позволило выделить изоляты с высокой и средней гидролитической активностью (см. табл. 1).

Некротическую активность изолятов определяли на трехсуточных проростках кабачка белоплодного сорта Ванда по методу Ворониной [11]. Для этого бактериальную суспензию исследуемых изолятов с титром клеток 10^6 КОЕ/мл уколам вносили в прикорневую часть проростков. Контролем служил стерильный изотонический раствор хлорида натрия. Далее проростки культивировали во влажных камерах при постоянном освещении и комнатной температуре в течение 3 суток. По истечении этого времени отмечали изменения опытных растений по сравнению с контрольными: задержка роста главного и придаточных корней, некроз тканей, редукция корневых частей и т.д.

В ходе исследований выявлено, что некротической активностью обладают 18 изолятов (табл. 2).

Для дальнейших исследований использовали изоляты с высокой и средней гидролитической активностью.

Таблица 2

Некротическая активность изолятов эпифитных микроорганизмов

Изоляты	Некротическая активность		
	Размеры главного корня, см	Выраженность признаков некроза	Направление роста корней
<i>Изоляты с высокой гидролитической активностью</i>			
ФП1	8	+++	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП2	5,3	++	придаточные корни растут в беспорядочном направлении
ФП6	6,0	+++	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП7	7,0	+	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП9	8,4	++	придаточные корни растут в беспорядочном направлении
ФП13	8,5	+++	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП14	9,6	-	рост главного корня в прямом направлении
ФП17	4,6	+++	рост главного корня в прямом направлении
ФП18	8,1	++	придаточные корни растут в беспорядочном направлении
ФП19	4,4	+++	главный и придаточные корни растут в беспорядочном направлении
ФП20	6,3	+++	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП21	6,7	-	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП25	5,7	+++	рост главного корня в прямом направлении
<i>Изоляты со средней гидролитической активностью</i>			
ФП4	6,2	+	главный и придаточные корни растут в беспорядочном направлении

Продолжение таблицы

ФП5	9,8	+++	рост главного корня в прямом направлении
ФП8	8,7	+	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП10	8,4	+	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП15	8,5	+	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП23	9,2	-	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП26	8,9	-	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП27	9,6	-	главный и придаточный корни растут в прямом направлении
ФП 30	7,8	+++	придаточные корни растут в беспорядочном направлении
ФП31	10,0	-	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП32	10,2	-	главный и придаточные корни растут в прямом направлении
ФП37	5,7	++	главный и придаточные корни растут в беспорядочном направлении

Примечания: «+++» - высокая выраженность признаков некроза: сильный некроз главного корня, придаточные полностью редуцированы, пораженные участки темно-коричневого цвета, ослизнение; «++» - средняя выраженность признаков некроза: главный корень редуцирован. придаточные корни подвержены слабому некрозу, пораженные участки светло-коричневого цвета; «+» - слабая выраженность признаков некроза: слабый некроз главного и придаточных корней, пораженные участки светло-коричневого цвета; «-» - признаки некроза отсутствуют

Важным свойством любого фитопатогена является способность инфицировать растение в период его прорастания из семени. Для оценки фитотоксических свойств изолятов использовали смена горчицы белой. Семена тест-растения поливали водной суспензией исследуемых изолятов с титром клеток 10^6 кл/мл, контролем служила стерильная водопроводная вода [8]. В результате исследований выявлено, что только 4 изолята существенно ингибируют прорастание семян (рис. 3).

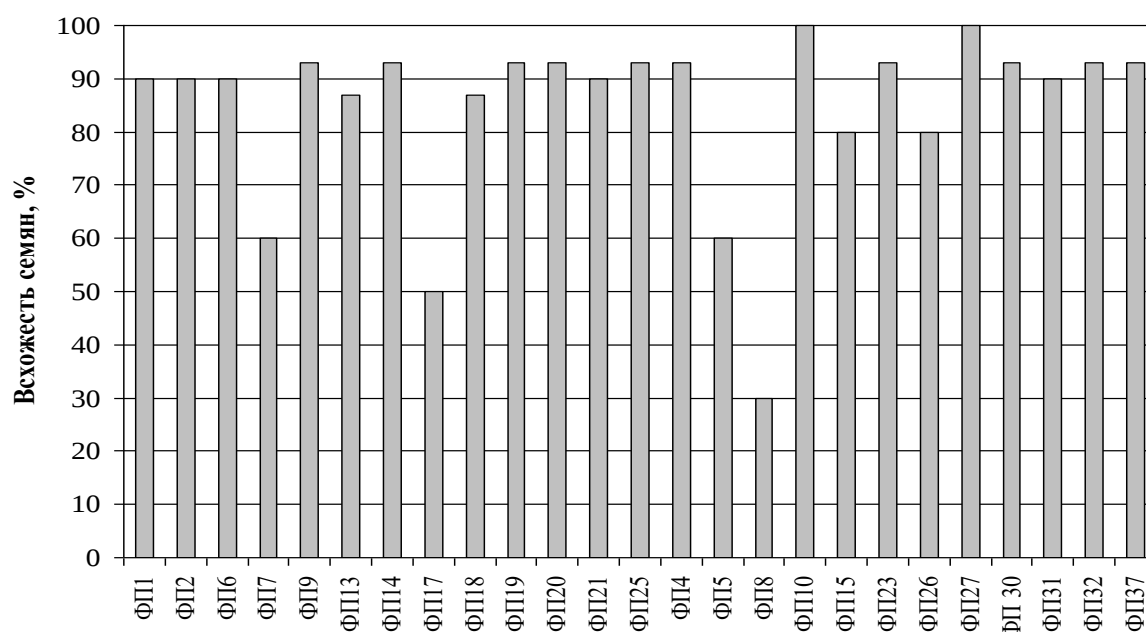
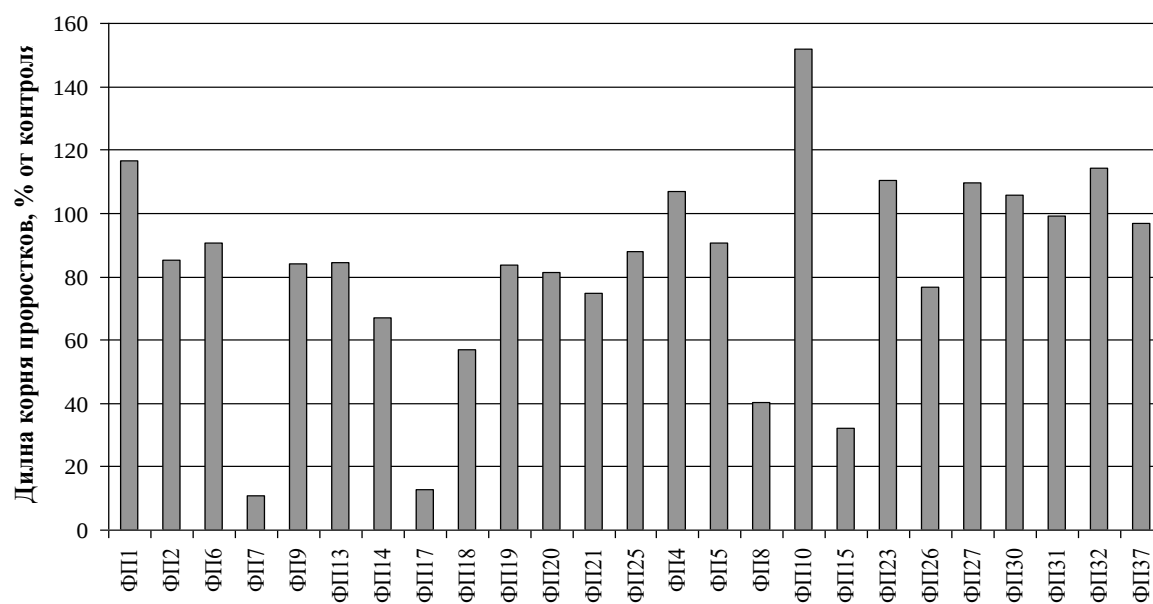
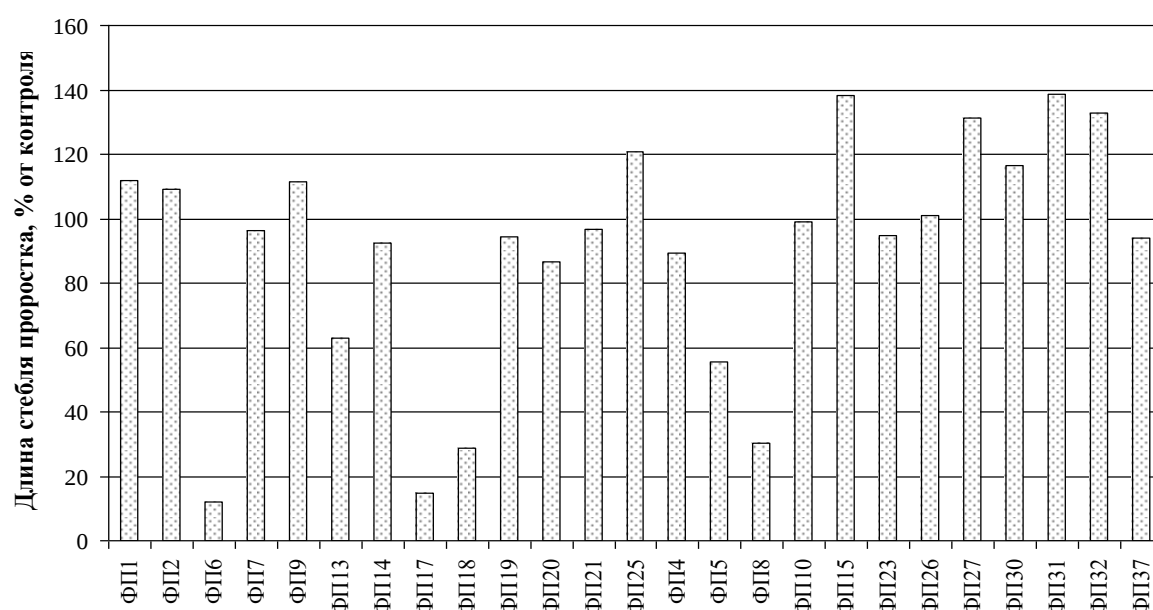


Рис. 3 Всхожесть семян в эксперименте

Помимо всхожести оценивали и морфометрические параметры проростков – длину корня и стебля. Отмечено, что 6 изолятов ингибируют развитие корня на 30% и более, что является признаком угнетения (рис. 4а). Схожая картина наблюдалась и при оценке длины стеблей проростков – 6 изолятов ингибируют развитие стебля (рис.4б).



а)



б)

Рис. 4 Морфометрические показатели проростков в эксперименте:
а) развитие корня, б) развитие стебля

Также отмечено, что 2 изолята угнетают все три параметра развития проростков – негативно влияют на всхожесть, развитие корня и стебля; а 3 изолята угнетают только развитие корня и стебля проростков.

Выводы

В результате проведенных исследований сформирована лабораторная коллекция эпифитных микроорганизмов, содержащая 52 изолята. Все изоляты окрашиваются по Граму положительно. Наибольшее количество изолятов (23 шт.) морфологически представлено неспоровыми палочками. Также отмечены споровые палочки и кокки. Изучение факторов фитопатогенности позволило выявить 25 изолята с гидролитической активностью: 13 изолятов с высокой и 12 со средней. При этом некротической активностью обладают всего 18 изолятов, а 10 – способны вызывать обширные некротические поражения. Выраженной фитотоксичностью по отношению к семенам обладают 2 изолята. Таким образом, для последующей идентификации отобраны 25 изолятов с гидролитической активностью, из которых изоляты ФП17 и ФП18 обладают всеми факторами патогенности.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» на тему «Аборигенные микроорганизмы – основа новых эко- и агробιοтехнологий Прикаспийского региона», номер государственной регистрации в ЕГИСУ: № 123031400044-2

Список литературы

1. Байрамбеков Ш.Б., Валеева З.Б., Дубровин Н.К., Полякова Е.В., Корнева О.Г. Научно обоснованные аргументы для фитосанитарной оптимизации орошаемых агроценозов овощебахчевых культур // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2012. – № 4(13). – С. 16-18.
2. Байрамбеков Ш.Б., Валеева З.Б. Совершенствование элементов технологий возделывания сельскохозяйственных культур в орошаемых условиях Нижнего Поволжья. – Астрахань: Издатель: Сорокин Роман Васильевич, 2015. – С. 101-106.
3. Нецадим Н.Н. Технология аграрного производства: методические рекомендации. – Краснодар: КубГАУ, 2019. – 82 с.
4. Желдакова Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы: Учеб. - метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. 31.01.01 «Биология». – Мн.: БГУ, 2006. – 116 с.
5. Хабибуллина А.Р. Выделение и характеристика бактериальной культуры для биологического контроля заболевания растений // Вестник технологического университета. – 2017. – Т.20, № 13. – С. 140-146.
6. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учеб. зав. / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: АСАДЕМИА, 2005. – 604 с.
7. Воронина М.В. Фитопатогенные бактерии рода *Agrobacterium*: генетическое разнообразие, диагностика, меры защиты. дис...канд. биол. наук. – М., 2018. – 180 с.
8. Зенова Г.М. Практикум по биологии почв: учеб. Пособие. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 120 с.
9. Adioumani A.E., Kakou-Ngazoa S., Trebissou J.N.D., Martin T., Addablah A., Koudou A., Kouassi K.S., Sina K. M., Coulibaly N., Aoussi S., Dosso M. Isolation and identification of phytopathogenic bacteria in vegetable crops in West Africa (Côte D’Ivoire) // African Journal of Microbiology Research. – Vol. 16. – N. 4. – p. 167-177. DOI: 10.5897/AJMR2021.9610
10. Jan van der Wolf J., De Boer S. Phytopathogenic bacteria // Principles of Plant-Microbe Interactions. – 2015. – P. 65-77. DOI:10.1007/978-3-319-08575-3_9
11. Strange R.N., Scott P.R. Plant disease: a threat to global food security // Annual Review of Phytopathology. – Vol. 43. – P. 83-116. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839

12. Kannan V., Bastas K., Devi R. Scientific and economic impact of plant pathogenic bacteria // Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. – Boca Raton, FL: CRCPress., 2015. – P. 369-392. DOI: 10.1201/b18892-21

Статья поступила в редакцию 29.07.2023 г.

Galperina A.R., Parhomenko A.N., Soprunova O.B. Epiphytic microorganisms of plants of the Astrakhan region and assessment of their phytopathogenic properties // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2024. – № 150 – P. 50-57

In order to study cultural, morphological and phytopathogenic properties, isolates of epiphytic microorganisms were isolated from plants of the Astrakhan region with obvious signs of bacterial damage. In the course of experimental studies, 52 isolates were isolated into pure cultures. The isolates revealed the presence of such pathogenicity factors as macerating activity in relation to the tissues of potato tubers, root crops of carrots and beets, necrotic activity in relation to seedlings of white-fruited squash and phytotoxic activity in relation to white mustard seeds. It was revealed that 25 isolates have hydrolytic activity in relation to plant tissues of potatoes, carrots and beets: 13 - high, 12 medium. 10 isolates are able to cause extensive necrotic lesions of squash seedlings. Two isolates have a complex phytotoxic effect on the germination of mustard seeds and morphometric parameters of seedlings. All 25 isolates with hydrolytic activity were selected for subsequent identification. And FP17 and FP18 isolates, which have all pathogenicity factors, can be recommended for testing agrochemical and biological plant protection products.

Key words: arid ecosystems; epiphytic microorganisms; pathogenic properties; phytotoxicity; macerating activity