

УДК 632.937.15

DOI 10.30679/2587-9847-2024-38-46-49

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ФИЛЛОСФЕРЫ ВИНОГРАДА**Елисютикова А.В., Табачникова А.А., Астапчук И.Л., канд. биол. наук**

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» (Краснодар)

Реферат. В результате проведенных исследований было выделено 20 штаммов бактерий из филлосферы винограда коллекции Кубанского ГАУ, 19 из которых идентифицированы методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS как *Bacillus sp.*, 1 – как *Pantoea agglomerans*. В результате оценки их антагонизма по отношению к фитопатогенам при совместном культивировании *in vitro* из образцов винограда устойчивых к болезням сортов было выделено 3 штамма, из неустойчивых – 2 штамма. Каждому сорту был присущ свой специфический комплекс микроскопических бактерий.

Ключевые слова: Микробиом, филлосфера, виноградная лоза, *Bacillus sp.*, MALDI-TOF MS, антагонизм.

Summary. As a result, of the conducted research, 20 bacterial strains were isolated from the phyllosphere of grapes selected by the Kuban State Agrarian University, 19 of which were identified by MALDI-TOF MS mass spectrometry as *Bacillus sp.*, 1 as *Pantoea agglomerans*. As a result, of evaluating their antagonism towards phytopathogens during *in vitro* joint cultivation, 3 - strains were isolated from disease-resistant grape samples, 2 strains from unstable ones. Each variety had its own specific complex of microscopic bacteria.

Key words: Microbiome, phyllosphere, grapevine, *Bacillus sp.*, MALDI-TOF MS, antagonism.

Введение. Виноград (*Vitis*) является одной из наиболее распространенных и ценных сельскохозяйственных культур в мире. Бактерии – это наиболее обширная группа микроорганизмов, ассоциированная с виноградной лозой, она же является наименее изученной. Бактериальный компонент микробиома отвечает за ряд жизненно важных для растения функций: поддержание неспецифического иммунитета, регуляция концентрации фитогормонов, синтез биологически активных веществ, повышение биодоступности питательных веществ, индукция стрессоустойчивости, а также защита от внедрения фитопатогенов. Так же известно, что бактериальная микрофлора принимает непосредственное участие в процессе виноделия, сказываясь на качестве и вкусовых особенностях вина [1-4].

Филлосфера или поверхность листьев (филлоплан), населенная микроорганизмами, является весьма динамичной средой обитания для микробов-колонизаторов, разнообразие которых невелико [5-6]. Она характеризуется ограниченной доступностью питательных веществ, присутствием стильбенов (ресвератрола и его производных), изменчивыми климатическими условиями и присутствием солнечного излучения [7-8]. Сведений о филлосфере винограда, в сравнении с ризосферой и эндосферой [9-12], немного. Таким образом, изучение эндофитной бактериальной непатогенной микрофлоры, имеющей большое значение для поддержания иммунитета винограда, является актуальным направлением. Цель работы – выделить и изучить бактериальный микробиом филлосферы винограда, сортов коллекции Кубанского ГАУ с разной устойчивостью к болезням.

Объекты и методы исследований. Объектами исследования являлись эндофитные микроорганизмы, изолированные из проводящих тканей виноградных листьев 6 сортов, из которых Донус, Юпитер и Вечерний обладают высокой устойчивостью к болезням (от 1,5 до 2 баллов), а сорта Пино Блан, Шоколадный, Атлант Дона обладают устойчивостью ниже среднего (от 3,5 баллов и выше). Отбор образцов проводили в фенофазу роста ягод в августе

2023 года на территории учебно-опытного хозяйства «Кубань» ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина».

Изолировали микроорганизмы из фрагментов листьев весом 2 г в трехкратной повторности, предварительно подвергнутых поверхностной стерилизации с целью удаления эпифитной микрофлоры (1 мин в 70 %-м этиловом спирте, затем 1 мин в ~5 % гипохлорита натрия, смыв 1 мин – в стерильной дистиллированной воде). Посев проводили на плотную питательную среду ГРМ. Результаты микробиологических посевов учитывались путём подсчёта и выделения в чистую культуру всех морфологически отличающихся типов бактериальных колоний [13]. Идентификацию изолятов проводили методами исследования морфологических и тинкториальных свойств и масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF MS («BactoSCREEN, Литех», Россия) по белковым профилям [14] на базе центра биотехнологий Кубанского ГАУ.

Антагонистические свойства выделенных изолятов бактериальных микроорганизмов были изучены методом встречных культур в отношении грибов из лабораторной коллекции *Fusarium* spp. (штамм GF23-9) и *Alternaria* sp. (штамм GA23-4) возбудителей фузариоза и альтернариоза – опасных заболеваний винограда. Посев осуществляли на плотную питательную среду картофельно-глюкозный агар (КГА), инкубацию проводили 7 суток при 28 °С. Степень антагонизма оценивали методом измерения зоны задержки роста в мм в контрольном и опытном варианте [15].

Обсуждение результатов. В результате проведенных исследований, из шести образцов винограда было выделено 20 эндофитных бактерий, ассоциированных с проводящими тканями, которые были отнесены к шести разным видам, среди которых доминировал род *Bacillus* – 19 видов. Помимо *Bacillus* sp., был выделен 1 изолят *Pantoea agglomerans* (Ewing and Fife 1972) Gavini et al. 1989. Полученный видовой состав и совпадение с базой данных MALDI-TOF MS представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изолированные бактерии из листьев винограда, и идентификация с базой данных MALDI-TOF MS

Сорт винограда	№ изолята	Вид	Совпадение с базой данных MALDI-TOF, MS*
Донус	1-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,89
	1-3	<i>Bacillus cereus</i>	0,85
	1-4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,82
	1-5	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,88
	1-19	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,89
Юпитер	9-27	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,90
	9-28	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,91
Вечерний	24-79	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,86
	24-80	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,83
Пино Блан	21-51	<i>Bacillus safensis</i>	0,80
	21-52	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,83
	21-53	<i>Bacillus subtilis</i>	0,83
	21-54	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,86
Шоколадный	7-16	<i>Bacillus cereus</i>	0,83
	7-38	<i>Bacillus subtilis</i>	0,81
	7-47	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,85
	7-48	<i>Bacillus pumilus</i>	0,80
Атлант дона	8-42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,87
	8-43	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,90
	8-44	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,84

*Примечание: Значение коэффициента совпадения: 0,85-100 – идентификация до вида; 0,65-0,85 – идентификация до рода; 0–0,65 – идентификация не прошла.

Исходя из таблицы, видно, что большую часть бактериальной микробиоты виноградных листьев составили *Bacillus* sp., которые имеют преимущество – высокую устойчивость в неблагоприятных условиях, связанную со свойством образовывать эндоспору,

которая защищает бактерии от неблагоприятных условий окружающей среды. Кроме того, данный род известен большим процентом бактерий, которые продуцируют антибиотические вещества, в том числе фунгистатики по отношению к фитопатогенным комплексам. В частности, для контроля фитопатогенов в виноградарстве активно применяют штаммы видов *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872, *Bacillus amyloliquefaciens* Priest et al., 1987 и *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887. Эти сообщества являются естественной неспецифической защитой растения и способны приносить растению пользу, стимулируя рост, участвуя в обмене веществ, подавляя патогены. К примеру, редкий вид *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil 1901 (Approved Lists 1980) используется в качестве активного компонента в составе микробиологических фунгицидов, который предотвращает прорастание спор грибов родов *Rhizoctonia* и *Fusarium*. Известно, что *Bacillus safensis* Satomi et al. 2006 влияет на рост растений, поскольку он является мощным производителем гормонов растений, а также действует как ризобактерии, усиливая рост растений. В дополнение, как уже было отмечено ранее, из устойчивого сорта была выделена бактерия *P. agglomerans*, которая может служить для биологического контроля болезней растений. Например, её используют для борьбы с бактериальным ожогом, вызываемым бактерией *Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow et al., 1920. После контакта с ней *P. agglomerans* производит антибиотики, которые токсичны для бактерии, вызывающей заболевание. Также её используют для борьбы с заболеванием виноградной лозы, вызываемое патогеном *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (2006).

В результате оценки антагонистических свойств бактерий наибольшую зону задержки роста (до 10 мм) против фитопатогена GF23-9, возбудителя фузариоза винограда, наблюдали у изолятов под номерами 1-19, 9-27, 9-28, 21-52, 21-53. У остальных изолятов зона задержки роста составила 0 баллов. По отношению к штамму GA23-4, возбудителя альтернариоза, проявили наибольшую степень антагонизма штаммы 1-19, 9-28, 21-53, у штаммов под номерами 8-42, 8-43 также появилась зона задержки роста, однако она не превышала 5 мм. У остальных изолятов антагонизм составил 0 баллов.

Таким образом, штамм *B. amyloliquefaciens* (1-19), выделенный из филлосферы сорта Донус в лабораторных условиях ингибирует рост как *Fusarium spp.* GF23-9, так и *Alternaria sp.* GA23-4. В микробиоте филлосферы винограда устойчивого сорта Юпитер оба штамма 9-27 и 9-28 ингибировали рост *Fusarium spp.* GF23-9, в то время, как только штамм 9-28 ингибировал рост *Alternaria sp.* GA23-4. Что примечательно, у винограда сорта Вечерний ни один из двух выделенных штаммов не проявили антагонизм к фитопатогенам. Среди сортов с низкой устойчивостью к фитопатогенам, микробиом сорта Пино Блан отличился двумя из четырех выделенных изолятов, которые проявили антагонизм по отношению к *Fusarium spp.* GF23-9, при этом один из изолятов проявил антагонизм и к *Alternaria sp.* GA23-4. Это может быть обусловлено тем, что несмотря на низкую устойчивость сорта, данные образцы коллекции КубГАУ могут иметь естественную защиту от патогенной микрофлоры. В микробиоте сорта Атлант дона два изолята ингибировали рост *Alternaria sp.* GA23-4, однако зона задержки роста не превышала 5 мм, что может обуславливать низкую устойчивость данного сорта. При этом в микробиоте сорта Шоколадный ни один из штаммов не проявил антагонизм по отношению к тест-штаммам фитопатогенов.

Выводы. Таким образом, при изучении микробиома филлосферы винограда коллекции Кубанского ГАУ, большую часть составили бактерии *Bacillus sp.* При этом из образцов устойчивых сортов было выделено 3 штамма бактерий с антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам, два из которых имели большой спектр действия – как на *Fusarium spp.* GF23-9, так и на *Alternaria sp.* GA23-4. Из образцов неустойчивых сортов винограда с наибольшей зоной задержки роста было выделено два штамма бактерий, из которых лишь 1 штамм ингибировал рост обоих тест-штаммов фитопатогенов. Наличие данных ассоциации бактерий могут помочь растениям-хозяевам адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и частично влиять на устойчивость или низкую степень устойчивости сортов винограда к тем или иным фитопатогенным заболеваниям путем защиты от внедрения фитопатогенов. На основе изолированных бактерий-антагонистов фитопатогенов могут в дальнейшем быть произведены биопрепараты, применяемые в целях

защиты виноградной лозы от заболеваний грибными патогенами. Кроме того, выделенный штамм вида *P. agglomerans* внесен в коллекцию микроорганизмов лаборатории фитопатологии центра биотехнологий и будет использоваться в качестве организма биологического контроля для борьбы с заболеваниями растений, с целью производства биопрепаратов.

Литература

1. Волынчук, Н. Н. Биоразнообразие микробного сообщества винограда культурного (*Vitis vinifera*) / Н. Н. Волынчук, О. Н. Жук // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. 2022. № 2. С. 8-28.
2. Влияние бактериальной и грибной инокуляции на физиолого-биохимические параметры листьев укорененных черенков винограда / Н. Н. Волынчук, Л. Ф. Кабашникова, Л. В. Пашкевич [и др.] // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2023. Т. 25, № 3(125). С. 276-283. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.009.
3. Разнообразие и антагонистические свойства бактериальных эндофитов винограда / К.А. Арзамазова, С.В. Виноградова, Э.В. Карасева, Е.Г. Юрченко // III Школа-конференция молодых ученых, аспирантов и студентов "Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие": Сборник тезисов (в рамках IX Пушкинской конференции "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов"), Пушкино, 05–07 декабря 2023 года. Москва: ООО "Издательство ГЕОС", 2023. С. 15-16. DOI 10.34756/GEOS.2023.17.38751.
4. Первые исследования бактериальных эндофитов винограда в промышленных насаждениях Западного Предкавказья (Россия) / Д.Д. Белкина, Е.Г. Юрченко, Д.В. Карпова, Э.В. Карасева // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2022. № 78(6). С. 348-367. DOI 10.30679/2219-5335-2022-6-78-348-367.
5. Singh, P. Assessing the impact of plant genetic diversity in shaping the microbial community structure of *Vitis vinifera* phyllosphere in the Mediterranean. *Front. Life Sci.*, 2018, vol. 11, pp. 35–46. DOI:10.1080/21553769.2018.1552628
6. Zhang J., Shang Y., Chen J., Brunel B. Diversity of non-Saccharomyces yeasts of grape berry surfaces from representative Cabernet Sauvignon vineyards in Henan Province, China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2021, vol. 368. DOI: 10.1093/femsle/fnab142
7. Белкина, Д.Д. Состав и значение бактериальных сообществ в агроэкосистемах винограда / Д.Д. Белкина, Е.Г. Юрченко // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. № 68(2). С. 272–286.
8. Глушакова, А.М. Массовое выделение анаморфных аскомицетовых дрожжей *Candida oleophila* из филлосферы растений / А.М. Глушакова // Микробиология. 2017. Т. 76. – № 6. С. 896–901.
9. Pinto C.D., Pinho S., Sousa M., Pinheiro C. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, pp. 1–12. DOI:10.1371/journal.pone.0085622
10. Counce A. Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 6. DOI:10.1371/journal.pone.0100668
11. Zarraonaindia I., Gilbert J.A. Understanding grapevine-microbiome interactions: implications for viticulture industry. *Microb. Cell*, 2015, vol. 2, pp. 171–173. DOI:10.15698/mic2015.05.204
12. Bokulich N. A., Collins T. S., Masarweh C., Allen G. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, 2016, Vol. 7, iss. 3. DOI:10.1128/mBio.00631-16
13. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии // Москва: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
14. Agustini B. C., Da Silva G.A., Bonfim T.M.B. MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes // *Folia Microbiologica*, 2018. Vol. 63, No. 6. P. 685-693.
15. Maslienko L.V., Kurilova D.A., Yu E., Asaturova A.M. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Scientific Research // Institute of Oilseeds, 2009. – Vol. 1, No. 140. – P. 114-119.
16. P. Ray. Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture // *Frontiers in Microbiology*, 2020. Vol. 11. P. 1-15.