

УДК. 579.64:634.8:581.2

**РАЗНООБРАЗИЕ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОБОБИОТЫ ВИНОГРАДА КУЛЬТУРНОГО
И ЕЕ ПОТЕНЦИАЛ В БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕНАМИ**

Н.Н. Волынчук

Полесский государственный университет,
volynchuk.n@mail.ru

Аннотация. Впервые в условиях данного региона проведено изучение количественного и качественного микробного состава ризосферы 16-летних корней винограда культурного (*Vitis vinifera*)

и определен спектр антагонистической активности выделенных микроорганизмов по отношению к фитопатогенным грибам.

Ключевые слова: виноград, антагонизм, ризосфера, микробиота, бактериом, дрожжевые грибы, микобиом.

Введение. Виноград (*Vitis*) является одной из наиболее распространенных и ценных плодовых культур в мире. В Беларуси промышленное виноградарство находится только в начале становления и наиболее подходящие для него условия складываются в Гомельской, Брестской и юге Минской областях, где выращивание этой замечательной ягоды экономически целесообразно. В Пинском регионе винограду внимание уделялось издавна. На сегодня площадь первого промышленного виноградника Беларуси на территории ОАО «Пинский винодельческий завод» составляет около 100 гектаров. А заложен он был посадочным материалом из сортов коллекции Опорного пункта по винограду и другим южным культурам, созданного в Пинске еще в 1948 году.

Учитывая растущие экологические ограничения, повышение устойчивости виноградарства в настоящее время является серьезной проблемой. Одна из важных областей исследований по повышению устойчивости и включает в себя лучшее понимание функциональности ризосферного микробиома и его влияния на виноградную лозу, метаболизм и агрономические реакции. Известно, насколько значительна средообразующая роль бактерий и грибов в почвах: они активно участвуют в регуляции почвообразовательных процессов, структурированности, кислотности, температурных характеристик почв, контролируют структуру и функциональную активность почвенной биоты, состав органического вещества почв. Так грибы способны влиять на количественные показатели биомассы, благодаря чрезвычайно высокой изменчивости и пластичности изменять патогенность, агрессивность и вирулентность, влиять на видовое разнообразие растений. Жизнедеятельность почвенной микробиоты оказывает оздоравливающий эффект, защищая растение от корневых патогенов путем синтеза антибиотиков, конкуренции за субстрат, индукции иммунных реакций у растения-хозяина. Следовательно, разработка биотехнологических агроприемов управления микробиотой для оптимизации биологической продуктивности винограда одно из перспективных направлений современного адаптивного растениеводства.

Цель исследования – провести сравнительную оценку основных эколого-трофических групп микроорганизмов ризосферы 16-летних корней винограда сорта Альфа, произрастающего в Пинском регионе, и определить спектр антагонистической активности выделенных штаммов по отношению к фитопатогенным грибам.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на кафедре биотехнологии ПолесГУ. Образцы 16-летних корней винограда сорта Альфа были отобраны на плантации ОАО «Пинский винодельческий завод» на глубине 30 см (рН почвы 5,5). Для выделения микроорганизмов использовали метод последовательных отмываний корней по Теппер. Экологотрофические группы микроорганизмов определяли методом посева на диагностические среды: ГРМ-агар – для бактерий-копиотрофов, сусло-агар (СА) – для микромицетов, крахмалоаммиачный агар (КАА) – для прототрофов, почвенный агар (ПА) – для олиготрофов, агар Эшби – для аэробных азотфиксаторов и олигонитрофилов [1]. Культивирование проводили в течение 7 суток при 30°C. Идентификация бактерий проводилась по общепринятым методам на основании культуральных, морфологических и физиолого-биохимических признаков; идентификация микромицетов – по микро- и макроморфологическим признакам [2, 3, 4]. Частоту встречаемости штаммов рассчитывали как отношение количества проб, содержащих исследуемый штамм, к общему количеству проб с наличием роста.

Первичный скрининг антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов проводили, используя стандартный метод агаровых блоков. Штаммы фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* БИМ Ф-609, *Alternaria alternata* БИМ Ф-119, *Cladosporium cladosporioides* БИМ Ф-593, *Aspergillus awamori* БИМ Ф-7, *Penicillium funiculosum* БИМ Ф-7, *Aspergillus terreus* БИМ Ф-17 культивировали на картофельно-декстрозном агаре (КДА) при 28°C в течение 4-10 дней. Для дальнейшего изучения антифунгальной активности агаровую пробку культуры фитопатогена диаметром 5 мм помещали в центр чашки с КДА, а положительные изоляты инокулировали в 3 см от них. Контрольные чашки инокулировали пробкой колонии фитопатогена без изолятов. Каждый штамм тестировали трижды.

Противогрибковую активность оценивали путем сравнения зон ингибирования роста мицелия с зонами в контрольных чашках. Статистическую обработку данных проводили с помощью современных программ *Microsoft Excel*.

Результаты исследования. В результате микробиологического анализа было выявлено, что в данной почве при наличии довольно значительного количества микроорганизмов различных эколого-трофических групп идут интенсивные минерализационные процессы (таблица 1). В ходе исследований на это указало то, что на бедных питательных средах численность микроорганизмов была выше, чем на богатых органических. Подтверждением этого факта послужило также и то, что на крахмало-аммиачной среде была зафиксирована бóльшая численность колоний микроорганизмов, чем на ГРМ.

Таблица 1. – Количественные показатели эколого-трофических групп микроорганизмов ризосферы в образцах 16-летних корней винограда сорта Альфа

Эколого-трофические группы микроорганизмов	Численность микроорганизмов, КОЕ/г (M±m)
Копиотрофы	$(7,1 \pm 0,1) \times 10^7$
Прототрофы	$(4,6 \pm 0,05) \times 10^7$
Олиготрофы	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^5$
Азотфиксаторы	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^6$
Микромицеты	$87,3 \times 10^3$

Согласно результатам исследования наиболее многочисленная эколого-трофическая группа среди микроорганизмов ризосферы корней 16-летнего винограда культурного – копиотрофы, что свидетельствует об увеличении количества корневых выделений, поскольку никакая другая исследованная группа микроорганизмов так тесно не связана с их количеством. Группу копиотрофов при анализе взаимоотношений между растениями и ризосферными микроорганизмами некоторые исследователи рассматривают как индикаторную, т.к. субстратом для роста этих микроорганизмов являются белковые вещества корневых выделений и отмершие фрагменты корней и корневых волосков. Содержание другой группы микроорганизмов – олиотрофов, растущих при низких концентрациях питательных веществ, в 3,1 раза меньше копиотрофов. Наименьшая численность среди исследуемых групп ризосферных бактерий отмечена у азотфиксаторов.

Среди микромицетов наиболее часто встречающимися таксонами в ризосфере винограда были *Ascomycota* (65%) и *Basidiomycota* (35%). А наиболее многочисленными бактериальными типами, обнаруженными в ризосфере виноградной лозы, были *Proteobacteria* (76%), *Actinobacteria* (4%), *Firmicutes* (20%). Эти типы являются ключевыми таксонами, которые выполняют широкий спектр функций в почвенной экосистеме. Филум *Proteobacteria*, являясь самым многочисленным включал в себя два класса *Alpha-* (36%) и *Gamma-Proteobacteria* (40%). Класс *Alpha-Proteobacteria* был представлен одним порядком *Hyphomicrobiales*. Тип *Firmicutes* был представлен одним классом *Bacilli*, многие из которых относят к группе PGPR-бактерий. Бактерии PGP благотворно влияют на здоровье и продуктивность растений за счет улучшения доступности и усвоения питательных веществ, замедления потери воды, за счет растворения фосфатов и высвобождения сидерофоров, а также за счет синтеза специфических активных соединений (например, индол-3-уксусной кислоты (ИУК), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК)), абсцизовой кислоты (АБК)) защитных терпенов в виноградной лозе.

После первичного скрининга методом агаровых блоков шесть положительных штаммов ризосферы были идентифицированы до рода (таблица 2).

Таблица 2. – Оценка ингибирования роста фитопатогенных грибов ризосферными штаммами микроорганизмов корней винограда, мм

Штаммы	Фитопатогенные грибы					
	<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ Ф-609	<i>Alternaria alternata</i> БИМ Ф-119	<i>Cladosporium cladosporioides</i> БИМ Ф-593	<i>Aspergillus awamori</i> БИМ Ф-7	<i>Penicillium funiculosum</i> БИМ Ф-7	<i>Aspergillus terreus</i> БИМ Ф-17
<i>Microbacterium sp.</i>	5,2±1,3	5,7±1,7	6,9±1,2	4,3±2,2	5,5±1,1	6,8±2,5
<i>Pantoea sp.</i>	2,0±2,9	–	–	7,0±0,8	5,1±1,5	6,2±2,3
<i>Pseudomonas sp.</i>	6,3 ±1,3	7,0±1,2	8,3±1,1	8,9±1,3	4,3±0,7	2,1±0,6
<i>Rhizobium sp.</i>	2,0±0,7	9,1±1,1	–	–	7,7±0,4	7,3±0,6
<i>Candida sp.</i>	3,1±1,4	3,6±2,2	4,1±0,8	–	–	3,7±2,1
<i>Rhodospiridiobolus sp.</i>	6,2±2,7	7,1±2,2	6,7±2,4	8,6±0,7	7,8±2,0	7,1±0,9

Все идентифицированные штаммы были способны ингибировать рост *Fusarium oxysporum* БИМ Ф-609. При этом зона торможения варьировала от 6,3 до 2,0 мм. *Pseudomonas sp.* показал самую сильную антагонистическую активность к *Cladosporium cladosporioides* БИМ Ф-593, *Aspergillus awamori* БИМ Ф-7, *Fusarium oxysporum* БИМ Ф-609. Максимальная зона торможения по отношению к *Alternaria alternata* БИМ Ф-119 отмечена у изолята *Rhizobium sp.* и составила 9,1±1,1 мм. Штаммы бактерий *Microbacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, а также дрожжевой гриба *Rhodospiridiobolus sp.* ингибировали рост всех исследуемых фитопатогенных грибов по сравнению с другими штаммами микроорганизмов.

Вывод. Численность копиотрофов, как наиболее многочисленная эколого-трофическая группа микроорганизмов ризосферы корней 16-летнего винограда культурного, составила $7,1 \times 10^7$ КОЕ/г. Среди микромицетов наиболее часто встречающимися были *Ascomycota* (65%). Филум *Proteobacteria*, являясь самым многочисленным включал в себя два класса *Alpha-* (36%) и *Gamma-Proteobacteria* (40%). Штаммы бактерий *Microbacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, а также дрожжевой гриба *Rhodospiridiobolus sp.* ингибировали рост всех исследуемых фитопатогенных грибов. Понимание разнообразия бактерий и грибов ризосферы, а также их взаимодействия с растением будет способствовать разработке будущих стратегий защиты виноградной лозы.

Список использованных источников

1. Красильников, Н. А. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Н.А. Красильников. – М.: Изд-во МГУ, 1966. – 239 с.
2. Красильников, Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов / Н. А. Красильников. – М., 1949. – 832 с.
3. Кудрявцев, В. И. Систематика дрожжей / В.И. Кудрявцев. – М., 1954. – 428 с.
4. Определитель бактерий Берджи / пер. с англ. под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина. – М.: Мир, 1997.