

# К изучению видовой и функциональной структуры микробиома винограда в ампелоценозах Республики Узбекистан

Турабекова Д.Б.<sup>1</sup>, Алейникова Н.В.<sup>2✉</sup>, Спотарь Г.Ю.<sup>2</sup>, Галкина Е.С.<sup>2</sup>, Болотьянская Е.А.<sup>2</sup>, Хужамшукуров Н.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ташкентский химико-технологический институт, Узбекистан, 100011, г. Ташкент, Шайхонтохурский р-н, пр-т Навои, 32;

<sup>2</sup>Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Россия, 298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт генетических ресурсов растений Минсельхоз РУз, Узбекистан, 111200, Ташкентская область, Кибрайский р-н, Ботанический массив, 3

✉aleynikova@magarach-institut.ru

**Аннотация.** В статье представлены результаты биоценологических исследований микробиома винограда. Полевые исследования проводились на промышленных виноградниках «Алижон Кувончбек Боги» в Сырдарьинской области Республики Узбекистан, выделение микроорганизмов – на кафедре «Биотехнология» Ташкентского химико-технологического института. В ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» проводились молекулярно-генетические исследования по прочтению последовательностей, а также идентификации бактерий и грибов методом ПЦР-анализа в лаборатории молекулярно-генетических исследований; лабораторные исследования антагонистической активности микроорганизмов, ассоциированных с виноградом в отношении патогенных микромицетов в лаборатории защиты растений. На основе секвенирования последовательности гена 16S рибосомной РНК бактерий при сравнении полученных последовательностей с базой данных NCBI выделенные 2 штамма бактерий были идентифицированы как *Nocardia dasonvillei* (99,78 % совпадение) либо генетически близкий ему вид, и *Streptomyces* spp.: *S. parvus*, *S. rubiginosohelvolus*, *S. albovinaceus* (100 % совпадение). По результатам секвенирования последовательности гена, кодирующего 18S рибосомной РНК, выделенные 3 штамма грибов идентифицированы как *Trichoderma virens* (97,17 %), *Fusarium fujikuroi* (100 %) и *Aspergillus* spp. (наиболее генетически близкие виды *A. puulaauensis*, *A. heteromorphus*, *A. lentulus* и *A. novofumigatus*). Результаты изучения антагонистической активности выделенных бактерий и грибов в условиях *in vitro* показали перспективность их использования в качестве агентов биологического контроля развития болезней виноградных растений.

**Ключевые слова:** виноград; сорт; агенты биологического контроля; эндофиты; ризосфера; бактерии; грибы; идентификация; секвенирование 16S рРНК и 18S рРНК.

**Для цитирования:** Турабекова Д.Б., Алейникова Н.В., Спотарь Г.Ю., Галкина Е.С., Болотьянская Е.А., Хужамшукуров Н.А. К изучению видовой и функциональной структуры микробиома винограда в ампелоценозах Республики Узбекистан // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(1):43-50. DOI 10.34919/IM.2023.25.1.006.

ORIGINAL RESEARCH

# To the study of species and functional composition of grape microbiome in ampelocenoses of the Republic of Uzbekistan

Turabekova D.B.<sup>1</sup>, Aleinikova N.V.<sup>2✉</sup>, Spotar G.Yu.<sup>2</sup>, Galkina Ye.S.<sup>2</sup>, Bolotianskaia E.A.<sup>2</sup>, Khujamshukurov N.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tashkent Institute of Chemical Technology, 32 Navoiy str., Shaykhontohur district, 100011 Tashkent, Uzbekistan;

<sup>2</sup>All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russia;

<sup>3</sup>Scientific Research Institute of Plant Genetic Resources, Ministry of Agriculture of the Republic of Uzbekistan, 3 Botanychesky Massiv str., Qibray district, 111200 Tashkent region, Uzbekistan

✉aleynikova@magarach-institut.ru

**Abstract.** The article presents the results of biocenotic studies of grape microbiome. Field studies were carried out in the industrial vineyards "Alijon Kuvonchbek Bogi" in the Syrdarya region of the Republic of Uzbekistan, the isolation of microorganisms - in the Department of Biotechnology of the Tashkent Institute of Chemical Technology. Molecular genetic studies were carried out in the FSBSI Institute Magarach of the RAS to read the sequences, as well as to identify bacteria and fungi using PCR analysis in the Laboratory of Molecular Genetic Research; laboratory studies of microorganism antagonistic activity associated with grapes against pathogenic micromycetes - in the Laboratory of Plant Protection. Based on the sequencing of 16S ribosomal RNA gene of bacteria, when comparing the obtained sequences with the NCBI database, the isolated 2 bacterial strains were identified as *Nocardia dasonvillei* (99.78 % match) or a genetically close species, and *Streptomyces* spp.: *S. parvus*, *S. rubiginosohelvolus*, *S. albovinaceus* (100 % match). According to the sequencing results of gene sequence encoding 18S ribosomal RNA, 3 strains of fungi were identified as *Trichoderma virens* (97.17 %), *Fusarium fujikuroi* (100 %) and *Aspergillus* spp. (the most genetically related species are *A. puulaauensis*, *A. heteromorphus*, *A. lentulus*, and *A. novofumigatus*). The research results of antagonistic activity of the isolated bacteria and fungi *in vitro* showed the promising outlook of their use as biological control agents against the development of grape plant diseases.

**Key words:** grapes; variety; biological control agents; endophytes; rhizosphere; bacteria; fungi; identification; 16S rRNA and 18S rRNA sequencing.

**For citation:** Turabekova D.B., Aleinikova N.V., Spotar G.Yu., Galkina Ye.S., Bolotianskaia E.A., Khujamshukurov N.A. To the study of species and functional composition of grape microbiome in ampelocenoses of the Republic of Uzbekistan Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(1):43-50. DOI 10.34919/IM.2023.25.1.006 (in Russian).

## Введение

Виноградная лоза (*Vitis vinifera* L.) является одной из самых важных плодовых культур в мире. На культивируемые сорта винограда в значительной степени влияет большое количество патогенных микроорганизмов, которые вызывают заболевания в период вегетации, влияя на количество и качество урожая, его переработку и экспорт. Среди потенциальных угроз – бактерии, грибы, оомицеты или вирусы с различными жизненными циклами, механизмами заражения и стратегиями выживания [1].

Виноград – одно из древнейших культурных растений, выращиваемых в Узбекистане, а виноградарство – ведущая отрасль сельскохозяйственного производства Республики [2]. В Узбекистане распространены следующие заболевания винограда: милдью, оидиум, антракноз, церкоспороз, серая гниль, фомоз, кладоспориоз, бактериальный рак и др. [3].

В настоящее время существуют различные методы контроля болезней винограда, в том числе применение эндофитных и ризосферных микроорганизмов в качестве агентов биологического контроля их развития. Например, эндофитный *Streptomyces* sp. VV/E1 и ризосферный *Streptomyces* sp., выделенные из растений винограда, снижали уровень заражения патогенами грибной этиологии, вызывающими увядание молодых виноградных лоз. Для инокуляции этими штаммами использовали два метода: перфорация подвоя с последующей инъекцией микроорганизмов или замачивание корневой системы в бактериальной взвеси [4].

Согласно данным литературы, колонизация эндофитными микроорганизмами позволяет быстро и интенсивно реагировать виноградным растениям на стрессы [5–7] и может снижать скорость повреждения и рост мучнистого червеца *Planococcus ficus*, который является одним из переносчиков вирусов скручивания листьев и морщинистости древесины в листьях виноградной лозы в вегетационных опытах и повреждение виноградной цикадкой *Empoasca vitis* в полевых условиях [8]. За последние несколько лет в различных работах сообщалось об идентификации эндофитного штамма C2J6 *Aspergillus niger*, продуцирующего ценные с фармацевтической точки зрения соединения, такие как ресвератрол [9].

Актиномицеты играют активную роль в защите от микробных заболеваний и в выработке антимикробного метаболизма, а также продемонстрировали наибольший потенциал в качестве источников противомикробных агентов. За последние несколько десятилетий накопилась обширная литература по производству биоактивных соединений из актиномицетов, в частности из рода *Streptomyces*. Египетские ученые выделили 7 изолятов *Streptomyces* из почвы в ризосфере виноградной лозы и изучили антагонистическую активность против *F. oxysporum*. Из 7 изолятов 1 проявлял наибольшую противогрибную активность – по молекулярно-генетическим исследованиям идентифицирован как *Streptomyces alni*. Свойства антагонизма выявляли при исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) *F. oxysporum* и *S. alni* на среде PDA. Некоторые исследователи (Wafaa M. и др.) проводили полевой эксперимент в 2011–2012 гг. на винограднике,

опрыскивая его дрожжами, либо *Streptomyces aureofaciens*, что оказалось очень эффективным для снижения развития *A. Niger* [10].

Ученые из Саудовской Аравии выделили из ризосферы винограда и других растений штаммы *Streptomyces* и изучали их антагонистическую активность по отношению к некоторым грибам. Штаммы *Streptomyces* с наиболее сильными антагонистическими признаками были идентифицированы с помощью секвенирования ампликонов гена 16S рибосомной РНК (рДНК), полученных с помощью ПЦР ДНК, и внесены в последовательности в GenBank. Изоляты *Streptomyces* обладали антагонизмом к 5 идентифицированным грибам (*Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* (1), *Aspergillus nidulans* (2), *Cladosporium herbarum*) и к 5 из 11 грамположительных бактерий; 3 отобранных изолята *Streptomyces* (14, 15, 17) были идентифицированы как штаммы *Streptomyces noboritoensis*, *Streptomyces salbolongus* и *Streptomyces griseorubiginosus* [11]. Другие ученые выделили изоляты, классифицированные как *Streptomyces* sp. (82), *Nocardia* sp. (11), *Microbispora* sp. (3) и *Micromonospora* sp. (2) [12].

Исследованиями установлено, что постинфекционное применение микроконидиальных суспензий *Fusarium proliferatum* G6 снижало образование спорангиев *Plasmopara viticola* на дисках листьев винограда на 97 % и предотвращало респоруляцию. Микроскопическое исследование взаимодействия гиф *in vitro* показало, что гифы *F. proliferatum* G6 свернуты вокруг и внутри спорангиеносцев *P. viticola*. *F. proliferatum* G6 снижал развитие болезни на листьях и гроздьях межвидовых гибридных сортов Chancellor и Lakemont. Инфекционная нагрузка *P. viticola* на гроздьях винограда сорта Chancellor снижалась на 77 % в 1992 г., 80 % в 1993 г. и 53 % в 1994 г.; на листьях – на 71 % в 1992 г. На сорте Lakemont интенсивность развития болезни также снижалась на гроздьях на 99 % в 1993 г., 94 % в 1994 г. и 81 % в 1995 г., на листьях – на 79 % в 1992 г., 67 % в 1994 г. и 60 % в 1995 г. [13].

Таким образом, *цель исследований* заключалась в решении такой актуальной проблемы, как поиск потенциальных агентов биологического контроля развития болезней винограда, который заключается в выделении, идентификации молекулярно-генетическими методами микроорганизмов, ассоциированных с виноградом, изучении их антагонистической активности в отношении грибов – возбудителей болезней виноградных растений.

## Материалы и методы исследования

Полевые исследования проводились на промышленных виноградниках «Алижон Кувончбек Боги» в Сырдарьинской области Республики Узбекистан, выделение микроорганизмов – на кафедре «Биотехнология» Ташкентского химико-технологического института.

В ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» проводились молекулярно-генетические исследования по прочтению последовательностей, а также идентификации бактерий и грибов методом ПЦР-анализа в лаборатории молекулярно-генетических исследований; лабораторные исследования антагонистической активности микроорганизмов, ассоциированных с виноградом в отношении патогенных микромицетов в лаборатории

защиты растений.

Образцы почвы и однолетних побегов винограда были собраны в весенний период (10–20 апреля 2021 г.) на промышленных виноградниках сортов Ризамат, Хусайне и Тайфи предприятия «Алижон Кувончбек Боги» в Сырдарьинской области Республики Узбекистан.

При выделении ризосферных микроорганизмов 6 га виноградника были разделены на 4 участка. На каждом участке отобрано по 1,5 г почвы, непосредственно контактирующей с корнями. Почву из каждого образца помещали в пластиковые пакеты под 2 слоя стерильной марли для просушки на столе в течение ночи. Образцы переносили в центрифужные пробирки объемом 50 мл, содержащие 10 мл буферного фосфатного раствора (0,5 М  $K_2HPO_4$ , 0,4 М  $KH_2P O_4$ , pH 7,0). Пробирки встряхивали в течение 1 ч на возвратно-поступательном шейкере VS 8 BE, Lauda, (4 °C, 250 об/мин.). Полученные суспензии почвы высевали на картофельно-глюкозный агар, инкубировали при 28 °C в течение 7 дней. Плотность общих культивируемых бактерий и грибов оценивали для каждого образца. Колонии, демонстрирующие характерную морфологию, отбирали случайным образом и культивировали для дальнейшего исследования. Очищенные суспензии спор каждого изолята хранили в 20 %-ном глицерине в морозильной камере ULT U100 при –80 °C [14].

Выделение эндофитных микроорганизмов из виноградной лозы проводилось по методу влажных камер Поликсеновой В.Д. и др. [15], который является наиболее простым для получения мицелия или органов спороношения. Перед закладкой образца (фрагменты лозы винограда 1 см) во влажную камеру, его промывали в проточной и дистиллированной воде. Поверхностную дезинфекцию растительного материала проводили, выдерживая его по 4 мин. последовательно в растворах 3 %-ной перекиси водорода, 2 %-ного марганцевокислого калия, 70 %-ного этилового спирта и многократно промывали стерильной водой. В чашки Петри помещали фильтровальную бумагу и стерилизовали в автоклаве НМС HV-501 1 ч при температуре 120 °C, затем увлажняли стерильной дистиллированной водой. После поверхностной дезинфекции отрезки побегов винограда раскладывали в чашках Петри так, чтобы они не соприкасались друг с другом. Чашки Петри выдерживали в термостате Memmert IPP 500 при 30 °C в течение 10 дней, после чего выделяли культуры микроорганизмов из образовавшихся колоний.

Точная идентификация некоторых бактерий и грибов классическими фенотипическими методами вызывает затруднение. В настоящее время сравнение последовательности гена 16S рРНК бактерий и 18S рРНК грибов для их идентификации стало предпочтительным молекулярно-генетическим методом [16]. В этом исследовании использовалось секвенирование последовательности гена 16S рДНК выделенных штаммов бактерий и 18S рДНК грибов для идентификации их рода и вида. Выделение ДНК штаммов бактерий и грибов из колоний выполняли с помощью набора реагентов для выделения НК «Фитосорб» (на магнитных частицах) ООО «Синтол». Количество и чистоту выделенной

ДНК определяли на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf, США).

ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США). Для амплификации части гена 16S рРНК использовались универсальные праймеры BSF8/27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и BSR1541/20 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') [17]. Для амплификации последовательности гена 18S рРНК использовались праймеры ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC -3') [18]. Амплификация была проведена в общем реакционном объеме 20–25 мкл с использованием 2,5-кратной реакционной смеси (ООО «Синтол») при добавлении 1,5–2,5 мкл выделенной ДНК.

Анализ ампликонов проводили с помощью электрофореза в 1,4 %-ном агарозном геле. Целевой ПЦР-продукт был вырезан из агарозного геля и очищен на колонках набора реагентов «ColGen» (ООО «Синтол», Россия) согласно инструкции по применению.

Для постановки сиквенсовой (терминирующей) реакции использовали набор Brilliant Dye V. 3.1 Cycle sequencing kit (NimaGen, Голландия) согласно протоколу производителя. Использовали пары праймеров для секвенирования с двух направлений. Сиквенсовую реакцию осуществляли на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США).

Очистку продуктов сиквенсовой реакции производили методом этанол/ацетат Na преципитации согласно протоколу. После чего высушенную пробу растворяли в 10 мкл формамида HiDi и денатурировали 5 мин. при 94 °C. Секвенирование осуществляли на 4-х капиллярном генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в полимере ПДМА-6 (ООО «Синтол», Россия). Результаты секвенирования обрабатывались в программном обеспечении Sequencing Analysis Software v.5.3.1 и Unipro Ugene v.34. Полученные последовательности сравнивали с базой данных генного банка NCBI с использованием программы поиска выравниваний BLAST [19].

Определение антагонистической активности эндофитных и ризосферных микроорганизмов винограда в отношении патогенных микромицетов (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Macrophoma flaccida*, *Alternaria alternata*) проводили методом встречных культур на картофельно-глюкозном агаре (КГА). На поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевали исследуемые микроорганизмы, продуцирующие различные антибиотические вещества и фитопатогенные микромицеты. Посев проводили по диаметру чашки, которую затем помещали в термостат. После инкубации в термостате при температуре 26 °C на 5-е и 10-е сутки оценивали антагонистическую активность, определяя размер колонии патогена [20].

### Результаты и их обсуждение

*Выделение и идентификация эндофитных и ризосферных микроорганизмов.* В общей сложности было выделено 105 изолятов эндофитных и ризосферных микроорганизмов, связанных с виноградной лозой. Из этих 105 образцов получено 13 образцов однолетних побегов и 33 образца почвы на участке сорта Хусайне, 18 образцов однолетних побегов и 13 образцов почвы

на участке сорта Тайфи и 15 образцов из однолетних лоз, 13 образцов почвы на участке сорта Ризамат.

Из этих 105 изолятов выбрали 5 наиболее часто встречаемых для их идентификации в ФГБУН «ВНИИ-ИВиВ «Магарач» РАН» (табл. 1).

Два образца (№ 1, № 2) – это выделенные штаммы бактерий, и три образца – изоляты грибов (№ 12, № 35, № 48). Идентификация бактерий с помощью секвенирования последовательности гена 16S рибосомной РНК (рРНК) и грибов с помощью секвенирования гена 18S рРНК считается более точной, чем традиционные фенотипические методы и позволяет определить не только род, но иногда и видовую принадлежность.

Полученные ПЦР-продукты для секвенирования образцов № 1 и № 2 при разных условиях проведения ПЦР были визуализированы в агарозном геле (рис. 1). Оптимальные температура отжига, объем реакционной смеси и условия амплификации позволяют избежать образование неспецифических ПЦР-продуктов. На рис. 1 показаны полученные целевые ампликоны длиной 1500 п.н.

При секвенировании участка гена 16S рибосомной РНК выделенного штамма бактерии образца № 1 после обработки результатов получена последовательность длиной 1346 п.н. (рис. 2). С помощью программы поиска выравниваний BLAST базы NCBI – исследуемый образец идентифицирован как *Nocardiopsis dassonvillei*. Совпадение последовательности составило 99,78 %. Схожесть последовательностей этого локуса у видов *Nocardiopsis* довольно высокая: с *N. deserti* идентичность последовательностей 99,70 %, с *N. alborubida* – 99,63 %. Последовательности *Nocardiopsis dassonvillei* и образца № 1 из сравниваемых 1346 п.н. не совпадают только в 3 п.н.: № 48 (замена Т на С), № 360 (замена Т на С), № 374 (замена А на G) при начале нумерации с первого полученного нуклеотида (рис. 3).

При секвенировании гена 16S рРНК образца № 2 после обработки результатов получена последовательность длиной 1366 п.н. Образец № 2 идентифицирован как *Streptomyces spp.* с полной идентичностью (100 %) последовательностей этого локуса для трех видов: *S. parvus*, *S. rubiginosohelvolus*, *S. albovinaceus*.

На рис. 4 представлено сравнение двух полученных последовательностей образца № 2 (*Streptomyces spp.*) с ранее изученной последовательностью *S. violaceoruber strain ND1 Uz-85 (MZ147793.1)*. Видны однонуклеотидная замена (Т/А) и делеция Т в последовательности образца № 2.

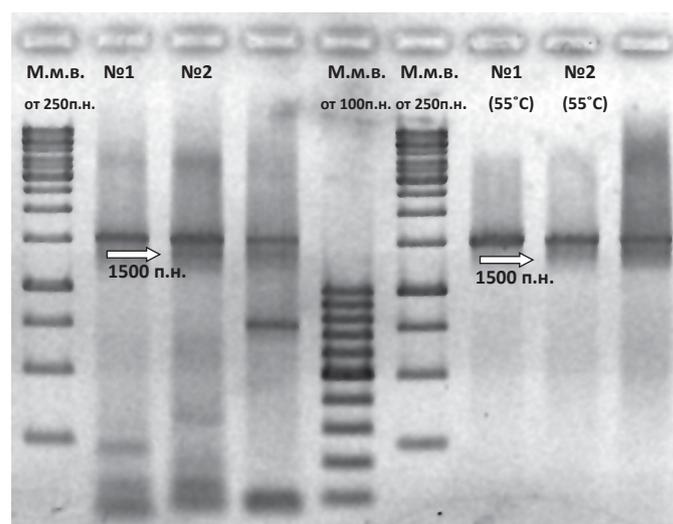
Род *Nocardiopsis* включает аэробные спорообразующие актиномицеты, которые образуют разветвленный вегетативный мицелий и воздушные гифы. *Nocardiopsis dassonvillei*, выделенный из пораженной милдью грозди и первоначально классифицированный под названием *Streptothrix dassonvillei*, впоследствии был переведен в роды *Nocardia* и *Actinomadura*. Генетические исследования подтвердили новый род *Nocardiopsis* [21].

При секвенировании участка гена 18S рибосомной РНК выделенного штамма гриба образца № 12 получена консенсусная последовательность длиной 566 п.н. С помощью программы поиска выравниваний BLAST базы NCBI образец идентифицирован как *Trichoderma virens*. Совпадение последовательности составило 97,17 %

**Таблица 1.** Изоляты эндофитных и ризосферных микроорганизмов для идентификации

**Table 1.** Isolates of endophytic and rhizospheric microorganisms for identification

Изолят	Из лозы	Из почвы	Сорт винограда
№ 1	+		Ризамат
№ 2	+		Хусайне
№ 12		+	Тайфи
№ 35		+	Хусайне
№ 48		+	Ризамат



**Рис. 1.** Разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле: слева – с неоптимизированными условиями проведения ПЦР с получением неспецифических продуктов ПЦР; справа – с оптимизированными условиями

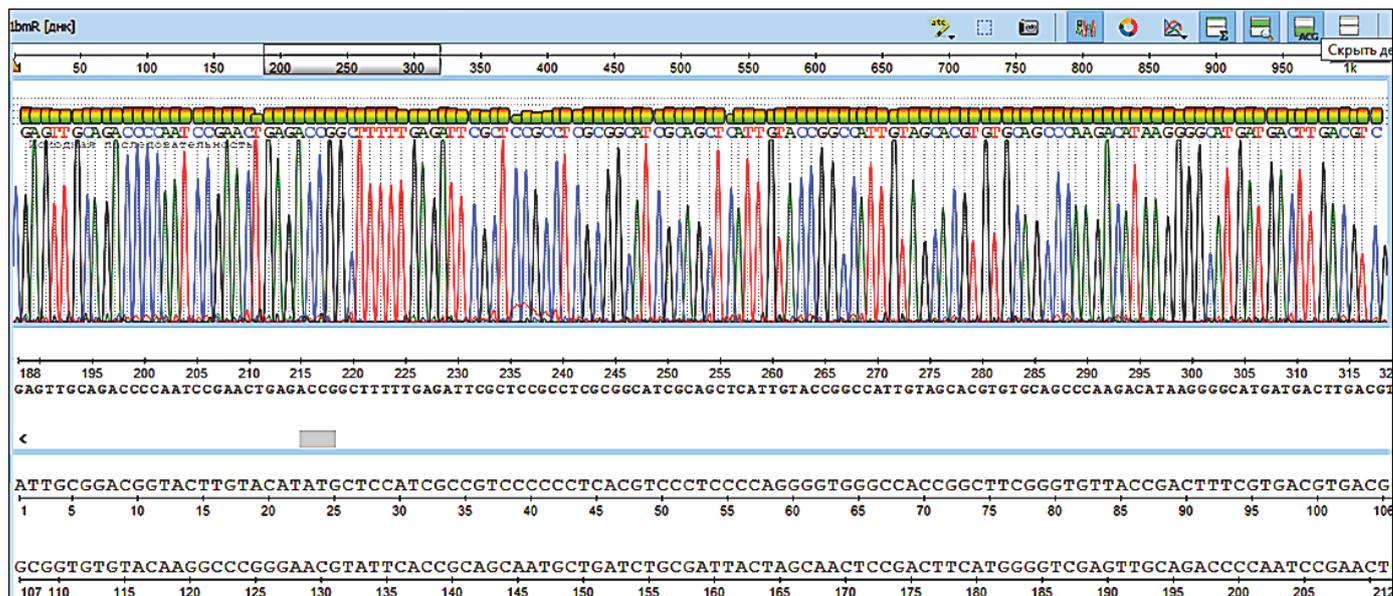
**Fig. 1.** Separation of PCR products in agarose gel: from the left - with non-optimized PCR conditions to obtain non-specific PCR products; from the right - with optimized conditions

(рис. 5). У локусов наиболее генетически близких видов *Trichoderma reesei* и *Trichoderma atroviride* значительно меньшая схожесть с полученной последовательностью – 91,11 % и 89,01 % соответственно.

Образец № 35 идентифицирован как *Fusarium fujikuroi*. Полученная последовательность 456 п.н. полностью (100 %) совпадает с локусом данного вида. У наиболее близких видов схожесть составляет: *Fusarium redolens* – 98,68 % (несовпадение в 5 п.н.), *Fusarium musae* и *Fusarium verticillioides* – 92,11 %.

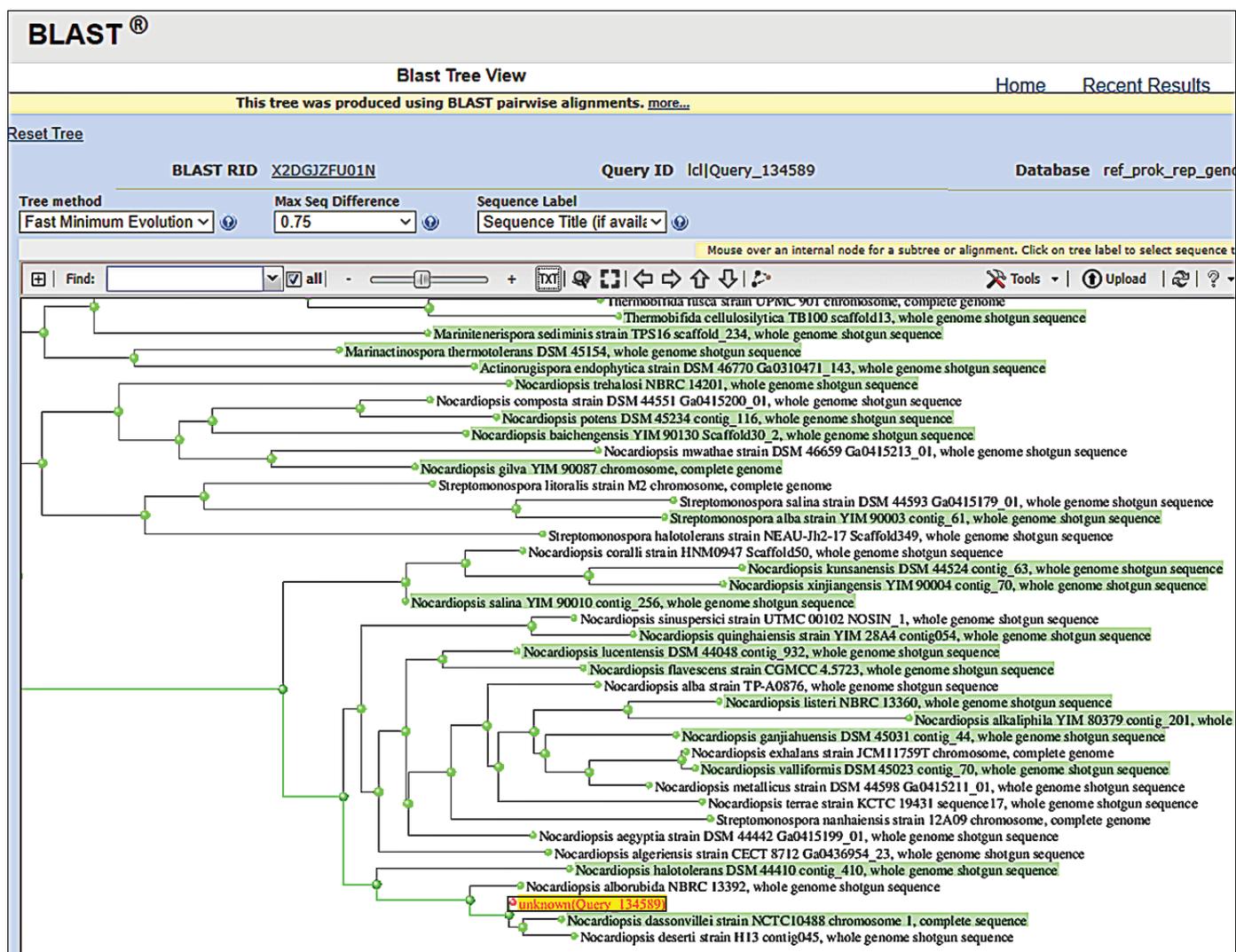
Для образца № 48 установлено, что он относится к роду *Aspergillus*. Полученная консенсусная последовательность составила 323 п.н. Наибольшая схожесть последовательностей выявлена для видов *Aspergillus puulaauensis* (99,33 % при области перекрытия запроса 92 %), *Aspergillus heteromorphus* (96,03 % при области 93 %), *Aspergillus lentulus* и *Aspergillus novofumigatus* (92,97 % при области 100 %).

Таким образом, по результатам секвенирования части гена 16S рРНК выделенные штаммы бактерий были идентифицированы как *Nocardiopsis dassonvillei* (99,87 % совпадение с последовательностью базы данных NCBI) и *Streptomyces spp.*: *S. parvus*, *S. rubiginosohelvolus*, *S. albovinaceus* (100 % совпадение).



**Рис. 2.** Пример хроматограммы, полученной в результате секвенирования образца №1 (reverse), отображение в программе Unipro Ugene v.34

**Fig. 2.** An example of chromatogram obtained as a sequencing result of sample No. 1 (reverse), displayed in the Unipro Ugene v.34 program



**Рис. 3.** Итоги работы Blast Tree View по построению дерева генетических расстояний с использованием попарного выравнивания BLAST (выделен запрос по исследуемому образцу)

**Fig. 3.** The results of Blast Tree View work on building a tree of genetic distances using pairwise BLAST alignment (highlights the query for the sample under study)

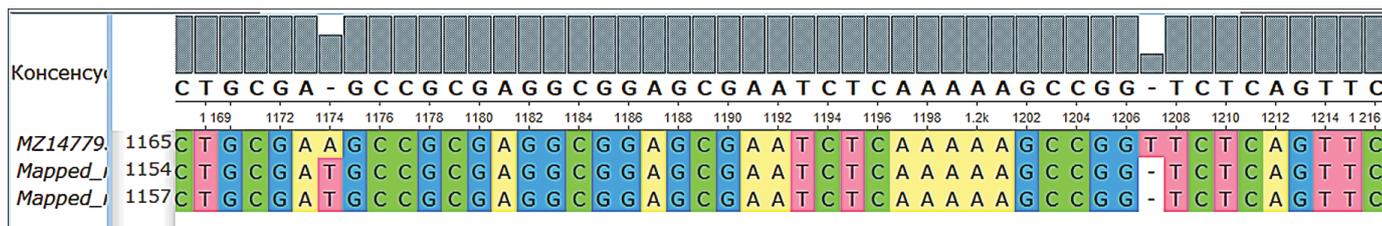


Рис. 4. Выравнивание двух полученных последовательностей образца № 2 (*Streptomyces spp.*) на ранее изученную последовательность *S. violaceoruber* штамм NDL Uz-85 (MZ147793.1) в программном обеспечении Unipro Ugene v.34

Fig. 4. Alignment of two obtained sequences of sample No. 2 (*Streptomyces spp.*) to the previously studied sequence of *S. violaceoruber* strain NDL Uz-85 (MZ147793.1) in Unipro Ugene v.34 software program

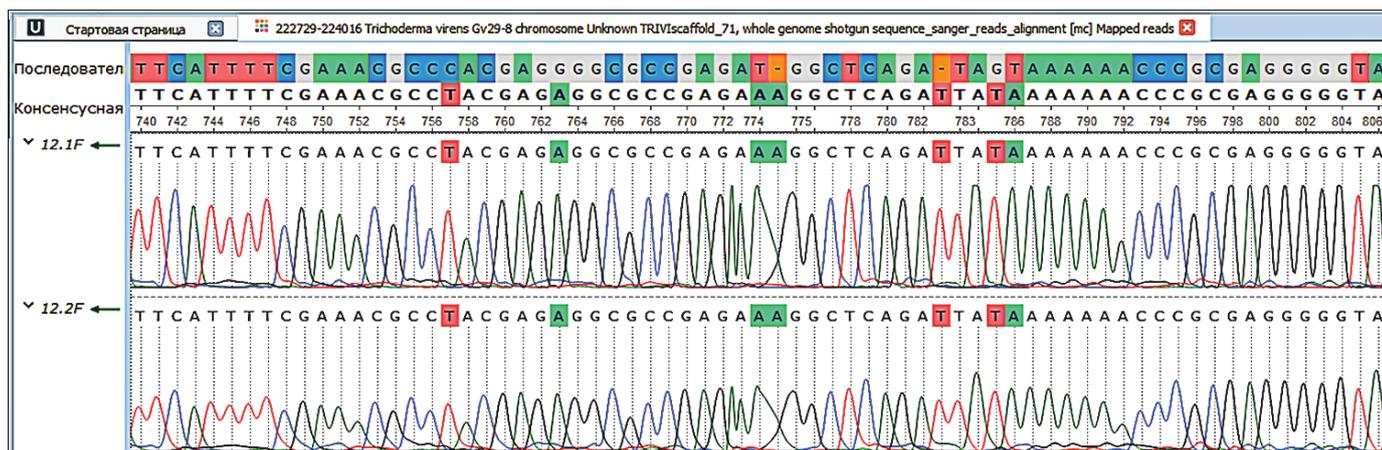


Рис. 5. Пример выравнивания полученных последовательностей характерного участка рДНК образца № 12 (2 forward) на референсную последовательность *Trichoderma virens* в программе Unipro Ugene v.34. Отдельными помеченными цветом нуклеотидами выделены замены и вставка в последовательности исследуемого образца по сравнению с последовательностью вида *Trichoderma virens*

Fig. 5. An example of alignment of the obtained sequences of typical element of rDNA sample No. 12 (2 forward) to the reference sequence of *Trichoderma virens* in the Unipro Ugene v.34 software program. Substitutions and insertions in the sequences of the studied sample compared to the sequence of *Trichoderma virens* species are highlighted by individual color-coded nucleotides

По результатам секвенирования последовательности гена, кодирующего 18S рибосомной РНК выделенные штаммы грибов были идентифицированы как *Trichoderma virens* (97,17 %), *Fusarium fujikuroi* (100 %) и *Aspergillus spp.* (наиболее генетически близкие виды *A. puulaauensis*, *A. heteromorphus*, *A. lentulus* и *A. novofumigatus*).

Результаты изучения антагонистической активности выделенных из растений винограда бактерий и грибов в отношении возбудителей болезней винограда грибной этиологии представлены в табл. 2.

Анализ результатов оценки антимикотической активности выделенных бактерий, как потенциальных агентов биологического контроля показывает, что максимальное ингибирование роста колоний патогенов наблюдали для *Nacardiopsis dasonvillei* (изолят № 1) в отношении *Botrytis cinerea* (42,8 %) и *Alternaria alternate* (53 %) на 10-е сутки; для *Streptomyces parvus* (изолят № 2) в отношении *Macrophoma flaccida* (47,6 %) на 10-е сутки и *Alternaria alternate* (30,6 %) на 5-е сутки культивирования (табл. 2).

Среди тестируемых грибов антагонистическое действие продемонстрировали *Trichoderma virens* (изолят № 12) ингибируя рост колоний *Aspergillus niger* и *Alternaria alternate* на 30,6 % и 44,6 % на 5-е и 10-е сутки соответственно. *Fusarium fujikuroi* (изолят № 35) контролировал развитие *Botrytis cinerea* (48,8 %) и *Alternaria alternate* (50,8 %) на 10-е сутки; в случае с *Aspergillus puulaauensis* (изолят № 48) наблюдалось ингибирование роста колонии *Botrytis cinerea* на 41,9 % (на 10-е сутки) и

*Aspergillus niger* на 37,6 % (на 5-е сутки).

Результаты экспериментов свидетельствуют о функциональном разнообразии микробиома винограда. Полученные данные о наличии бактерий и грибов антагонистов, как механизмов саморегуляции, можно использовать при оценке экологического воздействия агроприемов на ампелоценоз.

### Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований по поиску потенциальных агентов биологического контроля развития болезней винограда получены следующие данные:

- выделенные штаммы бактерий по результатам секвенирования части гена 16S рРНК были идентифицированы как *Nacardiopsis dasonvillei* (99,87 % совпадение с последовательностью базы данных NCBI) и *Streptomyces spp.*: *S. parvus*, *S. rubiginosohelvolus*, *S. alborvinaceus* (100 % совпадение);

- выделенные штаммы грибов по результатам секвенирования последовательности гена, кодирующего 18S рибосомной РНК, были идентифицированы как *Trichoderma virens* (97,17 %), *Fusarium fujikuroi* (100 %) и *Aspergillus spp.* (наиболее генетически близкие виды *A. puulaauensis*, *A. heteromorphus*, *A. lentulus* и *A. novofumigatus*).

Результаты изучения антагонистической активности выделенных из виноградных растений бактерий и грибов в условиях *in vitro* свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований для понимания за-

**Таблица 2.** Влияние изучаемых микроорганизмов на рост колоний возбудителей болезней винограда  
**Table 2.** The effect of the studied microorganisms on the growth of grape pathogen colonies

Тестируемый изолят	Ингибирование роста колоний, %							
	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Macrophoma flaccida</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
	5	10	5	10	5	10	5	10
№1 <i>Nacardiopsis dassonvillei</i>	24,4	42,8	26	3,2	8,6	10,2	39,4	53
№ 2 <i>Streptomyces parvus</i>	26,8	21	24,8	14	19,1	47,6	30,6	20,8
№ 12 <i>Trichoderma virens</i>	12,2	11,4	30,6	14,9	14,8	0	32,4	44,6
№ 35 <i>Fusarium fujikuroi</i>	30,9	48,8	10,4	7,9	6	18,4	41,2	50,8
№ 48 <i>Aspergillus puulaauensis</i>	20,3	41,9	37,6	47,4	0	49	0	21,7

кономерностей формирования биоценологических связей в амеллоценозе, а также поиска перспективных штаммов продуцентов биопрепаратов.

#### Источник финансирования

Работа выполнена в рамках выполнения договора № 189/2021 от 4.10.2021.

#### Financing source

The work was conducted within the framework of the Contract No. 189/2021 dd 4.10.2021.

#### Конфликт интересов

Не заявлен.

#### Conflict of interests

Not declared.

#### Список литературы

1. Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P. Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:382. DOI 10.3389/fpls.2016.00382.
2. Наркабулова Н.Ч. Влияние на качества вин перспективных гибридов технического винограда // *Universum: технические науки : электрон. научн. журн*. 2018;2(47). <https://7universum.com/ru/tech/archive/item/5514> (дата обращения: 07.02.2023).
3. Хасанов Б.А., Очилов Р.О., Холмуродов Э.А., Гулмуродов Р.А. Мевали ва ёнгок мевали дарахлар, цитрус, резавор мевали буталар ҳамда ток касалликлари ва уларга қарши кураш. Тошкент: Оффисе Принт. 2010:1-180.
4. González-García S., Álvarez-Pérez J.M., Sáenz de Miera L.E., Cobos R., Ibañez A., Díez-Galán A., Garzón-Jimeno E., Coque J.J.R. Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces* sp. strains into grapevine plants. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0211225. DOI 10.1371/journal.pone.0211225.
5. Strobel G., Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 2003;67(4):491-502. DOI 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
6. Martinez-Medina A., Flors V., Heil M., Mauch-Mani B., Pieterse C.M.J., Pozo M.J., Ton J., van Dam N.M., Conrath U. Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science*. 2016;21(10):818-822. DOI 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
7. Mauch-Mani B., Baccelli I., Luna E., Flors V. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017;68(1):485-512. DOI 10.1146/annurev-arplant-042916-041132.
8. Rondot Y., Reineke A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* L. reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biol. Control*. 2018;116:82-89. DOI 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006.
9. Liu Y., Nan L., Liu J., Yan H., Zhang D., Han X. Isolation and identification of resveratrol-producing endophytes from wine

grape Cabernet-Sauvignon. *Springer Plus*. 2016;5(1):1029. DOI 10.1186/s40064-016-2571-0.

10. Wafaa M.H., Abdall A.M. Evaluation of *Streptomyces Aureofaciens* and *Rhodotorulaglutinis* against Ochratoxin A producing *Aspergillusnigrin* grapevines. *Journal of Microbiology Research*. 2012;2(6):170-175. DOI 10.5923/j.microbiology.20120206.03.
11. Mohamed S.H., El-Helafiy Seham S.D., Ismail Mona A., Sadik A.S. Taxonomy of *Streptomyces* strains isolated from rhizospheres of various plant species grown in Taif region, KSA, having antagonistic activities against some microbial tissue culture contaminants. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(14):1657-1664. DOI 10.5897/AJB2013.11942.
12. Taechowisan T., Wanbanjob A., Tuntiwachwuttikul P., Taylor W.C. Identification of *Streptomyces* sp. Tc022, an endophyte in *Alpinia galanga*, and the isolation of actinomycin D. *Ann. Microbiol.* 2006;56:113-117. DOI 10.1007/BF03174991.
13. Falk S.P., Pearson R.C., Gadoury D.M., Seem R.C., Sztejnberg A. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. *Phytopathology*. 1996;86(10):1010-1017. DOI 10.1094/phyto-86-1010.
14. Davelos A.L., Kinkel L.L., Samac D.A. Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among *Streptomycetes* from prairie soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(2):1051-1058. DOI 10.1128/AEM.70.2.1051-1058.2004.
15. Поликсенова В.Д., Храпцов А.К., Пискун С.Г. Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения специальности «G 31 01 01 – Биология». Мн.: БГУ. 2004:1-36.
16. Patel J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*. 2001;6(4):313-321. DOI 10.1054/modi.2001.29158.
17. Benga L., Benten W.P., Engelhardt E., Köhrer K., Gougoula C., Sager M. 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. *Laboratory Animals*. 2014;48(4):305-312. DOI 10.1177/0023677214538240.
18. Ingle A.P. Diversity and identity of *Fusarium* species occurring on fruits, vegetables and food grains. *Nusantara Bioscience*. 2017;9:44-51. DOI 10.13057/nusbiosci/n090108.
19. Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (date of access: 07.02.2023).
20. Silva-Valderrama I., Toapanta D., Miccono M.A., Lolas M., Diaz G.A., Cantu D., Castro A. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2021;11:614620. DOI 10.3389/fmicb.2020.614620.
21. Beau F., Bollet C., Cotton T., Garnotel E., Drancourt M. Molecular identification of a *Nacardiopsis dassonvillei* blood isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(10):3366-3368. DOI 10.1128/JCM.37.10.3366-3368.1999.

## References

1. Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P. Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:382. DOI 10.3389/fpls.2016.00382.
2. Narkabulova N.Ch. The effect on the quality of wines of promising hybrids of wine grapes. *Universum: technical sciences: electron. scientific journal*. 2018;2(47). <https://7universum.com/ru/tech/archive/item/5514> (date of access: 02/07/2023) (in Russian).
3. Khasanov B.A., Ochilov R.O., Kholmurodov E.A., Gulmurodov R.A. Mevali va yongok mevali darakhtlar, citrus, rezavor mevali butalar hamda tok kasalliklari va ularga karshi kurash. Tashkent: Office Print. 2010:1-180 (in Uzbek).
4. González-García S., Álvarez-Pérez J.M., Sáenz de Miera L.E., Cobos R., Ibañez A., Díez-Galán A., Garzón-Jimeno E., Coque J.J.R. Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces* sp. strains into grapevine plants. *PLoS ONE*. 2019;14(1):e0211225. DOI 10.1371/journal.pone.0211225.
5. Strobel G., Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 2003;67(4):491-502. DOI 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
6. Martínez-Medina A., Flors V., Heil M., Mauch-Mani B., Pieterse C.M.J., Pozo M.J., Ton J., van Dam N.M., Conrath U. Recognizing plant defense priming. *Trends in Plant Science*. 2016;21(10):818-822. DOI 10.1016/j.tplants.2016.07.009.
7. Mauch-Mani B., Baccelli I., Luna E., Flors V. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017;68(1):485-512. DOI 10.1146/annurev-arplant-042916-041132.
8. Rondot Y., Reineke A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* L. reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biol. Control*. 2018;116:82-89. DOI 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006.
9. Liu Y., Nan L., Liu J., Yan H., Zhang D., Han X. Isolation and identification of resveratrol-producing endophytes from wine grape Cabernet-Sauvignon. Springer Plus. 2016;5(1):1029. DOI 10.1186/s40064-016-2571-0.
10. Wafaa M.H., Abdall A.M. Evaluation of *Streptomyces Aureofaciens* and *Rhodotorulaglutinis* against Ochratoxin A producing *Aspergillusnigrin* grapevines. *Journal of Microbiology Research*. 2012;2(6):170-175. DOI 10.5923/j.microbiology.20120206.03.
11. Mohamed S.H., El-Helafiy Seham S.D., Ismail Mona A., Sadik A.S. Taxonomy of *Streptomyces* strains isolated from rhizospheres of various plant species grown in Taif region, KSA, having antagonistic activities against some microbial tissue culture contaminants. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(14):1657-1664. DOI 10.5897/AJB2013.11942.
12. Taechowisan T., Wanbanjob A., Tuntiwachwuttikul P., Taylor W.C. Identification of *Streptomyces* sp. Tc022, an endophyte in *Alpinia galanga*, and the isolation of actinomycin D. *Ann. Microbiol.* 2006;56:113-117. DOI 10.1007/BF03174991.
13. Falk S.P., Pearson R.C., Gadoury D.M., Seem R.C., Szejnberg A. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. *Phytopathology*. 1996;86(10):1010-1017. DOI 10.1094/phyto-86-1010.
14. Davelos A.L., Kinkel L.L., Samac D.A. Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among *Streptomyces* from prairie soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(2):1051-1058. DOI 10.1128/AEM.70.2.1051-1058.2004.
15. Poliksenova V.D., Khramtsov A.K., Piskun S.G. Guidelines for the special workshop on the section "Mycology. Methods of experimental study of microscopic fungi" for 4th year students of the full-time department of the specialty "G 31 01 01 - Biology". MN.: BGU. 2004:1-36 (in Russian).
16. Patel J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*. 2001;6(4):313-321. DOI 10.1054/modi.2001.29158.
17. Benga L., Benten W.P., Engelhardt E., Köhrer K., Gougoula C., Sager M. 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. *Laboratory Animals*. 2014;48(4):305-312. DOI 10.1177/0023677214538240.
18. Ingle A.P. Diversity and identity of *Fusarium* species occurring on fruits, vegetables and food grains. *Nusantara Bioscience*. 2017;9:44-51. DOI 10.13057/nusbiosci/n090108.
19. Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (date of access: 07.02.2023).
20. Silva-Valderrama I., Toapanta D., Miccono M.A., Lolás M., Díaz G.A., Cantu D., Castro A. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2021;11:614620. DOI 10.3389/fmicb.2020.614620.
21. Beau F., Bollet C., Coton T., Garnotel E., Drancourt M. Molecular identification of a *Nocardia* *dassonvillei* blood isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(10):3366-3368. DOI 10.1128/JCM.37.10.3366-3368.1999.

## Информация об авторах

**Дилором Бахтияровна Турабекова**, старший преподаватель кафедры Биотехнологии; e-мэйл: dturabekova85@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5899-873X>;

**Наталья Васильевна Алейникова**, д-р с.-х. наук, зам. директора по научной работе, гл. науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: aleynikova@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1167-6076>;

**Геннадий Юрьевич Спотарь**, аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: robud@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

**Евгения Спиридоновна Галкина**, канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: galkinavine@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4322-4074>;

**Елена Александровна Болотянская**, науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: saklina@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2218-8019>;

**Нортожи Абдихаликович Хужамшукуров**, д-р биол. наук, зав. лабораторией микровиноделия; e-мэйл: nkhumshukurov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7807-4737>.

## Information about authors

**Dilorom B. Turabekova**, Assistant Professor, Department of Biotechnology; e-mail: dturabekova85@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5899-873X>;

**Natalia V. Aleinikova**, Dr. Agric. Sci., Deputy Director for Science, Chief Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: aleynikova@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1167-6076>;

**Gennadiy Yu. Spotar**, Postgraduate, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: probud@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

**Yevgenia S. Galkina**, Cand. Agric. Sci., Leading Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: galkinavine@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4322-4074>;

**Elena A. Bolotianskaia**, Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: saklina@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2218-8019>;

**Nortoji A. Khujamshukurov**, Dr. Biol. Sci., Head of Microwinemaking Laboratory; e-mail: nkhumshukurov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7807-4737>.

Статья поступила в редакцию 07.02.2023, одобрена после рецензии 13.02.2023, принята к публикации 21.02.2023.