

## ДРОЖЖЕВЫЕ СООБЩЕСТВА ВИНОГРАДНИКОВ ДАГЕСТАНА: ЧИСЛЕННОСТЬ И ВИДОВОЙ СОСТАВ

© 2015 Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова, Г.Г. Магомедов

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

Поступила в редакцию 05.05.2015

Изучена численность и таксономический состав дрожжей виноградников, произрастающих в северной зоне Дагестана. Показана их дифференциация в системе виноградное растение - почва, выявлены наиболее характерные группировки дрожжевого сообщества – *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, обуславливающие сходство его структуры независимо от сорта винограда и условий произрастания. Показана встречаемость видов, рассматриваемых в качестве ресурсов биотехнологии.

Ключевые слова: *дрожжи, виноградник*

Дрожжи, активно участвующие в биологических процессах окружающей среды и являющиеся продуцентами многих соединений, необходимых человеку, остаются популярным объектом изучения в различных научных направлениях – биологии, микробной экологии, генетики, биотехнологии. Естественной средой обитания и источником выделения различных видов дрожжей служат растительные субстраты, в том числе виноградное растение, микробиота которого с характерным для него видовым разнообразием дрожжей традиционно является объектом исследования во многих винодельческих регионах. На современном этапе их изучение активно проводится в странах Европы и Африки, Австралии, Китая с учётом развивающейся филогенетической систематики дрожжей [1-7]. Изучение структуры дрожжей виноградников, способных произрастать в широком диапазоне экологических условий, вносит большой вклад в исследование организации в природе этой группы грибов и даёт возможность провести поиск новых видов. В России старейшим очагом виноградарства является Дагестан, территория которого благодаря своему географическому положению и горному рельефу с хорошо выраженной высотной поясностью представляет чрезвычайное разнообразие ландшафтов. Это накладывает особый отпечаток на условия существования биоты в целом и отдельных её компонентов, что представляет большой интерес для биогеографических исследований в области микроэкологии.

Абдуллабекова Динаханум Абиляевна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: dina2407@mail.ru

Магомедова Елена Селимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: mile-na2760@rambler.ru

Магомедов Гаджи Гасайникадиевич, научный сотрудник. E-mail: magas1951@mail.ru

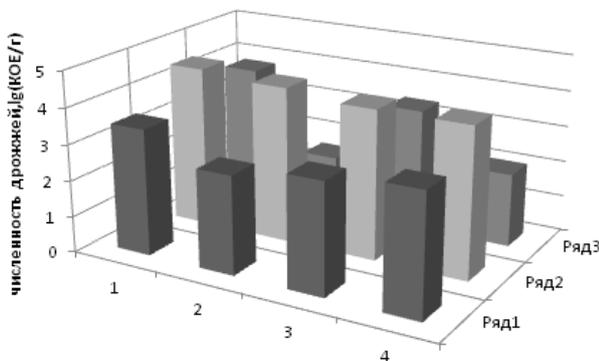
**Цель работы:** изучение основных характеристик структуры дрожжевых грибов – численности и видового разнообразия в условиях виноградников Дагестана.

**Материал и методы.** Исследовали дрожжевые грибы, изолированные с сортов винограда Ркацители и Молдова, произрастающих в условиях промышленных виноградников на равнине (Хасавюртовский район, с. Муцалаул) и в виде небольших участков в предгорьях (до 1000 кустов, Новолакский район, с. Новочуртах) северной зоны Дагестана. Отбор проб и выделение дрожжей проводили в сентябре 2013-2014 гг. в период технической зрелости винограда, когда дрожжевое население характеризуется обилием. Анализировали ягоды, листья и поверхностный слой почвы (0-5 см), образцы которых отбирали в 6-9 точках опытного участка. Методика отбора и подготовки образцов подробно описана в работах, опубликованных ранее [8, 9]. Для изоляции дрожжей использовали метод прямого выделения с предварительной десорбцией клеток на пробирочном вортексе MSV-3500 и накопительных культур. Посевы проводили на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (GY agar), куда при первом методе добавляли антибиотик левомецетин, подавляющий рост бактерий. Инкубировали посевы при комнатной температуре, учёт колоний проводили на основе макроморфологических признаков, по 2-3 колонии каждого типа выделяли в чистую культуру.

Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 региона и D1/D2 доменов региона 26S (LSU) рДНК. Выделение ДНК и проведение ПЦР производили по специальной методике [10]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование ам-

плифицированного региона производили в Научно-производственной компании «Синтол» (Москва). Видовая идентификация осуществлялась сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с данными размещенными в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (cbs.knaw.nl). Проведенный филогенетический анализ был выполнен с помощью программ MAFFT 6 и MEGA4.

**Результаты и обсуждение.** Количественный состав дрожжевых грибов был определен с учетом вида *Aureobasidium pullulans*, относящегося к так называемой группе дрожжеподобных грибов, в связи с чем он редко учитывается при подсчете. Анализ распределения дрожжей по типам субстратов виноградников в 2013 г. показал, что в обеих местностях их наибольшее количество было обнаружено на листьях –  $10^5$  КОЕ/г, на ягодах оно уменьшалось и составляло  $10^2$ - $10^4$  КОЕ/г.



**Рис. 1.** Численность дрожжевых грибов на различных типах субстратов:

ряды (типы субстратов виноградников): 1 – ягоды, 2 – листья, 3 – почва. 1, 2 – Ркацител и Молдова (с. Муцалаул), 3, 4 – Ркацител и Молдова (с. Новочуртах)

Минимальную численность наблюдали в почве под сортом Молдова в Муцалауле – менее  $10^2$  КОЕ/г, в почвах под Ркацител в обеих местностях она была на уровне  $10^4$  КОЕ/г, что соизмеримо с количеством дрожжей на ягодах. Отмечены колебания численности дрожжей по типам субстратов виноградников в 2014 г., но общая тенденция их распределения сохраняется – на растениях (ягоды, листья) она выше, чем в почве. Снижение количества дрожжей при переходе от живого растения к почве закономерно, так как она является менее благоприятной средой обитания для дрожжевых сообществ. В осенний период виноградные листья начинают стареть, целостность кутикулы нарушается, резко возрастает количество простых сахаров, доступных дрожжам, численность которых в сравнении с другими типами субстратов соответственно растет. Генетическая идентификация изолятов, выделенных с виноградного растения и почвы в 2013-2014 гг. показала видовое разнообразие дрожжей, обитающих в условиях виноградников (табл. 1).

Список дрожжевых грибов включает 22 вида, в том числе 18 относящихся к аскомицетам, 3 – анаморфам аскомицетового аффинитета, 1 – базидиомицетам. Выделенные виды принадлежат 12 родам, из которых *Pichia* представлена пятью, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* и *Candida* тремя, а остальные роды одним. Полученный список видов не является окончательным и может быть дополнен при продолжении исследований в последующие годы. Применение в 2014 г. параллельно с методом прямого выделения способа накопительных культур позволило дополнить спектр дрожжей видами *S. cerevisiae* и *P. manshurica*. Ранее через накопительную культуру сахаромицеты выделялись в 8 биотопах центральной и южной части Дагестана [9]. Изоляция *S. cerevisiae* при использовании этого метода подтверждает мнение об их редком присутствии на свежих ягодах винограда – в среднем из тысячи ягод *Saccharomyces* обнаруживается только на одной [11].

**Таблица 1.** Видовой состав дрожжей виноградников по годам

Вид дрожжей	Год выделения	
	2013	2014
Аскомицеты		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	+
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	+	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	+	-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	-	+
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	+
<i>Metschnikowia viticola</i>	+	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	+
<i>Pichia fermentans</i>	+	-
<i>Pichia terricola</i>	+	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	+
<i>Pichia manshurica</i> *	-	+
<i>Pichia occidentalis</i>	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	-	+
<i>Saccharomycopsis vini</i>	+	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-
Анаморфы		
<i>Candida zemplinina</i>	+	+
<i>Candida orthopsilosis</i>	-	+
<i>Candida glabrata</i>	+	-
Базидиомицеты		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-

Примечание: \* - культуры выделены накопительным методом с ягод винограда

Таксономический состав дрожжевого населения в годы исследования перестраивался, но имел черты сходства за счёт присутствия стабильно выделяемой из виноградников группы дрожжей – *Aureobasidium*, *Hanseniaspora*, *Pichia*,

*Metschnikowia*, *Candida*. Следует отметить, что среди дрожжей, изолированных из виноградников в 2013- 2014 гг. наряду с широко используемым в практике *S. cerevisiae*, представляют интерес следующие виды, рассматриваемые, как ресурсные: *Aureobasidium pullulans* (синтез полисахаридов и меланина), *Kodamaea ohmeri* (производство ксилита, превращение ксилулозы в ксилит), *Rhodotorula mucilaginosa* (синтез ауксина), *Meyerozyma guilliermondii*, который может быть использован для получения витамина – рибофлавина, а также ксилита. Очевидно, что результаты проводимых исследований способствуют поиску и выделению перспективных для использования в биотехнологии видов.

**Таблица 2.** Состав дрожжей различных субстратов виноградников

Вид дрожжей	Субстрат		
	1	2	3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+
<i>Candida zemplinina</i>	+	+	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	-	+	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	+	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	+	+	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	+	+
<i>Lachancea thermotolerans</i>	+	+	-
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	+	+
<i>Metschnikowia viticola</i>	+	+	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	+	-
<i>Pichia aff. fermentans</i>	-	+	-
<i>Pichia aff. fermentans</i>	+	-	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	+	-
<i>Pichia manshurica</i> *	+	-	-
<i>Pichia occidentalis</i>	+	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	+	-	-
<i>Saccharomycopsis vini</i>	-	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	+	-
Количество видов	14	18	8

Примечание: 1 – ягоды, 2 – листья, 3 – почва

Анализ распределения видов дрожжей в системе виноградно растение – почва, представленный в табл. 2 показал, что максимальным видовым разнообразием отличалась группа дрожжевых грибов, изолированных с листьев, минимальным из почвы – 18 и 8 видов, соответственно.

Исследование, проведенное ранее в динамике (июнь-декабрь) выявило наибольшее видовое разнообразие на ягодах. Максимальное количество видов для них приходилось на август-октябрь, для листьев – на сентябрь-октябрь, а для почвы – на октябрь-ноябрь. Частично это явление может быть объяснено «круговоротом» дрожжей – их постепенной миграцией из растения в почву, что является наиболее показательным по выделению из почвы дрожжевых грибов родов *Metschnikowia* и *Hanseniaspora*, являющихся типичными обитателями цветков и сочных плодов [8]. Приуроченность ко всем типам субстратов отмечена у 5 видов – *A. pullulans*, *H.uvarum*, *M. chrysoperlae*, *M. pulcherrima*, *M.viticola* и к одному у 9 – *H. opuntiae*, *M.guilliermondii*, *P. aff. fermentans*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae*, *S. vini*, *C.orthopsilosis*, *C. glabrata*, *W. anomalus*.

Для выявления особенностей организации дрожжевых грибов на виноградниках целесообразным было проведение сравнения их таксономического состава в зависимости от таких факторов, как сорт винограда и экологические условия произрастания. Видовое разнообразие дрожжевого населения разных сортов оценивали на примере Молдовы и Ркацители, культивируемых на двух смежных участках в равнинной зоне (с. Муцалаул), что сводило к минимуму влияние других факторов. Для сопоставления дрожжевых сообществ схожих субстратов в разных экологических ситуациях рассматривали сорт Молдова, выращиваемый на равнине и предгорье. Согласно данным, приведенным в табл.3, число видов, изолированных из разных сортов, различалось и было представлено на Ркацители и Молдове - 15 и 7 видами, соответственно, из которых 5 являются общими для обоих сортов.

**Таблица 3.** Состав дрожжей, изолированных с различных виноградников

Вид дрожжей	Место произрастания, сорт		
	Новочуртах	Муцалаул	
	Молдова	Молдова	Ркацители
1	2	3	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+
<i>Candida zemplinina</i>	+	-	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	-	+	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	+	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	+	-	-
<i>Lachancea thermotolerans</i>	+	+	+
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	-	-	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	+	+

<i>Metschnikowia viticola</i>	-	-	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	+
<i>Pichia aff. fermentans</i>	-	-	+
<i>Pichia terricola</i>	+	-	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	-	+
<i>Pichia manshurica</i> *	-	-	+
<i>Pichia occidentalis</i>	+	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	-	-	+
<i>Saccharomycopsis vini</i>	-	-	+
Количество видов	12	7	15

Отмечено таксономическое разнообразие дрожжевых группировок Молдовы в зависимости от среды произрастания, показавшее, что в условиях равнины из сорта было изолировано 7 видов, предгорий 12. обоих случаях наблюдается сходство дрожжевого сообщества виноградников, обусловленное тем, что изолированные с разных сортов и местностей виды объединены в составе общих для них родов – *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia Lachancea*.

**Выводы:** исследованы основные характеристики дрожжевых грибов виноградников в северной зоне Дагестана. Показана дифференциация их численности и таксономического состава в пространственно-сукцессионном ряду – максимальная численность и количество видов обнаружены на растении, минимальные в почве под виноградом. Дрожжевое население виноградников включает представителей *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, встречаемость которых независимо от сорта и условий произрастания регулярна, что обуславливает сходство его структуры. Список дрожжевых грибов виноградников представлен 22 видами, из которых 21 относится к аскомицетам. Показана выделяемость широко используемых в практике культур *S. cerevisiae*, а также ряда других, имеющих большой потенциал как ресурсные.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Hernan-Gomez, S.* Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis / *S. Hernan-Gomez, J.C. Espinosa, J.F. Ubeda* // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 193(1). P. 45-50.
- Rementeria, A.* Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain) / *A. Rementeria et al.* // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 86. P. 201-207.
- Raspor, P.* Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia / *P. Raspor et al.* // Int. J. Food Microbiol. 2006. V. 109. P. 97-102.
- Cordero-Bueso, G.* Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries / *G. Cordero-Bueso et al.* // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 145. P. 132-139.
- Settanni, L.* Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains / *L. Settanni et al.* // J. Biosci. Bioeng. 2012. V. 114(6). P. 606-614.
- Setati, M.E.* The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map / *M.E. Setati et al.* // PLoS one. 2012. V.7 (12). e52609.
- Li, S.S.* Yeast species associated with wine grapes in China / *S.S. Li et al.* // Int. J. Food Microbiol. 2010. V. 138. P. 85-90.
- Абдуллабекова, Д.А.* Структура сообществ дрожжевых грибов виноградника в Дагестане / *Д.А. Абдуллабекова и др.* // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48, №2. С. 80-85.
- Магомедова, Е.С.* Дрожжевые грибы плодов винограда Дагестана / *Е.С. Магомедова и др.* // Виноделие и виноградарство. 2012. №6. С. 44-47.
- Качалкин, А.В.* Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов в Московской области // Микробиология. 2010. Т. 79, №6. С. 843-847.
- Mortimer, R.* On the origins of wine yeast / *R. Mortimer, M. Polsinelli* // Res. Microbiol. 1999. V. 150. P.199-204.

#### YEAST COMMUNITIES OF VINEYARDS IN DAGESTAN: NUMBER AND SPECIFIC STRUCTURE

© 2015 D.A. Abdullabekova, E.S. Magomedova, G.G. Magomedov  
Pre-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

The number and taxonomical structure of yeast of the vineyards growing in northern zone of Dagestan is studied. Their differentiation in system grape plant - soil is shown, the most characteristic groups of yeast communities – *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* causing similarity of its structure irrespective of grapes variety and conditions of growth are revealed. Occurrence of the types considered as biotechnology resources is shown.

Key words: yeast, vineyard

*Dinahanum Abdullabekova, Candidate of Technical Sciences, Leading Research Fellow. E-mail: dina2407@mail.ru; Elena Magomedova, Candidate of Biology, Leading Research Fellow. E-mail: milena2760@rambler.ru; Gadji Magomedov, Research Fellow. E-mail: magas1951@mail.ru*