

УДК 579.8: 634.8

UDC 579.8: 634.8

DOI 10.30679/2219-5335-2022-6-78-348-367

DOI 10.30679/2219-5335-2022-6-78-348-367

**ПЕРВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОФИТОВ
ВИНОГРАДА В ПРОМЫШЛЕННЫХ
НАСАЖДЕНИЯХ ЗАПАДНОГО
ПРЕДКАВКАЗЬЯ (РОССИЯ)**

**THE FIRST STUDIES
OF BACTERIAL ENDOPHYTES
OF GRAPEVINE FROM INDUSTRIAL
VINEYARDS OF THE WESTERN
CISCAUCASIA (RUSSIA)**

Белкина Дарья Дмитриевна¹
младший научный сотрудник
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов
и фитофагов
e-mail: daria.microbiology@yandex.ru

Belkina Daria Dmitrievna¹
Junior Research Associate
of Biotechnological Control
of Phytopathogens
and Phytophage Laboratory
e-mail: daria.microbiology@yandex.ru

Юрченко Евгения Георгиевна¹
канд. с.-х. наук
зав. научным центром защиты
и биотехнологии растений
e-mail: yug.agroekos@yandex.ru

Yurchenko Evgenia Georgievna¹
Cand. Agr. Sci.
Head of SC Protection and
Biotechnology of Plants
e-mail: yug.agroekos@yandex.ru

Карпова Дарья Владимировна^{1,2}
магистрант²
младший научный сотрудник¹
лаборатории биотехнологического
контроля фитопатогенов
и фитофагов
e-mail: karpovadv9@mail.ru

Karpova Daria Vladimirovna^{1,2}
Post Graduate Student²
Junior Research Associate¹
of Biotechnological Control
of Phytopathogens
and Phytophage Laboratory
e-mail: karpovadv9@mail.ru

Карасева Эмма Викторовна²
канд. биол. наук
профессор кафедры генетики,
микробиологии и биохимии
e-mail: kemma@mail.ru

Karaseva Emma Viktorovna²
Cand. Bio. Sci.
Professor of Department of Genetics,
Microbiology and Biochemistry
e-mail: kemma@mail.ru

¹Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия

¹Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia

²Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кубанский
государственный университет»,
Краснодар, Россия

²Federal State
Budgetary Educational Institution
of Higher Education
«Kuban State University»,
Krasnodar, Russia

В работе представлены результаты исследования эндофитных сообществ проводящих органов винограда, возделываемого в ампелоценозах анапо-таманской зоны виноградарства. В процессе работы был проведён посев микробиоты однолетних и многолетних проводящих органов винограда сортов Молдова и Мерло, изучено разнообразие сообществ эндофитных бактерий, проанализирована их таксономическая структура, показана динамика фенотипического разнообразия эндофитов в зависимости от фенофазы винограда. По итогам работы сделан предварительный вывод о различиях в таксономической структуре сообществ эндофитных бактерий двух разных по генотипу сортов в двух отличающихся по свойствам субстратах проводящих органов винограда. Общее число изолированных эндофитных бактерий составило 93 штамма, бактериальные сообщества сорта Мерло показали большее таксономическое разнообразие, чем сообщества сорта Молдова. Большая часть выделенных штаммов входила в филумы *Firmicutes* (38 штаммов) и *Actinobacteria* (36 штаммов), в меньшем количестве были представлены штаммы, относящиеся к филуму *Proteobacteria* (12 штаммов). Идентифицировано 42 бактериальных штамма, в том числе *Pantoea agglomerans*, *Bacillus sp.*, *Kocuria sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Dietzia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rothia sp.*, *Staphylococcus sp.* Среди идентифицированных групп наибольшим разнообразием отличались представители рода *Bacillus*. Некоторые роды бактерий были отмечены только в определённых субстратах. Так, штаммы рода *Acinetobacter* выделены только из однолетней лозы обоих сортов, *Dietzia* и *Paenibacillus* – только из однолетней лозы Молдовы, *Pseudomonas* и *Rothia* – из многолетней древесины Мерло, *Kocuria* – из обоих сообществ сорта Мерло, но однолетние данные нуждаются в подтверждении в дальнейших исследованиях.

The article presents the results of a study of endophytic communities in the conductive organs of grapes, which is cultivated in the ampeloceneses of the Anapo-Taman viticulture zone. In the course of the work, the microbiota of annual and perennial conducting organs of Moldova and Merlot grape varieties was isolated, the diversity of bacterial endophytic communities was studied, their taxonomic structure was analyzed, and the dynamics of their phenotypic diversity depending on grape phenophase was demonstrated. Based on the results of the work, a preliminary conclusion was made about the differences in the taxonomic structure of bacterial endophytic communities from two varieties different in genotype and from two substrates of grape conducting organs differing in properties. The total number of isolated endophytic bacteria was 93 strains. The bacterial communities of the Merlot variety showed greater taxonomic diversity than the bacterial communities of the Moldova variety. Most of the isolated strains belonged to *Firmicutes* (38 strains) and *Actinobacteria* (36 strains). *Proteobacteria* (12 strains) were represented in a smaller number. We identified 42 bacterial strains, including *Pantoea agglomerans*, *Bacillus sp.*, *Kocuria sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Dietzia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rothia sp.*, *Staphylococcus sp.* Among the identified groups, strains of the genus *Bacillus* were the most diverse. Some genera of bacteria have been observed only in specific substrates. Thus, strains of the genus *Acinetobacter* were isolated only from annual vines of both varieties, *Dietzia* and *Paenibacillus* – only from annual vines of Moldova, *Pseudomonas* and *Rothia* – from perennial Merlot wood, *Kocuria* – from both communities of Merlot varieties, but one-year data need to be confirmed in further studies.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, *VITIS VINIFERA*, МИКРОБИОТА, БАКТЕРИИ, БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА, ЭНДОФИТЫ, БИОРАЗНООБРАЗИЕ

Key words: GRAPE, *VITIS VINIFERA*, MICROBIOTA, BACTERIA, BACTERIAL COMMUNITIES, ENDOPHYTES, BIODIVERSITY

Введение. Изучение эндофитных сообществ сельскохозяйственных растений в последние годы становится актуальной темой исследований многих научных коллективов по всему миру. Интерес к этим сообществам основан на всё более глубоком понимании их огромной роли в поддержании здоровья и жизнедеятельности растений [1]. Известно, что 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 [2, 3].

Для каждого региона возделывания винограда характерны индивидуальные особенности в микробиоме виноградных растений. Это понятие уже называют «микробным терруаром» [4]. При этом в нашем регионе до сих пор не проводятся системные исследования бактериальных сообществ винограда, и сведений о структуре его микробиома и биоэкологических особенностях его представителей явно недостаточно. Как правило, наиболее пристальное внимание исследователи уделяют возбудителям заболеваний винограда, но это самая малочисленная группа ассоциированных с растением микроорганизмов [5].

Объекты и методы исследований. Объекты исследования – растения винограда сортов Молдова и Мерло и комплекс эндофитных бактерий, ассоциированных с проводящими тканями этих растений.

Исследование проводилось в 2021 году, участок отбора образцов – АО «Южная», отделение № 11, ст. Фонталовская, Темрюкский р-н. Схема опыта представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема отбора образцов для исследования эндофитных бактериальных сообществ винограда

Сорт	Субстрат	Фенофаза	Даты отбора
Мерло	однолетняя лоза	рост побегов	19.05.21
		цветение	23.06.21
		рост ягод	28.07.21
	многолетняя древесина рукавов	рост побегов	19.05.21
		цветение	23.06.21
		рост ягод	28.07.21
Молдова	однолетняя лоза	рост побегов	19.05.21
		цветение	23.06.21
		рост ягод	28.07.21
	многолетняя древесина рукавов	рост побегов	19.05.21
		цветение	23.06.21
		рост ягод	28.07.21

Использовались лабораторные методы [6]. Образцы культурного винограда отбирали в трехкратной повторности, от каждого отделяли фрагменты по 2 г, подвергали поверхностной стерилизации с целью удаления эпифитных микроорганизмов (1 мин в 70 % этиловом спирте, затем 1 мин в ~ 5 % гипохлорита натрия), три раза промывали в стерильной дистиллированной воде, перетирали в ступке с физраствором (20 мл на 2 г субстрата) и сеяли по 0,1 мл бактериальной суспензии на 2 питательные среды – мясо-пептонный агар и R2A – для выявления копиотрофных и олиготрофных бактерий соответственно, в 2-х параллелях.

Использовали мясо-пептонный агар (МПА) производства ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург.

Среду R2A готовили по прописи: дрожжевой экстракт – 0,5 г/л, пептон – 0,5 г/л, гидролизат казеина – 0,5 г/л, глюкоза – 0,5 г/л, крахмал – 0,5 г/л, пируват натрия – 0,3 г/л, калия гидрофосфат – 0,3 г/л, сульфат магния – 0,05 г/л, агар – 15 г/л [4].

Идентификацию изолятов проводили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex от Bruker Daltonik GmbH, Германия) по белковым профилям.

Обсуждение результатов. Результаты микробиологических посевов учитывались путём подсчёта и выделения в чистую культуру всех морфологически отличающихся типов бактериальных колоний.

Общее число изолированных эндофитных бактерий, ассоциированных с проводящими органами винограда сортов Молдова и Мерло, составило 93 штамма.

Большая их часть, 67 штаммов, отмечалась в образцах сорта Мерло (35 штаммов выделено из многолетней древесины рукавов, 32 – из однолетней лозы). Из проводящих органов винограда сорта Молдова выделено в совокупности 26 штаммов (14 – из образцов многолетней древесины, 12 – из однолетней лозы).

Данные о количестве штаммов, выделенных в результате каждого проведённого посева, представлены на рисунке 1.

Общее разнообразие эндофитных бактерий, выделенных из винограда сорта Мерло, вне зависимости от даты отбора, примерно в 2,5 раза превосходило разнообразие эндофитов Молдовы. Особенно сильно эта разница проявилась на этапе роста побегов, когда на 7 штаммов из сорта Молдова приходилось 30 штаммов из сорта Мерло. Вместе с тем для образцов сорта Мерло отмечено снижение разнообразия эндофитов по мере сменяемости фенофаз: 30 штаммов на этапе роста побегов, 24 во время цветения винограда и всего 13 – на этапе роста ягод.

Фенофаза виноградных растений почти не повлияла на разнообразие эндофитов сорта Молдова, которое колебалось от 7 до 10 штаммов на посев.

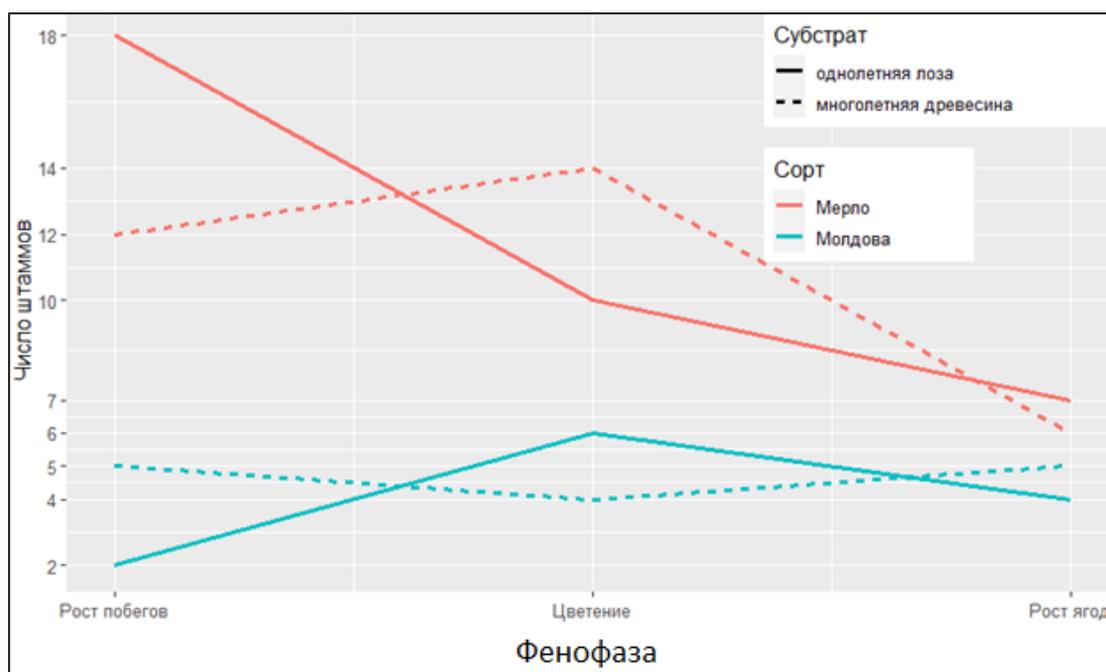


Рис. 1. Разнообразие бактериальных эндофитов, выделенных из проводящих органов винограда сортов Молдова и Мерло, Темрюкский район, Краснодарский край, 2021 г.

Исследование морфологических характеристик колоний выделенных штаммов позволяет отметить, что большая часть колоний – круглой формы, маленького диаметра (0,5-2 мм), глянцевые, с ровным краем. Около 59 % колоний пигментированы, 45 % из них имели жёлтую или оранжевую окраску, 38 % – белую, 15 % – розовую или красную. Некоторые штаммы после нескольких дней культивирования выделяли в среду водорастворимый коричнево-чёрный пигмент, 1 такой штамм отмечен в посеве на стадии роста побегов винограда, 3 штамма – на стадии цветения.

Чаще всего (56 %) отмечались штаммы с непрозрачными колониями, 33 % колоний были полупрозрачными и 11 % – прозрачными. Особенно часто прозрачные колонии наблюдались в результате посева образцов древесины сорта Мерло, а именно 60 % от всех прозрачных колоний.

Многие морфологические признаки изучаемых колоний были подвержены высокой изменчивости. Встречались выпуклые, плоские и складчатые

колонии, со вдавленным или выпуклым центром, с валиком по краю. Диаметр колоний варьировал от 0,5 мм до 30 мм. Иллюстрация некоторых изученных колоний приведена на рисунке 2.



Рис. 2. Внешний вид колоний некоторых выделенных штаммов эндофитных бактерий винограда

Клеточная морфология штаммов, выделенных в мае на стадии роста побегов винограда, описана в таблице 2 и проиллюстрирована на рисунке 3. Из 37-ми штаммов подавляющее большинство, а именно 31 штамм, то есть почти 84 %, окрашивались по Граму положительно, и всего 6 штаммов (16 %) окрашивались отрицательно.

Таблица 2 – Фенотипические свойства клеток бактериальных штаммов, выделенных из проводящих органов винограда на этапе роста побегов

Штамм	Морфология клеток	окраска по Граму
1	2	3
ЕЛ-6.1	палочки с вытянутыми спорами	+
ЕЛ-6.3	микрোকки	+
ЕЛ-6.4	микрোকки	+
ЕЛ-6.5	очень короткие палочки, окрашиваются биполярно	-
ЕЛ-6.6	короткие палочки	+
ЕЛ-6.7	мелкие палочки, похожи на коккобактерий, встречаются утолщенные и слегка изогнутые	+
ЕЛ-6.8	очень мелкие короткие палочки	+
ЕЛ-6.10	длинные палочки со спорами, превышающими ширину клеток, иногда собраны в короткие цепочки	+
ЕЛ-6.11	утолщенные палочки, встречаются цепочки, со спорами	+
ЕЛ-6.12	палочки, многие собраны в длинные нитевидные цепочки	+

Продолжение таблицы 2

1	2	3
ЕЛ-6.13	очень мелкие палочки, похожи на коккобактерий	+
ЕЛ-6.14	небольшие палочки без спор, некоторые сцеплены V-образно	+
ЕЛ-6.15	овоидные палочки, похожи на коккобактерий	+
ЕЛ-6.17	коккобактерии	+
ЕЛ-6.18	средние прямые и слегка изогнутые палочки	-
ЕЛ-6.19	небольшие палочки, встречаются цепочки	-
ЕЛ-6.20	палочки без спор разной длины, некоторые с утолщениями на концах	+
ЕЛ-6.21	палочки неправильной формы, некоторые с утолщениями на концах, часто сцеплены по две	+
ЕД-7.1	средние палочки, по форме напоминают рисовые зерна, со спорами, часто сцеплены по две	+
ЕД-7.2	средние палочки с острыми или закругленными концами, с субтерминальными спорами	+
ЕД-7.4	маленькие палочки, некоторые овоидной формы, часто сцеплены по две, окрашиваются биполярно	-
ЕД-7.5	кокки	+
ЕД-7.6	толстые палочки, довольно крупные, некоторые собраны в длинные цепочки (до 30 штук), со спорами	+
ЕД-7.7	крупные стафилококки	+
ЕД-7.10	стафилококки	+
ЕД-7.11	крупные стафилококки	+
ЕД-7.12	короткие палочки без спор, у некоторых утолщения на концах	+
ЕД-7.15	средние палочки	-
ЕД-7.16	небольшие палочки, окрашиваются биполярно	-
ЕД-7.17	овоидные клетки, похожие на коккобактерий	+
ОЛ-9.1	средние палочки с прямоугольными или овальными спорами	+
ОЛ-9.3	утолщённые палочки с вытянутыми спорами, некоторые собраны в цепочки (до 15 клеток)	+
ОД-10.1	мелкие палочки, похожи на коккобактерий	+
ОД-10.2	кокки, превращающиеся в короткие палочки	+
ОД-10.3	короткие овоидные палочки, многие сцеплены V-образно, на концах многие слегка утолщены, напоминая булаву	+
ОД-10.6	средние палочки с крупными спорами	+
ОД-10.19	маленькие палочки без спор, некоторые с утолщением на концах, некоторые кокковидные	+
Примечание – Буквы в названии штамма указывают на его происхождение: Е – сорт Мерло, О – сорт Молдова, Л – однолетняя лоза, Д – многолетняя древесина		

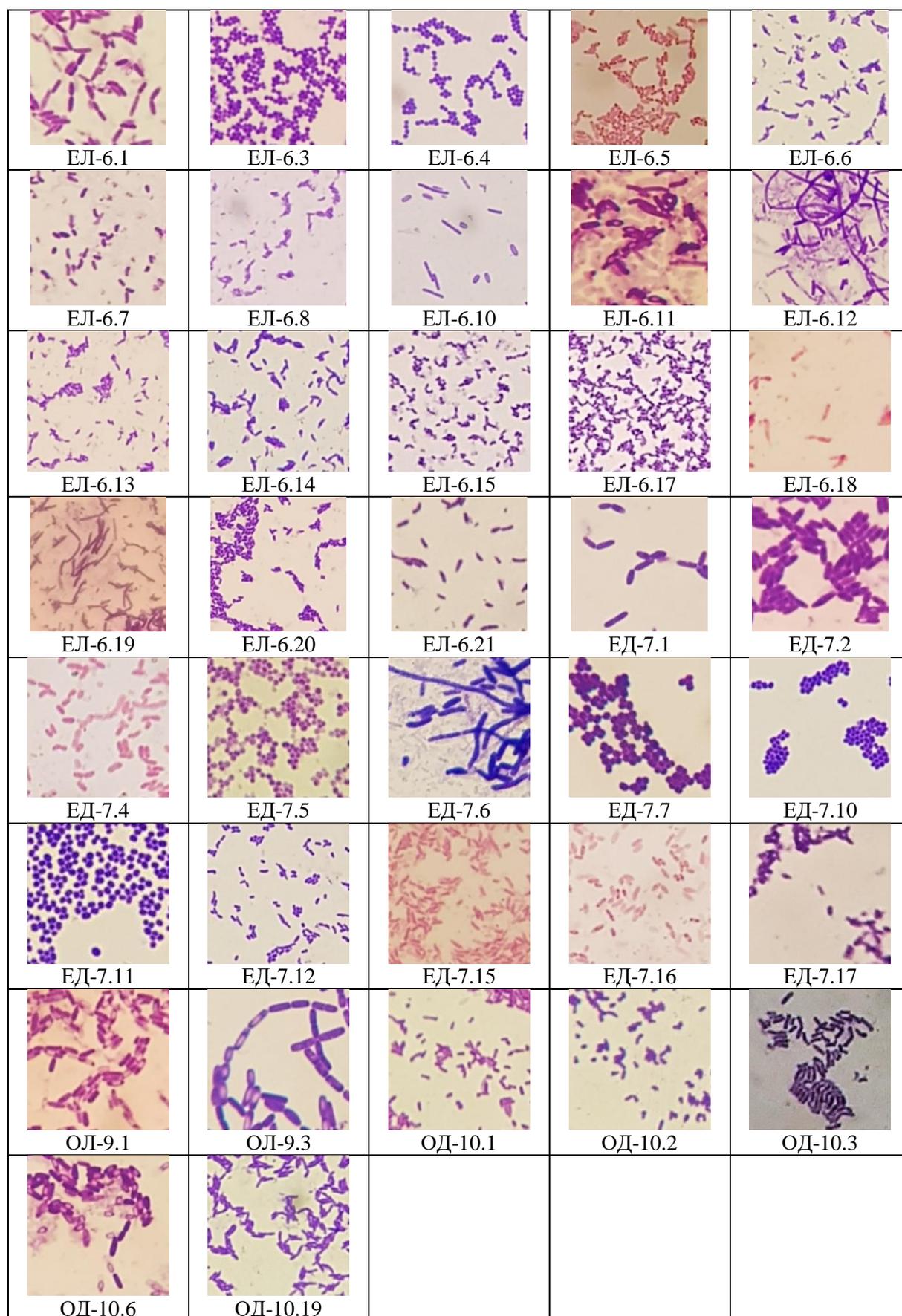


Рис. 3. Микрофотографии исследуемых эндофитов, выделенных на этапе роста побегов винограда

Отмечалось большое многообразие бактериальных клеток, которое невозможно исчерпывающе охарактеризовать разделением на фенотипические группы. В частности, среди штаммов палочковидных бактерий встречались собранные в короткие – ЕЛ-6.10, ЕЛ-6.11 – или длинные цепочки – ЕЛ-6.12, ЕЛ-6.19, ЕД-7.6, ОЛ-9.3. Некоторые из грамотрицательных штаммов окрашивались биполярно, с непигментированным участком в центре клетки: ЕЛ-6.5, ЕД-7.4, ЕД-7.16. Грамположительные палочки отличались между собой широкой амплитудой размеров, клетки некоторых (ЕЛ-6.11, ЕД-7.1, ЕД-7.2, ЕД-7.6) в несколько раз превышали в размерах большинство других. Даже в такой единообразной группе, как кокки, выделялись штаммы ЕД-7.7 и ЕД-7.11, обладающие более крупными клетками, чем остальные.

Морфология изолятов, выделенных в июне на стадии цветения винограда, представлена в таблице 3 и на рисунке 4. Среди 34-х штаммов было 29 грамположительных, 4 грамотрицательных и 1 грамвариабельный, что составляет 85 %, 12 % и 3 % соответственно.

Таблица 3 – Фенотипические свойства клеток бактериальных штаммов, выделенных из проводящих органов винограда на этапе цветения

Штамм	Морфология клеток	окраска по Граму
1	2	3
ЕЛ-14.2	подвижные средние палочки с крупными центральными спорами	+
ЕЛ-14.3	неподвижные стафилококки	+
ЕЛ-14.4	стафилококки	+
ЕЛ-14.6	неподвижные палочки мелкие, округлые концы, некоторые слегка изогнуты, с утолщениями по краям клеток	+
ЕЛ-14.7	толстые палочки в цепочках по 2-10	+
ЕЛ-14.8	средние палочки с центральными спорами, некоторые в цепочках	+
ЕЛ-14.9	неподвижные палочки	+
ЕЛ-14.10	неподвижные кокковидные (плеоморфны), иногда вытянутые овоидные клетки, встречаются цепочки	+
ЕЛ-14.11	кокковидные, иногда вытянутые овоидные клетки	+
ЕЛ-14.15	кокки	+
ЕД-15.1	подвижные палочки с острыми концами, разного размера, некоторые неправильной формы, сплюснутые или утолщённые	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3
ЕД-15.2	неподвижные средние палочки со спорами	+
ЕД-15.3	неподвижные палочки с обрубленными концами, с субтерминальными спорами	+
ЕД-15.4-1	палочки разного размера с закруглёнными концами	+
ЕД-15.4-2	коккобактерии, плеоморфные палочки	+
ЕД-15.5	подвижные средние слегка продолговатые палочки с острыми концами, с прямоугольными спорами	+
ЕД-15.6	неподвижные недлинные палочки, сцеплены в основном по 2, с центральными или слегка субтерминальными спорами	+
ЕД-15.7	крупные палочки, иногда в цепочках, со спорами	+
ЕД-15.9	неподвижные стафилококки	+
ЕД-15.11	небольшие подвижные палочки без спор, некоторые с утолщением на концах	+
ЕД-15.12	маленькие подвижные палочки без спор	-
ЕД-15.15	небольшие подвижные палочки без спор, некоторые слегка изогнуты, встречаются V-образные	+
ЕД-15.16	неподвижные палочки без спор, некоторые слегка изогнуты, у некоторых утолщения на концах, есть V-образно сцепленные	+
ЕД-15.17	неподвижные палочки с булавовидными утолщениями на концах, без спор, есть V-образно сцепленные	+
ОЛ-16.2	крупные неподвижные кокковидные, иногда овоидные клетки, большинство расположено поодиночке	+
ОЛ-16.3	неподвижные коккобактерии	+
ОЛ-16.4	неподвижные кокковидные, овоидные клетки, в старой культуре преобладают палочки, прямые и слегка изогнутые, без спор	+
ОЛ-16.5	неподвижные крупные палочки с обрубленными концами, споры с терминальным расположением	+
ОЛ-16.6	неподвижные плеоморфные коккобактерии	+
ОЛ-16.7	подвижные небольшие палочки	+
ОД-17.1	подвижные небольшие палочки	-
ОД-17.2	подвижные маленькие палочки	-
ОД-17.3	неподвижные стафилококки	-/+
ОД-17.4	маленькие короткие неподвижные палочки	+
Примечание – Буквы в названии штамма указывают на его происхождение: Е – сорт Мерло, О – сорт Молдова, Л – однолетняя лоза, Д – многолетняя древесина		

Обнаруженные на этапе цветения палочковидные бактерии обладали высоким разнообразием форм: встречались веретеновидные с кластридальным спорообразованием – штамм ЕД-15.5, прямые с обрубленными концами – ЕД-15.4-1, очень мелкие, как штамм ОД-17.4, палочки с неравномерными утолщениями по краям клетки – ЕД-15.17. Некоторые палочки отличались крупными размерами клеток – штаммы ЕЛ-14.2, ЕЛ-14.7, ЕД-15.3, ЕД-15.7,

ОЛ-16.5. Кроме того, внимание привлекали очень крупные кокковидные и овоидные клетки, присущие штаммам ЕЛ-14.10, ЕЛ-14.11, ОЛ-16.2.

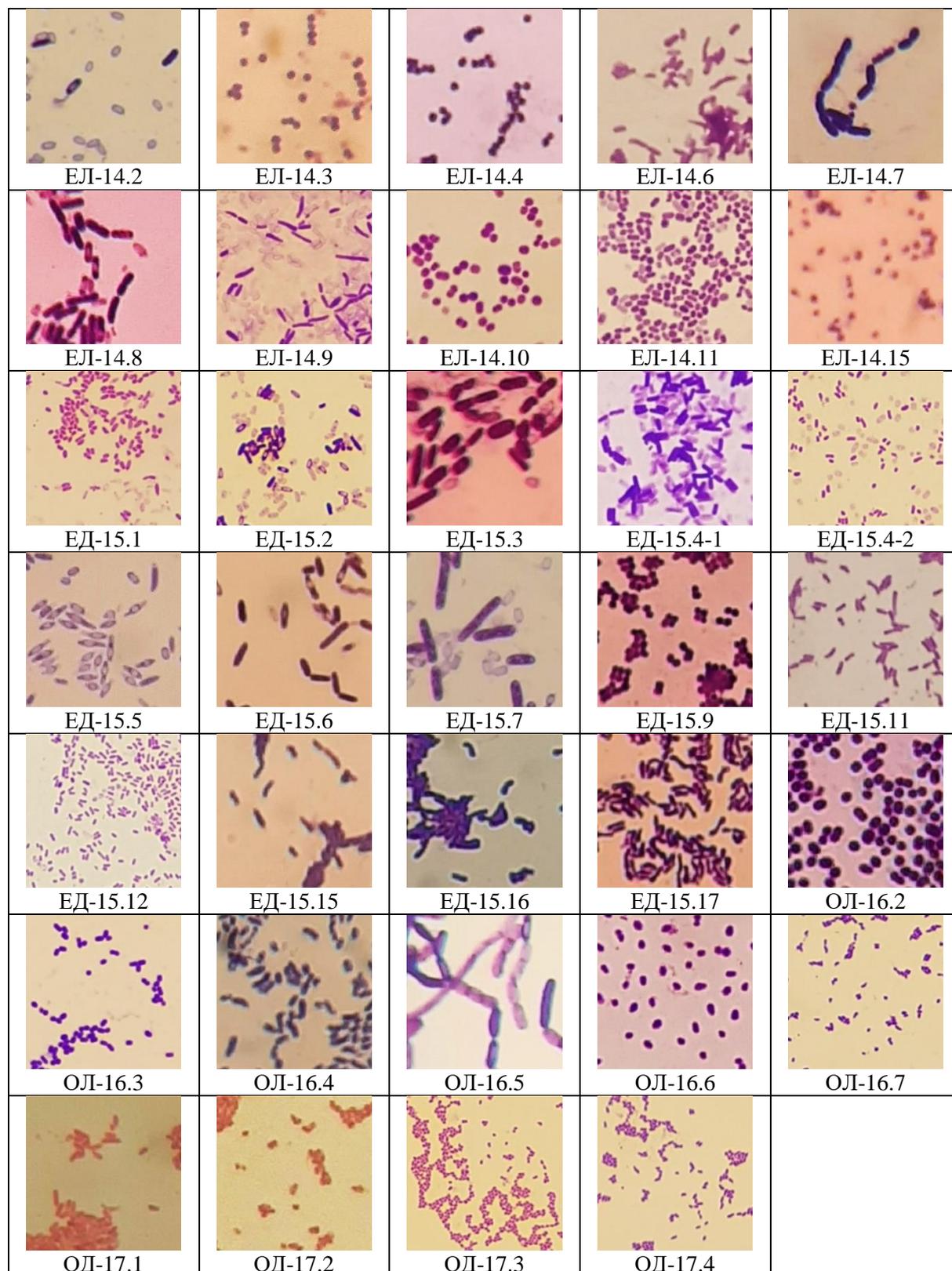


Рис. 4. Микрофотографии исследуемых эндофитов, выделенных на этапе цветения винограда

Клеточная морфология штаммов, выделенных в июле на стадии роста ягод винограда, описана в таблице 4 и представлена на рисунке 5. В этом посеве отмечена сравнительно высокая доля грамвариабельных штаммов – 3 изолята из 40, что составляет 7,5 %, хотя количество грамположительных штаммов по-прежнему очень велико – 35 штаммов (87,5 %). Меньше всего представлены грамотрицательные бактерии – 2 штамма, то есть 5 %.

Таблица 4 – Фенотипические свойства клеток бактериальных штаммов, выделенных из проводящих органов винограда на этапе роста ягод

Штамм	Морфология клеток	окраска по Граму
1	2	3
ЕЛ-18.1	мелкие палочки	-
ЕЛ-18.2	небольшие палочки со спорами	+
ЕЛ-18.4	коккобактерии	-/+
ЕЛ-18.5	стафилококки	+
ЕЛ-18.8	стафилококки	+
ЕЛ-18.9	палочки со спорами	+
ЕЛ-18.10	короткие палочки	-
ЕД-19.3	стафилококки	+
ЕД-19.5	мелкие палочки, по форме напоминают гантели	+
ЕД-19.8	на МПА длинные прямые или слегка изогнутые палочки с округлыми концами, с неравномерными утолщениями, часто собраны в цепочки, без спор или с единичными спорами; на среде R2A плеоморфные веретенообразные, зерновидные и овоидные, с разнообразными утолщениями, расположены поодиночке, морфология меняется в течение месяца: часть клеток удлиняется, другие утолщаются, к 30-м суткам большая часть клеток приобретает овоидную форму; споры появляются между 7 и 17 сутками	-/+
ЕД-19.9	небольшие палочки, по форме напоминают гантели	+
ЕД-19.10	небольшие палочки, некоторые с булавовидными утолщениями	-/+
ЕД-19.12	продолговатые палочки с крупными спорами, многие собраны в цепочки	+
ОЛ-20.1	палочки с прямоугольными спорами	+
ОЛ-20.2	длинные, крупные, слегка изогнутые палочки, часто сцепленные по две, с вытянутыми прямоугольными спорами, превышающими толщину клетки	+
ОЛ-20.3	палочки со спорами	+
ОЛ-20.6	продолговатые палочки с прямоугольными спорами	+
ОД-21.1	продолговатые палочки с прямоугольными спорами	+
ОД-21.2	продолговатые палочки с прямоугольными спорами	+
ОД-21.3	продолговатые палочки с прямоугольными спорами	+

Продолжение таблицы 4

1	2	3
ОД-21.4	палочки с прямоугольными спорами	+
ОД-21.5	продолговатые палочки с прямоугольными спорами	+
Примечание – Буквы в названии штамма указывают на его происхождение: Е – сорт Мерло, О – сорт Молдова, Л – однолетняя лоза, Д – многолетняя древесина.		

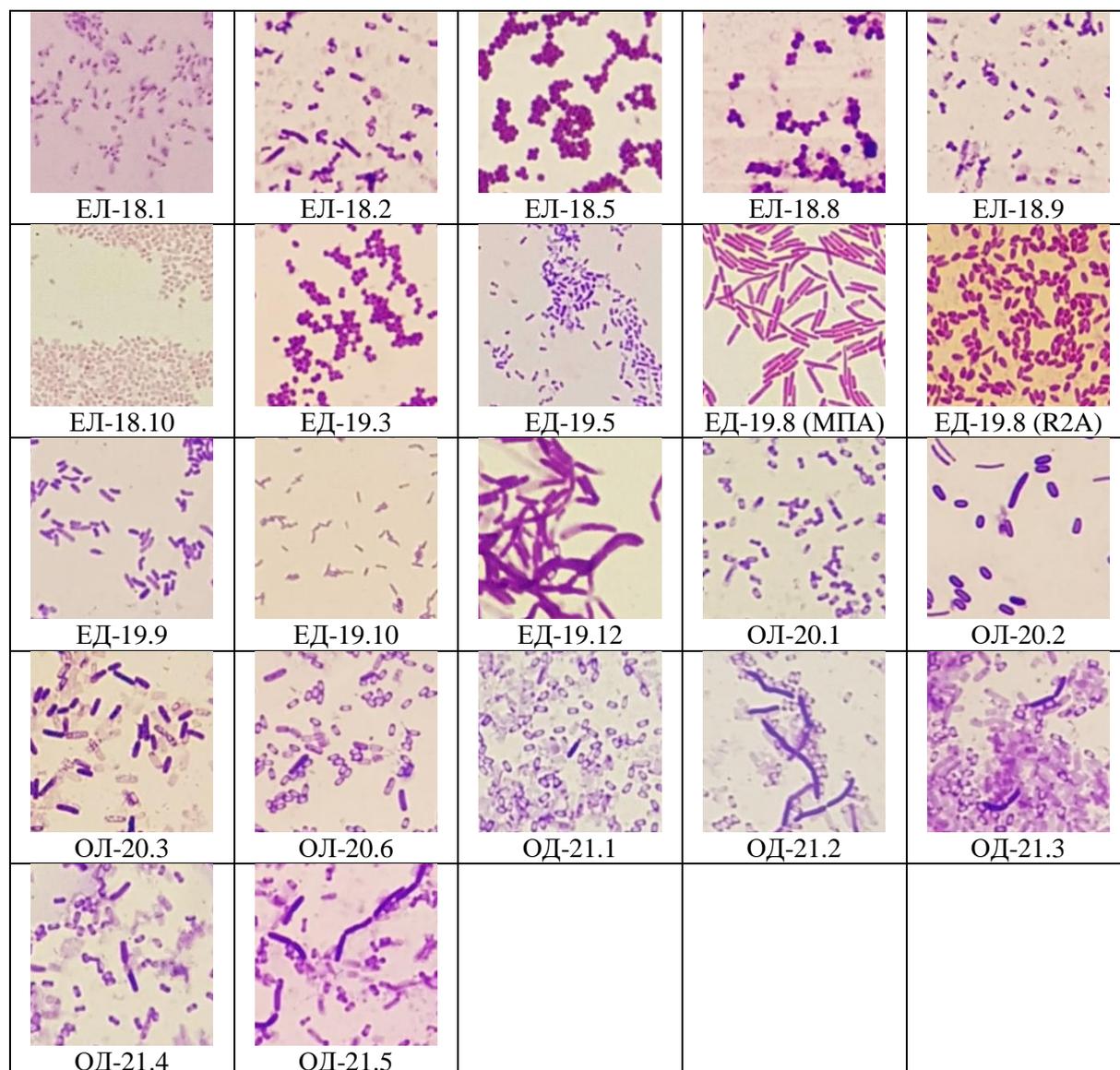


Рис. 5. Микрофотографии исследуемых эндофитов, выделенных на этапе роста ягод винограда

В соответствии с современной филогенетической систематикой по совокупности морфологических, тинкториальных и культуральных признаков установлено, что основная часть выделенных эндофитных бактерий относилась к трём филумам – *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (рис. 6).

Подавляющее число изолятов входило в филумы *Firmicutes* (38 штаммов) и *Actinobacteria* (36 штаммов), в меньшем количестве были представлены штаммы, относящиеся к филуму *Proteobacteria* (12 штаммов).

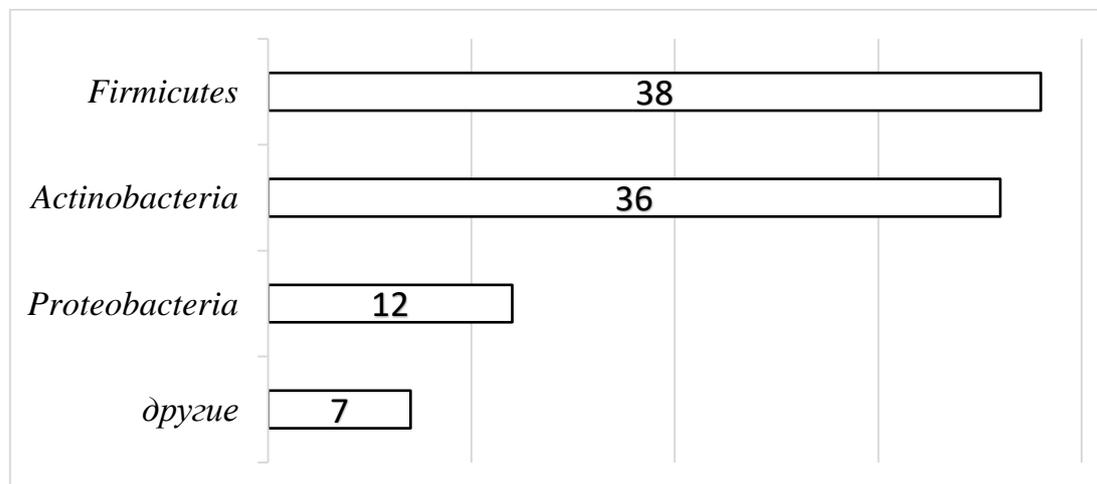


Рис. 6. Распределение изучаемых эндофитов винограда по бактериальным филумам

Наблюдаемая нами картина распределения бактериальных филумов в микробиоте винограда подтверждает результаты других исследований [8, 9].

Уточнение систематического положения выделенных штаммов проводилось с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, однако ввиду ограниченности референтной базы масс-спектров используемого аппарата, были идентифицированы не все штаммы. С разной долей достоверности установлено систематическое положение 42-х штаммов эндофитных бактерий (см. табл. 2).

Таким образом, в проводящих органах исследуемых виноградных растений выявлено присутствие по меньшей мере 9-ти родов бактерий. С точностью до вида определён штамм *Pantoea agglomerans* ЕЛ-18.10, с точностью до рода – 13 штаммов, ещё для 27-ти штаммов установлены предположительные родовые названия.

Таблица 5 – Систематическое положение идентифицированных штаммов бактериальных эндофитов, выделенных из проводящих органов винограда сортов Молдова и Мерло, Темрюкский район, Краснодарский край, 2021 г.

Наименование таксона	Точность идентификации	Количество штаммов
<i>Pantoea agglomerans</i>	Идентифицированы с точностью до вида	1
<i>Bacillus cereus</i>	Идентифицированы с точностью до рода	1
<i>Bacillus megaterium</i>		1
<i>Bacillus simplex</i>		3
<i>Kocuria rosea</i>		1
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>		1
<i>Pantoea agglomerans</i>		2
<i>Rothia amarae</i>		1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		2
<i>Staphylococcus warneri</i>		1
<i>Acinetobacter sp.</i>		Установлены предположительные родовые названия
<i>Bacillus sp.</i>	16	
<i>Dietzia sp.</i>	1	
<i>Kocuria sp.</i>	3	
<i>Pseudomonas sp.</i>	1	
<i>Rothia sp.</i>	1	
<i>Staphylococcus sp.</i>	3	

В литературе имеется множество свидетельств об участии бактерий обнаруженных нами родов в поддержании здоровья и жизнедеятельности винограда, а также других растений [10, 11, 12]. Особенно заметна роль родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, в меньшей степени в источниках упоминаются роды *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Kocuria*. Например, деятельность бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Kocuria*, значительно увеличила (на 51-94 %) урожай клубники в условиях солевого стресса [13]. Многие бактерии из названных родов известны

как антагонисты патогенов винограда. Так, против бактериального рака действуют *Pantoea sp.* и *Pseudomonas sp.*, ингибируют развитие трахеомикозов – *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* [14], подавляют развитие *Botrytis cinerea*, возбудителя серой гнили, – представители родов *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* [15-17].

Совместно с данными, полученными в ходе идентификации, таксономическая структура исследуемых эндофитных сообществ приняла вид, представленный на рисунке 7.

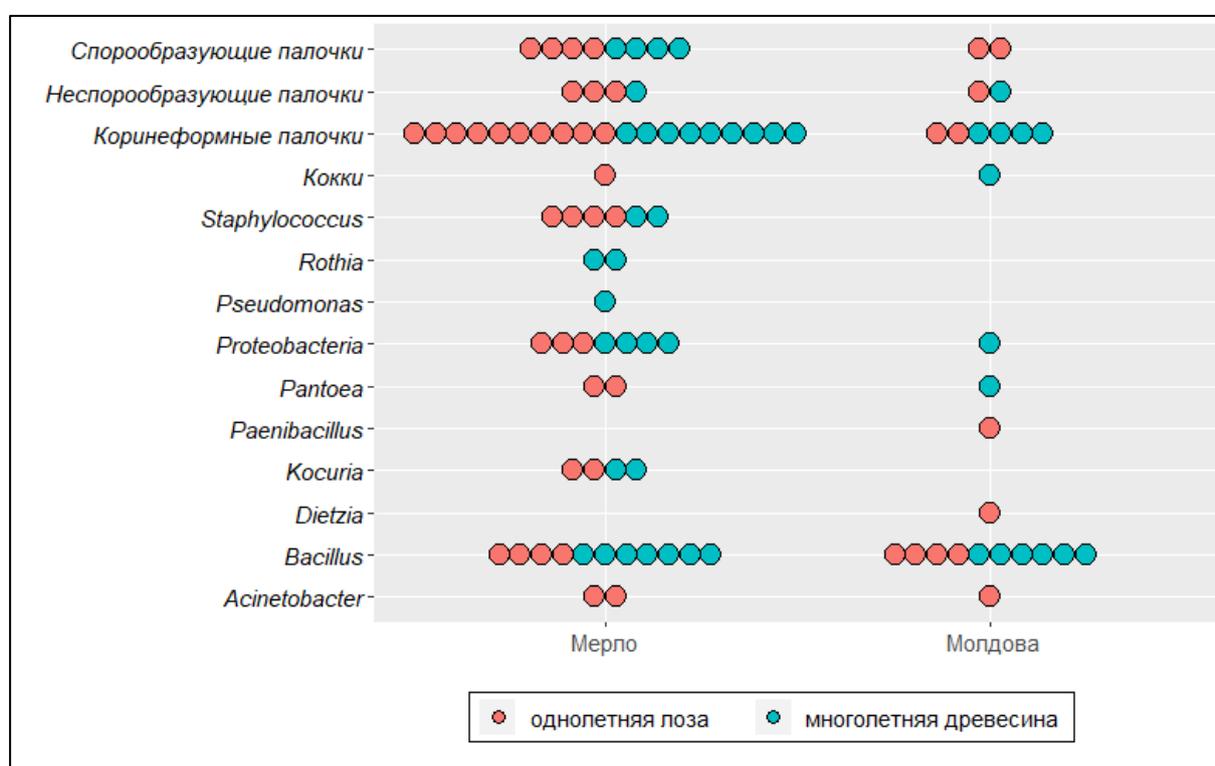


Рис. 7. Таксономическая структура бактериальных эндофитов, выделенных из проводящих органов винограда сортов Молдова и Мерло. Каждая точка соответствует отдельному штамму.

Проиллюстрированное разнообразие таксонов бактерий даёт представление о различиях состава микробиоты проводящих органов четырёх типов исследованных сообществ. Среди идентифицированных групп наибольшим разнообразием отличались представители рода *Bacillus*, для микробиоты обоих сортов было характерно сходное количество штаммов

(10 и 11), а также преобладание бацилл в образцах многолетней древесины рукавов по сравнению с однолетней лозой. Разнообразие неидентифицированных спорообразующих палочек было больше в сообществах сорта Мерло (по 4 штамма в обоих субстратах), а из Молдовы выделены только 2 штамма, обнаруженные в однолетней лозе. В отношении неспорообразующих палочек разнообразие в Мерло также превосходило Молдову, на 3 штамма из однолетней лозы сорта Мерло приходилось по 1 штамму из остальных сообществ.

Неидентифицированные коринформные бактерии показали примерно в 3 раза большее разнообразие в эндофитных сообществах сорта Мерло, причём из обоих субстратов этого сорта выделено почти одинаковое число штаммов (9 и 10 шт.). Сообщества сорта Молдова менее разнообразны по коринформным бактериям, при этом из многолетней древесины выделено в 2 раза больше штаммов, чем из однолетней лозы (4 и 2 шт.).

Представители рода *Staphylococcus* обнаружены только в сообществах сорта Мерло, причём в однолетней лозе их разнообразие в 2 раза больше, чем в многолетней древесине. Интересно, что связь этого рода бактерий с сортом Мерло ранее была отмечена в литературных источниках. Campisano с соавт. указывают, что эндофитные стафилококки были обнаружены в восьми образцах виноградной лозы сорта Мерло, где составляли 1-8 % от всего сообщества, за исключением одного образца растений того же сорта из виноградника, находящегося под органическим управлением, где доля стафилококков составляла подавляющее большинство – 44 % [18].

Неидентифицированные представители филума *Proteobacteria* были более разнообразны в обоих сообществах сорта Мерло – 7 штаммов против 1 штамма из образцов Молдовы.

Некоторые роды бактерий были отмечены только в определённых субстратах. Так, штаммы рода *Acinetobacter* выделены только из однолетней

лозы обоих сортов, *Dietzia* и *Paenibacillus* – только из однолетней лозы Молдовы, *Pseudomonas* и *Rothia* – из многолетней древесины Мерло, *Kocuria* – из обоих сообществ сорта Мерло.

В целом выявленный нами таксономический состав эндофитных сообществ винограда не выходит за рамки описанных ранее в литературе. Например, в исследовании Bruisson и соавт. подавляющим большинством эндофитов были грамположительные бактерии с доминированием двух родов: *Bacillus* и *Staphylococcus*. Кроме них, встречались штаммы родов *Micrococcus*, *Paenibacillus* и *Erwinia* [19]. Такая же картина отмечена в исследовании Vionnet и соавт. [20].

Выводы. Общее число изолированных эндофитных бактерий составило 93 штамма, при этом из образцов сорта Мерло выделено примерно в 2,5 раза больше эндофитов, чем из образцов Молдовы. Большая часть выделенных штаммов входили в филумы *Firmicutes* (38 штаммов) и *Actinobacteria* (36 штаммов), в меньшем количестве были представлены штаммы, относящиеся к филуму *Proteobacteria* (12 штаммов). Установлено систематическое положение 42 штаммов эндофитных бактерий. Среди идентифицированных групп наибольшим разнообразием отличались представители рода *Bacillus*. Полученные однолетние данные нуждаются в подтверждении в дальнейших исследованиях.

Литература

1. Identification of culturable bacterial endophyte community isolated from tissues of *Vitis vinifera* “Glera” / E. Baldan [et al.] // Plant Biosystems. 2014. Vol. 148. P. 508-516.
2. Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture / P. Ray [et al.] // Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 11. P. 1-15.
3. Diversity Profiling of Grapevine Microbial Endosphere and Antagonistic Potential of Endophytic *Pseudomonas* Against Grapevine Trunk Diseases / J. Niem [et al.] // Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 11. P. 1–15.
4. Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards / V. Mezzasalma [et al.] // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. P. 1-13.

5. The plant endosphere world – bacterial life within plants / S. Compant [et al.] // *Environmental Microbiology*. 2021. Vol. 23. P. 1812-1829.
6. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.]. Москва: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
7. Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water // *Applied and Environmental Microbiology*. 1985. Vol. 49. P. 1-7.
8. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization / S. Compant [et al.] // *Microbial Ecology*. 2011. Vol. 62. P. 188-197.
9. Endophytic Bacterial Diversity in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaves Described by 16S rRNA Gene Sequence Analysis and Length Heterogeneity-PCR / D. Bulgari [et al.] // *Journal of Microbiology*. 2009. Vol. 47, Issue 4. P. 393-401.
10. Endophytic bacteria in grapevine / C.R. Bell [et al.] // *Canadian Journal of Microbiology*. 1994. Vol. 41. P. 46-53.
11. Lindow, S., Antonova, E., Baccari, C. Biological control of Pierce's disease of grape with an endophytic bacterium // *Phytopathology*. 2018. Vol. 109, Issue 2. P. 248-256.
12. Diversity of bacterial endophytes in 3- and 15-year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control / M. Andreolli [et al.] // *Microbiological Research*. 2016. Vol. 183. P. 42-52.
13. Appraisal of emerging crop management opportunities in fruit trees, grapevines and berry crops facilitated by the application of biostimulants / B. Basile [et al.] // *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 267. P. 1-19.
14. The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers / D. Pacifico [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. P. 1256.
15. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine / M. V. Salomon [et al.] // *Physiologia Plantarum*. 2014. Vol. 151. P. 359-374.
16. Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent / A. Passera [et al.] // *Microbiological Research*. 2017. Vol. 198. P. 16-26.
17. Haggag, W. M. Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against Botrytis grey mould in strawberry // *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2008. Vol. 41. P. 477-491.
18. Bacterial Endophytic Communities in the Grapevine Depend on Pest Management / A. Campisano [et al.] // *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9, Issue 11. P. 1-10.
19. Endophytes and Epiphytes from the Grapevine Leaf Microbiome as Potential Biocontrol Agents Against Phytopathogens / S. Bruissson [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 1-17.
20. Microbial life in the grapevine: what can we expect from the leaf microbiome? // L. Vionnet [et al.] // *OENO One*. 2018. Vol. 52. P. 219-224.