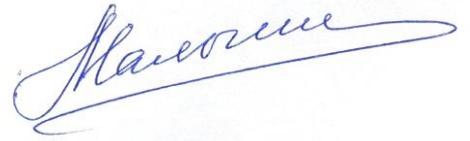


На правах рукописи



Малышина Марина Сергеевна

ДИНАМИКА ВИДОВОГО СОСТАВА И ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ МИКРОБОЦЕНОЗОВ ТЛЕЙ (НОМОРТЕРА: ARNIDIDAE),
ПАРАЗИТИРУЮЩИХ НА ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ
РАСТЕНИЯХ

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на кафедре микробиологии и физиологии растений

- Научный руководитель: Петерсон Александра Михайловна,
кандидат биологических наук, доцент
- Официальные оппоненты: Батлуцкая Ирина Витальевна,
доктор биологических наук, профессор,
НИУ «Белгородский государственный
университет»,
заведующая кафедрой биотехнологии
и микробиологии
- Карпунина Лидия Владимировна,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
заведующая кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии
- Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Самарский государственный
университет»

Защита состоится 15 ноября 2013 г. в 12 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. E-mail: biosovet@sgu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



С.А. Невский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современной экологии любой макроорганизм рассматривается как среда обитания, как своеобразная экосистема в узком значении этого понятия. Важнейшим компонентом такой экосистемы являются микроорганизмы, обитающие во внутренней среде хозяина и оказывающие на него огромное влияние (Сукачев, 1972; Балашов, 1982). Несмотря на это, микробоценозы большинства видов живых организмов остаются практически неизученными. Объектами наших исследований являются тли – широко распространённые вредители сельскохозяйственных культур. Многие фенотипические признаки этих насекомых определяются не собственными генами, а генами живущих в них бактерий, что позволяет рассматривать тлей как своеобразные симбиотические «сверхорганизмы» (Russel, Moran, 2006; Guay et al., 2009; Degnan et al., 2010). До настоящего времени внимание исследователей привлекали, в основном, облигатные симбионты тлей – бактерии рода *Buchnera*. Эти бактерии обеспечивают своих хозяев незаменимыми аминокислотами, которых нет в растительных соках, определяют способность насекомых приспосабливаться к колебаниям температуры (Douglas, 1998; Tsuchida et al., 2010). Из факультативных бактериальных симбионтов тлей в мировой литературе описано лишь небольшое количество видов, ассоциированных с гороховой тлёй (Mandrioli, Manicardi, 2013). Присутствие этих симбионтов защищает их хозяев от наездников и энтомопатогенных грибов, придает насекомым защитную пигментацию, способствует синтезу некоторых аминокислот. Вопрос о том, насколько разнообразны микробные ассоцианты других видов тлей, и какую роль они могут играть в жизнедеятельности своих хозяев остается открытым.

Интерес к изучению тлей связан и с их участием в сохранении и передаче возбудителей болезней растений (Nault, 1997; Leach, 2007; Hogenhout, 2008; Stawrinides, Nadarasah, 2011). В литературе большое внимание уделяется роли тлей как переносчиков фитопатогенных вирусов. Среди возбудителей бактериозов растений лишь для *Pseudomonas syringae* (Stavriniades et al., 2009), *Dickeya dadantii*, *Erwinia aphidicola*, *Pantoea stewartii* (Nadarasah, Stavriniades, 2011) доказана способность выживать и размножаться в организмах этих насекомых. Детальное изучение спонтанной микробной обсеменённости тлей поможет выявить более широкий спектр фитопатогенов, способных сохраняться в организмах этих вредителей.

Изучение микробоценозов тлей является важным этапом разработки новых микробиологических методов ограничения численности насекомых. Существующие биопрепараты на основе облигатных энтомопатогенов имеют ряд недостатков, главный из которых – необходимость в постоянных повторных обработках. Причина этого в высокой степени специализации таких микроорганизмов: гибель насекомых влечет за собой отмирание самих возбудителей бактериозов. Этот недостаток микробных инсектицидов может быть устранен с помощью методов генной инженерии. Предлагается вводить

гены, обеспечивающие синтез токсических веществ, в широко распространенные сапрофитные бактерии (Lacey, Кауа, 2007). Такие микроорганизмы после гибели вредителей будут сохраняться в природной среде как обычные сапрофиты и в течение длительного времени контролировать численность насекомых. Становится актуальным поиск штаммов бактерий, которые могли бы послужить материалом для создания таких трансгенных агентов.

В связи с этим, исследование микробоценозов тлей не только представляет теоретический интерес, но и имеет большое практическое значение.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стало выявление видового состава и эколого-физиологических особенностей микробоценозов тлей, паразитирующих на древесных и кустарниковых растениях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить эколого-физиологические аспекты формирования микробоценозов тлей.

2. Установить структуру микробоценозов четырёх видов тлей: яблонной (*Aphis pomi* Deg.), сливоопыленной (*Hyalopterus pruni* Geoffr.), вишневой (*Myzus cerasi* F.) и смородиновой (*Aphis schneideri* C.B.), и количественные показатели содержания отдельных видов бактерий-ассоциантов в организмах этих насекомых.

3. Оценить роль исследуемых видов тлей как резервуаров фитопатогенных бактерий в природе.

4. Выявить изменчивость качественных и количественных характеристик микробоценозов тлей.

Научная новизна. Впервые установлена структура микробоценозов яблонной (*A. pomi*), сливоопыленной (*H. pruni*), вишневой (*M. cerasi*) и смородиновой (*A. schneideri*) тлей; показана высокая степень изменчивости микробоценозов тлей как в разные годы, так и в течение одного сезона; доказана способность тлей сохранять в своём организме фитопатогенные виды *Brenneria nigrifluens*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Erwinia mallotivora*, *Pantoea ananatis*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*; установлено высокое содержание в организмах тлей азотфиксирующих бактерий.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты существенно расширяют представления о роли тлей в циркуляции бактерий в природе. Выявленная способность некоторых фитопатогенных бактерий сохраняться в организме тли позволит фитопатологам более точно прогнозировать распространение вызываемых ими бактериозов растений. Выделены штаммы бактерий, которые являются обитателями окружающей среды, но способны успешно проникать во внутреннюю среду тлей и активно там размножаться. Эти штаммы могут быть использованы для создания трансгенных энтомопатогенов, которые позволят более эффективно контролировать численность этих вредителей.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на II Международной научно-практической конференции «Биодиверситология. Современные проблемы сохранения и изучения биологического разнообразия» (Чебоксары, 2010); Региональной конференции биологического факультета СГУ «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2011); Международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011); Международной заочной научно-практической конференции: «Современные тенденции в науке: новый взгляд» (Тамбов, 2011); I Международной интернет-конференции «Растения и микроорганизмы» (Казань, 2011); Региональной конференции биологического факультета СГУ «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2012); XIV съезде Русского энтомологического общества (Санкт-Петербург, 2012); Всероссийской (с международным участием) научной конференции «Актуальные проблемы экологии и физиологии живых организмов» (Саранск, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из которых 4 в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Личный вклад автора. Автор лично провёл полевые и лабораторные исследования. Обработка полученных данных, их интерпретация и оформление проведены автором самостоятельно. Доля участия автора в совместных публикациях составляет 60–80%.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах, содержит 23 таблицы, 31 рисунок. Состоит из введения, 6 глав, 6 выводов, заключения, списка литературы, включающего 184 источника, в том числе 121 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Микробоценозы тлей в значительной степени формируются за счет микроорганизмов, попадающих во внутреннюю среду насекомых с кормовых растений и способных адаптироваться к новым условиям обитания.

2. Организмы яблонной, сливоопыленной, вишневой и смородиновой тлей являются средой обитания для широкого круга гетеротрофных и фитопатогенных бактерий. Многие сапрофитические виды бактерий, изолированные из тлей, обладают различными факторами фитопатогенности.

3. Видовой состав микробоценозов всех исследованных видов тлей крайне нестабилен и существенно изменяется в разные годы и в течение сезона.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность проблемы, определены цель и задачи исследования, охарактеризована научная новизна, научно-практическая значимость, представлены сведения об апробации работы и сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ТЛЕЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ

В главе проведен обзор литературы, посвящённой особенностям морфологии, физиологии и экологии тлей, которые могут оказывать влияние на формирование микробоценозов этих насекомых. Обобщены имеющиеся в мировой литературе данные об облигатных и факультативных симбионтах тлей, рассмотрена роль тлей в сохранении и распространении фитопатогенных микроорганизмов; проанализированы перспективы использования энтомопатогенных микроорганизмов для борьбы с этими вредителями.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований послужили бескрылые и крылатые самки тлей, собранные в Саратовском, Энгельском, Балашовском и Базарно-Карабулакском районах Саратовской области в 2007–2012 гг. Было исследовано 2300 особей яблонной (*Aphis pomi* Deg.), 1000 особей сливоопыленной (*Hyalopterus pruni* Geoffr.), 800 особей вишневой (*Myzus cerasi* F.), и 1100 особей смородиновой (*Aphis schneideri* C.V.) тлей. Из каждого биотопа одновременно исследовалось по 100 насекомых.

Непосредственно перед бактериологическим посевом насекомых усыпляли, обрабатывали в 96%-ном этаноле в течение 5 мин для уничтожения микроорганизмов, обитающих на внешних покровах, затем дважды промывали в стерильном физиологическом растворе. 10 экземпляров тлей, обработанных таким образом, растирали в ступке с 0,5 мл физиологического раствора, и полученный гомогенизат высевали на ГРМ-агар, картофельную среду, среду Сабуро, а также на экспериментальные среды на основе водных вытяжек из кормовых растений. Посевы инкубировали при температуре 28°C в течение 48–72 ч. Далее проводили количественный учёт выделенных штаммов микроорганизмов и отсеивали их для дальнейшего изучения. Культуральные, морфологические и биохимические свойства изолятов изучали по общепринятым методикам (Нетрусов, 2005). При выявлении факторов фитопатогенности определяли способность к мацерации тканей тест-растений и целлюлолитическую активность (Желдакова, Мямин, 2006). В ходе работы с каждым штаммом было поставлено около 20 биохимических тестов, которые позволили выявить способность изолятов использовать различные химические соединения в своем метаболизме, установить диапазон их устойчивости к некоторым физико-химическим факторам.

Первоначальную идентификацию выделенных ассоциантов проводили по фенотипическим признакам. Видовая принадлежность доминирующих штаммов и штаммов фитопатогенных бактерий была подтверждена секвенированием 16S рРНК в сервисной лаборатории «Синтол» (г. Москва).

Для изучения микрофлоры поверхности кормовых растений тлей проводили посевы смывов с листьев на ГРМ-агар и картофельную среду. Для

подтверждения способности бактерий попадать в организм тли с поверхности кормового растения использовали штамм *Serratia marcescens* 205, который обладал ярко-красной пигментацией, и его можно было легко выявить в посеве. Этот штамм был выделен нами из организмов калиновой тли *Aphis viburni* Scop. Взвесьями этого штамма в концентрациях 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^9 м.к./мл обрабатывали поверхности листьев яблони и вишни, на которых обитали колонии тлей. На 1, 2 и 3-е сутки проводили микробиологические исследования смывов с листьев и внутренней среды насекомых.

Для изучения микрофлоры внутренней среды листьев кормового растения фрагмент листовой пластинки обрабатывали в спирте в течение пяти минут, затем промывали в физиологическом растворе. 0,1 г листовой пластинки гомогенизировали с 0,9 мл физиологического раствора. Полученную суспензию засеивали на питательные среды ГРМ-агар и картофельную среду. Через 48–72 ч проводили учет выросших колоний.

Численность микроорганизмов во внутренней среде насекомых оценивали по количеству колониобразующих единиц (КОЕ) в пробе из 10 особей тлей. Индексы общности видового состава микробоценозов тлей рассчитывали как отношение видов, общих для двух сравниваемых групп, к общему количеству выделенных из них видов, выраженное в процентах. Встречаемость рассчитывали как число проб, в которых обнаружены бактерии данного вида, к общему числу проб, выраженное в процентах (Беклемишев, 1970).

Обработку полученных данных проводили с помощью программы Статистика 6.0. В основу кластерного анализа были положены такие параметры, как средняя встречаемость в организмах тлей за весь период исследования, максимальная встречаемость в 10 пробах из одного биотопа, а также средние и максимальные количественные показатели в пробе. Использование в анализе максимальных показателей обусловлено интересом к видам, способным успешно проникать в организм тли и достигать там высокой численности. Количество кластеров, которые целесообразно выделять в микробоценозе того или иного вида тли, определяли с помощью графика процесса объединения (Graph of Amalgamation schedule) и таблицы объединения объектов (Amalgamation schedule). Выявленному количеству кластеров соответствовало расстояние объединения, равное 6.

Глава 3. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБОЦЕНОЗОВ ТЛЕЙ

Формирование микробоценоза внутренней среды любого макроорганизма является важным этапом его развития. Известно, что передача по вертикали, т.е. от материнских особей дочерним, характерна только для облигатных симбионтов тлей – бактерий рода *Buchnera*, которые обнаруживаются уже у эмбрионов насекомых (Bermingham, Wilkinson, 2010). Мы предположили, что основная часть факультативных ассоциантов приобретает тлями во время

контакта с кормовым растением. Для выяснения сходства микрофлоры кормового растения и внутренней среды питающихся на нем тлей были параллельно проведены их микробиологические исследования. Было установлено, что видовое разнообразие микроорганизмов на поверхности растения всегда намного выше, чем во внутренней среде тли. Индексы общности видового состава микрофлоры поверхности листа кормового растения и внутренней среды насекомых составили у яблонной тли 31,5 %, сливоопыленной тли – 28,5%, вишнёвой тли – 23,1%, смородиновой тли – 15,0%.

Для подтверждения возможности проникновения бактерий с поверхности кормовых растений во внутреннюю среду насекомых была проведена обработка поверхности кормовых растений яблонной и вишнёвой тлей взвесями бактерий *Serratia marcescens* 205 в различных концентрациях.

При использовании взвесей в концентрации от 10^2 до 10^6 м.к./мл единичные клетки *S. marcescens* обнаруживались на поверхности листьев вишни лишь в течение первых суток и в организм насекомых не попадали. При использовании взвеси в концентрации 10^9 м.к./мл, *S. marcescens* в течение 3-х суток выделялся как с поверхности листьев, так и из внутренней среды вишневой тли. При обработке листьев яблони взвесями в концентрациях от 10^4 до 10^9 м.к./мл бактерии сохраняли свою жизнеспособность на поверхности кормовых растений лишь в течение первых суток и не изолировались из организмов насекомых.

Таким образом, успешное попадание интродуцированного штамма в организм тлей зависит как от его концентрации на поверхности растения, так и от вида насекомого.

После проникновения в макроорганизм, бактериям необходимо адаптироваться к специфическим условиям внутренней среды своего хозяина. Известно, что бактерии, активно размножающиеся в том или ином макроорганизме, как правило, приносят ему определенную пользу (если они не являются патогенными для него). В противном случае в процессе эволюции неизбежно возникнут механизмы, препятствующие их размножению там. В связи с этим нами были изучены биологические свойства штаммов, выделенных из внутренней среды насекомых, позволяющие им адаптироваться к обитанию во внутренней среде насекомых и оказывать влияние на функционирование организма хозяина.

Из-за высоких концентраций углеводов во флоэмном соке, тли подвергаются постоянному осмотическому стрессу. Известен ряд механизмов, позволяющих тлям избегать обезвоживания (Ashford, 2000; Powell, Hardie, 2002; Pompon et al., 2010). Дополнительным осморегуляторным механизмом может служить способность бактериальных ассоциантов тли к использованию сахаров в качестве источника углерода и энергии. Действительно, 79% штаммов были способны использовать те или иные углеводы. Помимо глюкозы – углевода, чаще всего используемого бактериями, большое количество

штаммов было способно расщеплять сахарозу, которая является основным компонентом флоэмного сока растений (таблица 1).

Таблица 1 – Сахаролитическая активность бактерий-ассоциантов различных видов тлей

Виды тлей	Количество штаммов, использующих данный углевод, %						
	сахароза	маннит	глюкоза	лактоза	арабиноза	ксилоза	манноза
Яблонная	45,6	20,9	54,3	12,3	14,8	22,2	22,2
Сливоопыленная	62,9	29,6	62,9	16,6	27,7	31,4	31,4
Вишневая	51,2	30,7	53,8	7,6	23,0	23,0	28,2
Смородиновая	72,8	38,9	59,3	16,9	30,5	32,2	54,2

Причем количественные показатели сахаролитических штаммов достигали 10^6 – 10^7 КОЕ, а несакхаролитических штаммов не превышали 10^3 – 10^5 КОЕ в пробе. Таким образом, способность к использованию сахаров бактериями-ассоциантами не только позволяет им самим активно размножаться за счет этих соединений, но и существенно влияет на их концентрацию в пищеварительном канале насекомых.

Важным ресурсом-ограничителем для любого биологического вида является азот. Наиболее остро проблема азотного питания стоит у тлей, питающихся растительным соком, с низкой концентрацией азотсодержащих соединений. Ряд растительноядных насекомых (некоторые муравьи, термиты) решают эту проблему за счёт азотфиксирующих ассоциативных микроорганизмов (Pinto-Tomas et al., 2009; Reid, Lloyd-Jones, 2009). Наши исследования впервые показали, что в организме тлей также присутствует большое количество азотфиксирующих бактерий. Способностью к фиксации молекулярного азота в разных видах тлей обладали от 62,7 до 94,4% изолятов. Большое количество штаммов было способно использовать нитраты, присутствующие в растительных соках, в качестве источника азота или в энергетическом метаболизме. Протеолитическая активность бактерий-ассоциантов была значительно ниже, так как белков в пищеварительном тракте тли крайне мало (таблица 2).

Таблица 2 – Способность бактерий-ассоциантов различных видов тлей к трансформации азотсодержащих соединений

Виды тлей	Количество штаммов, использующих данное соединение, %			
	N ₂	NO ₃ ⁻		Белки
		ассимиляционная нитратредукция	диссимиляционная нитратредукция	
Яблонная	79,5	84,3	77,1	43,3
Сливоопыленная	94,4	87,0	94,4	37,0
Вишневая	87,1	92,2	92,3	41,0
Смородиновая	62,7	76,2	91,5	69,4

Тли способны сохранять жизнеспособность при температуре от +1 до +39°C (Hazell et al., 2010). Было важно выяснить, будут ли бактерии-ассоцианты успешно функционировать при таких температурах. Оказалось, что большая часть выделенных штаммов более устойчива к низким температурам (таблица 3).

Таблица 3 – Диапазон устойчивости бактерий-ассоциантов различных видов тлей к некоторым физико-химическим факторам

Виды тлей	Количество штаммов, способных к росту при данном значении фактора, %					
	температура			рН		
	10°C	28°C	43°C	5	7	10
Яблонная	59,2	100	25,9	43,2	100	92,5
Сливоопыленная	72,2	100	24,0	51,8	100	88,8
Вишневая	56,4	100	23,0	51,2	100	92,3
Смородиновая	47,4	100	15,2	84,7	100	88,1

От 15,2 до 25,9% штаммов были способны размножиться при температуре +43°C. Таким образом, при колебаниях температуры окружающей среды от +10 до +43°C часть ассоциантов будет сохранять метаболическую активность.

Известно, что в пищеварительном канале растительноядных насекомых поддерживается щелочная реакция среды (Carinera, 2008). Следовательно, чтобы успешно существовать в таких условиях микроорганизмы должны быть алкалотолерантными. Действительно, от 88,1 до 92,5% штаммов, выделенных из разных видов тлей, оказались способны к росту даже при рН10.

Таким образом, микробоценоз тлей формируется преимущественно за счет микроорганизмов, попадающих во внутреннюю среду насекомых с кормовых растений. Часть обитателей внешней среды в организме насекомых неизбежно погибнет, часть сможет адаптироваться к этой специфической экологической нише, будет успешно там размножаться, и оказывать определенное влияние на организм своего хозяина.

Глава 4. СТРУКТУРА МИКРОБОЦЕНОЗОВ ТЛЕЙ, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ НА ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЯХ

Наши исследования показали, что организм тли является резервуаром для огромного количества микроорганизмов. Из одной пробы выделялось от одного до семи видов бактерий и грибов. Бактериальные ассоцианты изолировались из 100% проб, а их общие количественные показатели варьировали от 10^3 до 10^7 КОЕ в 10 особях. Встречаемость грибов в организмах исследованных видов тлей в весенне-летний период была низкой (не более 10%), а количественное содержание в отдельных пробах не превышало 10^3 КОЕ. В связи с этим, основное внимание в работе было уделено бактериальной составляющей микробоценозов этих насекомых.

Всего из организмов четырех видов тлей было выделено 915 штаммов бактерий, идентификация которых показала их принадлежность к 86 видам 36 родов.

В микробоценозах всех исследованных насекомых наиболее разнообразно был представлен род *Bacillus* (27 видов). Отдельные роды (*Aureobacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xenorhabdus*) включали от двух до семи видов, остальные таксоны в микробоценозах тлей имели единичных представителей.

Из организмов яблонной тли за весь период исследований было выделено 65 видов 29 родов, сливоопыленной – 37 видов 19 родов, вишневой – 31 вид 19 родов, смородиновой – 38 видов 19 родов.

Статистический анализ показателей встречаемости и численности бактериальных ассоциантов во внутренней среде тлей позволил объединить выделенные виды в несколько кластеров. В микробоценозе яблонной тли было выделено пять кластеров (рисунок 1), в микробоценозах сливоопыленной, вишневой и смородиновой тлей – четыре кластера (рисунки 2, 3, 4).

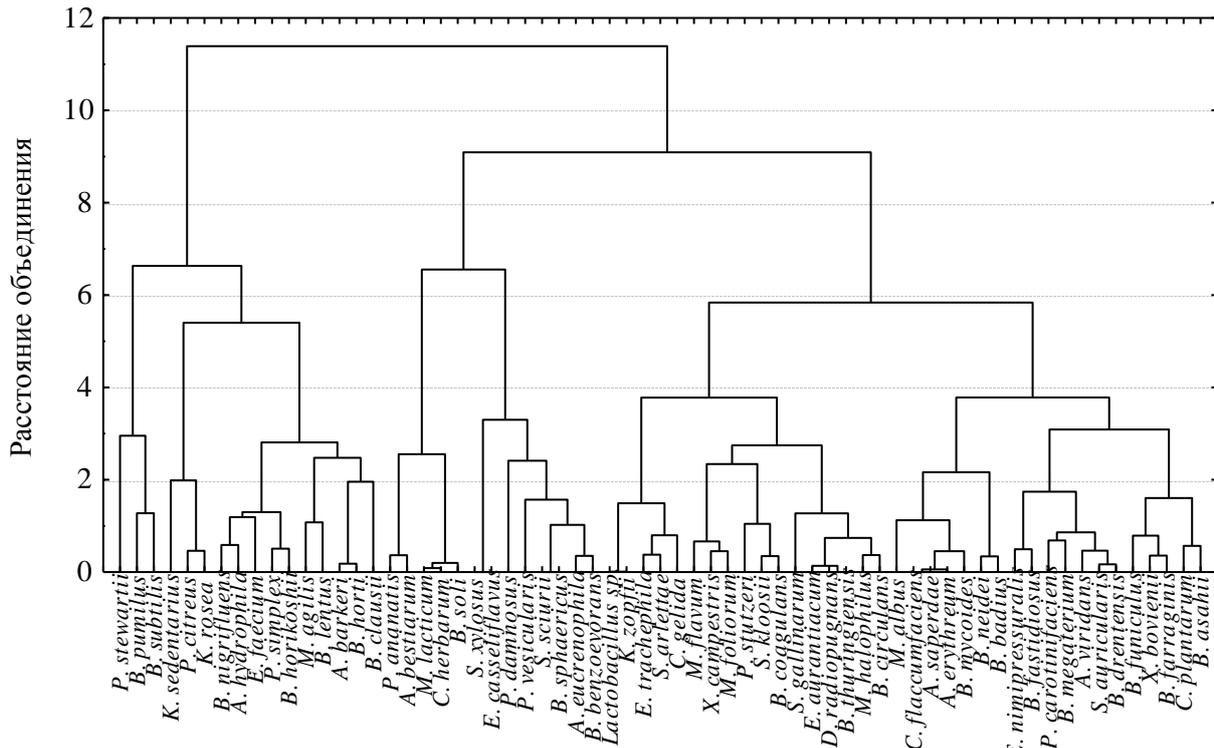


Рисунок 1 – Кластеры, выделяемые в микроценозе яблонной тли

Третий и четвёртый кластеры яблонной тли были очень схожи по основным сравниваемым параметрам, отличаясь только по встречаемости в отдельных биотопах.

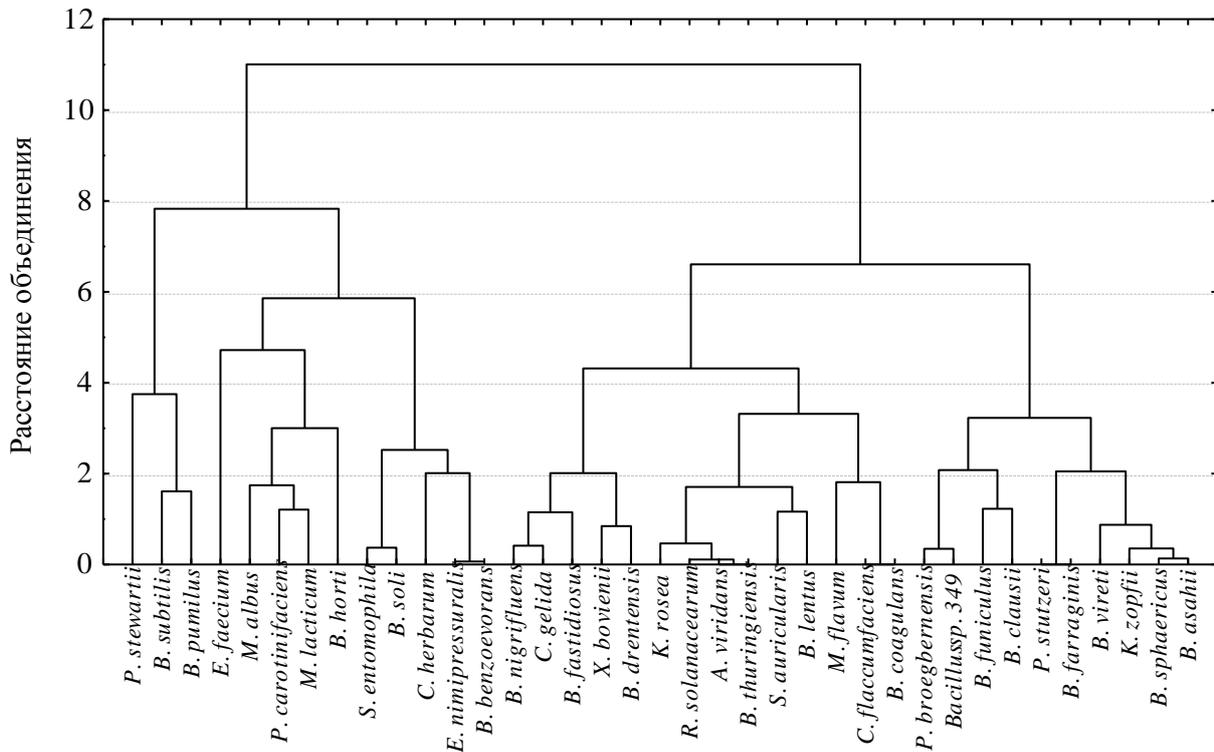


Рисунок 2 – Кластеры, выделяемые в микроценозе сливоопылённой тли

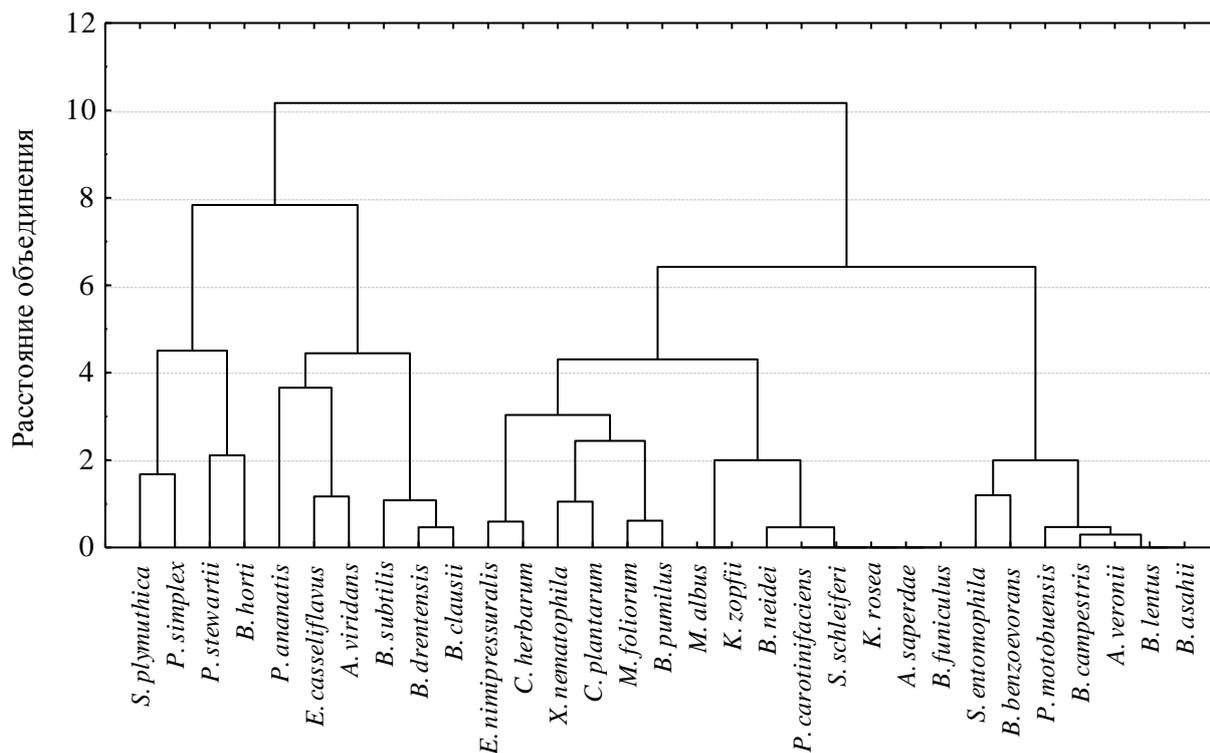


Рисунок 3 – Кластеры, выделяемые в микробиоценозе вишнёвой тли

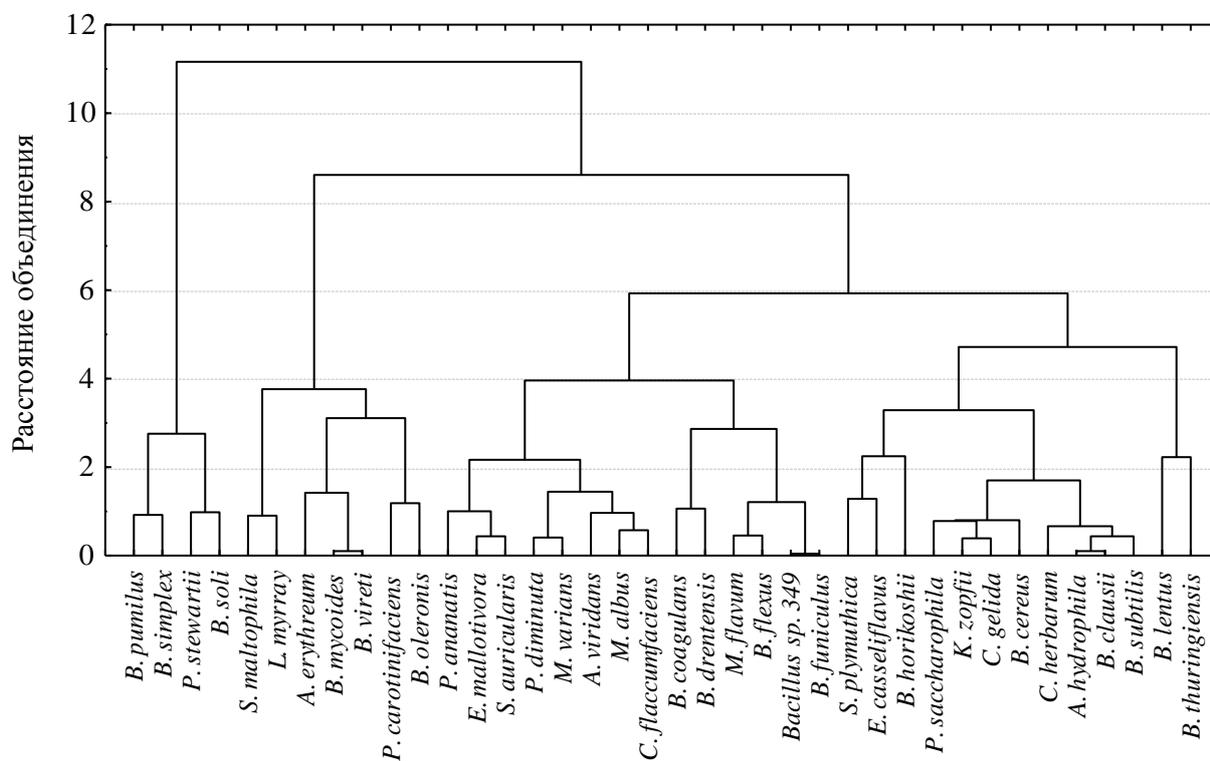


Рисунок 4 – Кластеры, выделяемые в микробиоценозе смородиновой тли

В целом в микробиоценозах всех исследованных видов тлей выделялись четыре основные группы бактериальных ассоциантов с разной степенью адаптированности к обитанию в организмах тлей. Первая группа включала

виды, которые регулярно встречаются в организмах тлей и достигают там высокой численности, т.е. это виды, наиболее адаптированные к обитанию во внутренней среде насекомых. Вторая группа объединяла бактериальных ассоциантов, которые также выделялись из организмов тлей в разных биотопах и в разные годы, но показатели их встречаемости и численности были ниже, чем у предыдущей группы. Третья группа (у яблонной тли это виды третьего и четвертого кластера) включала бактериальных ассоциантов, которые редко попадают в организм тли, но, попав туда, могут активно там размножаться, достигая высокой концентрации в организме насекомого. К четвертой группе (у яблонной тли это виды пятого кластера) относились виды, которые редко попадают в организм тли, и их численность там никогда не достигает высоких показателей.

Индексы общности видового состава исследованных видов тлей варьировали от 28,3 до 46,3% (рисунок 5). Наиболее схожими оказались микробоценозы яблонной и сливоопыленной тлей (индекс общности 46,3%).

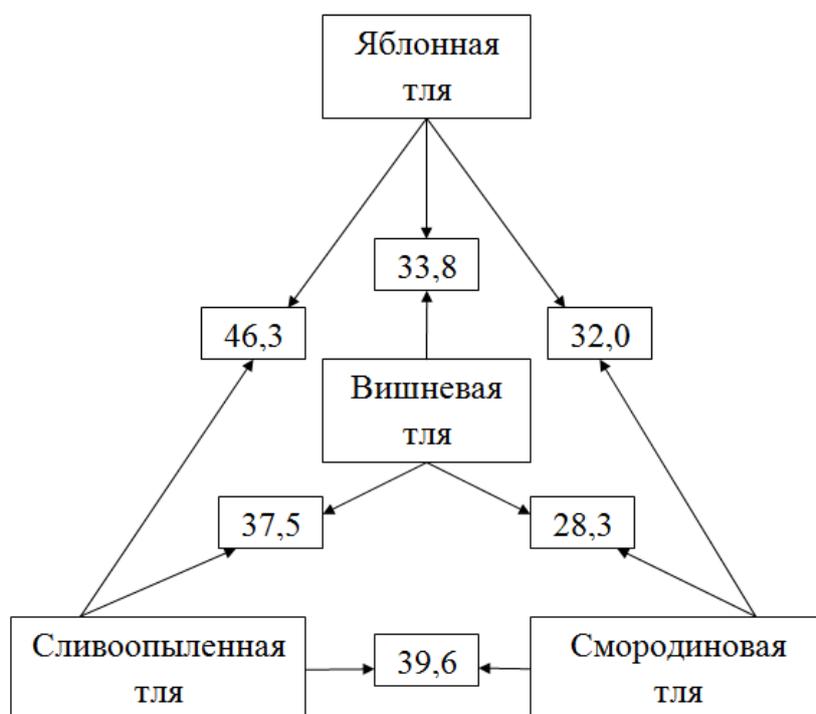


Рисунок 5 – Индексы общности (%) видового состава микробоценозов различных видов тлей

Несмотря на достаточно низкие индексы общности, было выделено 12 видов (*Bacillus clausii*, *B. drentensis*, *B. funiculus*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Curtobacterium herbarum*, *Kurthia zopfii*, *Aerococcus viridans*, *Marinococcus albus*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Pantoea stewartii*), встречавшихся во всех исследованных таксонах насекомых. Вид *P. stewartii* оказался доминирующим в микробоценозах всех видов тлей, что говорит о его высокой адаптационной способности.

Глава 5. ОРГАНИЗМЫ ТЛЕЙ КАК РЕЗЕРВУАРЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Наши исследования показали, что внутренняя среда тли благоприятна для сохранения широкого круга фитопатогенных бактерий (таблица 4).

Таблица 4 – Выделение фитопатогенных бактерий из организмов тлей

Виды фитопатогенных бактерий	Объекты выделения (виды тлей)	Количественные показатели содержания в организме тли, КОЕ в пробе
<i>Brenneria nigrifluens</i>	яблонная	10^3-10^7
	сливоопыленная	10^3-10^6
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	яблонная	10^3-10^7
	сливоопыленная	10^5
	смородиновая	10^3
<i>Erwinia mallotivora</i>	смородиновая	10^3
<i>Pantoea ananatis</i>	яблонная	10^6-10^7
	вишневая	10^4-10^5
	смородиновая	10^3
<i>Pantoea stewartii</i>	яблонная	10^3-10^7
	сливоопыленная	10^3-10^7
	вишневая	10^4-10^7
	смородиновая	10^4-10^7
<i>Ralstonia solanacearum</i>	сливоопыленная	10^3
<i>Xanthomonas campestris</i>	яблонная	10^3-10^5

Наиболее широкий спектр фитопатогенных бактерий (5 видов) был выделен из организмов яблонной тли, из организмов сливоопыленной и смородиновой тлей было изолировано по четыре фитопатогенных вида, из вишневой тли – два.

Таким образом, из всех исследованных нами видов наибольшее значение как резервуар фитопатогенов имеет яблонная тля, способная сохранять в своём организме наибольшее число фитопатогенных видов в высоких концентрациях. Наиболее активно тли участвуют в сохранении в природе популяции *P. stewartii*, который входил в число доминирующих видов у всех исследованных таксонов насекомых.

Помимо хорошо известных фитопатогенных видов в последнее время многие сапрофитические виды постепенно переходят в разряд условно-патогенных и патогенных. Выделенные в ходе экспериментов штаммы сапрофитических видов бактерий-ассоциантов были проверены на способность к мацерации растительных тканей и на наличие целлюлолитической активности. Было установлено, что 44% всех изолятов обладали различными

факторами фитопатогенности. В большем количестве такие бактерии выделялись из организмов яблонной и сливоопылённой тлей. Обращают на себя внимание 3 штамма, обладавшие несколькими факторами фитопатогенности. Именно они с наибольшей вероятностью могут оказаться патогенными для растений (таблица 5).

Таблица 5 – Штаммы сапрофитических видов бактерий, обладающие наибольшим количеством факторов фитопатогенности

Штамм	Объекты выделения	Наличие целлюлазы	Мацерация тканей		
			картофеля	моркови	свёклы
<i>B. simplex</i> 422	смородиновая тля	+	+	+	+
<i>B. funiculus</i> 166		+	+	–	+
<i>B. pumilus</i> 580	вишневая тля	–	+	+	+
+ положительная реакция; – отрицательная реакция					

Таким образом, тли могут являться носителями как уже известных фитопатогенов, так и видов, которые потенциально способны вызывать патологические изменения в растительных тканях.

Глава 6. ДИНАМИКА МИКРОБОЦЕНОЗОВ ТЛЕЙ

Отмечена высокая вариабельность микробоценозов исследуемых насекомых. Индексы общности микробоценозов тлей одного вида, собранных с одних и тех же кормовых растений в одни и те же периоды, но в разных районах Саратовской области не превышали 26,9% у яблонной тли, 41,6% у сливоопыленной, 40% у вишневой и 16% у смородиновой тли. Низкие значения индексов общности можно объяснить достаточно большим видовым разнообразием выделяемых бактерий. При этом лишь 2–3 ассоцианта изолировались из организмов одного вида тлей во всех исследованных биотопах. К числу таких стабильных ассоциантов у яблонной тли можно отнести *B. clausii*, *B. subtilis* и *P. stewartii*, у сливоопыленной тли – *B. subtilis* и *P. stewartii*, у вишневой тли – *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Serratia plymuthica*, у смородиновой – *B. subtilis* и *P. stewartii*. Однако, несмотря на стабильность выделения этих видов, их количественные показатели содержания в организмах тлей и показатели встречаемости существенно варьировали в разных районах.

Изменчивы оказались и микробоценозы тлей, собранных в одних и тех же биотопах в разные годы. Индексы общности микробоценозов яблонной тли в разные вегетационные сезоны составляли от 23,5 до 45,4%, сливоопыленной – от 24,1 до 47,0%, вишневой – от 20,0 до 40,0%, смородиновой – от 30,0 до 42,8%. Отмечено, что из организмов одного вида тли лишь несколько

ассоциантов выделялось в течение всех лет исследования. Однако, несмотря на стабильность выделения этих видов в разные годы, количественные показатели их содержания в организмах насекомых и показатели встречаемости в течение одного сезона у многих из них были низкие. Максимальной численности в организмах тлей в разные годы достигали разные виды бактерий.

Моделями для изучения динамики микробоценоза насекомых в течение сезона послужили смородиновая и яблонная тли. Исследования смородиновой тли проводили с мая по июль 2012 г. Оказалось, что в микробоценозе этого вида ежемесячно происходила смена доминанта (таблица 6).

Таблица 6 – Встречаемость (%) некоторых видов бактерий в организмах смородиновой тли в течение вегетационного сезона 2012 г.

Виды бактерий	Месяцы		
	май	июнь	июль
<i>Serratia plymuthica</i>	35	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	25	0	0
<i>B. pumilus</i>	15	40	0
<i>B. soli</i>	45	10	0
<i>B. thuringiensis</i>	0	80	30
<i>Pantoea stewartii</i>	0	10	40
<i>B. horikoshii</i>	0	0	60

Вид, доминировавший в предыдущие месяцы, в последующие либо не изолировался совсем, либо выделялся в меньшем количестве. При аналогичных исследованиях яблонной тли были отмечены схожие закономерности.

Ежемесячные микробиологические исследования тлей не позволили обнаружить период смены доминанта. С этой целью была проведена серия 10-дневных исследований микробоценозов тлей, снимаемых с одного и того же кормового растения. В качестве модельного объекта была выбрана смородиновая тля, поскольку у неё наиболее чётко прослеживалась смена доминирующих видов в течение сезона (таблица 7).

Таблица 7 – Смена доминирующих видов в микробоценозе смородиновой тли в течение 10 дней (встречаемость в пробах, %)

Виды бактерий	Сутки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. horti</i>	0	0	0	30	0	0	30	0	0	0
<i>B. imperiale</i>	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0
<i>B. pumilus</i>	100	60	100	100	100	60	30	0	0	0
<i>B. simplex</i>	0	0	0	0	100	100	60	100	60	100
<i>P. stewartii</i>	60	30	0	30	100	60	100	100	100	60

Исследования первых проб выявили доминирование в микробоценозе смородиновой тли вида *B. pumilus*. Его стабильность сохранялась в течение первых шести дней, но, уже начиная с пятого дня в большинстве проб появлялись *B. simplex* и *P. stewartii*, которые вскоре становились главными доминантами.

Таким образом, микробоценоз тлей является динамичной системой, на которую оказывают влияние микробная обсемененность кормового растения, физиологическое состояние насекомого-хозяина и т.д. Изменения этих параметров приводят к изменениям качественных и количественных характеристик микробоценозов тлей.

ВЫВОДЫ

1. Основными источниками микроорганизмов, обитающих в пищеварительных каналах тлей, являются поверхность и внутренняя среда кормовых растений насекомых-хозяев. Индексы общности видового состава микробоценозов поверхности кормового растения и внутренней среды тлей составляют от 15,0 до 31,5%, микробоценозов внутренней среды растения и внутренней среды насекомых – от 48,2 до 57,6%.

2. Успешность выживания бактерий в организмах насекомых зависит от их способности адаптироваться к специфическим условиям этих биотопов: щелочной реакции среды, высокой концентрации сахарозы и недостатку азотных соединений. Показано, что алкалотолерантными являются от 88,1 до 92,5% выделенных из тлей штаммов, использовать сахарозу были способны от 45,6 до 72,8%, процесс азотфиксации могут осуществлять от 62,7 до 94,4% изолятов.

3. В состав микробоценоза яблонной тли (*Aphis pomi* Deg.) входят 65 видов бактерий 29 родов, сливоопыленной (*Hyalopterus pruni* Geoffr.) – 37 видов 19 родов, вишневой (*Myzus cerasi* F.) – 31 вид 19 родов, смородиновой (*Aphis schneideri* C.B.) – 38 видов 19 родов. Количественные показатели содержания отдельных видов бактерий в организмах насекомых-хозяев варьируют от 10^3 до 10^7 КОЕ в пробе.

4. В микробоценозах тлей выделяются четыре основные экологические группы бактериальных ассоциантов, характеризующиеся разной степенью адаптированности к обитанию во внутренней среде насекомых. К группе доминирующих видов у яблонной и сливоопыленной тлей относятся *B. subtilis*, *B. pumilus*, *P. stewartii*, вишневой – *B. horti*, *P. simplex*, *P. stewartii*, *S. plymuthica*, смородиновой – *B. simplex*, *B. pumilus*, *B. soli*, *P. stewartii*.

5. В состав микробоценозов тлей входят фитопатогенные бактерии *Brenneria nigrifluens*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Erwinia mallotivora*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*. 44% штаммов сапрофитических видов бактерий, изолированных из тлей, обладали различными факторами фитопатогенности.

6. Микробоценозы тлей являются чрезвычайно динамичными структурами. Индексы общности видового состава микробоценозов насекомых одного вида, собранных в разных районах Саратовской области, составляют от 16 до 42%, в разные годы – от 20 до 47%. В течение одного сезона также происходит смена как общего видового состава микробоценозов, так и доминирующих видов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*–публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

1. Петерсон, А.М. Динамика микробоценоза яблонной тли (*Aphis pomi* Deg.) в Саратовской области в 2007–2009 гг. / Петерсон А.М., Глинская Е.В., Зарезина Д.О., Малышина М.С. // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2010. – Вып. 8. – С. 96–100.

2. Петерсон, А.М. Таксономическое разнообразие бактерий, ассоциированных с организмом сливоопыленной тли (*Hyalopterus pruni* Geoffr.) / Петерсон А.М., Глинская Е.В., Зарезина Д.О., Малышина М.С. // Биодиверситиология. Современные проблемы сохранения и изучения биологического разнообразия: сб. матер. II Международ. науч.-практ. конф. – Чебоксары, 2010. – С. 32–34.

3. Малышина, М.С. Сезонная динамика видового состава микробной ассоциации яблонной тли (*Aphis pomi* Deg.) / Малышина М.С. // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2011. – Вып. 9. – С. 55–59.

4. Малышина, М.С. Яблонная тля (*Aphis pomi* Deg.) как возможный переносчик фитопатогенных бактерий / Малышина М.С. // Современные тенденции в науке: новый взгляд: сб. науч. тр. – Тамбов, 2011. – С. 77.

5. Глинская, Е.В. Организм тли как резервуар сапрофитных и фитопатогенных бактерий в природе / Глинская Е.В., Петерсон А.М., Малышина М.С. // Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке: матер. Международ. научн. конф. – СПб., 2011. – С. 32.

6. Петерсон, А.М. Участие некоторых видов тли в сохранении фитопатогенных бактерий в природе / Петерсон А.М., Глинская Е.В., Малышина М.С. // Растения и микроорганизмы: матер. I Международ. интернет-конф. – Казань, 2011. – С. 202–205.

7. Малышина, М.С. Микробоценоз сливоопыленной тли (*Hyalopterus pruni* Geoffr.) в Саратовской области / Малышина М.С. // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2012. – Вып. 10. – С. 54–57.

8. Малышина, М.С. Роль внеклеточных симбионтов в осморегуляции тли (Insecta, Homoptera) / Малышина М.С., Петерсон А.М., Глинская Е.В. // Энтомопатологические и паразитологические исследования в Поволжье: сб. науч. тр. – Изд-во Сарат. ун-та, 2012. – Вып. 10. – С. 92–96.

9. Петерсон, А.М. Роль факультативных бактерий-симбионтов в азотном питании тли *Aphis pomi* Deg. (Homoptera: Aphidoidea) / Петерсон А.М., Глинская Е.В., Малышина М.С. // XIV съезд Русского энтомологического общества: матер. съезда. – СПб, 2012. – С. 340.

10.* Петерсон, А.М. Сравнительная характеристика микробных ассоциаций некоторых видов тли в Саратовской области / Петерсон А.М., Глинская Е.В., Малышина М.С. // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология, 2011. – Т. 11, вып. 2. – С. 63–67.

11.* Малышина, М.С. Биологические свойства бактерий-ассоциантов вишневой тли (*Myzus cerasi* F., 1775) (Insecta: Homoptera, Aphididae) / Малышина М.С., Петерсон А.М., Глинская Е.В. // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология, 2013. – Т. 13, вып. 1. – С. 47–52.

12. Малышина, М.С. Микробоценоз калиновой тли (*Aphis viburni* Scop.) в Саратовской области в 2011–2012 гг. / Малышина М.С. // Актуальные проблемы экологии и физиологии живых организмов: матер. Всероссийской конф.– Саранск, 2013. – С. 121–125.

13.* Малышина, М.С. Выявление факторов фитопатогенности у бактерий-ассоциантов некоторых видов тли в Саратовской области / Малышина М.С., Петерсон А.М., Балтаева С.Ю. // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология, 2013. – Т. 13, вып. 2. – С. 49–53.

14.* Малышина, М.С. Микробоценоз яблонной тли (*Aphis pomi* Deg., 1775) в некоторых районах Саратовской области / М.С. Малышина, Е.В. Глинская, А.М. Петерсон // Поволжский экологический журнал. – 2013. – № 2. – С. 226–230.