

УДК 634.8:579.2

UDC 634.8:579.2

DOI 10.30679/2219-5335-2022-4-76-183-192

DOI 10.30679/2219-5335-2022-4-76-183-192

**К ИЗУЧЕНИЮ ЭПИФИТНОЙ  
ГРИБНОЙ МИКОФЛОРЫ ЛИСТЬЕВ  
ДИКОРАСТУЩЕГО ВИНОГРАДА  
СЕВЕРНОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ  
(РОССИЯ)\***

**TO STUDY OF THE EPIPHYTIC  
FUNGAL MICROFLORA  
OF LEAVES OF WILD GRAPES  
OF THE NORTHERN BLACK SEA  
REGION (RUSSIA)\***

Лукьянова Анна Александровна<sup>1</sup>  
канд. биол. наук  
старший научный сотрудник  
лаборатории виноградарства  
и виноделия

Lukyanova Anna Aleksandrovna<sup>1</sup>  
Cand. Biol. Sci.  
Senior Research Associate  
of Viticulture and Wine-making  
Laboratory

Юрченко Евгения Георгиевна<sup>2</sup>  
канд. с.-х. наук  
зав. научным центром  
защиты и биотехнологии  
растений

Yurchenko Eugeniya Georgievna<sup>2</sup>  
Cand. Agr. Sci.  
Head of SC Protection  
and Biotechnology  
of Plants

Горбунов Иван Викторович<sup>1</sup>  
канд. биол. наук  
научный сотрудник  
лаборатории виноградарства  
и виноделия

Gorbunov Ivan Viktorovich<sup>1</sup>  
Cand. Biol. Sci.  
Research Associate  
of Viticulture and Wine-making  
Laboratory

<sup>1</sup>*Анапская зональная опытная станция  
виноградарства и виноделия –  
филиал Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Северо-Кавказский федеральный  
научный центр садоводства,  
виноградарства, виноделия»,  
Анапа, Россия*

<sup>1</sup>*Anapa Zonal Experimental Station  
of Viticulture and Wine-making –  
Branch of Federal State  
Budgetary Scientific Institution  
«North-Caucasus Federal  
Scientific Center of Horticulture,  
Viticulture, Wine-making»,  
Anapa, Russia*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Северо-Кавказский федеральный  
научный центр садоводства,  
виноградарства, виноделия»,  
Краснодар, Россия*

<sup>2</sup>*Federal State Budget  
Scientific Institution  
«North Caucasian Federal  
Scientific Center of Horticulture,  
Viticulture, Wine-making»,  
Krasnodar, Russia*

---

\*Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/25.

\* The research was carried out with the financial support of the Kuban science Foundation in the framework of the scientific project № MFI-20.1/25.

Проведен анализ эпифитной микрофлоры листьев дикорастущего винограда, произрастающего в лесном массиве близ реки на горном склоне Крымского района. Исследования проводили в 2020-2021 гг. Численность и структуру комплексов микромицетов, ассоциированных с листьями винограда определяли методом посева разведенной суспензии на плотную питательную среду (КСА). Структура комплекса микромицетов, ассоциированных с листьями, у растений винограда, произрастающих в пойме реки, в весенний период отличалась обилием дрожжей (61,3%), а у растений, произрастающих в лесном массиве, мицелиальные, дрожжевые и дрожжеподобные грибы находились примерно в равных пропорциях. К началу осени в структуре микромицетов обоих экотопов преобладали мицелиальные грибы. Общая численность микроскопических грибов листовой поверхности дикорастущего винограда изменялась под воздействием условий внешней среды обитания. Листовой аппарат растений винограда из лесного массива, имел меньшую численность микромицетов (в среднем за 2 года колебалась в пределах 1315,2...5094,7 тыс. КОЕ/1гр сух в-ва), по сравнению с растениями, произрастающими в пойме реки (в среднем за 2 года колебалась от 5116,1 до 9279,7 тыс. КОЕ/1гр сух в-ва). Таким образом, на общую численность микрофлоры листьев винограда влияет режим влажности воздуха и почвы. В качестве доминанты на листьях дикого винограда лесного массива, в период вегетации, выделялись виды рода *Cladosporium* sp. – 44,4% (май), *Phomopsis* sp. – 65,8-78,2% (июль-сентябрь). В образце, произрастающем в пойме реки, доминирующими являлись: *Phomopsis* sp. (54,8% в мае; 82,4% в сентябре) и *Cladosporium* sp. (53,6% в июне; 35,3% в июле).

*Ключевые слова:* ДИКОРАСТУЩИЙ ВИНОГРАД, ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА, ЧИСЛЕННОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ

The analysis of the epiphytic microflora of the leaves of wild grapes growing in the forest near the river and the mountain slope of the Crimean district was carried out. The research was carried out in 2020-2021. The number and structure of complexes of micromycetes associated with grape leaves were determined by swab test method of diluted suspension on a dense nutrient medium (PSA). The structure of the complex of micromycetes associated with leaves in grape plants growing in the floodplain of the river in the spring period was characterized by an abundance of yeast (61,3%), and in plants growing in the forest, mycelial, yeast and yeast-like fungi were approximately in equal proportions. By the beginning of autumn, mycelial fungi dominated in the structure of micromycetes of both ecotopes. The total number of microscopic fungi on the leaf surface of wild grapes changed under the influence of environmental conditions. The leaf apparatus of grape plants from the forest had a smaller number of micromycetes (on average for 2 years ranged from 1315.2...5094.7 thous. CFU /1gr dry matter), compared with plants growing in the floodplain of the river (on average for 2 years ranged from 5116.1 to 9279.7 thous. CFU /1gr dry matter). Thus, the total number of microflorae of grape leaves is affected by the humidity regime of the air and soil. Species of the genus *Cladosporium* sp. – 44.4% (May), *Phomopsis* sp. – 65.8-78.2% (July-September) were distinguished as dominant on the leaves of wild grapes of the forest area during the growing season. In the sample growing in the floodplain of the river, the dominant ones were: *Phomopsis* sp. (54.8% in May; 82.4% in September) and *Cladosporium* sp. (53.6% in June; 35.3% in July).

*Key words:* WILD GRAPES, EPIPHYTIC MICROFLORA, THE NUMBER OF MICROMYCETES

**Введение.** Все живые организмы существуют не отдельно, а в биологических системах или комплексах с другими организмами. Так, растения представляют собой биосистемы, основу которых составляют растительно-микробные взаимодействия. Микроорганизмы заселяют ризосферу, филлосферу, эндосферу растения и могут бессимптомно обитать на корнях и вегетирующих органах, а также в сосудах и тканях – вместе они составляют единый микробиом растительного организма [1]. Растительно-микробные взаимодействия в последнее время стали все активнее изучаться, все чаще в научной литературе описываются исследования на различных культурах о том, что «спрятанный микробиологический мир растений» имеет прямое влияние на жизнь симбионта, а именно: рост, развитие, фитоиммунитет и приспособление к меняющимся условиям существования [1-3]. В работах исследователей В.А. Тереховой (2007), А.А. Широких (2007), И.А. Заикиной (2008) обосновывается понимание того, что микрофлора надземных органов растений не является случайной, а образует микробно-растительные ассоциации [4-6]. Некоторые эпифитные микроорганизмы продуцируют соединения, ингибирующие патогенную микрофлору (токсины, антибиотики, сидерофоры) и способствуют появлению у растений так называемой индуцированной устойчивости, способствующей защите от фитопатогенов [6].

Исследования непатогенной микрофлоры растений винограда стали проводиться в мире сравнительно недавно. Исследователи Taylor et al. (2014), Vokulich et al. (2016), Mezzasalma et al. (2018) высказывают предположение, что по характерным комплексам микроорганизмов можно идентифицировать происхождение растений винограда [7-9].

В нашей стране такие исследования пока единичны. Известна научная работа по изучению непатогенного разнообразия микрофлоры растения рода *Vitis* на Дальнем Востоке, посвященная анализу разнообразия эндифитных бактерий и грибов дикорастущего винограда *Vitis amurensis*

Rupr. с целью получения новых биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов винограда [10]. В данных исследованиях из листьев и стеблей *V. amurensis* инокулировано около 600 штаммов бактерий и 160 штаммов грибов. Эндофитные грибы винограда были представлены 25 родами. Наибольшее количество представителей составили рода *Didymella*, *Cladosporium* и *Colletotrichum* [11].

Целью нашей работы было изучение видовой структуры грибной микрофлоры листьев дикорастущего винограда одного из центров происхождения вида *Vitis vinifera* - Северного Причерноморья.

**Объекты и методы исследований.** Объектами исследования являлись дикорастущие виноградные растения, отобранные из лесных экотопов в пойме реки и лесном массиве Крымского района Краснодарского края в 15 км от пос. Школьный. Эколого-географическая характеристика местообитания дикорастущего винограда представлена в таблице 1. Исследования проводили в 2020-2021 гг.

Таблица 1 – Эколого-географическая характеристика местообитаний дикорастущего винограда

Образцы винограда			Рельеф	Крутизна склона	Экспозиция склона	Тип растительности	Тип почвы
Место обнаружения образцов	№ популяции	Название образца					
Крымский район	5	Кр. 1 (3 растения)	низкогорный	35	ЮВ	лес	серая лесная
Краснодарский край	6	Кр. 2 (5 растений)	пойма реки Псебепс	-	-	лес	перегнойно-глиевая

Численность и структуру комплексов микромицетов, ассоциированных с листьями винограда определяли методом посева разведенной суспензии на плотную питательную среду по стандартным методикам [13, 14].

Выросшие микромицеты микроскопировались при увеличении  $\times 1350$ . Производился количественный учет колоний мицелиальных грибов, дрожжей и дрожжеподобных грибов. Видовую принадлежность грибов определяли по отечественным и зарубежным определителям [14-18] с использованием микроскопа Micros MC 20.

**Обсуждение результатов.** Исследования микрофлоры листьев, проведенные в период 2020-2021 гг., у образцов дикорастущего винограда Крымского района (Кр. 1, Кр. 2) показали, что наибольшее количество микромицетов, ассоциированных с листьями, изолируется в образцах, которые произрастают в более влажных местах. Так, наибольшая общая численность микроскопических грибов была зафиксирована в летний период у образца Кр. 2, произрастающего в пойме реки и достигала в 2021 году – 9398,8 тыс. КОЕ/1 гр. сух. вещества, а в 2020 году – 9202,0 тыс. КОЕ/1 гр. сух. вещества (рис. 1). Листовой аппарат образцов винограда из лесного массива (Кр. 1) имел меньшую численность микромицетов: 1812,0...5028,3 тыс. КОЕ/1гр сух. в-ва (2020 г.) и 1936,3...5161,1 тыс. КОЕ/1гр сух. в-ва (2021 г.).

Структура комплекса микромицетов листового аппарата весной у образцов (Кр. 2), произрастающих в пойме реки, отличалась обилием дрожжей и варьировала от 53,8 % в 2020 году и до 68,8 % в 2021 году (рис. 2В). В летние месяцы преобладали дрожжеподобные грибы (46,4-59,0 % в 2020 году и 43,6-59,5 % в 2021 году). В сентябре 2020 года произошло снижение доли дрожжеподобных грибов с увеличением доли дрожжей (48,7 %) и мицелиальных грибов (21,9 %). В 2021 году осенью доминировали мицелиальные грибы (75,1 %).

В образцах из лесного массива доля мицелиальных грибов, дрожжей и дрожжеподобных грибов весной распределялась примерно в равных пропорциях (рис. 2А). Так, в 2020 году мицелиальные грибы составляли

40,3 %, дрожжи 28,9 %, дрожжеподобные 30,8 %, а в 2021 году: 34,6 %, 30,8 % и 34,6 %, соответственно. В начале лета доминировали дрожжеподобные, а к концу лета мицелиальные грибы. В сентябре 2020 года в структуре микромицетов образца Кр. 2 доля мицелиальных грибов увеличилась до 74,6 %, а в 2021 году до 80,9 % (рис. 2).

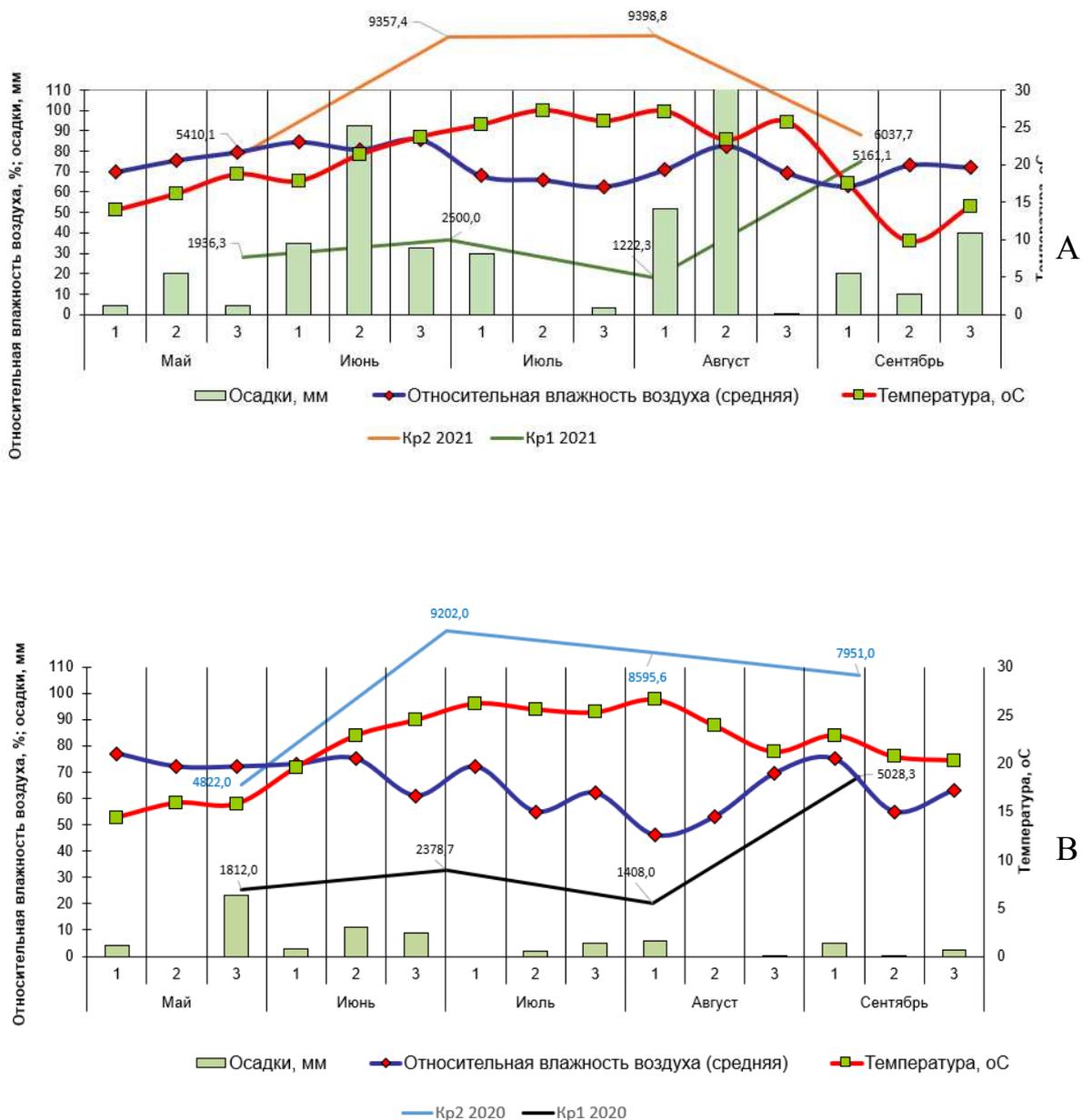
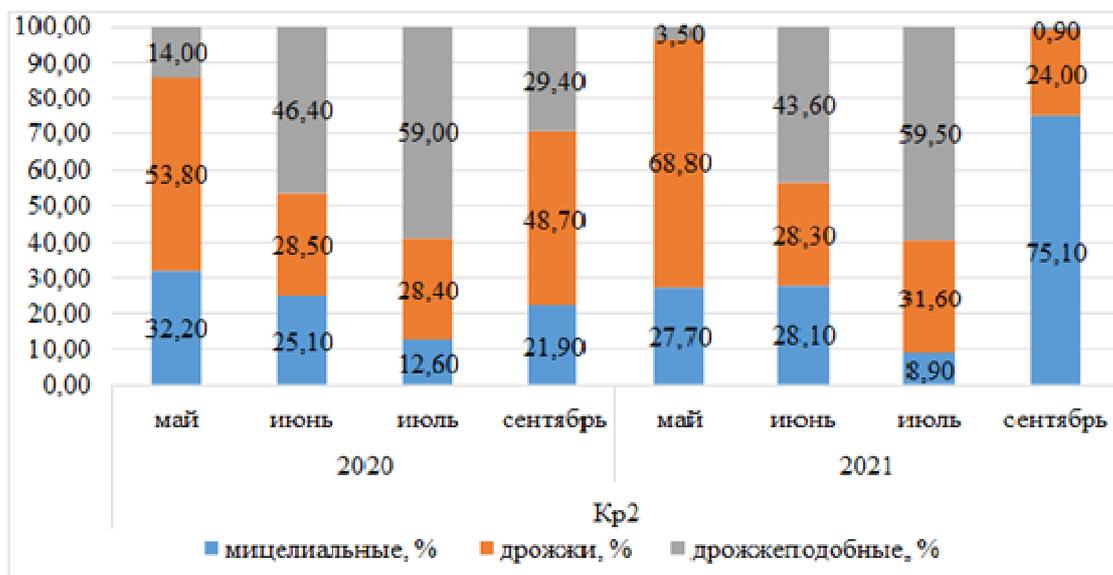
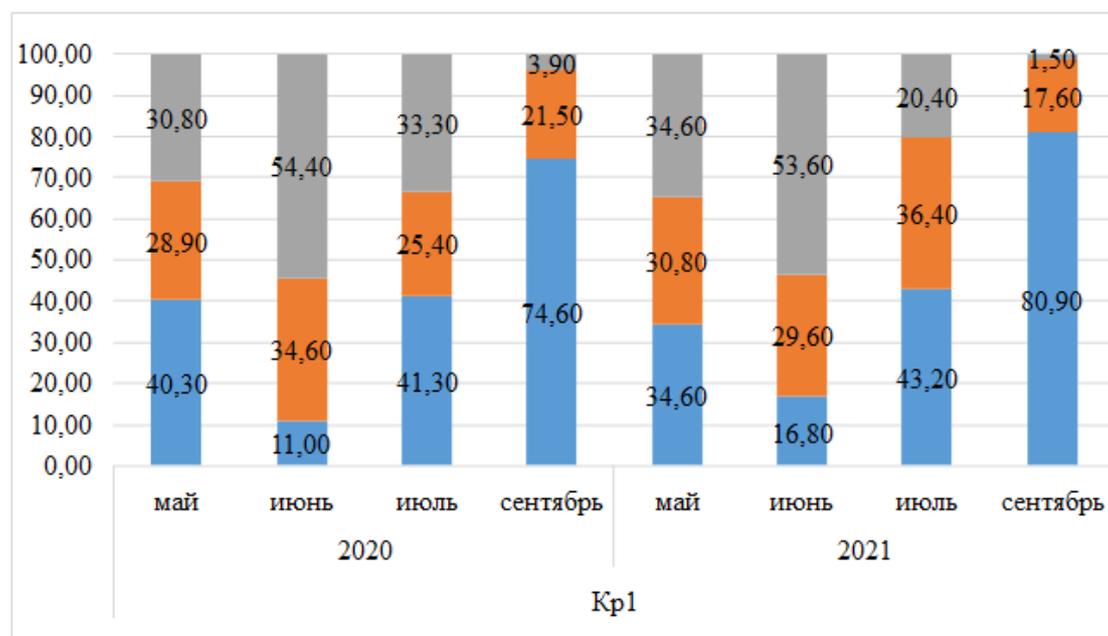


Рис. 1. Динамика общей численности (тыс. КОЕ/1гр сух. в-ва) микрофлоры листьев дикорастущего винограда в период вегетации 2020-2021 гг. (Крымский район, Краснодарский край): Кр1 – низкоротный биотоп; Кр2 – пойма реки



А



В

Рис. 2. Изменение структуры микрофлоры листьев дикорастущего винограда речного и низкогорного биотопов в период вегетации:  
А – образцы из низкогорного биотопа; В – образцы из поймы реки

Качественный состав мицелиальных грибов (в % от их численности) в образцах Кр.1 и Кр.2 представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Таксономическая структура мицелиальных грибов, ассоциированных с листьями дикого винограда, в % от их численности, 2020-2021 гг.

Мицелиальные грибы	Образец Кр. 1				Образец Кр. 2			
	май	июнь	июль	сентябрь	май	июнь	июль	сентябрь
<i>Phomopsis</i> sp.	5,6	0	<b>65,8</b>	<b>78,2</b>	<b>54,8</b>	33,9	8,8	<b>82,4</b>
<i>Cladosporium</i> sp.	<b>44,4</b>	19,0	0	19,5	19,3	<b>53,6</b>	<b>35,3</b>	14,5
<i>Alternaria</i> sp.	0	14,3	10,5	1,4	0	2,4	0	1,0
<i>Penicillium</i> sp.	16,7	4,8	2,6	0,2	19,4	0,6	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	11,1	0	5,3	0,1	0	0	3,0	0,1
<i>Fusarium</i> sp.	11,1	0	5,2	0,1	0	0	2,9	0,2
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	0,2	0	0	6,0	0,1
<i>Mucor</i> sp.	0	0	0	0	0	0	2,9	0
Неидентифицированные	11,1	61,9	10,6	0,2	6,5	9,5	41,1	1,7

Из 8 выявленных таксонов грибов на листьях дикорастущего винограда образца Кр. 1 первое место в период вегетации по частоте встречаемости мицелиальных грибов занимали виды р. *Penicillium* sp. (100 %), а у образца Кр. 2 виды рода *Phomopsis* sp. (100 %) и *Cladosporium* sp. (100 %).

В качестве доминанты на листьях дикого винограда Кр. 1, в период вегетации, выделялись виды рода *Cladosporium* sp. – 44,4 % (май), *Phomopsis* sp. – 65,8-78,2 % (июль-сентябрь). В образце Кр.2 доминирующими являлись: *Phomopsis* sp. (54,8 % в мае; 82,4 % в сентябре) и *Cladosporium* sp. (53,6 % в июне; 35,3 % в июле).

**Выводы.** Структура комплекса микромицетов, ассоциированных с листьями, у растений винограда, произрастающих в пойме реки, в весенний период отличалась обилием дрожжей (61,3 %), а у растений, произрастающих в лесном массиве, мицелиальные, дрожжевые и дрожжеподобные грибы находились примерно в равных пропорциях. К началу осени в структуре микромицетов обоих экотопов преобладали мицелиальные грибы.

Общая численность микроскопических грибов листовой поверхности дикорастущего винограда изменялась под воздействием условий внешней среды обитания. Листовой аппарат растений винограда из лесного массива, имел меньшую численность микромицетов (в среднем за 2 года колебалась в

пределах 1315,2...5094,7 тыс. КОЕ/1гр сух в-ва), по сравнению с растениями, произрастающими в пойме реки (в среднем за 2 года колебалась от 5116,1 до 9279,7 тыс. КОЕ/1гр сух в-ва). Таким образом, на общую численность микрофлоры листьев винограда влияет режим влажности воздуха и почвы.

### Литература

1. Jan E Leach et al. Communication in the Phytobiome. Cell. 2017 May 4;169(4):587-596. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.025
2. Haroim P.R., Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 2008;16: 463-471.
3. Грибы филлопланы в городской среде / М.С. Зеленская [и др.] // Биосфера. 2017. Т. 9. № 2: 136-151.
4. Заикина И.А. Экологическая роль бактериального сообщества эпифитов филлосферы в жизнедеятельности растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Заикина Ирина Аркадьевна. Ставрополь, 2008. 21 с.
5. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 214 с.
6. Широких А.А. Изучение микробного потенциала фитосферы растений для использования в сельскохозяйственной биотехнологии : автореф. дисс. ... д-ра биол. наук :03.00.07 / Широких Александр Анатольевич. Киров, 2007. 48 с.
7. Taylor M.W., Tsai P., Anfang N., Ross H.A., & Goddard M.R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. Environmental Microbiology, 16(9), 2848–2858. doi:10.1111/1462-2920.12456
8. Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allen G., Heymann H., Ebeler S.E., & Mills D.A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. mBio, 7(3). doi:10.1128/mbio.00631-16
9. Mezzasalma V., Sandionigi A., Guzzetti L., Galimberti A., Grando M. S., Tardaguila J., & Labra M. (2018). Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. Frontiers in Microbiology, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00946
10. Нитяговский Н.Н., Киселев К.В., Алейнова О.А. Биоразнообразие эндофитов винограда *Vitis amurensis* Rupr // Системная Биология и Биоинформатика (SBB-2020). Тезисы докладов 12-ой школы молодых ученых. Новосибирск, 2020. С. 93.
11. Olga A. Aleynova, Nikolay N. Nityagovsky and Konstantin V. Kiselev. Biodiversity of endophytic bacteria and fungi of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr. // BIO Web Conf., 39 (2021) 05001 DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213905001>
12. Благовещенская Е.Ю. Микологические исследования: основы лабораторной техники. учебное пособие / М.: ЛЕНАНД, 2017. 96 с.
13. Хохрякова М.К. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов / Л.: ВИЗР, 1969. 68 с.
14. Simmons E.G. Alternaria. An identification manual, CBS Biodiversity series, 775 p. (2007)
15. Nelson P.E., Toussoun T.A. et al. Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park and London: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
16. База данных Species Fungorum. – URL: <http://www.speciesfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=270431> (дата обращения 03.05.2021).

17. Leslie, J.F. The Fusarium Laboratory Manual / J.F. Leslie, B.A. Summerell. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006. – 388 p.

18. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М.: Мир, 2001. 486 с.

### References

1. Jan E Leach et al. Communication in the Phytobiome. Cell. 2017 May 4;169(4):587-596. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.025

2. Hardoim P.R., Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 2008;16: 463-471.

3. Griby filloplany v gorodskoj srede / M.S. Zelenskaya [i dr.] // Biosfera. 2017. T. 9. № 2: 136-151.

4. Zaikina I.A. Ekologicheskaya rol' bakterial'nogo soobshchestva epifitov fillosfery v zhiznedeyatel'nosti rastenij : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk : 03.00.07 / Zaikina Irina Arkad'evna. Stavropol', 2008. 21 s.

5. Terekhova V.A. Mikromicety v ekologicheskoy ocenke vodnyh i nazemnyh ekosistem. M.: Nauka, 2007. 214 s.

6. Shirokih A.A. Izuchenie mikrobnogo potenciala fitosfery rastenij dlya ispol'zovaniya v sel'skohozyajstvennoj biotekhnologii : avtoref. diss. ... d-ra biol. nauk :03.00.07 / Shirokih Aleksandr Anatol'evich. Kirov, 2007. 48 s.

7. Taylor M.W., Tsai P., Anfang N., Ross H.A., & Goddard M.R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. Environmental Microbiology, 16(9), 2848–2858. doi:10.1111/1462-2920.12456

8. Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allen G., Heymann H., Ebeler S.E., & Mills D.A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. mBio, 7(3). doi:10.1128/mbio.00631-16

9. Mezzasalma V., Sandionigi A., Guzzetti L., Galimberti A., Grando M. S., Tardaguila J., & Labra M. (2018). Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. Frontiers in Microbiology, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00946

10. Nityagovskij N.N., Kiselev K.V., Alejnova O.A. Bioraznoobrazie endofi-tov vinograda *Vitis amurensis* Rupr // Sistemnaya Biologiya i Bioinformatika (SBB-2020). Tezisy dokladov 12-oj shkoly molodyh uchenyh. Novosibirsk, 2020. S. 93.

11. Olga A. Aleynova, Nikolay N. Nityagovsky and Konstantin V. Kiselev. Biodiversity of endophytic bacteria and fungi of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr. // BIO Web Conf., 39 (2021) 05001 DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213905001>

12. Blagoveshchenskaya E.Yu. Mikologicheskie issledovaniya: osnovy laboratornoj tekhniki. uchebnoe posobie / M.: LENAND, 2017. 96 s.

13. Hohryakova M.K. Metodicheskie ukazaniya po eksperimental'nomu izucheniyu fitopatogennyh gribov / L.: VIZR, 1969. 68 s.

14. Simmons E.G. Alternaria. An identification manual, CBS Biodiversity series, 775 p. (2007)

15. Nelson P.E., Toussoun T.A. et al. Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park and London: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

16. Baza dannyh Species Fungorum. – URL: <http://www.speciesfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=270431> (data obrashcheniya 03.05.2021).

17. Leslie, J.F. The Fusarium Laboratory Manual / J.F. Leslie, B.A. Summerell. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2006. – 388 p.

18. Satton D., Fotergill A., Rinal'di M. Opredelitel' patogennyh i uslovno patogennyh gribov. M.: Mir, 2001. 486 s.