

УДК 634.836.3:630:576.8

Н. А. Мулюкіна., д-р біол. наук, ORCID 0000-0003-3176-9827
М. Б. Бузовська, канд. с.-г. наук, ORCID 0000-0003-1334-4171
Г. В. Ляшенко, д-р. геогр. наук, проф., ORCID 0000-0003-2069-8971
Г. К. Попова, наук. співр, ORCID 0000-0002-2714-5264
Е. Б. Мельник, канд. с.-г. наук, ORCID 0000-0002-9272-4625
В. І. Суздальова. мол. наук. співр.

Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

e-mail: tairmna2005@ukr.net
marbuz@ukr.net

ОЦІНКА ПОТЕНЦІАЛУ МІКРОБІОМУ ВИНОГРАДНОЇ ЯГОДИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТЕРУАРУ

Оцінено компоненти мікробіому виноградної ягоди, потенційно придатні для ідентифікації теруару. В статті проаналізовано результати досліджень вчених виноградарських країн світу стосовно мікробіому виноградної ягоди.

Ключові слова: мікробіом, виноградна ягода, теруар, дріжджі.

Розвиток виноградарсько-виноробної галузі в Україні вимагає розробки нових принципів, підходів та методів ідентифікації теруару, які спрямовані на забезпечення світового ринку високоякісною продукцією згідно з європейськими стандартами. На даному напрямку важливе значення надається встановленню основних чинників, які зображають зв'язки між продовольчою продукцією та екологічними умовами території та генетично детермінованими особливостями місцевої культури винограду та її мікробіому.

Впровадження результатів дослідження мікробіомів теруару у виноградарсько-виноробну галузь дасть можливість забезпечити наукове обґрунтування та підвищити точність процесів, які проводяться протягом тисячоліть. Це буде важливий крок вперед, оскільки допоможе поліпшити процес вибору ділянки для винограду або, власне, надати відомості щодо того, як ним можна маніпулювати за допомогою оптимізації видового складу мікрофлори, яка може поліпшити якість ґрунту, що безпосередньо впливає на врожайність винограду та якість вина.

Мета досліджень: оцінка сучасних методів ідентифікації теруару із застосуванням характеристик ландшафтно-екологічних умов, ДНК-ідентифікації ґрунтової мікробіоти, дріжджового компонента мікробіому ягоди.

Методи і методики досліджень: При вирішенні поставлених завдань буде застосовано аналітичний та порівняльний методи.

Результати та обговорення. Мікробіологічна ідентифікація теруару можлива шляхом оцінки специфічності видового складу мікробіомів ягід. Оцінюючи видове різноманіття зазначених мікробіомів, слід відштовхуватися як від загального різноманіття (кількості) таксонів різного рівня, так і від наявності таксонів (видів), специфічних для даного теруару.

В роботі Н. Morgan [1] зі співавторами (2017) відмічено, що мікробіом винограду є сукупністю міцеліальних грибів, дріжджів, а також бактерій. Різноманіття мікробіому виноградної рослини та винограду залежить від різних факторів: місцезнаходження винограду, природно-кліматичних умов, сорту винограду, агротехнічних прийомів, що використовуються.

Для комплексної оцінки мікробіому виноградної рослини та винограду необхідно

з'ясувати його видовий склад та роль окремих видів, оцінити їх потенційний внесок щодо якості винограду та вина. Для цього застосовують насамперед стандартні мікробіологічні методи виділення штамів. Вибірка матеріалу для аналізу мікробіому виноградної ягоди коливається зазвичай від декількох грон до кількох кілограмів винограду.

Бактеріальна та грибна мікрофлора ягід

Morgan H. et al. (2017) при проведенні досліджень використовували метод секвенування. Аналіз виноградної лози, квітів та ягід показав, що в бактеріальних спільнотах переважали *Proteobacteria*, а далі йшли *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* і *Bacteroidetes*. Відносна чисельність груп змінювалася в залежності від тканини та органів виноградної рослини. До домінуючих таксонів входять члени роду *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Frigoribacterium*, *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Citrobacter*, *Pantoea*, і *Methylobacterium* [1].

Ними також встановлено, що едофітне різноманіття виноградної ягоди в основному складається з видів *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Mesorhizobium*, *Propionibacterium*, *Dyella* і *Bacillus*. Вони відзначають, що структура бактеріальних спільнот коливається в залежності від сортового складу та агротехніки. Крім того, розвиток хвороби на виноградних насадженнях може призвести до появи різних структурних бактеріальних спільнот [1].

Було підтверджено, що деякі види, наприклад *Methylobacterium populi* та *Sphingomonas pseudosanguinis*, життєздатні в кінці ферментації, а також було показано, що популяції цього роду зберігаються на неферментуючих поверхнях. Однак необхідні подальші дослідження цих таксонів, щоб оцінити їх можливий вплив на ферментацію вина і якість вина [1].

Грибні спільноти, пов'язані з виноградною лозою, в основному досліджувалися у суслі після подрібнення. В цілому популяції грибів на рівні філума дуже схожі й в основному включають *Ascomycota* та *Basidiomycota*. Інші типи, такі як *Zygomycota* і *Chytridiomycota*, представлені тільки в невеликій кількості. Часто зустрічаються таксони нитчастих грибів (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Lewia*, *Davidiella*, *Erysiphe*, *Botrytis*), дріжджоподібних грибів (*Aureobasidium* пуллулан) та дріжджів (*Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Sporobolomyces* та *Torulasporea*) [1].

Регіональна диференціація складу мікробіомів ампелоценозів

Деякі дослідження показали, що для мікробіомів ампелоценозів притаманна регіональна диференціація – в різних регіонах переважають декілька видів. Бокуліч та ін. у 2014 р. продемонстрували значну асоціацію *Aspergillus* та *Penicillium spp.* в насадженнях винограду сорту Шардоне в долині Напа. *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Saccharomycetes* та *Erysiphe necator* переважали на Центральному узбережжі, а *Botryotinia fuckeliana* і *Proteobacteria* – в Сономі [2].

Pinto у 2015 р. показав, що *Lachancea* переважали в апелласьоні Алентежу, в той час, як *Rhodotorula* та *Botrytinia* домінували в апелласьоні Естремадура, *Hanseniaspora* та *Ramularia* – в Байррада, *Lachancea* та *Rhodotorula* – в Dão, *Rhodotorula* та *Erisyphe* – в Дора, та *Rhodotorula* і *Alternaria* – в Мінхо. Також слід зазначити, що на різноманіття грибів впливає агротехніка на виноградниках [3].

Технологічні впливи на склад мікробіому винограду

Дослідження [1] показують присутність дріжджів, таких як *Kazachstania*, *Malassezia*, *Schizosaccharomyces* і *Debaryomyces*, які зустрічаються з низькою частотою, а *Hanseniaspora* були виявлені наприкінці ферментації.

Встановлено, що *S. cerevisiae* дуже рідко зустрічається у виноградному суслі навіть при використанні технологій секвенування нового покоління. Однак грибне співтовариство у суслі в стадії ферментації має тенденцію бути менш різноманітним до кінця ферментації та в ньому переважають *Saccharomyces spp.* Проте, сильні ферментативні дріжджі, такі як *Lachancea*, *Starmerella* і *Schizosaccharomyces*, часто присутні на початку бродіння,

зберігаються до кінця ферментації.

Диференціація мікробіому в залежності від частини виноградної рослини

Опираючись на проведені дослідження, можна зробити висновок, що мікробіом виноградної ягоди та лози менш складний у порівнянні з іншими екосистемами, такими як ґрунт, і що більша частина видів дріжджів, пов'язаних з виноградною та винним середовищем, придатна для культивування.

Martins [4] та інші показали, що ґрунт і кора містять більшу різноманітність і видове багатство, ніж виноград і листя, і що популяції бактерій виявляють схожість між корою і ґрунтом.

Nicola Vitulo [5] зі співавторами (2019) було зібрано тридцять шість зразків виноградної ягоди і кори стовбура (штамба) в асептичних умовах на території двох різних виноробних районів, для кожної ділянки ідентифіковані три точки відбору проб в різних рядах. Зразки винограду зібрано у вересні, за кілька днів до збору врожаю; зразки кори виноградної насаджень – у червні та вересні (за кілька днів до збору врожаю, разом з ягодами винограду). Таким чином, на чотирьох виноградниках ними було зібрано три біологічних повторних зразка (12 зразків ягід та 24 зразки кори), які представляли два регіони. Склад поверхневої бактеріальної спільноти був вивчений за допомогою високопродуктивного секвенування амплікона регіону V3 - V4 гена 16S. Класифікація таксономії дозволила вченим виділити 14 типів, 36 класів (690 ASV), 48 порядків (663 ASV), 70 сімейств (608 ASV), 67 родів (292 ASV) і 15 видів (38 ASV). Nicola Vitulo зі співавторами (2019) встановлено, що домінуючими бактеріальними типами в зразках кори були *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* і *Chloroflexi*, домінуючими бактеріальними типами у зразках винограду були *Actinobacteria*, *Firmicutes* і *Proteobacteria*.

Ними також було підтверджено, що кора штамба виноградної рослини має значно більше видове різноманіття, ніж ягоди, що раніше спостерігалось як для бактерій, так і для грибів. Було виявлено всі шість класів бактерій, які раніше знайдені на корі виноградної рослини за допомогою культурально-залежних методів, в межах 35 класів, визначених за допомогою методу NGS. Цей метод дає можливість розрізняти таксони мікробів на порядок глибше, ніж підходи, які засновані на культурі, у середовищі виноградників.

Аналізуючи окремо мікробіом кори і ягоди винограду, вчені підтвердили, що регіон походження є найбільш важливим фактором, який впливає на популяції бактерій кори (за яким слідує агротехнічні прийоми та умови сезону), тоді як агротехніка є єдиною змінною, що істотно впливає на мікробіом винограду. Таким чином, ми можемо спостерігати диференціацію між бактеріомами, які можуть бути віднесені до різних теруарів, а не просто до різних місць, як це було раніше і в інших роботах. Завдяки результатам, які отримані іншими вченими, такими як Bokulich (2014 р.) [6], Portillo (2016 р.) [7], Marasco (2018 р.) [8], Mezzasalma (2018) [9] можна зробити висновок щодо впливу фактору території (теруару) на мікробіом винограду.

Висновок про те, що агротехнічні прийоми значно впливають на виноградною ягоду, ніж на мікробіом кори, раніше пропонувалося для грибів (Morrison-Whittle et al. 2017 р.) [10], проте, необхідні додаткові дослідження мікробіому кори протягом багатьох років, щоб встановити стійкість його мікробіоти та вплив на неї ландшафту та агротехнічних прийомів.

Iratxe Zarraonaindia [10] зі співавторами дослідження проводилися на виноградної насаджень сорту Мерло. Ними підтверджено, що на надземних зразках (листя, виноград, квіти) мікробіом був менш різноманітний, ніж на підземних зразках (ґрунт, коріння), а зразки коріння не були такими різноманітними, як зразки з ґрунту. У всіх надземних зразках переважали *Proteobacteria* (виноград, 80,7 %; листя, 90 %; квіти, 98 %), які також були у зразках ґрунту та коренів, хоча і в значно меншому ступені (32 % і 57 %).

Дослідження показали, що мікробні спільноти виноградної ягоди склалися з *Firmicutes*, *Acidobacteria* і *Bacteroidetes*. Проте у зразках квітів ними виявлено *Pseudomonas spp.* (61,8 %) і *Erwinia spp.* (25,2 %), а домінуючими таксонами були *Proteobacteria*.

Вчені припускають, що види таксонів *Pseudomonas* та *Sphingomonas*, які виявлені в надземних частинах рослин, впливають на здоров'я і продуктивність виноградних насаджень, а *Methylobacterium spp.*, які виявлені в листках та винограді, стимулюють розвиток рослин шляхом виробництва фітогормонів. *Sphingomonas* і *Methylobacterium spp.* можуть вижити в процесі ферментації, але їх вплив на органолептичні властивості вина залишається невідомим.

Походження мікробіоти за винної ферментації недостатньо вивчено, але, якщо не робити їх інокуляцію, прийнято вважати, що вони походять з самого винограду; проте деякі види можуть надходити також з обладнання виноробні та бочок. Результати цього дослідження свідчать про те, що структури мікробіомних угруповань були найбільш схожі між зразками винограду і сусла, що дозволяє припустити, що спільноти, які присутні на винограді до ферментації, залишаються відносно стабільними або, принаймні, більш стабільними, ніж відмінності між органами виноградної рослини. Незважаючи на це, при порівнянні філотипів (загальних для різних типів зразків), у зразках з Каліфорнії спостерігається більше видів бактеріальних таксонів з ґрунтом, ніж зі зразками винограду. Це може бути пов'язано з методами збору врожаю і транспортуванням, коли зібраний виноград (який є частиною сусла), міг отримати значний внесок філотипів мікроорганізмів з ґрунту при ручному зборі врожаю, оскільки цей виноград зазвичай зберігається в ящиках, розташованих на землі.

На присутність мікробіому ґрунту на ягодах впливає також і механічний збір врожаю, оскільки машини генерують пил із ґрунту, який може осідати на виноград. Martins et al. (2013) [4] запропонували аналогічну ідею, припускаючи, що пил, який утворюється при обробці ґрунту, може сприяти міграції мікроорганізмів з ґрунту в надземні частини, де вони будуть закріплюватися у вигляді епіфітів винограду.

Враховуючи вищевикладене, за допомогою метагеномних підходів можливо дослідити всю мікробну популяцію, а не лише одну групу, як це зазвичай робиться за допомогою культуральних методів. При цьому можна оцінити динаміку популяції під час ферментації та комплекси хвороб виноградної лози та виявити унікальні мікробіоми, які присутні у винограді.

Висновок. Внаслідок аналізу численних даних зарубіжних дослідників оцінено потенціал компонентів мікробіому виноградної ягоди для ідентифікації теруару. В цілому оцінка різноманіття мікробіому виноградної ягоди призводить до висновку щодо потенційної можливості його використання для ідентифікації теруару через значну різноманітність складу порівняно з іншими частинами виноградної рослини. Виходячи з даних, отриманих науковцями ряду виноградарських країн світу, слід зазначити, що таким «ідентифікатором» можуть стати види дріжджів, тим більше, що вони дозволяють характеризувати не лише рослинне угруповання, але й винопродукцію і ґрунти.

Список використаних джерел

1. Horatio H. Morgan, Maret du Toit and Mathabatha E. Setati. The Grapevine and Wine Microbiome : insights from High-Throughput Amplicon Sequencing. *Front. Microbiol.* 11 May 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820>.
2. Bokulich N. A., Thorngate J. H., Richardson P. M. and Mills D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. P. E139–E148. doi: 10.1073/pnas.1317377110.
3. Pinto C., Pinho D., Cardoso R. et al. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. P. 905. doi: 10.3389/fmicb.2015.00905.
4. Martins G., Lauga B., Miot-Sertier C. et al. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLoS One.* 2013. Vol. 8. E73013. doi: 10.1371/journal.pone.0073013].

5. Nicola Vitulo¹, Wilson José Fernandes Lemos Jr.¹, Matteo Calgaro¹, Marco Confalone¹, Giovanna E. Felis¹, Giacomo Zapparoli¹ and Tiziana Nardi². Bark and Grape Microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of Geographic Patterns and Agronomic Management on Bacterial Diversity. *Front. Microbiol.* 08 January 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03203>.
6. Bokulich N. A., Thorngate J. H., Richardson P. M., and Mills D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. E139–E148. doi: 10.1073/pnas.1317377110].
7. Portillo M., Del C., Franquès J., Araque I., Reguant C., and Bordons A. Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 2016. Vol. 219 P. 56–63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002.
8. Marasco R., Rolli E., Fusi M., Michoud G., and Daffonchio D. Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome.* 2018. Vol. 6. P. 3. doi: 10.1186/s40168-017-0391-2].
9. Mezzasalma V., Sandionigi A., Guzzetti L. et al. Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in northern Italy and Spain vineyards. *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 946. doi: 10.3389/fmicb.2018.00946.
10. Morrison-Whittle P., Lee S. A. and Goddard M. R. Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2017. Vol. 246. P. 306–313. doi: 10.1016/j.agee.2017.05.022.
11. Iratxe Zarraonaindia, Sarah M. Owens, Pamela Weisenhorn et al. The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>].

N. Muljukina, M. Buzovska, G. Lyashenko, G. Popova, E. Melnyk, V. Suzdalova

National Science Center “V.Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking”

ASSESSMENT OF THE GRAPE BERRY MICROBIOME POTENTIAL FOR TERROIR IDENTIFICATION

The components of the grape berry microbiome, potentially suitable for terroir identification, were evaluated. The results of world wine-growing countries researches regarding the grape berry microbiome were analyzed.

Keywords: microbiome, grapeberry, terroir, yeast.