

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Статьи данного раздела подготовлены по материалам Итоговой научной сессии Прикаспийского института биологических ресурсов ДНЦ РАН (2010–2013 гг.), состоявшейся 25–26 апреля 2013 года

УДК 663.252.41; 663.2

НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ ВИНОГРАДА И ПЛОДОВ ДАГЕСТАНА

Е. С. Магомедова, Д. А. Абдуллабекова

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Изучено дрожжевое население, обитающее на различных типах субстратов виноградника, плодах абрикоса и яблок, произрастающих в различных природных условиях Дагестана. Выявлено, что состав дрожжей сочных плодов гетерогенен и представлен в основном аскомицетами, в том числе *Sacharomyces cerevisiae*, среди которых проведен скрининг эффективных для биотехнологии штаммов. Показано изменение численности дрожжей на виноградном растении и почве в период лето – осень, молекулярно-биологическими методами идентифицировано 20 видов дрожжей.

The yeast population inhabiting different substrates of grapes, apricots, and apples growing under various environmental conditions in Daghestan is studied. Yeast composition of fleshy fruits is detected to be heterogeneous and in general is presented by *Ascomycetes*, inter alia, *Sacharomyces cerevisiae*, among which the screening of strains effective for the biotechnology has been carried out. Change in the yeast number on vines and soil in the summer-autumn period is shown. 20 species of yeast have been identified by the molecular-biological methods.

Ключевые слова: дрожжи; сочные плоды; виды; численность; виноградник; *S. cerevisiae*; биотехнология.

Keywords: yeast; fleshy fruits; species; number; vineyard; *S. cerevisiae*; biotechnology.

Дрожжи, являющиеся ценным естественным биоресурсом, который широко распространен в природе благодаря способности к адаптации, остаются одним из популярных объектов исследования в различных научных направлениях. В центре внимания остается выявление их биоразнообразия, закономерностей распространения, выделения и изучения потенциала, селекция высокоэффективных штаммов для микробного синтеза. Наиболее типичной естественной средой обитания и источником выделения различных видов дрожжей служат наземные части растений, которые почти всегда заселены дрожжами.

Цель исследований – получить сведения, способствующие выявлению особенностей организации дрожжей в природе; поиск и изучение свойств выделенных из природы сахаромицетов, отбор перспективных для биотехнологии штаммов.

Объект и методы исследований. Объект исследований – дрожжевые грибы, обитающие на ягодах винограда, а также плодах яблони и абрикоса, выбор которых обусловлен их способностью произрастать в разнообразных природных условиях низменного и предгорного Дагестана. В каждой из 10 местностей плоды отбирались 2–3 года в период зрелости, когда дрожжевое население характеризуется обилием. Для изоляции дрожжей с различных органов растений и почв использовали метод накопительных культур и способ смыва с поверхности субстратов. Таксономическую принадлежность дрожжей определяли по фенотипическим признакам до рода, а *Sacharomyces* до вида по определителям и пособиям [1] и по филогенетическим признакам 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 [2]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование амплифицированного 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 выполнен с помощью программ MAFFT 6 и MEGA4.

Результаты и их обсуждение. Исследование дрожжевого населения сочных плодов, одной из задач которого был поиск дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, имеющих важное практическое значение и являющихся хорошим модельным объектом при изучении фундаментальных биологических процессов, в том числе клеточной биологии, проводили методом накопительных культур, позволяющего выделить их с большей вероятностью. Полученные результаты показали, что дрожжевые грибы плодов на всех обследованных территориях можно отнести к 8 группировкам, в основном аскомицетового аффинитета. Отмечено, что специфическими для всех биотопов являются представители *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Pichia*, реже встречаются таксоны *Torulopsis* и *Debaryomyces*. К более избирательным отнесены дрожжи *Candida* и *Rhodotorula*, изредка обнаруживаемые на винограде, и так называемые «черные дрожжи», выделенные с яблок и абрикосов (рис. 1).

Анализ представленности и характера распределения дрожжей, формирующих сообщества на винограде и плодах в каждой местности, позволил выявить, что дрожжевое население ге-

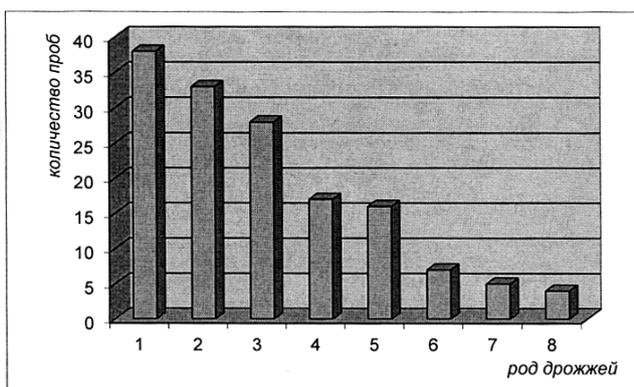


Рис. 1. Встречаемость дрожжей на винограде и плодах в исследованных местностях: 1 – *Hanseniaspora*; 2 – *Saccharomyces*; 3 – *Pichia*; 4 – *Debaryomyces*; 5 – *Torulopsis*; 6 – черные дрожжи; 7 – *Candida*; 8 – *Rhodotorula*

терогенно, может иметь стабильную структуру, зависит от вида растения и условий года. Выявлено также, что предгорные и равнинные таксоцены различаются по суммарному числу родов, при этом отмечена тенденция к снижению разнообразия в условиях предгорий [3].

Важными характеристиками при синэкологических исследованиях дрожжевых грибов является их численность и видовое разнообразие в онтогенезе растения, изучение которых проводили в динамике на одном из виноградников, расположенном в равнинной части Дагестана, в сезон лето – осень. Мониторинг проводили на основе вертикально-ярусного подхода, включающего одновременный анализ образцов из различных биогеоценотических ярусов – живое растение, опад, почва, позволяющего с большой достоверностью проводить изучение дрожжевых

грибов в синэкологическом и биогеографическом аспектах [4]. Видовую дифференциацию дрожжей, выделенных в культуру, осуществляли методом анализа нуклеотидных последовательностей рДНК. Полученные результаты показали, что численность дрожжевых грибов, выделенных с виноградника, заметно изменяется в течение летних и осенних месяцев (рис. 2).

Так, максимальные значения численности на листьях и ягодах винограда приходятся на конец вегетационного периода, минимальные – на начало, при этом характер динамики численности дрожжевых грибов для этих типов субстратов достаточно схож. Наибольшее количество дрожжевых грибов среди всех проанализированных субстратов выявлено в опаде, наименьшее – в почве. Основной вклад в значение численности дрожжей на винограднике вносят

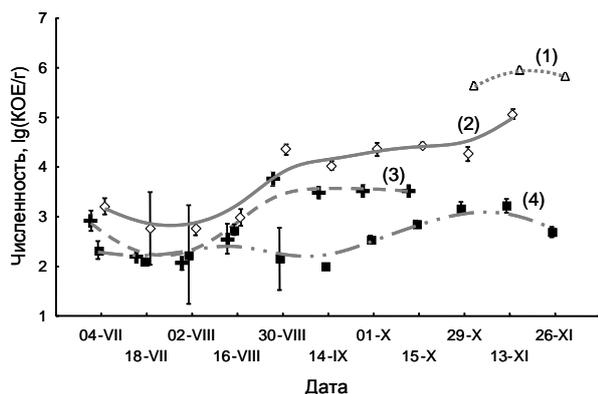


Рис. 2. Динамика численности дрожжевых грибов: (1) – опад; (2) – листья; (3) – ягоды; (4) – почва

дрожжи, изолированные с различных типов субстратов виноградника в период лето – осень, относятся к 20 видам, большую часть которых составляют аскомицеты – 85%. Максимальное количество видов среди всех субстратов было обнаружено на ягодах – 15 видов.

Исследование морфологических и физиолого-биохимических свойств дрожжей в связи с биотопической и субстратной приуроченностью проводили на дрожжах вида *S. cerevisiae*, выделенных через накопительную культуру с виноградных ягод и плодов абрикоса, культиви-

Молекулярно-биологический метод идентификации дрожжей позволил выявить, что

тогда накопительных культур.

руемых в различных биотопах. Сравнительный анализ их морфометрической организации не выявил признаков, связанных с условиями обитания и видом растения. Клетки и гигантские колонии дрожжей, выделенных с винограда и абрикосов различных местностей, были однородны по своим свойствам, соответствовали стандартным описаниям вида, а некоторые морфологические отличия не выходили за пределы внутривидовой изменчивости. Изучение физиолого-биохимических свойств предварительно отобранных штаммов *S. cerevisiae* проводили по показателям, имеющим важное технологическое значение в бродильных производствах – энергия брожения, способность к забраживанию высокосахаристых сред, образованию этанола, высших спиртов, альдегидов, эфиров, диоксида серы. Результаты показали варьирование значений этих показателей среди штаммов, независимо от приуроченности их к среде обитания, включая вид растения и схожесть отдельных штаммов по этим признакам с производственно-ценными для виноделия. Этот факт свидетельствует о целесообразности поиска среди природных сахаромицетов эффективных для биотехнологии [3].

В современных производствах нормой становится использование штаммов, видовая принадлежность которых определена молекулярно-биологическим методом. Анализ нуклеотидных последовательностей позволил уточнить таксономический статус опытного штамма *S. cerevisiae* с виноградных ягод, идентифицированного ранее по фенотипическим признакам и зарекомендовавшего себя в качестве перспективного агента в бродильном производстве (рис. 3) [7].

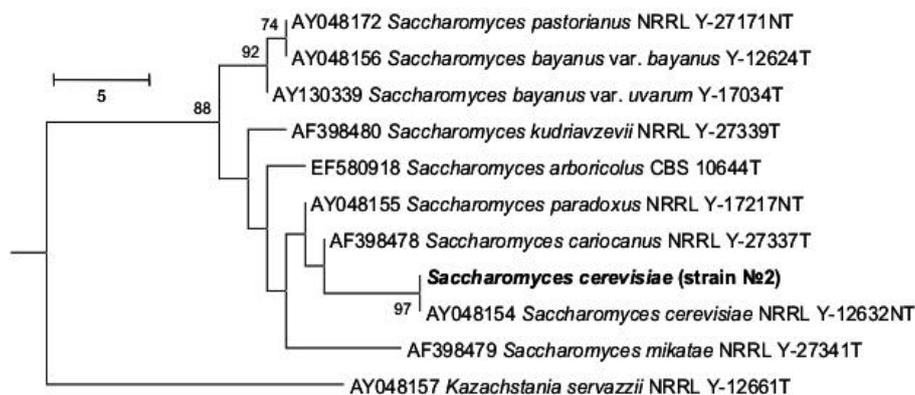


Рис. 3. Филогенетическое положение штамма *S. cerevisiae* (№ 2), полученное методом максимальной экономии (Maximum Parsimony analysis) на основании выровненных нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S рДНК. Номера, данные над разветвлениями, соответствуют частоте (>55%) соединения таксонов при 1000 построений. Шкала показывает число замен на длину используемых для анализа нуклеотидных последовательностей (567 п.н.). U72163 *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229T – скрытая внешняя группа

Проведенное исследование подтвердило, что сочные плоды заселены в основном дрожжами аскомицетами, и выявило повсеместную встречаемость сахаромицетов. Результаты изучения потенциала отдельных штаммов показали, что в естественных местообитаниях возможен поиск перспективных для биотехнологии дрожжей. Полученные впервые данные об изменчивости динамики численности и видового разнообразия дрожжевых грибов виноградарства способствуют выявлению их биоразнообразия и закономерностей организации в природе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-01222 и гранта Отделения биологических наук РАН, программа «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurtzman C.P., Fell J.W. (Eds.) The Yeasts, a taxonomic study. Fourth Revised and enlarged edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 98. 1055 p.
2. Качалкин А.В. Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов в Московской области // Микробиология. 2010. Т. 79, № 6. С. 843–847.
3. Магомедова Е.С., Абдуллабекова Д.А. Особенности организации дрожжевых сообществ в равнинных и предгорных ландшафтах Дагестана // Вестн. Дагест. науч. центра. 2010. № 37. С. 29–33.
4. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 221 с.
5. Prakitchaiwattana C.J., Fleet G.H., Heard G.M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes // FEMS Yeast Res. 2004. Vol. 4(8). P. 865–877.
6. Guerzoni E., Marchetti R. Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers // Applied and Environmental Microbiology. 1987. Vol. 53. P. 571–576.
7. Дрожжевые грибы на ягодах винограда Дагестана / Е.С. Магомедова, Д.А. Абдуллабекова, А.В. Качалкин, Г.Г. Магомедов // Виноделие и виноградарство. 2012. № 6. С. 44–47.

Поступила в редакцию 14.01.2014 г.

