



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

EXPERIMENTAL BIOLOGY and BIOTECHNOLOGY

Издается с января 1969 г.
(с 1969 по 2016 г. – под названием
«Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География»,
с 2017 по 2021 г. – под названием
«Журнал Белорусского государственного университета. Биология»)
Выходит три раза в год

3

2023

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор **ДЕМИДЧИК В. В.** – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; декан биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

**Заместитель
главного редактора** **СИДОРОВ А. В.** – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: sidorov@bsu.by

**Ответственный
секретарь** **ФИЛИПЦОВА Г. Г.** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: filiptsova@bsu.by

- Адамович Б. В.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Валентович Л. Н. Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Гельтман Д. В. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Гурин А. В. Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Костюк В. А. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Лермонтова И. Н. Институт генетики и исследования сельскохозяйственных растений им. Г. В. Лейбница, Гатерслебен, Германия.
Медведев С. С. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Мороз Л. Л. Флоридский университет, Гейнсвилл, США.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Стржалка К. Ягеллонский университет, Краков, Польша.
Тихомиров В. Н. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Чубанов В. С. Институт фармакологии и токсикологии им. Вальтера Штрауба Мюнхенского университета им. Людвига и Максимилиана, Мюнхен, Германия.
Шабала С. Н. Университет Тасмании, Хобарт, Австралия.
Ю Мин Международный исследовательский центр экологической биологии мембран Фошаньского университета, Фошань, Китай.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief **DEMIDCHIK V. V.**, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; dean of the faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchyk@bsu.by

Deputy editor-in-chief **SIDOROV A. V.**, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by

Executive secretary **FILIPTSOVA G. G.**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology, Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: filiptsova@bsu.by

- Adamovich B. V.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Chubanov V. S. Walther Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.
Geltman D. V. V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Gourine A. V. University College of London, London, United Kingdom.
Kilchevsky A. V. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kostyuk V. A. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Lermontova I. N. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany.
Medvedev S. S. Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Moroz L. L. University of Florida, Gainesville, USA.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Shabala S. N. University of Tasmania, Hobart, Australia.
Strzalka K. Jagiellonian University, Kraków, Poland.
Tikhomirov V. N. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Valentovich L. N. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Yu Min International Research Centre for Environmental Membrane Biology, Foshan University, Foshan, China.

ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ МИКОПАТОГЕНОВ ВИНОГРАДА

Н. Н. ВОЛЫНЧУК¹⁾, Л. Ф. КАБАШНИКОВА²⁾

¹⁾Полесский государственный университет,
ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь

²⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Из эписферы и эндосферы различных органов винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) сорта Альфа были выделены 77 штаммов дрожжевых грибов, из которых 6 штаммов после вторичного скрининга проявляли антагонистическое действие по отношению к послеуборочным микопатогенам винограда *Botrytis cinerea* БИМ F-71 и *Fusarium oxysporum* БИМ F-609Г. Средний показатель ингибирования мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 аборигенными дрожжевыми биоагентами составил 75,1 %, средний показатель ингибирования мицелия *F. oxysporum* БИМ F-609Г – 65,3 %. Анализ минимальной ингибирующей концентрации показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития обоих патогенов всеми штаммами дрожжевых грибов. Из исследованных механизмов антагонистического действия дрожжевых грибов присутствовал синтез уреазы, целлюлазы, амилазы и частично протеазы. Выработки летучих органических соединений немиецелиальными грибами в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г не выявлено.

Ключевые слова: виноград; *Botrytis*; *Fusarium*; дрожжевые грибы; биоконтроль.

YEAST FUNGI AS PROMISING AGENTS FOR BIOCONTROL OF MYCOPATHOGENS IN GRAPES

N. N. VOLYNCHUK^a, L. F. KABASHNIKOVA^b

^aPolessky State University, 23 Dniaprowskaj flacilii Street, Pinsk 225710, Belarus

^bInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: N. N. Volynchuk (volynchuk.n@mail.ru)

From the episphere and endosphere of various organs of cultivated grapes (*Vitis vinifera* L.) variety Alpha, 77 strains of yeast fungi were isolated, of which 6 strains after secondary screening showed antagonistic activity against postharvest mycopathogens of grapes *Botrytis cinerea* BIM F-71 and *Fusarium oxysporum* BIM F-609G. The average rate of

Образец цитирования:

Волынчук НН, Кабашникова ЛФ. Дрожжевые грибы как перспективные агенты биоконтроля микопатогенов винограда. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023; 3:24–33.

EDN: RCUKUM

For citation:

Volynchuk NN, Kabashnikova LF. Yeast fungi as promising agents for biocontrol of mycopathogens in grapes. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:24–33. Russian.

EDN: RCUKUM

Авторы:

Наталья Николаевна Волынчук – аспирантка кафедры биотехнологии биотехнологического факультета. Научный руководитель – Л. Ф. Кабашникова.

Людмила Федоровна Кабашникова – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, доцент; заведующий лабораторией прикладной биофизики и биохимии.

Authors:

Natalia N. Volynchuk, postgraduate student at the department of biotechnology, biotechnological faculty.

volynchuk.n@mail.ru

Ljudmila F. Kabashnikova, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, docent; head of the laboratory of applied biophysics and biochemistry.

kabashnikova@mail.ru

inhibition of the mycelium of *B. cinerea* BIM F-71 by native yeast bioagents was 75.1 %, the average rate of inhibition of the mycelium of *F. oxysporum* BIM F-609G – 65.3 %. Analysis of the minimum inhibitory concentration showed that the concentration of 10^5 CFU/mL is sufficient to reduce the development of both pathogens by all yeast strains. Of the studied mechanisms of the antagonistic action of yeast fungi, there was a synthesis of urease, cellulase, amylase and partially protease. Production of volatile organic compounds by non-filamentous fungi against *B. cinerea* BIM F-71 and *F. oxysporum* BIM F-609G was not revealed.

Keywords: grapes; *Botrytis*; *Fusarium*; yeast fungi; biocontrol.

Введение

Виноград культурный (*Vitis vinifera* L.) является одной из наиболее распространенных и ценных плодовых культур в мире. Примерно 80 % всей мировой продукции винограда идет на вино, 20 % потребляется в свежем виде и подвергается сушке [1]. Виноградная лоза относится к числу наиболее поражаемых болезнями растений из-за таких особенностей возделывания культуры, как значительные площади массивов насаждений, большое разнообразие сортов, отсутствие плодосмена, возраст растений и др. [2]. Потери урожая в виноградарстве (до 25 % от общего объема производства в промышленно развитых странах и более 50 % в развивающихся странах) связаны с грибными патогенами из родов *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, которые также являются источником микотоксинов. Некротрофный фитопатогенный гриб *B. cinerea* Pers., вызывающий серую гниль и продуцирующий поликетидный микотоксин и ботциновую кислоту, особенно актуален для виноделия [3; 4], поскольку в зависимости от условий развития он может влиять на качество вина как положительно (благородная серая гниль), так и отрицательно. Кроме прямого влияния на состав и качество вина, данный гриб может оказывать и косвенное действие, ведь применяемые против серой гнили фунгициды, частично оставаясь на ягодах винограда до момента их сбора, в дальнейшем могут задерживать спиртовое брожение и отрицательно сказываться на вкусовых качествах вина [5]. В последнее время особую опасность для винограда и других многолетних сельскохозяйственных культур представляют также грибы рода *Fusarium*, установленные в качестве возбудителей усыхания генеративных органов винограда, которые вызывают значительное снижение урожая и даже полную гибель растения. Наиболее распространенными патогенами данного рода на винограде являются *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg и *F. oxysporum* Schltdl. [6; 7]. Для снижения вредоносности фузариоза и серой гнили винограда необходима разработка мер контроля. Отдельно стоит отметить, что технологии контроля должны отвечать требованиям современного адаптивного земледелия, включающего в себя биологический метод.

Дрожжевые грибы, как микроорганизмы с высоким биотехнологическим потенциалом, являются объектами различных научных исследований. За последние 35 лет проводилась обширная исследовательская деятельность по их изучению в качестве экологически чистой альтернативы синтетическим фунгицидам в виноградарстве [8; 9]. Описаны следующие механизмы действия штаммов дрожжевых грибов против микопатогенов: конкуренция за питательные вещества или пространство, истощение запасов железа [8–10], производство внеклеточных литических ферментов и летучих органических соединений (ЛОС) [11], толерантность к активным формам кислорода [8], образование биопленок [11; 12], микопаразитизм [13; 14], индуцирование устойчивости растений путем накопления фитоалексинов и синтеза белков, связанных с патогенезом [15].

Основная цель настоящей работы заключалась в оценке антагонистического потенциала и механизма действия аборигенных дрожжевых грибов винограда культурного сорта Альфа по отношению к двум видам послеуборочных микромицетов – *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609G.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на базе кафедры биотехнологии биотехнологического факультета Полесского государственного университета. Образцы тканей винограда без видимых повреждений и поражений асептически отбирались весной – летом 2022 г. на плантации Пинского винодельческого завода (пос. Садовый, Пинский р-н, Брестская обл.). На площади примерно 70 га произрастают более 70 сортов винограда, однако значительную ее часть (63 га) занимает винный сорт Альфа (табл. 1).

Таблица 1

Важнейшие сорта винограда, произрастающего на плантации
Пинского винодельческого завода

Table 1

The most important varieties of grapes growing
on the plantation of the Pinsk Winery

Сорт	Процент от общей площади	Генетическая формула
Альфа	90,0	50 % <i>V. labruska</i> L. 50 % <i>V. riparia</i> L.
Тажный изумруд	4,3	100 % <i>V. riparia</i> L.
Бианка	1,4	78 % <i>V. vinifera</i> L. 15 % <i>V. rupestris</i> L.
Московский устойчивый	1,4	25 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L. 25 % <i>V. labruska</i> L.
Фиолетовый августовский	1,4	75 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L.
Кристалл	0,7	53 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. amurensis</i> L.
Маршал Фош	0,7	50 % <i>V. vinifera</i> L. 25 % <i>V. riparia</i> L. 25 % <i>V. rupestris</i> L.

Характеристика сорта Альфа. Срок созревания 110–145 дней. Морозоустойчивость до -35°C . Урожайность 150–180 ц/га. Сахаристость 15–18 %. Кислотность 10–13 г/л. Кусты сформированы в виде четырехрукавного горизонтального кордона. Система ведения шпалерная, вертикальная. Расстояние между кустами 1,2 м, ширина междурядья 2,5 м. Покровные культуры состоят из смеси многолетних трав. Виноградник неорошаемый, неукрывной (рис. 1).

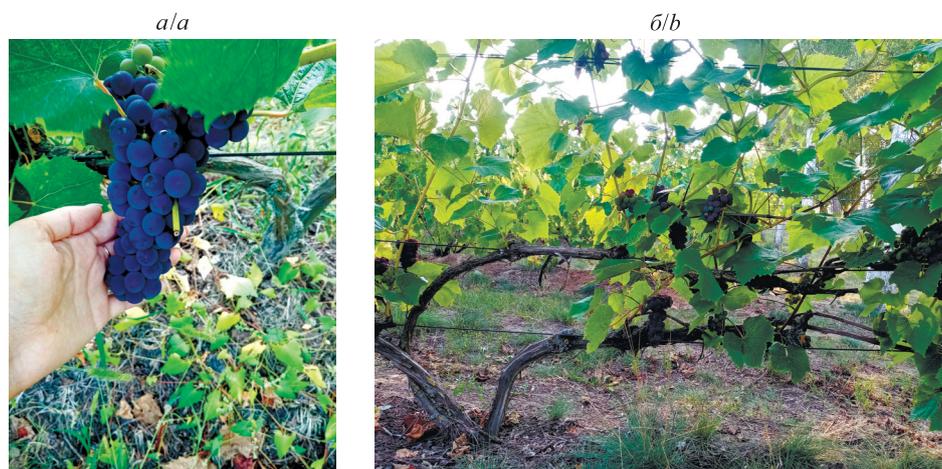


Рис. 1. Виноград сорта Альфа: а – гроздь; б – общий вид куста
Fig. 1. Alpha grapes: a – bunch of the grapes; b – general view of the bush

Анализ антагонистической активности *in vitro*. Использовали двойной скрининг антагонистической активности на агаровой среде. Антагонистическую активность изолятов дрожжевых грибов исследовали в отношении двух микопатогенов винограда и других сельскохозяйственных растений – *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Их вирулентность также была подтверждена путем искусственной инокуляции на поврежденном винограде. Культуры микромицетов высевали на картофельно-сахарозную агаризованную (КСА) среду. Чашки Петри инкубировали при температуре 25°C под постоянным белым светом не менее 10 сут. После этого споры собирали в растворе Tween-20 (0,1 об. %). Концентрацию конидиальной суспензии доводили до $6 \cdot 10^6$ спор на 1 мл. При первом скрининге 5 мкл свежей конидиальной суспензии

микопатогена инокулировали в центр чашки Петри со средой КСА (диаметр чашки 90 мм). Затем по 5 мкл свежих культур дрожжевых грибов помещали на расстоянии 2,5 см от центра (6 вариантов на 1 чашку). Далее чашки Петри инкубировали при температуре 25 °С под постоянным белым светом в течение 10 сут. Чистая зона вокруг колоний дрожжевых грибов интерпретировалась как полное подавление роста фитопатогенов. Штаммы, проявляющие ингибирующую активность при первичном скрининге, были отобраны для второго этапа. При вторичном скрининге в чашку Петри добавляли сначала 10 мл среды КСА, затем 5 мл мягкой среды КСА (7 г/л агара) с конечной концентрацией дрожжевых клеток 10⁶ КОЕ/мл. Когда агар застывал, в чашки инокулировали 5 мкл свежей конидиальной суспензии тестируемых грибов. Далее чашки инкубировали при условиях первичного скрининга. После инкубации измеряли площадь грибных патогенов с помощью программы *ImageJ* и рассчитывали процент ингибирования фитопатогена дрожжевыми грибами как разность площади колонии в контрольном и опытном вариантах, деленную на площадь колонии в контроле и умноженную на 100. Эксперименты повторяли трижды для подтверждения воспроизводимости результатов.

Оценка минимальной ингибирующей концентрации. Оценка исходной концентрации дрожжевых клеток, способных ингибировать рост микромицетов, проводили с помощью следующего теста. Свежие культуры дрожжевых грибов, прошедших второй этап селекции, выращивали на среде YEPD при температуре 25 °С в течение 3 сут. Чашки со средой КСА готовили для каждого штамма с различной концентрацией клеток (от 10³ до 10⁶ КОЕ/мл). В центр чашки Петри наносили по 10 мкл конидиальной суспензии (3 · 10⁵ спор на 1 мл) *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г. Планшеты инкубировали при температуре 25 °С и постоянном освещении в течение 7 сут. Результаты считались положительными, когда дрожжи были способны ингибировать общий рост микромицетов на протяжении всего времени инкубации. Проводили контрольные опыты без инокуляции клеток дрожжевых грибов. Эксперимент повторяли трижды.

Исследование механизма действия дрожжей. Чтобы установить причину наблюдаемого ингибирующего эффекта, исследовали ферментативную активность потенциальных штаммов дрожжевых грибов и синтез ЛОС.

Исследование синтеза ЛОС. Для изучения данного механизма использовали трехсекционные чашки Петри, содержащие по 5 мл среды КСА в каждом секторе. В один сектор инокулировали 20 мкл суспензии (10⁶ КОЕ/мл) дрожжевых грибов и инкубировали чашки Петри при температуре 25 °С в течение 3 сут. Затем в остальные два сектора инокулировали по 20 мкл конидиальной суспензии (6 · 10⁶ спор на 1 мл) каждого микопатогена. В качестве контроля использовали чашки без дрожжевых грибов. Чашки Петри дважды оборачивали стерильной пищевой пленкой для предотвращения выхода воздуха и инкубировали при температуре 25 °С под постоянным белым светом в течение 5 сут. Снижение радиального роста по отношению к контрольному тесту рассчитывали через 6 сут. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Определение амилолитической активности. В агар Чапека – Докса добавляли растворимый крахмал с массовой долей 1 %. Далее наносили каждый исследуемый изолят на поверхность плотной среды в чашки Петри, инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут и для визуализации эффекта покрывали поверхность раствором йода (йод – 5 г, йодид калия – 10 г, дистиллированная вода – 100 мл) [16]. При использовании разводили реактив дистиллированной водой в соотношении 1 : 10.

Определение целлюлозолитической активности. Активность целлюлазы изучали на среде, содержащей 7 г/л КН₂РО₄, 2 г/л К₂НРО₄, 0,1 г/л MgSO₄ · 7H₂O, 1 г/л (NH₄)₂SO₄, 0,6 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л карбоксиметилцеллюлозы и 15–20 г/л агара [17]. Чашки Петри инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут, затем культуры заливали 5 мл раствора йода и промывали дистиллированной водой для визуализации зоны гидролиза.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность подтверждали согласно методике, изложенной в работе [18]. Культуры инокулировали в чашки Петри с пептонной средой с добавлением 1 % желатина как источника белка и инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 сут.

Определение уреазной активности. Уреазный скрининг проводили по методике, описанной в работе [19], с некоторыми модификациями. Питательную среду Кристенсена (пептон – 1 г/л, глюкоза – 1 г/л, NaCl – 5 г/л, КН₂РО₄ – 2 г/л, феноловый красный – 0,012 г/л, агар – 20 г/л (рН 6,8)) распределяли в микропробирки объемом 1,5 мл и добавляли каплю 20 % раствора мочевины, стерилизованного фильтрованием. Затем штаммы инокулировали и инкубировали при температуре 25 °С в течение 5 сут. Гидролиз мочевины вызывает изменение цвета среды с оранжево-желтого на розовато-красный.

Определение липолитической активности. Продукция липазы была подтверждена после нанесения штамма на среду КСА с добавлением 1 % Tween-20 [18] в качестве липидного субстрата и инкубации при температуре 25 °С в течение 3 сут.

Результаты и их обсуждение

Из эписферы и эндосферы разных органов винограда культурного сорта Альфа были выделены 77 штаммов немикелиальных грибов. Из эндосферы изолированы 15 штаммов. Наибольшее количество эпифитных дрожжевых грибов выделены из корней и штамба (рис. 2).

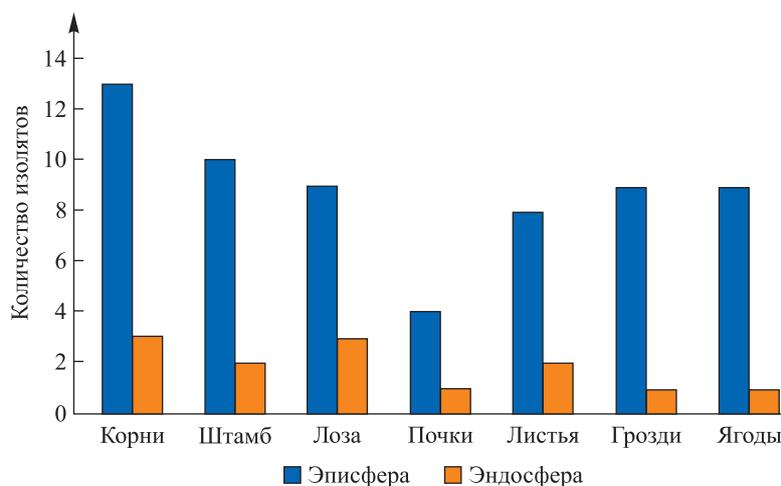


Рис. 2. Количество дрожжевых грибов, выделенных из разных органов *V. vinifera* L.

Fig. 2. The number of yeast fungi isolated from different organs of *V. vinifera* L.

Все изоляты дрожжевых грибов подвергали предварительному анализу *in vitro* для выявления антагонистической активности в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г. При первичном скрининге 27 из 77 изолятов (35,1 %) показали эффект замедления или ингибирования роста двух протестированных микопатогенов. Из 27 отобранных дрожжей-антагонистов 12 штаммов были выделены из корней и штамба, что составило 15,6 % от общего количества изолятов (табл. 2). Дрожжевые грибы, выделенные из эписферы и эндосферы почек винограда, не демонстрировали антагонистической активности ни к одному исследованному микопатогену. По результатам первичного скрининга 18,2 % от общего количества дрожжевых грибов не ингибировали рост микромицетов вообще, 35,0 % демонстрировали антагонизм лишь к *F. oxysporum* БИМ F-609Г, а 27,3 % – лишь к *B. cinerea* БИМ F-71.

Таблица 2

Антагонистическая активность штаммов дрожжевых грибов
 в отношении *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г на 10-е сутки культивирования

Table 2

Antagonistic activity of yeast fungi strains
 against *B. cinerea* BIM F-71 and *F. oxysporum* BIM F-609G on the 10th days of cultivation

Орган растения	Общее количество изолятов	Количество (доля, %) изолятов с ингибиторной активностью		Процент изолятов с ингибиторной активностью от общего количества изолятов
		Первичный скрининг	Вторичный скрининг	
Корни	16	6 (37,5)	1 (16,6)	6,3
Штамб	12	6 (50,0)	1 (16,6)	8,3
Лоза	12	3 (25,0)	2 (66,6)	16,7
Почки	5	0 (0)	0 (0)	0
Листья	10	4 (40,0)	1 (25,0)	10,0
Грозди	10	4 (40,0)	0 (0)	0
Ягоды	12	4 (33,3)	1 (25,0)	8,3

После вторичного скрининга лишь 6 изолятов (7,8 % от общего количества), выделенных из корней, штамба, лозы, листьев и ягод винограда сорта Альфа, проявляли явное ингибирование роста мицелия обоих микопатогенов. Степень ингибирования варьировала в зависимости от патогена и дрожжевого антагониста. Антагонистическая активность выделенных штаммов дрожжевых грибов против *B. cinerea* БИМ F-71 находилась в диапазоне от 69,9 до 79,1 %, а против *F. oxysporum* БИМ F-609Г – в диапазоне от 52,1 до 71,8 % (табл. 3).

Таблица 3

Процент ингибирования роста *B. cinerea* БИМ F-71
и *F. oxysporum* БИМ F-609Г дрожжевыми грибами, прошедшими вторичный скрининг

Table 3

Percentage of growth inhibition of *B. cinerea* BИM F-71
and *F. oxysporum* BИM F-609G by yeast fungi that passed the secondary screening

Номер штамма	Орган растения	Процент ингибирования роста	
		<i>B. cinerea</i> БИМ F-71	<i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г
17	Листья (эписфера)	77,70 ± 1,22	71,80 ± 2,02
27	Лоза (эндосфера)	73,60 ± 1,10	61,20 ± 1,33
32	Корни (эндосфера)	78,20 ± 2,34	69,60 ± 1,20
36	Штамб (эписфера)	72,20 ± 2,08	70,60 ± 0,82
37	Лоза (эписфера)	79,10 ± 1,46	66,60 ± 0,64
64	Ягоды (эписфера)	69,90 ± 1,28	52,10 ± 1,24

Таким образом, средний показатель ингибирования мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 составил 75,1 %, максимальный процент ингибирования его роста демонстрировал штамм № 37. Средний показатель ингибирования мицелия *F. oxysporum* БИМ F-609Г составил 65,3 %, что в 1,4 раза меньше показателя ингибирования серой гнили винограда. Среди исследованных дрожжевых грибов наиболее эффективным против фузариоза оказался штамм № 17. Эпифитный штамм № 64 демонстрировал наименьшие показатели ингибирования грибных возбудителей фузариоза и серой гнили согласно использованной методике анализа.

Оценка минимальной ингибирующей концентрации показала, что из 6 изолятов дрожжевых грибов 2 штамма (№ 37 и 64) значительно замедляли рост гиф *B. cinerea* БИМ F-71 только при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, а 4 штамма (№ 17, 27, 32 и 36) – как при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл, так и при концентрации 10^3 – 10^4 КОЕ/мл в указанных условиях культивирования (табл. 4). Однако рост микомицета *F. oxysporum* БИМ F-609Г при концентрации 10^3 КОЕ/мл был полностью снижен только 1 штаммом (№ 36), а при концентрации 10^4 КОЕ/мл – 2 штаммами (№ 36 и 37). Остальные штаммы (№ 17, 27, 32 и 64) уменьшали рост фитопатогенного гриба *F. oxysporum* БИМ F-609Г лишь при концентрации 10^5 – 10^6 КОЕ/мл.

Таблица 4

Ингибирование роста *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г
различными концентрациями штаммов дрожжевых грибов на 7-е сутки культивирования

Table 4

Growth inhibition of *B. cinerea* BИM F-71 and *F. oxysporum* BИM F-609G
by various concentrations of yeast fungi strains on the 7th days of cultivation

Номер штамма	Ингибирование роста <i>B. cinerea</i> БИМ F-71 при концентрации				Ингибирование роста <i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г при концентрации			
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^6	10^5	10^4	10^3
17	+	+	+	+	+	+	–	–
27	+	+	+	+	+	+	–	–
32	+	+	+	+	+	+	–	–
36	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	–	–	+	+	+	–
64	+	+	–	–	+	+	–	–

Примечания: 1. Знак «плюс» обозначает способность ингибировать общий рост микопатогена при определенной концентрации, а знак «минус» – неспособность ингибировать общий рост микопатогена при заданной концентрации. 2. Единица измерения концентрации – КОЕ/мл.

Анализ минимальной ингибирующей концентрации, определяемой как самая низкая концентрация дрожжевых грибов, приводящая к полному подавлению роста микромицетов, показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г всеми штаммами дрожжевых грибов. Это значительно ниже, чем у других дрожжей-антагонистов [13; 20; 21]. Однако необходимы дальнейшие исследования по оценке влияния условий роста на значения минимальной ингибирующей концентрации в полевых условиях.

Поскольку в биоконтролирующую активность дрожжей-антагонистов вовлечено несколько механизмов действия, были исследованы основные из них. Известно, что штаммы видов *Meyerozyma guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki, *Hanseniaspora clermontiae* Čadež, Poot, Raspor & M. T. Sm., *H. uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff ex M. T. Sm., *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev, *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud могут продуцировать β -1,3-глюканазу и хитиназу, активные против *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *Penicillium expansum* Link и *B. cinerea*, особенно когда клеточная стенка плесневых грибов представляет собой единственный источник углерода [17; 20; 22]. Также сообщалось, что механизмы действия дрожжей против *B. cinerea* в основном связаны с ферментативной активностью, конкуренцией за железо или питательные вещества и продуцированием ЛОС. Таким образом, дрожжевые грибы, прошедшие второй этап скрининга, оценивали на наличие или отсутствие ферментативной активности и выработку ЛОС (табл. 5).

Таблица 5

Некоторые механизмы антагонистического действия дрожжевых грибов

Table 5

Some mechanisms of antagonistic action of yeast fungi

Номер штамма	Выработка ЛОС		Ферментативная активность				
	В отношении <i>B. cinerea</i> БИМ F-71	В отношении <i>F. oxysporum</i> БИМ F-609Г	Протеаза	Амилаза	Липаза	Целлюлаза	Уреаза
17	–	–	–	+	–	+	+
27	–	–	–	–	–	+	+
32	–	–	±	+	–	+	+
36	–	–	±	+	–	+	+
37	–	–	±	+	–	+	+
64	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. Знак «плюс» обозначает положительную реакцию, знак «минус» – отрицательную реакцию, а знак «плюс-минус» – слабую реакцию.

Известно, что выработка ЛОС и гидролитических ферментов дрожжевыми грибами может изменить баланс резидентной микробиоты и дестабилизировать микробный состав виноградного суслу. В наших исследованиях штаммы-антагонисты не продуцировали ЛОС в отношении патогенных микромицетов *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum* БИМ F-609Г, а штаммы № 32, 36 и 37 демонстрировали очень слабый синтез протеазы при заданных условиях культивирования. Следует отметить, что зона гало (просветления) активных продуцентов целлюлозолитических энзимов составила 11–13 мм. Штамм № 64, входящий в состав микробиома карпосферы *V. vinifera* L. и имеющий отрицательные данные относительно исследованных нами механизмов антагонизма, вероятно, конкурирует с изученными фитопатогенами за питательные вещества и пространство, как доказано и другими учеными [23; 24]. Этот штамм также может быть перспективен в биологизированном растениеводстве, так как имеются данные о том, что штаммы дрожжевых грибов, выделенные из винограда, ингибируют грибы рода *Botrytis* и не конкурируют при этом с *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen, поэтому могут использоваться в качестве перспективных агентов биоконтроля без изменения процессов ферментации [24; 25].

Заключение

Из эписферы и эндосферы разных органов винограда культурного сорта Альфа, произрастающего на плантации Пинского винодельческого завода, были выделены 77 штаммов дрожжевых грибов. По результатам первичного скрининга антагонистическое действие по отношению к *B. cinerea* БИМ F-71 и *F. oxysporum*

БИМ F-609Г проявляли 35,1 % от общего количества немикелиальных грибов, по результатам вторичного скрининга – 7,8 %. Средний показатель ингибирования роста мицелия *B. cinerea* БИМ F-71 составил 75,1 %, а *F. oxysporum* БИМ F-609Г – 65,3 %. Анализ минимальной ингибирующей концентрации показал, что концентрация 10^5 КОЕ/мл достаточна для снижения развития обоих патогенов всеми штаммами дрожжевых грибов. Из исследуемых механизмов антагонистического действия присутствовал синтез уреазы, целлюлазы, амилазы и частично протеазы. Все штаммы характеризовались отсутствием выработки ЛОС и липолитических ферментов. Дальнейшее исследование у аборигенных изолятов дрожжевых грибов антагонизма к патогенам винограда будет способствовать выявлению перспективных видов для разработки новых стратегий по предотвращению или сокращению до- и послеуборочных потерь винограда, а также проверке использования отдельных штаммов дрожжей в качестве альтернативы химическим фунгицидам в соответствии с особыми требованиями Международной организации винограда и вина.

Библиографические ссылки

1. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1):139–148. DOI: 10.1073/pnas.1317377110.
2. Yurchenko EG, Savchuk NV, Porotikova EV, Vinogradova SV. First report of grapevine (*Vitis* sp.) cluster blight caused by *Fusarium proliferatum* in Russia. *Plant Disease*. 2020;104(3):991. DOI: 10.1094/PDIS-05-19-0938-PDN.
3. Yang Q, Diao J, Solairaj D, Ngea Guillaume Legrand N, Zhang H. Investigating possible mechanisms of *Pichia caribbica* induced with ascorbic acid against postharvest blue mold of apples. *Biological Control*. 2020;141:104129. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104129.
4. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in *Leotiomycetes* (Ascomycota). *IMA Fungus*. 2014;5:91–120. DOI: 10.5598/ima fungus.2014.05.01.11.
5. Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*. 2011;12(6):564–579. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x.
6. Юрченко ЕГ, Савчук НВ, Буровинская МВ. Фузариозное усыхание генеративных органов винограда: особенности патогенеза и вредоносность. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2020;22(4):344–349.
7. Юрченко ЕГ, Якуба ГВ, Насонов АИ, Савчук НВ, Астапчук ИЛ, Буровинская МВ. Анализ скрининга аборигенных штаммов-антагонистов *Trichoderma* spp. для использования в биотехнологиях контроля новых заболеваний яблони и винограда в Краснодарском крае. *Научные труды СКФНЦСВВ*. 2022;34:158–165. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-158-165.
8. Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Bulletin OEPP*. 2011;41(1):65–71. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x.
9. Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;47:39–49. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003.
10. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 2015;47:85–92. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.013.
11. Cordero-Bueso G, Mangieri N, Maghradze D, Foschino R, Valdetara F, Cantoral JM, et al. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2025. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02025.
12. Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A, Stevens C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. *Biological control: a global perspective*. [S. l.]: CABI Books; 2007. p. 262–273. DOI: 10.1079/9781845932657.0262.
13. Nally M, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. 2012;64(1):40–48. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2011.09.009.
14. Sipiczki M, Pfliegler WP, Holb IJ. *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e67384. DOI: 10.1371/journal.pone.0067384.
15. Fernandez-San Millan A, Gamir J, Larraya L, Farran I, Veramendi J. Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis. *Biological Control*. 2022;174:105033. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105033.
16. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607. DOI: 10.1080/00275514.1975.12019782.
17. Abe CAL, Faria CB, De Castro FF, De Souza SR, dos Santoset FC, dos Santos FC, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15328–15346. DOI: 10.3390/ijms160715328.
18. Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan R, Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013;9(5):238–242. DOI: 10.6026/97320630009238.
19. Seeliger HPR. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *Journal of Bacteriology*. 1956;72(2):127–131. DOI: 10.1128/jb.72.2.127-131.1956.
20. Zhang H, Zheng X, Yu T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 2007;18(4):287–291. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.10.007.

21. Galli V, Romboli Y, Barbato D, Mari E, Venturi M, Guerrini S, et al. Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability*. 2021;13(16):9389. DOI: 10.3390/su13169389.
22. Ruiz-Moyano S, Martin A, Villalobos MC, Calle A, Serradilla MJ, Córdoba MG. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. 2016;57:45–53. DOI: 10.1016/j.fm.2016.01.003.
23. Pinto C, Custodio V, Nunes M, Songy A, Rabenoelina F, Courteaux B, et al. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3047. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03047.
24. Bozoudi D, Tsaltas D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivicultural sector. *Fermentation*. 2018;4(4):185–198. DOI: 10.3390/fermentation4040085.
25. Sipiczki M. Overwintering of vineyard yeasts: survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:212. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00212.

References

1. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(1):139–148. DOI: 10.1073/pnas.1317377110.
2. Yurchenko EG, Savchuk NV, Porotikova EV, Vinogradova SV. First report of grapevine (*Vitis* sp.) cluster blight caused by *Fusarium proliferatum* in Russia. *Plant Disease*. 2020;104(3):991. DOI: 10.1094/PDIS-05-19-0938-PDN.
3. Yang Q, Diao J, Solairaj D, Ngea Guillaume Legrand N, Zhang H. Investigating possible mechanisms of *Pichia caribbica* induced with ascorbic acid against postharvest blue mold of apples. *Biological Control*. 2020;141:104129. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104129.
4. Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY, Marvanová L. Recommendations on generic names competing for use in *Leotiomycetes* (Ascomycota). *IMA Fungus*. 2014;5:91–120. DOI: 10.5598/imafungus.2014.05.01.11.
5. Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*. 2011;12(6):564–579. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x.
6. Yurchenko EG, Savchuk NV, Burovinskaya MV. Fusarium cluster blight of grapes: features of pathogenesis and harmfulness. *Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie*. 2020;22(4):344–349. Russian.
7. Yurchenko EG, Yakuba GV, Nasonov AI, Savchuk NV, Astapchuk IL, Burovinskaya MV. Screening analysis of native antagonist strains *Trichoderma* spp. for use in biotechnologies for the control of new diseases of apple and grapes in the Krasnodar Region. *Scientific Works of North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making*. 2022;34:158–165. Russian. DOI: 10.30679/2587-9847-2022-34-158-165.
8. Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *Bulletin OEPP*. 2011;41(1):65–71. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x.
9. Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;47:39–49. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003.
10. Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*. 2015;47:85–92. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.013.
11. Cordero-Bueso G, Mangieri N, Maghradze D, Foschino R, Valdetara F, Cantoral JM, et al. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:2025. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02025.
12. Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A, Stevens C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. *Biological control: a global perspective*. [S. l.]: CABI Books; 2007. p. 262–273. DOI: 10.1079/9781845932657.0262.
13. Nally M, Pesce VM, Maturano YP, Muñoz CJ, Combina M, Toro ME. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*. 2012;64(1):40–48. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2011.09.009.
14. Sipiczki M, Pfliegler WP, Holb IJ. *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e67384. DOI: 10.1371/journal.pone.0067384.
15. Fernandez-San Millan A, Gamir J, Larraya L, Farran I, Veramendi J. Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis. *Biological Control*. 2022;174:105033. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105033.
16. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607. DOI: 10.1080/00275514.1975.12019782.
17. Abe CAL, Faria CB, De Castro FF, De Souza SR, dos Santos FC, dos Santos FC, et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15328–15346. DOI: 10.3390/ijms160715328.
18. Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan R, Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013;9(5):238–242. DOI: 10.6026/97320630009238.
19. Seeliger HPR. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *Journal of Bacteriology*. 1956;72(2):127–131. DOI: 10.1128/jb.72.2.127-131.1956.
20. Zhang H, Zheng X, Yu T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 2007;18(4):287–291. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.10.007.
21. Galli V, Romboli Y, Barbato D, Mari E, Venturi M, Guerrini S, et al. Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability*. 2021;13(16):9389. DOI: 10.3390/su13169389.

22. Ruiz-Moyano S, Martin A, Villalobos MC, Calle A, Serradilla MJ, Córdoba MG. Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology*. 2016;57:45–53. DOI: 10.1016/j.fm.2016.01.003.
23. Pinto C, Custodio V, Nunes M, Songy A, Rabenoelina F, Courteaux B, et al. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3047. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03047.
24. Bozoudi D, Tsaltas D. The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*. 2018;4(4):185–198. DOI: 10.3390/fermentation4040085.
25. Sipiczki M. Overwintering of vineyard yeasts: survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:212. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00212.

Получена 24.08.2023 / исправлена 29.09.2023 / принята 30.09.2023.
Received 24.08.2023 / revised 29.09.2023 / accepted 30.09.2023.