

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА,  
ЭКОЛОГИЯ**

УДК 641.46 : 582.23.017.64

© А. М. Глушакова, И. Ю. Чернов

**ДИНАМИКА ДРОЖЖЕВЫХ СООБЩЕСТВ  
В ПЛОДАХ ШИПОВНИКА (ROSA CANINA L.)**GLUSHAKOVA A. M., CHERNOV I. Yu. YEAST COMMUNITIES DYNAMICS  
IN FRUITS OF HEDGE ROSE (ROSA CANINA L.)

Долгое время считалось, что ассоциированные с растениями сапротрофные микроорганизмы обитают только на их поверхности. Ткани здорового растения, особенно меристематические, абсолютно стерильны, и размножение микроорганизмов внутри растения представляет собой патологический процесс. Исключением являются специализированные симбионты, такие как клубеньковые бактерии или грибы эндотрофной микоризы. В последние годы появляется все больше сведений о способности многих бактерий и грибов размножаться в растительных тканях под кутикулярным покровом (Cao et al., 2002; Muller, Krauss, 2005; Santamaria, Bayman, 2005; Jordaanb et al., 2006). При этом эндофитное развитие микроорганизмов расценивается как реализация стратегии избегания неблагоприятных факторов, таких как солнечная радиация и иссушение. До сих пор не вполне понятно, можно ли считать эндофитный рост мутуалистическим или проявлением скрытого (латентного) паразитизма (Schulz, Boyle, 2005; Kogel et al., 2006). Наиболее детально исследованы эндофитные грибы злаков, имеющие практическое значение в связи со снижением кормовой ценности зараженных растений (Благовещенская, 2006).

К числу наиболее характерных эпифитных эккрисотрофных микроорганизмов, активно размножающихся на поверхности листьев растений, относятся дрожжевые грибы. Однако сведения о существовании эндофитных дрожжей практически отсутствуют. Имеются лишь единичные работы, посвященные выделению дрожжевых клеток из ксилемы и других внутренних тканей растений, но результаты этих исследований сомнительны и требуют подтверждения (Zhao et al., 2002). Многие виды эпифитных дрожжей обладают липолитическими и пектинолитическими ферментами, что может позволить им проникнуть во внутренние ткани с поверхности, в результате локального разрушения кутикулы. В отличие от мицелиальных грибов одноклеточные дрожжи не способны распространяться за счет апикального роста по межклеточному пространству. Кроме того, дрожжи относятся к типичным копиотрофам, для роста и размножения которых требуется относительно высокая концентрация легкодоступных соединений. Учитывая эти особенности, можно предположить, что эндофитно дрожжи могут достаточно активно развиваться лишь в тех частях растений, которые характеризуются неплотным сложением и высокой концентрацией простых сахаров. Проведенные авторами статьи предварительные исследования показали, что внутри неповрежденных плодов многих растений действительно встречаются дрожжи, численность которых особенно велика в созревших высокосахаристых плодах. Знание масштабов распространения и закономерностей развития таких эндокарпных дрож-

жей может быть полезным не только для более детальных представлений об особенностях экологии этих микроорганизмов, но и иметь практический аспект, связанный с разработкой методов хранения и контроля качества сельскохозяйственной продукции. Эндокарпные дрожжи в съедобных плодах могут также служить источником аллергических реакций.

Одним из видов растений, в плодах которого в ходе предварительных исследований дрожжи обнаруживались постоянно и в высоком обилии, был шиповник (*Rosa canina* L.). В настоящей работе представлены результаты более детальных исследований динамики численности и таксономического состава группировок дрожжей в плодах шиповника.

## Материал и методы

Образцы плодов шиповника отбирали в двух пунктах: на территории заповедника Лосинный остров и в окрестностях станции Лобня. Целые неповрежденные плоды отбирали каждые 1—2 недели, начиная с момента формирования плодов в июне 2005 г. и заканчивая почти полным их разложением в марте 2006 г. В каждый срок анализировали по 10—20 плодов. Всего было проанализировано 934 плода. Для анализа численности и видового состава дрожжей каждый плод помещали в пробирку, заливали 5 мл стерильной воды, обрабатывали на вортексе 2 мин. Смыв высевали на глюкозо-пептонную среду, подкисленную молочной кислотой до pH 4—4.5. Далее поверхность отмытых плодов стерилизовали 96%-м спиртом, снимали экзокарпий, измельчали оставшуюся часть плода, помещали ее в пробирки, заливали стерильной водой так, чтобы получить разведение 1 : 50. После обработки суспензии на вортексе в течение 2 мин ее также высевали на подкисленную глюкозо-пептонную среду. Посевы инкубировали при комнатной температуре 5—7 суток. Выросшие колонии дрожжей с помощью бинокулярной лупы разделяли на морфологические типы, и подсчитывали число колоний каждого типа. Представителей каждого типа колоний выделяли в чистую культуру и идентифицировали по морфологическим и физиологическим признакам с использованием определителя (*The Yeasts...*, 1998) и дополнительных ключей и определительных таблиц (*Fonseca et al.*, 2000). Для каждого плода определяли общую численность дрожжей и численность каждого вида внутри и снаружи плода в КОЕ/плод (масса одного плода в среднем около 0.7 г).

## Результаты и обсуждение

Дрожжи присутствовали практически во всех исследованных плодах. Максимальная численность их была зафиксирована в середине сентября и составила  $7.6 \times 10^7$  КОЕ/плод. При этом в 94 % случаев дрожжи были обнаружены не только на поверхности, но и внутри плода, т. е. после удаления экзокарпия. Однако в среднем численность дрожжей внутри плодов была меньше ( $8.1 \times 10^5$  КОЕ/плод), чем на поверхности ( $6.2 \times 10^6$  КОЕ/плод).

В ходе онтогенеза плодов количество дрожжей существенно изменялось (рис. 1). Численность дрожжей на поверхности молодых только что сформировавшихся плодов достигала  $10^6$  КОЕ/плод, затем в течение лета снизилась до  $10^5$  и снова возросла до  $10^6$  КОЕ/плод осенью. Далее, в течение всей зимы количество дрожжей на поверхности плодов существенно не изменялось и оставалось на уровне  $10^5$ — $10^6$  КОЕ/плод до их полного разрушения в марте. Динамика численности дрожжей внутри плода носила иной характер. В молодых плодах количество дрожжей не превышало  $10^3$  КОЕ/плод и затем в течение всего онтогенеза закономерно увеличивалось, достигнув максимума в конце зимы и весной, к моменту разрушения плодов.

Всего на плодах шиповника было обнаружено 20 видов дрожжевых грибов (см. таблицу). Однако большинство из них было выделено лишь в отдельные сроки

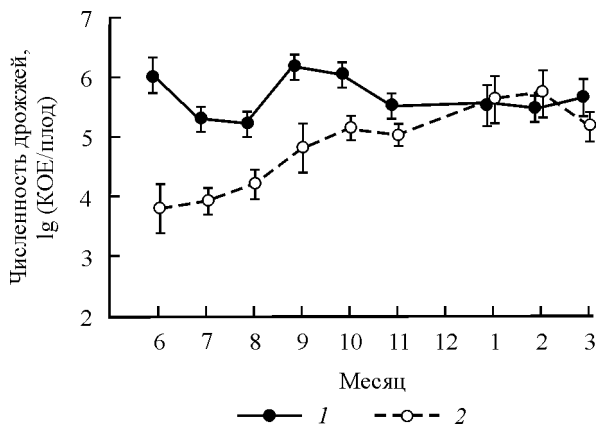


Рис. 1. Динамика общей численности дрожжей на поверхности (1) и внутри (2) плодов шиповника. Точки — среднемесячные значения, вертикальные отрезки — ошибки среднего. То же для рис. 2.

проведения анализа и только в одном из пунктов. Только 4 вида встречались постоянно, в обоих исследованных пунктах и во все сроки анализа. Это широко распространенные виды дрожжей, часто обнаруживаемые на различных растительных субстратах. Среди них *Cryptococcus albidus* — один из наиболее часто встречающихся эврибионтных анаморфных видов из порядка *Filobasidiales*, характеризующийся высокой изменчивостью и экологической пластичностью, представляющий комплекс множества близких форм, некоторые из которых были недавно описаны как самостоятельные виды на основании различий в последовательностях рДНК (Fonseca et al., 2000). Они также могут быть диагностированы на основании расширенного физиологического спектра, включающего тесты на ассимиляцию ароматических соединений и альдаровых кислот (Fonseca et al., 2000). Среди выделенных нами штаммов филобазидиевых криптококков подавляющее большинство соответствовало описанию *C. al-*

#### Среднее относительное обилие видов дрожжей на поверхности и внутри плодов шиповника

Вид	На поверхности	Внутри
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> Pijper	26.5	32.7
<i>Cystofilobasidium capitatum</i> (Fell et al.) Hamamoto et al.	20.6	19.4
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Pitt et Miller	17.0	14.6
<i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) Skinner	15.3	6.3
<i>Candida kunwiensis</i> Hong Soon Gyu et al.	5.1	6.7
<i>Candida oleophila</i> Montrocher	3.6	5.5
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) Harrison	3.6	5.0
<i>Cryptococcus magnus</i> (Lodder et Kreger) Baptist et Kurtzman	3.7	2.8
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Zopf) Lodder et Kreger	0	4.3
<i>Rhodotorula</i> sp. 1	2.3	0
<i>Tremella encephala</i> Pers.	1.2	0
<i>Rhodotorula</i> sp. 2	0	1.1
<i>Rhodotorula</i> sp. 3	0.8	0
<i>Rhodotorula vanillica</i> Sampaio	0	0.7
<i>Cryptococcus wieringae</i> Fonseca et al.	0	0.7
<i>Candida</i> sp. 1	0	0.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Jorgensen) Harrison	0.1	0
<i>Sporobolomyces</i> sp.	0.1	0
<i>Rhodotorula fujisanensis</i> (Soneda) Johnson et Phaff	0	0.1
<i>Cryptococcus diffluens</i> (Zach) Lodder et Kreger	0.1	0

*bidus sensu stricto*, однако несколько однократно выделенных штаммов были более сходны с описанием близкого вида *C. wieringae*. Кроме того, достаточно регулярно встречались представители другого близкородственного вида — *C. magnus*. Все эти виды филогенетически достаточно близкие, их трудно различить на основании морфологии колоний, поэтому при дальнейшем анализе мы их рассматриваем в качестве единой группы филобазидиевых криптококков.

Еще один доминирующий на плодах шиповника вид дрожжевых грибов — *Cystofilobasidium capitatum* — представитель диморфных телиоспоровых базидиомицетов, один из наиболее обычных видов обитателей свежих и особенно разлагающихся растительных остатков в лесной полосе умеренной зоны (Максимова, Чернов, 2004).

Два других доминанта представлены аскомицетовыми видами *Hanseniaspora guilhermondii* и *Metschnikowia pulcherrima*, широко распространенными в природных местообитаниях. Представители рода *Hanseniaspora* встречаются на растениях, в почве, причем особенно часто обнаруживаются на различных высокосахаристых сочных плодах (Rossini et al., 1982); *M. pulcherrima* — один из наиболее типичных обитателей цветочного нектара (Бабьева, Горин, 1973).

В дрожжевых сообществах, формирующихся на плодах шиповника, эти виды составили круг потенциальных доминантов. Как правило, на отдельном плоде на долю одного из них приходилось более 50—60 % от общей численности дрожжей. В редких случаях на отдельных плодах преобладали другие виды дрожжей: анаморфные аскомицеты (*Candida* spp.) и краснопигментированные базидиомицеты *Rhodotorula glutinis*.

Все перечисленные виды были обнаружены как на поверхности, так и внутри плодов, причем средние за весь срок наблюдений показатели их обилия различались достоверно, но незначительно. Исключением являются филобазидиевые криптококки *Cryptococcus albidus/magnus*, среднее относительное и абсолютное обилие которых на поверхности существенно выше. Все виды, которые были обнаружены только на поверхности или только в мякоти плода, являются минорными, их среднее относительное обилие не превышало 5 %.

Численность доминирующих видов дрожжей изменялась в течение онтогенеза плодов, причем характер динамики был различным для разных видов (рис. 2). Филобазидиевые криптококки были наиболее обильны на поверхности молодых плодов в середине лета, затем их численность сокращалась и в течение зимы они находились редко. Численность криптококков внутри плодов была существенно ниже, причем обнаруживали их здесь почти исключительно в летний период. Динамика численности *Cystofilobasidium capitatum* характеризовалась наличием максимума в начале осени и особенно сильным подъемом весной, перед разрушением плодов. При этом характер динамики на поверхности и внутри плодов был одинаковым. Доминирующие аскомицетовые виды имели максимумы численности в разные периоды: численность *Metschnikowia pulcherrima* была наиболее высокой на поверхности молодых плодов в июне, а внутри плодов — в конце лета и в сентябре. Зимой этот вид находили очень редко. Напротив, апикулятные дрожжи рода *Hanseniaspora* отсутствовали на только что сформировавшихся плодах и имели максимальную численность в сентябре—октябре на поверхности и в середине зимы внутри плодов.

Полученные данные показывают, что дрожжевые грибы могут активно размножаться как на поверхности, так и внутри растительных тканей, по крайней мере в сахаросодержащих плодах. При этом численность дрожжей постепенно возрастает по мере созревания и дальнейшего старения плода. Так как видимых повреждений плода при этом не возникает, остается предположить, что внутри плода дрожжи также выполняют функцию подбора простых сахаров и не образуют активных гидролитических ферментов, разрушающих ткани плода.

Возникает вопрос о механизме попадания дрожжей внутрь плода. Здесь возможны два варианта. Во-первых, дрожжевые клетки могут сохраняться в плоде в процессе его формирования из цветка. Хорошо известно, что в цветочном нектаре развиваются разнообразные дрожжевые группировки, которые могут оставаться в разрастающемся плоде и в дальнейшем размножаться после накопления достаточного количества

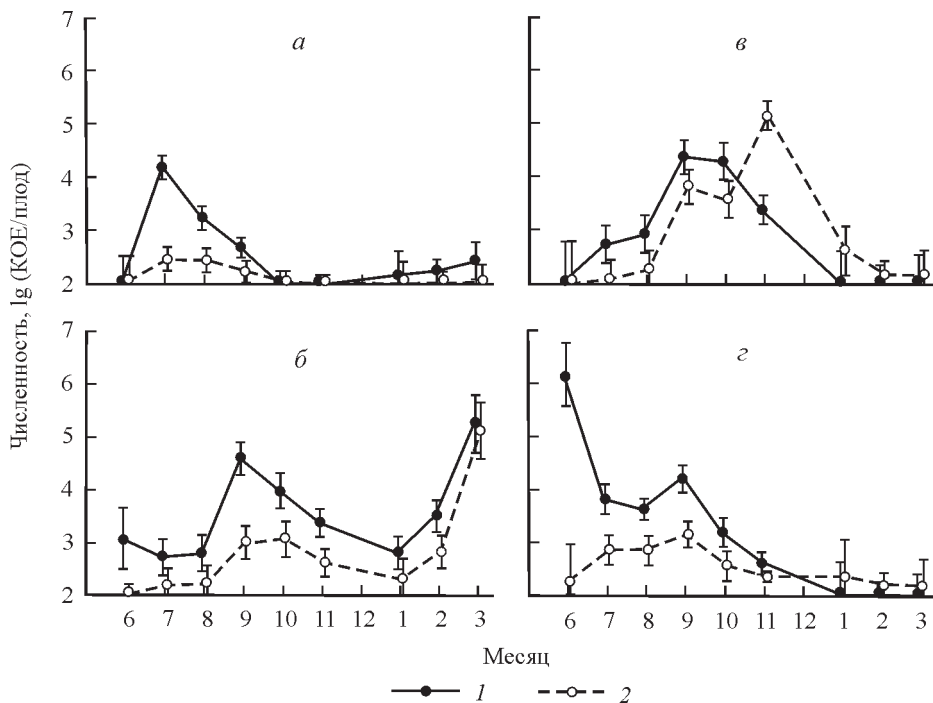


Рис. 2. Динамика численности доминирующих видов дрожжей на плодах шиповника.  
 а — *Cryptococcus albidus/magnus*, б — *Cystofilobasidium capitatum*, в — *Hanseniaspora guilliermondii*, г — *Metschnikowia pulcherrima*.

свободных сахаров. Во-вторых, дрожжевые клетки могут попадать в плод через микроповреждения покровных тканей.

Ранее нами было обнаружено (неопубликованные данные), что в некоторых плодах, обладающих плотными покровами, исключая случайное попадание микробных клеток внутрь, в частности в плодах дуба и конского каштана, также присутствуют дрожжи. При этом видовой состав дрожжевого населения экзокарпия и внутренних тканей, окружающих семена, существенно различался. По-видимому, в этих случаях дрожжи попадают в плод из нектара, сохраняются в семядолях и размножаются при активизации процесса развития зародыша, который сопровождается гидролизом крахмала и образованием легкодоступных сахаров.

Таксономический состав сообществ внутри плодов шиповника не специфичен и представлен теми же видами, что и на их поверхности. Поэтому более вероятным представляется частое попадание дрожжевых клеток внутрь плода с поверхности. Плоды шиповника (цинарродии) представляют собой многоорешки, у которых суккулентизации подвергся гипантий (сросшиеся основания лепестков, чашелистиков и тычинок). Попадание дрожжевых клеток внутрь гипантия возможно в результате нарушения целостности его покровных тканей. Это регулярно происходит по мере созревания и старения непадающих плодов, начиная с середины лета (конец июня—июль). Кроме того, в верхней части гипантия элементы цветка часто остаются практически свободными, и по мере созревания плода связь между ними постепенно ослабевает, что также создает возможность попадания эпифитных дрожжей во внутренние ткани гипантия. Как следствие этого, наблюдался сходный таксономический состав и особенности временной динамики дрожжевых группировок на поверхности и внутри плода.

Тем не менее имеются определенные различия в характере дрожжевых сообществ внутри и на поверхности плодов. На поверхности плода на протяжении всего онтогенеза выше значимость базидиомицетовых дрожжей. Как уже отмечалось, в первую

очередь это касается филобазидиевых криптококков, которые были особенно многочисленны на молодых плодах. Численность пигментированных диморфных базидиомицетов, среди которых доминирует *Cystofilobasidium capitatum*, также несколько выше на поверхности на протяжении всего онтогенеза. Относительное обилие аскомицетовых дрожжей в среднем приблизительно одинаковое как внутри, так и на поверхности плода. Однако, как видно из данных, приведенных на рис. 2, увеличение численности доминирующих аскомицетов *Metschnikowia pulcherrima* и *Hanseniaspora guilliermondii* внутри плода начинается несколько позже того периода, когда наблюдается максимум их численности на поверхности. В незначительной численности эти виды сохранялись в тканях плодов до их полного разрушения в марте, тогда как на поверхности они перестали встречаться, начиная с января. Это наводит на мысль о том, что эндокарпное развитие аскомицетовых дрожжей можно рассматривать как стратегию избегания неблагоприятных факторов. Считается, что возникновение истинного эндофитного образа жизни у некоторых бактерий и мицелиальных грибов связано именно с избеганием негативного влияния факторов, лимитирующих рост эпифитных микроорганизмов, прежде всего солнечной инсоляции (Lindow, Brandl, 2003). В отличие от аскомицетовых дрожжей диморфные базидиомицеты обладают комплексом морфологических признаков, в частности каротиноидной пигментацией, полисахаридными капсулами, которые, судя по их распространению, являются адаптациями именно к эпифитному образу жизни. С другой стороны, диморфные базидиомицеты — в основном строгие аэробы, в отличие от способных к брожению аскомицетовых дрожжей должны хуже развиваться в микроаэрофильных условиях в тканях плода.

На основании имеющихся в настоящее время данных рано говорить о распространности и ценотической роли эндофитных дрожжей. Однако на примере плодов шиповника нами был, вероятно, обнаружен один из возможных вариантов, а именно неспецифическое псевдоэндофитное сообщество, возникающее в результате достаточно легкого попадания клеток эпифитных дрожжей внутрь плода. Явление массового размножения дрожжей внутри сахаросодержащих плодов, по-видимому, распространено достаточно широко и, несомненно, требует более детальных исследований.

Работа выполнена при финансовом содействии РФФИ (грант № 07-04-00481) и программы Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ РФ (грант № НШ-8797.2006.4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бабьева И. П., Горин С. Е. О спорообразовании и жизненном цикле *Metschnikowia pulcherrima* и *M. teukaufii* в природе // Вест. МГУ, сер. Биология, почвоведение. 1973. № 5. С. 82—85.

Благовещенская Е. Ю. Эндофитные грибы злаков: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2006. 124 с.

Максимова И. А., Чернов И. Ю. Структура сообществ дрожжевых грибов в лесных биогеоценозах // Микробиология. 2004. Т. 73, вып. 4. С. 558—556.

Sao L. X., You J. L., Zhou S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 18, N 2. P. 169—171.

Fonseca A., Scorzett G., Fell J. W. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis // Can. J. Microbiol. 2000. Vol. 46. P. 7—27.

Jordaanb A., Taylor J. E., Rossenkhan R. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana // South African J. Bot. 2006. Vol. 72. P. 245—255.

Kogel K. H., Franken P., Hückelhoven R. Endophyte or parasite — what decides? // Curr. Opin. in Plant Biol. 2006. Vol. 9. P. 358—363.

Lindow S. E., Brandl M. Microbiology of the phyllosphere // Appl. Environm. Microbiol. 2003. Vol. 69, N 4. P. 1875—1883.

Müller C. B., Krauss J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes // Curr. Opin. in Plant Biol. 2005. Vol. 8. P. 450—456.

Rossini G., Fedetici F., Martini A. Yeast flora of grape berries during ripening // Microbiol. Ecol. 1982. Vol. 8. P. 83—89.

Santamaria J., Bayman P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*) // Microbiol. Ecol. 2005. Vol. 50, N 1. P. 1—8.

Schulz B., Boyle C. The endophytic continuum // Mycol. Res. 2005. Vol. 109. P. 661—686.

The Yeasts, a taxonomic study / Eds C. P. Kurtzman, J. W. Fell. 5th revised and enlarged edition. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1998. 1055 p.

Zhao J. H., Bai F. Y., Guo L. D., Jia J. H. *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from zylem of pine twigs // Fems Yeast Res. 2002. Vol. 2, N 2. P. 159—163.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова  
yes@soil.msu.ru

Поступила 20 V 2008

### РЕЗЮМЕ

На примере плодов шиповника показано, что разнообразные дрожжевые сообщества формируются не только на их поверхности, но и во внутренних тканях. Общая численность эндофитных дрожжей постепенно увеличивается в ходе онтогенеза плодов и достигает максимума в перезревших плодах, перед их разрушением. Эндофитные дрожжевые группировки представлены в основном теми же видами, что и на поверхности плодов, среди которых доминируют филобазидиевые криптококки — *Cystofilobasidium capitatum*, *Metschnikowia pulcherrima* и *Hanseniaspora guilliermondii*. Их численность существенно меняется в течение онтогенеза плодов, причем каждый вид характеризуется особым типом динамики. Значимость базидиомицетовых дрожжей в среднем несколько выше на поверхности плодов. Численность эпифитных и эндофитных аскомицетовых дрожжей в среднем одинакова, однако внутри плода аскомицеты появляются позже и сохраняются дольше, поэтому их эндофитное развитие можно рассматривать как стратегию избегания неблагоприятных факторов. Наиболее вероятным механизмом формирования эндофитных сообществ представляется регулярное попадание дрожжевых клеток внутрь плода через микроповреждения покровных тканей и верхнюю часть гепантия.

Ключевые слова: дрожжи, шиповник, эпифитные микроорганизмы, эндофиты, сезонная динамика.

### SUMMARY

Composition of yeast communities in fruits of hedge rose (*Rosa canina* L.) was investigated during all ontogenetic periods from primordium to fruits' destruction. Yeasts were found to be numerous and diverse not only on surface of fruits but also inside. The whole number of yeasts inside fruits gradually increased during ripening and was maximal in winter before their destruction. Species composition of yeasts inside fruits and on fruit's surface was similar. The dominant species were represented by *Cryptococcus albidus* and related filobasidious species, *Cystofilobasidium capitatum*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Hanseniaspora guilliermondii*. The relative abundance of these species changed during fruits ripening, and each species was characterized by its own type of dynamic. The abundance of basidiomycetous yeasts was higher on fruit's surface while ascomycetous yeasts were more numerous inside ripe fruits. So the outgoing of ascomycetous yeasts inside fruits in winter is assumed to be the strategy to escape negative factors.

Key words: yeasts, hedge rose (*Rosa canina*), epiphytic microorganisms, endophytes, seasonal dynamics.