

УДК 634.11: 58.071: [632.3+632.4]

**РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ ЯБЛОНИ ОТ ПАТОГЕНОВ**

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией
element68@mail.ru

Маслова Марина Витальевна

кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник
Marinamaslova@mail.ru

Сысоев Артем Михайлович

аспирант

Ильичёв Алексей Сергеевич

аспирант

Гречушкина Кристина Сергеевна

магистрант

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Отмечено защитное действие эндофитных микроорганизмов яблони против различных патогенов, которое осуществляется их подавлением после синтеза некоторых химических соединений. Данное свойство может быть успешно использовано для биологической защиты производственных насаждений яблони в системах органического земледелия и производства плодовой продукции.

Ключевые слова: яблоня, эндофитная микробиота, бактерии, грибы, фитопатогенные микроорганизмы, болезнь.

Культивируемые человеком растения могут выступать в качестве среды обитания для различных микроорганизмов, называемых эндофитами, которые имеют полезное значение, не причиняют вред или являются патогенными [1, 2, 12-14]. Большинство эндофитов являются бактериями или грибами и служат симбионтами для растения-хозяина.

Яблоня (*Malus domestica* Borkh.) является основной плодовой культурой большинства стран мира. Интенсификация садоводства, сопровождающаяся увеличенной плотностью посадки растений, нестабильные климатические условия в разные годы привели к повышению видового состава и патогенной активности ряда микроорганизмов, которые снижают продуктивность плодовых деревьев и значительно снижают качество плодов.

В настоящее время против фитопатогенов разработан широкий спектр химических средств защиты, однако их усиленное применение увеличивает производственные расходы и противоречит современной тенденции экологизации сельского хозяйства.

Естественные механизмы взаимодействий между эндофитами и растением-хозяином не только стимулируют рост и развитие его побегов, но и могут ограничивать распространение патогенных микроорганизмов, играя важную роль в биологической защите. Это позволяет снизить применение химических обработок и повышает устойчивость агроценозов [9]. Разработка и использование биопрепаратов на основе культур микроорганизмов соответствует органическому производству плодов.

Тридцать восемь различных штаммов бактерий были выделены из почек деревьев яблони сортов Гала, Голден Делишес и Орловим. В результате генетического анализа установлена принадлежность 13 штаммов из них к родам бактерий *Curtobacterium*, *Pantoea* и *Pseudomonas*. Экспериментально обнаружено, что 8 штаммов синтезируют цианистый водород, которые может оказаться эффективным средством борьбы с болезнетворными микроорганизмами. Несколько штаммов проявили антагонистическую активность против выбранных непатогенных и патогенных бактериальных

штаммов: 17 изолятов были способны ингибировать рост *Micrococcus luteus*, 4 – синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*, 3 – кишечной палочки *Escherichia coli*, 2 – сенной палочки *Bacillus subtilis*. Кроме того, отмечается, что два изолята *Pantoea* sp. (D_8 и D_10) и изолят D_7 *Pseudomonas fluorescens* были способны подавлять рост возбудителя парши яблони (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.), что предполагает роль эндофитных бактерий в устойчивости к болезням и потенциальное использование для приложений биоконтроля [10, 11].

Многие исследования показали, что эндофитные микроорганизмы листьев повышают устойчивость растения-хозяина к листовым патогенам. Устойчивые и восприимчивые сорта различаются видовым составом грибов-эндофитов листьев. При этом различия в устойчивости к болезням объясняются видами грибов в большей степени, чем бактериальными эндофитами. При искусственной инокуляции спор альтернарии, вызывающей листовую пятнистость яблони (*Alternaria mali*), в органическом саду, который не подвергался воздействию каких-либо химических пестицидов в течение более 30 лет, оценивали степень повреждения листьев у 18 деревьев яблони трех сортов с разным уровнем устойчивости. Установлено, что численность грибов-эндофитов в значительной степени коррелирует со степенью поражения листьев альтернариозной пятнистостью. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что эндофитные грибы могут способствовать формированию устойчивости к патогенам пятнистости листьев у сортов яблони [5].

Различные системы содержания почв и насаждений яблони могут оказывать влияние на состав энмикробиоты растений и степень устойчивости к патогенам. С деревьев яблони, выращиваемых в органических и традиционных садах на юге Бразилии, были собраны образцы корней и ризосферной почвы вместе с образцами почвы с участка, который никогда не использовался для ведения сельского хозяйства. Выделенные бактерии идентифицировали на уровне рода с помощью ПЦР-диагностики и частичного секвенирования гена 16S рРНК. Самыми многочисленными выявленными родами бактерий были *Enterobacter* (27,7% изолятов), *Pseudomonas* (18,7%), *Burkholderia* (13,7%) и

Rahnella (12,3%). Шестьдесят девять штаммов эндофитных бактерий проявили некоторую антагонистическую активность против фитопатогенного микромицета *Colletotrichum gloeosporioides*. В условиях эксперимента через пять дней после воздействия его спор в среднем было инфицировано около 30% площади листьев растений, предварительно инокулированных штаммом *Burkholderia* sp. №89, тогда как у необработанных растений оказалось инфицировано 60-73% площади листьев. Данные результаты позволяют сделать предположение о влиянии антропогенной деятельности и типа агроценоза на бактериальные почвенные сообщества, а также в дальнейшем получить штамм, позволяющий отсрочить появление инфицирования листьев яблони [4].

Из тканей семян яблони был выделен штамм эндофитной бактерии Y-1. На основании анализа гомологии последовательности гена 16S рРНК и морфологических, физических и биохимических показателей было установлено, что данной бактерией является *Bacillus subtilis*. В результате проведенных исследований удалось установить ингибирующее действие ее изолированного штамма на рост гиф различных видов фузариума – *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. solani*, а также патогенного базидиомицета *Rhizoctonia solani*. Противогрибковая активность штамма *B. subtilis* в отношении *F. oxysporum* была самой высокой, достигая 64,9%. Тесты *in vivo* также показали, что штамм Y-1 эффективно защищает 92,3% растений яблони от поражения *F. oxysporum*, если инокуляцию бактерий проводили за 3 дня до обработки спорами патогена. Штамм Y-1 способен заселить ризосферу и внутренние ткани яблони в течение 30 дней. Он также способен вызывать системную резистентность у проростков яблони, при этом способствуя значительному увеличению длины корней, сырой и сухой массы корней, высоты сеянцев яблони по сравнению с контрольной группой [6, 7]. В дальнейшем на основании штамма *B. subtilis* Y-1 может быть разработано потенциальное средство биоконтроля против *Fusarium* sp.

Исследования нескольких коллективов китайских ученых позволили оценить возможность использования выделенных эндофитных грибов из коры

яблони в качестве биологических агентов борьбы с возбудителем рака у данной плодовой культуры – патогенным грибом *Valsa ceratosperma*. Эффективность биологического действия 7 штаммов эндофитных актиномицетов на данного патогена была проверена с помощью контроля за прорастанием конидий, ростом мицелия, а также степени поражения побегов в полевых испытаниях. После обработки растений двукратно разбавленным культуральным фильтратом 7 штаммов эндофитных актиномицетов степень ингибирования прорастания конидий патогена составила более 85%, а после обработки 20-кратно разведенным фильтратом степень ингибирования роста мицелия была более 80%. Обнаружено, что гифы мицелия *V. ceratosperma* проявляли явную деформацию после обработки культуральным фильтратом штамма Nhs.015 (BAR1-5). После нанесения фильтрата на пораженные участки и инокуляции мицелиевого осадка на срезанные иссеченные побеги отмечено задержка развития симптомов рака вальсы яблони не менее, чем на 5 дней. Эффективность защитного действия штаммов эндофитов AR1-14, Nhs.015 и TGYXCSA-7 на развитие патогена составила на пятый день обработки 83,2%, 69,7% и 85,6% соответственно. В этот же срок фунгициды тебуконазол и дифеноконазол, используемые в качестве эталонов, подавляли развитие симптомов болезни на 94,5% и 91,2% соответственно. В полевых условиях эффективность борьбы с рецидивом поражения деревьев *V. ceratosperma* после нанесения культуральных фильтратов штаммов эндофитных актиномицетов на поврежденные патогеном участки побегов составила более 80% по сравнению с контролем [3, 8].

Таким образом, установленные антогонистические взаимоотношения между симбионтными эндофитными микроорганизмами и патогенами культурных растений на примере яблони являются эффективным механизмом биологического контроля насаждений и могут способствовать разработке защитных микробиологических препаратов для органического производства плодов.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания МСХ РФ «Селекция зимостойких слаборослых клоновых подвоев с использованием методов

Список литературы:

1. Микробиологическая обсемененность столовых сортов винограда / Д.В. Акишин, М.В. Маслова, Е.В. Грошева, И.В. Поленин // Наука и Образование. - 2020. - Т. 3. - № 4. - С. 237.
2. Assessment of fire blight resistance in apple clonal rootstocks using molecular markers / I.N. Shamshin, M.V. Maslova, N.V. Drenova [et al.] // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. - 2020. - Т. 181. - № 4. - С. 185-191.
3. Biocontrol efficacy of apple tree valsa canker by endophytic actinomycetes / G. Zuopeng, K. Xiwang, W. Jiuling et al. // Acta Phytophyl. Sinica. – 2009. – Vol. 36, N 5. – P. 410-416.
4. Cultivable bacteria isolated from apple trees cultivated under different crop systems: Diversity and antagonistic activity against *Colletotrichum gloeosporioides* / J.F.M. dos Passos, P.B. da Costa, M.D. Costa et al. // Genetics and Molecular Biology. – 2014. – V. 37, Is. 3. – P. 560-572.
5. Hirakue A., Sugiyama S. Relationship between foliar endophytes and apple cultivar disease resistance in an organic orchard // Biological Control. – 2018. – Vol. 127. – P. 139-144. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.007>.
6. Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings / R. Ju, Y. Zhao, J. Li et al. // Ann. Microbiol. – 2014. – V. 64. – P. 377-383. – DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0672-3>.
7. Inside the Plants: Endophytic Bacteria and their Functional Attributes for Plant Growth Promotion / P.K. Pandey, M.C. Singh, S. Singh et al. // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2017. – V. 6. – N 2. – P. 11-21. – DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.002>.
8. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their potential for biological control of *Valsa ceratosperma* / X. Tao; H. Tongle; W. Yanan et al. // Acta

Phytophyl. Sinica. – 2012. – Vol. 39, N 4. – P. 327-333.

9. Lacava P.T., Azevedo J.L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System // Maheshwari D., Saraf M., Aeron A. (eds) Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity. – Springer, Berlin, Heidelberg. – 2013. – DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_1.

10. Microbial antagonism of putative bacterial endophytes from apple (*Malus × domestica* Borkh) / O. Buzaitė, I. Miliūtė, D. Gelvonauskienė et al. // Molecular plant-microbe interactions (IS MPMI, 2014) [electronic resource]: 16th international congress, 6-10 July, 2014, Rhodes, Greece. – Athens: Agricultural University of Athens, 2014. – P. 127.

11. Plant growth promoting and antagonistic properties of endophytic bacteria isolated from domestic apple / I. Miliute, O. Buzaitė, D. Gelvonauskiene et al. // Zemdirbyste-Agriculture. – 2016. – Vol. 103, No. 1. – P. 77-82. – DOI: <http://dx.doi.org/10.13080/z-a.2016.103.010>.

12. Shamshin, I.N. The use of molecular markers in searching for tomato fusarium blight resistance genes / I.N. Shamshin, Y.V. Gryazneva, M.V. Maslova // International Journal of Recent Technology and Engineering. - 2019. - T. 7. - № 6. - C. 1800-1803.

13. The effect of laser irradiation on the activity of the bacteria bacillus subtilis and pseudomonas fluorescens / M.V. Maslova, E.V. Grosheva, A.V. Budagovsky, O.N. Budagovskaya // Amazonia Investiga. - 2019. - T. 8. - № 21. - C. 610-616.

14. The impact of pseudomonas syringae bacteria on the plant pathogenic fungi and cherry plants / M. Maslova, E. Grosheva, I. Shamshin [et al.] / Сб.: Bio Web of Conferences, 2020. - C. 00019.

UDC 634.11: 58.071: [632.3+632.4]

**ROLE OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS
IN THE BIOLOGICAL PROTECTION OF APPLE AGAINST PATHOGENS**

Dubrovsky Maxim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Head of Laboratory
element68@mail.ru

Maslova Marina Vitalievna

Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher
Marinamaslova@mail.ru

Sysoev Artem Mikhailovich

graduate student

Ilyichev Alexey Sergeevich

graduate student

Grechushkina Kristina Sergeevna

master student

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. The protective effect of endophytic microorganisms of apple tree against various pathogens is noted. This action is carried out by their suppression after the synthesis of certain chemical compounds. This property can be successfully used for biological protection of apple orchards in organic farming and fruit production systems.

Key words: apple tree, endophytic microbiota, bacteria, fungi, phytopathogenic microorganisms, disease.