

Влияние бактериальной и грибной инокуляции на физиолого-биохимические параметры листьев укорененных черенков винограда

Волынчук Н.Н.¹✉, Кабашникова Л.Ф.², Пашкевич Л.В.², Лукша В.И.², Доманская И.Н.²

¹Полесский государственный университет, Беларусь, 225710, Брестская область, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23;

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

✉volynchuk.n@mail.ru

Аннотация. Изучены содержание фотосинтетических пигментов, полифенольных соединений и активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях 45-дневных укорененных черенков винограда культурного (*Vitis vinifera*) сорта Альфа при бактериальной (*Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*) и грибной (*Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*) инокуляции. Бактериальная инокуляция *Enterobacter sp.* (штамм №22) вызывала снижение содержания хлорофилла (Хл) *a* и Хл (*a+b*) в пересчете на сырую массу листьев на 30 и 29 % соответственно относительно контрольных значений, тогда как грибная инокуляция достоверно не изменяла эти показатели. В результате бактериальной инокуляции количество Хл *a* было снижено в 3,7, а каротиноидов в 1,3 раза относительно значений при инокуляции дрожжевыми грибами. Обнаружено снижение содержания каротиноидов в листьях винограда при бактериальной инокуляции (на 41–46 %), а при грибной инокуляции тенденция к его снижению, которое при использовании *Hanseniaspora uvarum* (штамм №64) достигало 57,7 %, а в случае *Aureobasidium pullulans* (штамм №32) не выявлялось. Инокуляция дрожжевым грибом *Hanseniaspora uvarum* (штамм №64) приводила к снижению активности ПОЛ в листьях винограда на 23,8 % на фоне снижения общего содержания фенольных соединений (на 32,3 %), а при использовании гриба *Aureobasidium pullulans* (штамм №27) отмечено увеличение содержания полифенолов на 17,4 %. Сделан вывод о более выраженном негативном действии бактериальной инокуляции на пигментный аппарат листьев в сравнении с дрожжевыми грибами и о положительном влиянии определенных дрожжевых штаммов на окислительный статус листьев укорененных черенков культурного винограда.

Ключевые слова: виноград; дрожжевые грибы; фотосинтетические пигменты; фенолы; перекисное окисление липидов; фитопатогены.

Для цитирования: Волынчук Н.Н., Кабашникова Л.Ф., Пашкевич Л.В., Лукша В.И., Доманская И.Н. Влияние бактериальной и грибной инокуляции на физиолого-биохимические параметры листьев укорененных черенков винограда // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(3):276-283. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.009.

ORIGINAL RESEARCH

The effect of bacterial and fungal inoculation on physiological and biochemical parameters of the leaves of rooted grape cuttings

Volynchuk N.N.¹✉, Kabashnikova L.F.², Pashkevich L.V.², Luksha V.I.², Domanskaya I.N.²

¹Polesky State University, 23 Dneprovskoy Flotilii str., 225710 Pinsk, Brest reg., Belarus;

²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya str., 220072 Minsk, Belarus

✉volynchuk.n@mail.ru

Abstract. The content of photosynthetic pigments, polyphenolic compounds and activity of lipid peroxidation (LPO) in the leaves of 45-day-old rooted cuttings of cultivated grapes (*Vitis vinifera*) of 'Alpha' variety were studied during bacterial (*Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*) and fungal (*Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*) inoculation. Bacterial inoculation with *Enterobacter sp.* (strain No. 22) caused a decrease in the content of chlorophyll (Chl) *a* and Chl (*a+b*) in terms of wet leaf weight by 30 and 29 %, respectively, relative to the control values, while fungal inoculation did not significantly change these parameters. As a result of bacterial inoculation, the amount of Chl *a* was reduced by 3.7, and carotenoids – by 1.3 times relative to the values during inoculation with yeast fungi. A decrease in the content of carotenoids in grape leaves was found during bacterial inoculation (by 41–46 %), and during fungal inoculation – a tendency to be decreased to reach 57.7 % when using *Hanseniaspora uvarum* (strain No. 64), but in the case of *Aureobasidium pullulans* (strain No. 32) – no such tendency was detected. Inoculation with yeast fungus *Hanseniaspora uvarum* (strain No. 64) led to a decrease in LPO activity in grape leaves by 23.8 % against the background of a decrease in the total content of phenolic compounds (by 32.3 %), and when using the fungus *Aureobasidium pullulans* (strain No. 27) – an increase in the content of polyphenols by 17.4 %. A conclusion was made about a more pronounced negative effect of bacterial inoculation on the pigment apparatus of leaves in comparison with yeast fungi, and about the positive effect of certain yeast strains on the oxidative status of leaves of rooted cuttings in cultivated grapes.

Key words: grapes; yeast fungi; photosynthetic pigments; phenols; lipid peroxidation; phytopathogens.

For citation: Volynchuk N.N., Kabashnikova L.F., Pashkevich L.V., Luksha V.I., Domanskaya I.N. The effect of bacterial and fungal inoculation on physiological and biochemical parameters of the leaves of rooted grape cuttings. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(3):276-283. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.009 (in Russian).

Введение

Виноградная лоза (*Vitis spp.*) – одна из основных и наиболее экономически важных плодовых культур во всем мире, большая часть урожая которой используется для виноделия. Качество и ценность ягод винограда в основном определяются его биохимическим составом, на который влияют как генетические факторы, так и факторы окружающей среды (абиотические и биотические) [1, 2]. Исследования влияния абиотических факторов на виноградную лозу широко освещены в литературе и некоторые из этих данных успешно применялись в виноградарстве. Что касается биотических факторов, то внимание больше уделялось изменениям при совместном воздействии патогенных и ризосферных микроорганизмов [3–6]. В некоторых исследованиях установлено, что комбинированная инокуляция *Glomus aggregatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus sp.* [7] и *Rhizophagus, Funneliformis, Pseudomonas* [8] привела к значительному увеличению содержания фенолов и каротиноидов в растениях. Микробная инокуляция растений *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sp.* и *Rhodotorula glutinis* значительно увеличивала содержание хлорофилла (Хл) и уменьшала концентрацию малонового диальдегида (МДА) по сравнению с необработанным контролем в условиях засухи [9]. Биологизация виноградарства, как важной отрасли сельскохозяйственного производства, базируется на принципах, сохраняющих природные ресурсы и сберегающих целостность экосистемы в долгосрочной перспективе. Одна из групп средств биоконтроля фитопатогенных грибов, которая в последнее время привлекает повышенное внимание ученых и промышленности – это дрожжевые грибы. Часто используемые дрожжи-антагонисты включают главным образом штаммы, принадлежащие к роду *Pichia* (*P. caribbica*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus* (ранее *P. anomala*) и *Meyerozyma guilliermondii* (ранее *P. guilliermondii*) [10–12], *Rhodotorula* (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa*) [13, 14], *Candida* (*C. saitoana*, *C. intermedia*) [15], *Hanseniaspora* (*H. uvarum*, *H. opuniatae*), *Metschnikowia* (*M. pulcherrima*, *M. caribbica*), *Saccharomyces cerevisiae* [16] и дрожжеподобного гриба *Aureobasidium pullulans* (черные дрожжи) [17, 18].

Полесский регион является ведущим регионом промышленного виноградарства в Беларуси. Увеличение производства качественной виноградно-винодельческой продукции, а также активное расширение отечественного виноградарства требуют соответствующей научной поддержки в изучении уникальной аборигенной микрофлоры, которая эволюционно приспособлена к определенным условиям обитания и формирует характеристики микробиоты Полесского региона. Это дает возможность отбора потенциальных штаммов-кандидатов дрожжевых грибов для улучшения управления виноградниками с точки зрения роста и урожайности, устойчивости к стрессам, фитопатогенам и т.д.

Цель работы – изучение влияния бактериальной и грибной инокуляции на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата (ФСА), активность перекисного окисления липидов и общее

содержание полифенольных соединений в листьях черенков 45-дневного винограда.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили укорененные черенки винограда культурного (*Vitis vinifera*) сорта Альфа. Для инокуляции отбирали укорененные в воде черенки с длиной корней не менее 1,5 см. Перспективные штаммы бактерий и дрожжевых грибов, выделенные из разных органов виноградной лозы сорта Альфа, демонстрировали высокие показатели ингибирования роста фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* БИМ F-71 (70,0–79,0 %) и *Fusarium oxysporum* БИМ F-609 (52,0–72,0 %) из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Штаммы были обозначены соответствующими номерами: №4 – *Pseudomonas sp.*, №22 – *Enterobacter sp.*, №17, 27, 32, 37 – *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*), №64 – *Hanseniaspora uvarum* (*H. uvarum*). Обработку корней проводили водной суспензией штаммов с титром не менее 10^6 КОЕ/мл из расчета 5 мл на растение. Растения (6 штук на каждый вариант) выращивали в горшечной культуре при комнатной температуре и естественном освещении с фотопериодом 10–12 часов в грунте на основе предварительно простерилизованного торфа. Анализ проводили через 45 дней после инокуляции. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной водой.

Для экстракции пигментов использовали навеску листьев (20–30 мг). Хл и каротиноиды экстрагировали 99,5 % ацетоном в трехкратной повторности. Количество пигментов в экстрактах определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре «Shimadzu UV-2401 PC» (Shimadzu, Япония) при трех длинах волн: 662 нм (Хл а), 644 нм (Хл б) и 440,5 нм (каротиноиды). Количество пигментов рассчитывали по формулам [19]. Содержание фотосинтетических пигментов выражали в расчете на единицу сырой биомассы листа.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) тестировали по количеству МДА, содержание которого определяли спектрофотометрическим методом по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [20]. Навески листьев (0,15 г) в трехкратной повторности для каждого варианта гомогенизировали в 5 мл фосфатного буфера 0,005 М (рН 7,2–7,4). К полученному гомогенату добавляли равный объем 0,5 %-го раствора ТБК в 20 % трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта регистрировали фотометрически при 532 нм с поправкой на неспецифическое поглощение при 650 нм на спектрофотометре «Shimadzu-UV 2401 PC» (Shimadzu, Япония). Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА с трихлоруксусной кислотой, который с поправкой на неспецифическое поглощение при $\lambda=650$ нм ($1,5 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$) составил $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Для определения общего содержания полифенолов использовали спектрофотометрический метод определения суммы фенольных соединений (при дли-

Таблица 1. Абсолютные и относительные значения содержания Хл и каротиноидов в листьях инокулированных черенков винограда (мг/г сырой массы)

Table 1. Absolute and relative values of chlorophyll and carotenoid content in leaves of inoculated grape cuttings (mg/g wet weight)

| Вариант | Хл <i>a</i> | Хл <i>b</i> | Хл (<i>a+b</i>) | Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i> | Каротиноиды | Хл (<i>a+b</i>)/каротиноиды |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Контроль | 1,64±0,06 100,0** | 0,75±0,04 100,0** | 2,40±0,09 100,0** | 2,19±0,07 100** | 0,41±0,003 100,0** | 5,79±0,207 100,0** |
| Бактерии | | | | | | |
| <i>Pseudomonas sp.</i> , штамм №4 | 1,44±0,05 87,8** | 0,71±0,01 94,6** | 2,15±0,04 89,6** | 2,02±0,12 92,2** | 0,29±0,05* 70,7** | 7,93±1,47 137,0** |
| <i>Enterobacter sp.</i> штамм №22 | 1,26±0,07* 76,8** | 0,60±0,07 80,0** | 1,86±0,01* 77,5** | 2,11±0,14 96,3** | 0,28±0,05* 68,3** | 7,16±1,75 123,6** |
| Дрожжевые грибы | | | | | | |
| <i>A. pullulans</i> штамм №17 | 1,51±0,22 92,1** | 0,80±0,07 106,7** | 2,31±0,26 96,3** | 1,89±0,21 86,3** | 0,29±0,10 70,7** | 11,51±5,43 198,8** |
| <i>A. pullulans</i> штамм №27 | 1,60±0,02 97,6** | 0,79±0,03 105,3** | 2,40±0,02 100,0** | 2,02±0,09 92,2** | 0,30±0,05 73,2** | 8,58±1,59 148,1** |
| <i>A. pullulans</i> штамм №32 | 1,60±0,03 97,6** | 0,75±0,01 100,0** | 2,36±0,03 98,3** | 2,12±0,02 96,8** | 0,42±0,01 102,4** | 5,63±0,21 97,2** |
| <i>A. pullulans</i> штамм №37 | 1,56±0,06 95,1** | 0,77±0,07 102,6** | 2,33±0,11 97,1** | 2,03±0,13 92,7** | 0,32±0,06 78,0** | 8,14±2,35 140,6** |
| <i>H. uvarum</i> штамм №64 | 1,53±0,05 93,3** | 0,81±0,04 108,0** | 2,34±0,09 97,5** | 1,87±0,04* 85,4** | 0,26±0,02* 63,4** | 9,09±0,92* 156,9** |

Примечание. Здесь и далее в таблицах:

* – достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

** – относительные значения параметров в процентах.

не волны 760 нм) с помощью комплексообразующих реагентов. Количественную оценку действующих веществ в листьях винограда проводили по суммарному содержанию фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту. Метод основан на реакции полифенольных соединений с реактивом Фолина-Чокалтеу, содержащим фосфомолибдат и вольфрамат натрия, которые при восстановлении фенольными соединениями в щелочной среде образуют комплекс синего цвета (вольфрамовая синь), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений [21]. Суммарное содержание фенольных соединений выражали в мг-эквивалентах галловой кислоты на г сырой массы листьев винограда.

Все исследования проводили в трехкратной биологической повторности. Достоверность различий средних значений определяли с использованием компьютерных программ *Statistica* (версия 10.0) (*StatSoft*) и *Excel 2010* (*Microsoft*). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0,05$ (в таблицах отмечены звездочкой).

Результаты и их обсуждение

Пигменты фотосинтеза в ассимилирующих органах являются одним из основных показателей потенциальной продуктивности растений. Имея сведения о содержании Хл, можно оценить потенциальную фотохимическую активность листьев винограда. На

первом этапе исследования был проведен количественный анализ содержания фотосинтетических пигментов в листьях черенков винограда, инокулированных разными бактериальными и грибными штаммами (табл. 1).

Как видно из представленных результатов, бактериальная и грибная инокуляция вызвала уменьшение содержания Хл *a* в опытных растениях. При этом только обработка бактериальным штаммом №22 привела к достоверному снижению содержания этого пигмента в листьях винограда на 30 % относительно необработанных растений. Среднее содержание Хл *a* при бактериальной инокуляции составило 1,35 мг/г сырой массы, что меньше грибной в 1,15 раза. Снижение содержания Хл *a* в листьях черенков винограда, инокулированных дрожжевыми грибами рода *Aureobasidium* и *Hanseniopsis*, оказалось незначительным в сравнении с контрольными данными и находилось в диапазоне 2,4–7,9 %.

Иная тенденция наблюдалась при количественном определении содержания Хл *b*, который присутствует в составе светособирающих комплексов фотосинтетических мембран. Для большинства вариантов инокуляции уровень содержания данного пигмента составил 0,71–0,79 мг/г сырой массы листьев винограда. Инокуляция бактериями рода *Enterobacter sp.* (штамм №22) уменьшала содержание Хл *b* на 20,0 % по сравне-

Таблица 2. Влияние инокуляции разными штаммами бактерий и дрожжей на содержание продуктов ПОЛ и суммарное содержание фенольных соединений в листьях черенков винограда

Table 2. The effect of inoculation with different strains of bacteria and yeasts on the content of lipid peroxidation products and the total phenolic compounds in the leaves of grape cuttings

| Вариант | МДА | | Фенольные соединения | |
|-------------------------------------|---------------------|--------------|--|--------------|
| | нмоль/г сырой массы | % к контролю | мг-экв. галловой кислоты/г сырой массы | % к контролю |
| Контроль | 161,93±5,96 | 100,0 | 11,06±1,10 | 100,00 |
| Бактерии | | | | |
| <i>Pseudomonas sp.</i> , штамм №4 | 146,60±7,95 | 90,5 | 12,69±0,68* | 114,69* |
| <i>Enterobacter sp.</i> , штамм №22 | 174,00±5,00 | 107,4 | 9,58±1,75 | 86,85 |
| Дрожжевые грибы | | | | |
| <i>A. pullulans</i> , штамм 17 | 173,10±10,8 | 106,89 | 12,15±3,49 | 109,82 |
| <i>A. pullulans</i> , штамм №27 | 181,12±6,93 | 112,28 | 12,99±3,28* | 117,43* |
| <i>A. pullulans</i> , штамм №32 | 155,44±5,35 | 95,99 | 11,44±3,69 | 103,20 |
| <i>A. pullulans</i> , штамм №37 | 168,18±3,32 | 103,86 | 11,28±2,76 | 101,95 |
| <i>H. uvarum</i> , штамм №64 | 123,39±1,17* | 76,20* | 7,49±3,12* | 67,69* |

нию с контролем, в то время как бактерии рода *Pseudomonas sp.* незначительно уменьшали содержание этого пигмента. Инокуляция всеми вариантами дрожжевых грибов привела к повышению его содержания от 2,6 до 8,0 % по сравнению с контролем. Известно, что Хл *b* обладает уникальным физико-химическим свойством поглощать свет в коротковолновой области (425–475 нм), в которой слабо поглощает Хл *a*, тем самым повышение содержания Хл *b* значительно увеличивает светосбор, что особенно важно при пониженной освещенности, которая характерна для условий Беларуси [22]. Максимальное количество Хл *b* содержали листья черенков винограда сорта Альфа, инокулированных дрожжевым штаммом №64.

Исходя из полученных данных, бактериальная инокуляция *Enterobacter sp.* (штамм №22) вызывала снижение содержания Хл (*a+b*) в пересчете на сырую массу листьев на 29 % относительно контрольных значений, тогда как грибная инокуляция достоверно не изменяла эти показатели.

На основе полученных данных по содержанию Хл *a* и Хл *b* в листьях винограда было рассчитано соотношение между ними (табл. 1). Бактериальная и грибная инокуляции привели к незначительному уменьшению данного показателя в среднем на 5,7 и 9,3 % соответственно. Минимальное уменьшение соотношения Хл *a*/Хл *b* отмечалось в листьях черенков винограда инокулированных штаммом дрожжевого гриба №32 (3,2 %). Как свидетельствуют литературные источники, соотношение между формами Хл может характеризовать потенциальную фотохимическую активность, при этом физиологическое соотношение Хл *a*/Хл *b* варьирует около значения 3,0.

Известно, что каротиноиды играют важную роль в механизмах защиты фотосинтетического аппарата (ФСА) от различных повреждающих факторов окружающей среды. Функции каротиноидов в растении весьма многообразны: они вносят свой вклад в формирование структуры ФСА растений, участвуют в поглощении световой энергии и защите молекул Хл от активных форм кислорода (АФК) и выполняют роль антиоксидантов в липидной фазе мембран, регулируют различные механизмы диссипации избыточной энергии, включая нефотохимическое тушение флуоресценции Хл (NPQ), а также обеспечивают функционирование виолаксантинового цикла, связанного с ликвидацией АФК и регуляцией энергетического баланса в фотосинтезе [23].

Экспериментально показано (табл. 1) снижение содержания каротиноидов в листьях винограда как при бактериальной инфекции рода *Pseudomonas sp.* (на 41 %), так и бактериями рода *Enterobacter sp.* (на 46 %). Анализ содержания желтых пигментов в листьях черенков винограда, предварительно инокулированных пятью вариантами дрожжевых грибов, показал тенденцию к его снижению, которое при использовании *H. uvarum* (штамм №64) достигало 57,7 %, а в случае *A. pullulans* (штамм №32) не выявлялось.

Проведенный анализ соотношения суммарного содержания Хл (*a+b*) к общему содержанию каротиноидов, которое часто используют как показатель устойчивости ФСА к внешним неблагоприятным факторам или для характеристики экологической пластичности растений [24], показал, что диапазон значений соотношения Хл (*a+b*)/каротиноиды составил от 5,6 до 11,5 (табл. 1). Бактериальная инокуляция увеличила пока-

затель соотношения в среднем на 30,5 % относительно контроля. Инокуляция дрожжевыми грибами привела к повышению показателя на 61 % в сравнении с контролем, за исключением *A. pullulans* (штамм №32), который не оказывал влияния на этот параметр.

Известно, что в растительной клетке при нормальных условиях ее жизнедеятельности постоянно происходят процессы ПОЛ, способные приводить к разнообразным структурно-функциональным нарушениям, однако благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты данные процессы удерживаются на определенном стабильном уровне [25]. Состояние окислительно-восстановительного статуса клеток листьев черенков винограда тестировали по количеству образовавшегося стабильного продукта ПОЛ – МДА, который образуется при перекисном окислении линолевой или арахидоновой кислот. Результаты определения содержания стабильных продуктов ПОЛ в листьях винограда представлены в таблице 2.

Снижение уровня МДА, составившее 23,8 % к контрольному значению отмечено при инокуляции дрожжевым грибом *H. uvarum* (штамм №64), выделенным из эписферы ягод винограда на стадии сбора урожая. Дрожжевые грибы №17 и №27 показали тенденцию к увеличению содержания МДА на 6,9 и 11,9 % соответственно по сравнению с контролем.

Остальные варианты инокуляции дрожжевыми грибами демонстрировали снижение уровня стабильных продуктов ПОЛ от 4,1 до 11,6 % в сравнении с контролем. Известно, что увеличение активности ПОЛ снижает текучесть мембраны, повышая вероятность перескока фосфолипидов из одного монослоя в другой и утечку электролитов через мембрану, ведет к повреждению белков, инактивации рецепторов, ферментов, ионных каналов и в целом к нарушению целостности мембраны в результате образования альдегидов и углеводов [26].

Фенольные соединения, являясь обязательными компонентами клеток высших растений, выполняют в них различные функции: участвуют в окислительно-восстановительных процессах, реакциях иммунитета, регулируют рост и развитие растений, защищают клетки от различных стрессовых воздействий [27]. Сезонное варьирование содержания фенольных соединений специфично для отдельного вида растения и общей тенденции в накоплении этих веществ не наблюдается [28, 29]. Эти соединения вторичного метаболизма весьма реакционноспособны, в связи с чем могут инактивировать свободные радикалы клеток, защищая их от избыточного образования АФК. Присутствие фенольных соединений в растительных объектах, а также увеличение их количества, является важным показателем устойчивости растений к стрессовым воздействиям. По данным [30] в листьях винограда обнаруживается высокое содержание фенолов, сравнимое с показателями кожуры ягод – до 14,22 мг-экв. галловой кислоты/г сырой массы. Определение суммарного содержания фенольных соединений в наших опытах показало снижение этого показателя при бактериальной инвазии штаммом *Enterobacter sp.* №22

(на 13 %) и увеличение их количества на 15 % бактериями рода *Pseudomonas sp.* по сравнению с необработанными растениями (табл. 2). Четыре штамма дрожжевых грибов рода *Aureobasidium* продемонстрировали тенденцию к повышению содержания фенольных соединений (от 2 до 17 % по сравнению с контролем). И только в листьях винограда, инокулированных штаммом №64 дрожжевого гриба *H. uvarum*, обнаружено снижение содержания полифенолов на 32,3 %, что, скорее всего, объясняется их катаболизмом, связанным с изменением структуры хлоропластов и обнаруженным нами нарушением биосинтеза каротиноидов (табл. 1).

Выводы

Проведен количественный анализ содержания фотосинтетических пигментов в листьях укорененных черенков винограда после инокуляции грибными и бактериальными микроорганизмами. Содержание Хл *a*, Хл *b*, их суммы и каротиноидов в листьях изменялось, что указывает на реакцию пигментного аппарата листьев винограда при инокуляции биоагентами. Спустя 45 дней после инокуляции бактериями *Pseudomonas sp.* и *Enterobacter sp.* отмечено уменьшение количества фотосинтетических пигментов (Хл *a* и каротиноидов) в листьях черенков винограда в пересчете на сырую массу. Анализ результатов инокуляции четырьмя штаммами дрожжевых грибов *Aureobasidium pullulans* и одного штамма *Hanseniaspora uvarum* демонстрирует тенденцию к увеличению содержания Хл *b*, что способствует увеличению светосбора при фотосинтезе. Из пяти «дрожжевых» вариантов лишь внедрение гриба *Aureobasidium pullulans* (штамм №32) не приводит к изменению содержания таких важных фотосинтетических пигментов, как каротиноиды.

Некоторые варианты инокуляции дрожжевыми грибами демонстрировали снижение содержания продуктов ПОЛ от 4,1 до 23,8 % по сравнению с физиологическими условиями, что указывает на стабилизацию окислительных процессов в липидном бислое клеточных мембран. К компонентам антиоксидантной защиты относятся низкомолекулярные соединения фенольной природы, которые в наших опытах показали тенденцию к увеличению содержания после инокуляции бактериальными и дрожжевыми микроорганизмами (от 7 до 30 %), что указывает на развитие защитных реакций в листьях черенков винограда под действием ряда использованных биоагентов.

Таким образом, инокуляция может стать хорошим инструментом тонкой настройки регуляции вторичных метаболитов винограда. Однако для возможного его использования в маточниках подвойных и привойных лоз необходимо изучить другие способы инокуляции или внесения отобранных штаммов. При обсуждении перспектив использования этого тонкого регулятора для формирования метаболитов винограда следует также учитывать негативные эффекты, такие как риск образования вредных или токсичных веществ. Однако именно этот фактор можно корректировать путем использования природных штаммов, выделенных из аборигенных сортов винограда Ре-

спублики Беларусь, а также проводя исследования *in vitro* и *in vivo* каждого штамма-кандидата дрожжевого гриба.

Полученные результаты можно экстраполировать и на плодоносящие виноградные растения. Это создаст научную основу для разработки средств биологической защиты растений винограда с использованием дрожжевых грибов в качестве альтернативы использованию химических фунгицидов, что позволит снизить потери урожая из-за фитопатогенов и обеспечить более высокую экологическую безопасность индустрии винограда. Исследованные штаммы дрожжей показали свою высокую эффективность в отношении фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* и *Fusarium oxysporum*, что делает их весьма полезными для потенциального применения в биологической борьбе.

Источник финансирования

Не указан.

Financing source

Not specified.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

- Ming-Zhi Y., Mian-Di M. Fungal endophytes as a metabolic fine-tuning regulator for wine grapes. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163186. DOI 10.1371/journal.pone.0163186.
- Kuhn N., Guan L., Dai Z., Wu B.-H., Lauvergeat V., Gomès E., Li S.-H., Godoy F., Arce-Johnson P., Delrot S. Berry ripening: recently heard through the grapevine. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65:4543-4559. DOI 10.1093/jxb/ert395.
- Amarouchi Z., Esmael Q., Sanchez L., Jacquard C., Hafidi M., Vaillant-Gaveau N., Ait Barka E. Beneficial microorganisms to control the gray mold of grapevine: from screening to mechanisms. *Microorganisms*. 2021;9(7):138-146. DOI 10.3390/microorganisms9071386.
- Nascimento R., Maia M., Ferreira A., Silva A. da, Ponces A., Cordeiro C., Silva M., Figueiredo A. Early stage metabolic events associated with the establishment of *Vitis vinifera* – *Plasmopara viticola* compatible interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;137:1-13. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.01.026.
- Pertot I., Caffi T., Rossi V., Mugnai L., Hoffmann C., Grandi M.S., Gary C., Lafond D., Duso C., Thiery D., Mazzoni V., Anfora G. A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*. 2017;97:70-84. DOI 10.1016/j.cropro.2016.11.025.
- Esmael Q., Jacquard C., Clement C., Sanchez L., Barka E.A. Genome sequencing and traits analysis of *Burkholderia* strains reveal a promising biocontrol effect against grey mold disease in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35:141-150. DOI 10.1007/s11274-019-2613-1.
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.-L., Touraine B., Moenne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:356-368. DOI 10.3389/fpls.2013.00356.
- Aalipour H., Nikbakht A., Sabzalian M.R. Essential oil composition and total phenolic content in *Cupressus arizonica* G. in response to microbial inoculation under water stress conditions. *Scientific Reports*. 2023;13(1):120-129. DOI 10.1038/s41598-023-28107-z.
- Duo L.A., Liu C.X., Zhao S.L. Alleviation of drought stress in turfgrass by the combined application of nano-compost and microbes from compost. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65:419426. DOI 10.1134/S102144371803010X.
- Matic S., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. *Biological Control*. 2014;73:59-67. DOI 10.1016/j.biocontrol.2014.03.008.
- Fernandez San Millan A., Larraya L., Farran I., Ancin M., Veramendi J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*. 2021;160:267-278. DOI 10.1016/j.biocontrol.2021.104683.
- Zhang Q., Zhao L., Li Z., Li C., Li B., Gu X., Zhang X., Zhang H. Screening and identification of an antagonistic yeast controlling postharvest blue mold decay of pears and the possible mechanisms involved. *Biological Control*. 2019;133:26-33. DOI 10.1016/j.biocontrol.2019.03.002.
- Rossetti A., Perpetuini G., Battistelli N., Zulli C., Arfelli G., Suzzi G., Cichelli A., Tofalo R. Capturing the fungal community associated with conventional and organic *Trebbiano Abruzzese* grapes and its influence on wine characteristics. *Food Bioscience*. 2023;52:352-364. DOI 10.1016/j.fbio.2023.102382.
- Sipiczki M. *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*. 2020;8:186-194. DOI 10.3390/microorganisms8071029.
- Abdel-Kareem M.M., Zohri A.N., Elmohsen S. Novel marine yeast strains as plant growth-promoting agents improve defense in wheat (*Triticum aestivum*) against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2021;128:973-988. DOI 10.1007/s41348-021-00461-y.
- Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*. 2017;63:191-198. DOI 10.1016/j.fm.2016.11.021.
- Oufensou S., Hassan Z., Balmes V., Jaoua S., Migheli Q. Perfume guns: potential of yeast volatile organic compounds in the biological control of mycotoxin-producing fungi. *Toxins*. 2023;15(1):274-282. DOI 10.3390/toxins15010045.
- Ghanbarzadeh B., Ahari A.B., Sampaio J.P., Arzanlou M. Biodiversity of epiphytic and endophytic yeasts on grape berries in Iran. *Nova Hedwigia*. 2020;110:137-156. DOI 10.1127/nova_hedwigia/2020/0569.
- Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука. 1971:154-170.
- Калашников Ю.Е., Балахнина Т.И., Бенничели Р.П. Активность антиокислительной системы и интенсивность перекисного окисления липидов в растениях пшеницы в связи с сортовой устойчивостью к переувлажнению почвы // Физиология растений. 1999;46(2):268-275.
- Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чекалтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021;2:291-299. DOI 10.14258/jcprm.2021028250.
- Кабашникова Л.Ф., Абрамчик Л.М., Макаров В.Н., Зеневич Л.А., Черленок Ю.И., Козловская З.Я., Устинов В.Н., Савченко Г.Е. Характеристика пигментного аппарата интродуцированных сортов винограда // Вестник фонда

- фундаментальных исследований. 2011;1(55):30-43.
23. Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф., Слемнев Н.Н. Функции каротиноидов в листьях высших растений (обзор) // Журнал общей биологии. 2020;81(4):297-310. DOI 10.31857/S0044459620040065.
 24. Кабашникова Л.Ф. Фотосинтетический аппарат и стресс у растений. Мн.: Беларуская навука. 2014:1-267.
 25. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Серия: Физиология растений. 1989;6:111-123.
 26. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 2006;141:312-322. DOI 10.1104/pp.106.077073.
 27. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Высшая школа. 1993:1-271.
 28. Raal A., Boikova T., Püssa T. Content and dynamics of polyphenols in *Betula* spp. leaves naturally growing in Estonia. *Records of Natural Products*. 2015;9(1):41-48.
 29. Шалдаева Т.М., Костикова В.А., Высочина Г.И. Фенольные соединения *Agrimonia pilosa ledeb.* в зависимости от фазы развития растений // Химия растительного сырья. 2021;1:151-158. DOI 10.14258/jcprm.2021016628.
 30. Güler A., Candemir A. Total phenolic and flavonoid contents, phenolic compositions and color properties of fresh grape leaves. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*. 2014;1:778-782.
- ### References
1. Ming-Zhi Y., Mian-Di M. Fungal endophytes as a metabolic fine-tuning regulator for wine grapes. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163186. DOI 10.1371/journal.pone.0163186.
 2. Kuhn N., Guan L., Dai Z., Wu B.-H., Lauvergeat V., Gomès E., Li S.-H., Godoy F., Arce-Johnson P., Delrot S. Berry ripening: recently heard through the grapevine. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65:4543-4559. DOI 10.1093/jxb/ert395.
 3. Amarouchi Z., Esmaeel Q., Sanchez L., Jacquard C., Hafidi M., Vaillant-Gaveau N., Ait Barka E. Beneficial microorganisms to control the grey mold of grapevine: from screening to mechanisms. *Microorganisms*. 2021;9(7):138-146. DOI 10.3390/microorganisms9071386.
 4. Nascimento R., Maia M., Ferreira A., Silva A. da, Ponces A., Cordeiro C., Silva M., Figueiredo A. Early stage metabolic events associated with the establishment of *Vitis vinifera* – *Plasmopara viticola* compatible interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;137:1-13. DOI 10.1016/j.plaphy.2019.01.026.
 5. Pertot I., Caffi T., Rossi V., Mugnai L., Hoffmann C., Grando M.S., Gary C., Lafond D., Duso C., Thiery D., Mazzoni V., Anfora G. A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*. 2017;97:70-84. DOI 10.1016/j.cropro.2016.11.025.
 6. Esmaeel Q., Jacquard C., Clement C., Sanchez L., Barka E.A. Genome sequencing and traits analysis of *Burkholderia* strains reveal a promising biocontrol effect against grey mold disease in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;35:141-150. DOI 10.1007/s11274-019-2613-1.
 7. Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.-L., Touraine B., Moenne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4:356-368. DOI 10.3389/fpls.2013.00356.
 8. Aalipour H., Nikbakht A., Sabzalian M.R. Essential oil composition and total phenolic content in *Cupressus arizonica* G. in response to microbial inoculation under water stress conditions. *Scientific Reports*. 2023;13(1):120-129. DOI 10.1038/s41598-023-28107-z.
 9. Duo L.A., Liu C.X., Zhao S.L. Alleviation of drought stress in turfgrass by the combined application of nano-compost and microbes from compost. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65:419426. DOI 10.1134/S102144371803010X.
 10. Matic S., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. *Biological Control*. 2014;73:59-67. DOI 10.1016/j.biocontrol.2014.03.008.
 11. Fernandez San Millan A., Larraya L., Farran I., Ancin M., Veramendi J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control*. 2021;160:267-278. DOI 10.1016/j.biocontrol.2021.104683.
 12. Zhang Q., Zhao L., Li Z., Li C., Li B., Gu X., Zhang X., Zhang H. Screening and identification of an antagonistic yeast controlling postharvest blue mold decay of pears and the possible mechanisms involved. *Biological Control*. 2019;133:26-33. DOI 10.1016/j.biocontrol.2019.03.002.
 13. Rossetti A., Perpetuini G., Battistelli N., Zulli C., Arfelli G., Suzzi G., Cichelli A., Tofalo R. Capturing the fungal community associated with conventional and organic *Trebbiano Abruzzese* grapes and its influence on wine characteristics. *Food Bioscience*. 2023;52:352-364. DOI 10.1016/j.fbio.2023.102382.
 14. Spiczki M. *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*. 2020;8:186-194. DOI 10.3390/microorganisms8071029.
 15. Abdel-Kareem M.M., Zohri A.N., Elmohsen S. Novel marine yeast strains as plant growth-promoting agents improve defense in wheat (*Triticum aestivum*) against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2021;128:973-988. DOI 10.1007/s41348-021-00461-y.
 16. Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*. 2017;63:191-198. DOI 10.1016/j.fm.2016.11.021.
 17. Oufensou S., Hassan Z., Balmes V., Jaoua S., Migheli Q. Perfume guns: potential of yeast volatile organic compounds in the biological control of mycotoxin-producing fungi. *Toxins*. 2023;15(1):274-282. DOI 10.3390/toxins15010045.
 18. Ghanbarzadeh B., Ahari A.B., Sampaio J.P., Arzanlou M. Biodiversity of epiphytic and endophytic yeasts on grape berries in Iran. *Nova Hedwigia*. 2020;110:137-156. DOI 10.1127/nova_hedwigia/2020/0569.
 19. Shlyk A.A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts. *Biochemical Methods in Plant Physiology*. M.: Science. 1971:154-170 (in Russian).
 20. Kalashnikov Yu.E., Balakhnina T.I., Benniceli R.P. The activity of antioxidant system and the intensity of lipid peroxidation in wheat plants in connection with varietal resistance to waterlogging of the soil. *Physiology of Plants*. 1999;46(2):268-275 (in Russian).
 21. Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zagorskina N.V. Method for determining the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin-Denis reagent and Folin-Ciocalteu reagent: modification and comparison. *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2021;2:291-299. DOI 10.14258/jcprm.2021028250 (in Russian).
 22. Kabashnikova L.F., Abramchik L.M., Makarov V.N., Zenevich L.A., Cherlenok Yu.I., Kozlovskaya Z.Ya., Ustinov

- V.N., Savchenko G.E. Characteristics of pigment apparatus of introduced grape varieties. Bulletin of the Foundation for Fundamental Research. 2011;1(55):30-43 (*in Russian*).
23. Maslova T.G., Markovskaya E.F., Slemnev N.N. Functions of carotenoids in leaves of higher plants (a review). Journal of General Biology. 2020;81(4):297-310. DOI 10.31857/S0044459620040065 (*in Russian*).
24. Kabashnikova L.F. Photosynthetic apparatus and stress in plants. Mn.: Belarus Science. 2014;1-267 (*in Russian*).
25. Merzlyak M.N. Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes. Results of science and technology. Series: Plant Physiology. 1989;6:111-123 (*in Russian*).
26. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology. 2006;141:312-322. DOI 10.1104/pp.106.077073.
27. Zaprometov M.P. Fundamentals of biochemistry of phenolic compounds. M.: Higher School. 1974:1-271 (*in Russian*).
28. Raal A., Boikova T., Püssa T. Content and dynamics of polyphenols in *Betula* spp. leaves naturally growing in Estonia. Records of Natural Products. 2015;9(1):41-48.
29. Shaldayeva T.M., Kostikova V.A., Vysochina G.I. Phenolic compounds *Agrimonia Pilosa ledeb.* depending on the phase of plant development. Chemistry of plant raw materials. 2021;1:151-158. DOI 10.14258/jcprm.2021016628 (*in Russian*).
30. Güler A., Candemir A. Total phenolic and flavonoid contents, phenolic compositions and color properties of fresh grape leaves. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences. 2014;1:778-782.

Информация об авторах

Наталья Николаевна Волыничук, аспирант; e-мэйл: volynchuk.n@mail.ru;

Людмила Федоровна Кабашникова, д-р биол. наук, чл.-кор. Национальной академии наук Беларуси, доцент, зав. лабораторией прикладной биофизики и биохимии; e-мэйл: kabashnikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0111-2827>;

Любовь Валерьевна Пашкевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории прикладной биофизики и биохимии; e-мэйл: ljubi.k87@gmail.com;

Виктория Ивановна Лукша, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной биофизики и биохимии; e-мэйл: saphyjana2@gmail.com;

Ирина Николаевна Доманская, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной биофизики и биохимии; e-мэйл: domanin07@mail.ru.

Information about authors

Natalia N. Volynchuk, Postgraduate; e-mail: volynchuk.n@mail.ru;

Liudmila F. Kabashnikova, Dr. Biol. Sci., Corresponding Member of the NASB, Associated Professor, Head of the Laboratory of Applied Biophysics and Biochemistry; e-mail: kabashnikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0111-2827>;

Lyubov V. Pashkevich, Cand. Biol. Sci., Staff Scientist, Laboratory of Applied Biophysics and Biochemistry; e-mail: ljubi.k87@gmail.com;

Victoria I. Luksha, Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Laboratory of Applied Biophysics and Biochemistry; e-mail: saphyjana2@gmail.com;

Irina N. Domanskaya, Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Laboratory of Applied Biophysics and Biochemistry; e-mail: domanin07@mail.ru.

Статья поступила 08.08.2023, одобрена после рецензии 21.08.2023, принята к публикации 21.08.2023.