

На правах рукописи



НИТЯГОВСКИЙ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ

**АКТИВАЦИЯ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ВИНОГРАДА
VITIS AMURENSIS RUPR. ПОСРЕДСТВОМ ЭНДОФИТНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2024

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» и лаборатории биотехнологии ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Санина Нина Михайловна

Официальные оппоненты: **Кулуев Булат Разяпович**
доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений

Мельникова Дарья Игоревна
кандидат биологических наук, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, научный сотрудник лаборатории фармакологии

Ведущая организация: ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» СО РАН, г. Иркутск

Защита состоится «28» января 2025 г. в «14:00» часов на заседании диссертационного совета Д 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан « » декабря 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Виноград является одной из самых востребованных и экономически-важных агрокультур в мире (Alston, Sambucci, 2019). На Дальнем Востоке России распространены дикорастущие виды *Vitis amurensis* Rupr. и *V. coignetiae* Pulliat ex Planch. На виноградниках Приморского края культивируются сорта *V. vinifera* × *V. amurensis* cv. Адель, *V. riparia* × *V. vinifera* cv. Мукузани, *V. labrusca* × *V. riparia* cv. Альфа и *Vitis* Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар. Важность винограда обусловлена его питательными свойствами – он содержит много витаминов, минералов и полифенольных соединений, в частности, стильбенов, обладающих антиоксидантными свойствами. Растения винограда довольно сильно подвержены воздействию внешней среды и заболеваниям разной этиологии (Kedage *et al.*, 2007). Для дальневосточных сортов винограда обычными патогенами являются *Botrytis cinerea* и *Plasmopara viticola*, вызывающие такие заболевания, как серая гниль и милдью, которые ежегодно встречаются на виноградных плантациях по всему миру (Wilcox *et al.* 2015). В последние годы активно изучается влияние эндофитных бактерий и грибов растений и препаратов на их основе на устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам, а также на урожайность растений и качество продукции, в том числе на содержание в ней полезных для здоровья человека веществ (Aly *et al.*, 2011; Reinhold-Hurek, Hurek, 2011). Эндофитами принято считать бактерии и грибы, которые колонизируют внутреннюю часть растения, не вызывая повреждений (Чеботарь и др. 2015; Pacifico *et al.* 2019; Vandana *et al.* 2021). Они действуют комплексно, потому что могут являться источниками новых биологически-активных веществ, в частности фунгицидов, а также запускать другие механизмы борьбы с патогенами, например, иммунитет растения и биосинтез защитных вторичных метаболитов (Vandana *et al.* 2021). Как и все растения, виноград *V. amurensis* является потенциальным источником «полезных» эндофитов, которые могут использоваться для улучшения роста и повышения устойчивости к стрессам у винограда и других растений. Таким образом, развитие новых подходов усиления защитных свойств растений и повышения качества биохимического состава плодов на основе эндофитных микроорганизмов из *V. amurensis* является актуальной задачей.

Степень разработанности темы

Некоторые микроорганизмы, населяющие виноград *V. vinifera* L., имеют способность угнетать рост патогенных грибов и бактерий, а также проявляют способность синтезировать ауксины, производить минерализацию слаборастворимых солей фосфора, обладают ферментативной активностью, что в свою очередь способствует росту растения (Campisano *et al.*, 2015; Shcherbakov *et al.*, 2016; Andreolli *et al.*, 2016). В настоящее время мало что известно об эндофитах и патогенах винограда, произрастающего на Дальнем Востоке. Ранее китайскими учеными был описан новый патогенный гриб

Fusarium avenaceum, поражающий плоды *V. amurensis* (Wang *et al.*, 2015). Также было показано, что эндофитный гриб *Albifimbria verrucaria*, выделенный из амурского винограда, активен против *B. cinerea* (Li *et al.*, 2020). На этом список работ, посвященных исследованию микроорганизмов, населяющих и поражающих виноград *V. amurensis*, исчерпывается. Обзор современных исследований показывает, что необходимы дальнейшие активные исследования патогенов и эндофитов дикорастущих видов винограда, произрастающих на территории Азиатско-тихоокеанского региона, для разработки простых и безопасных подходов для защиты растений винограда и развития виноградарства на Дальнем Востоке России.

Цель и задачи исследования

Цель работы – изучить состав эндофитных бактерий и грибов винограда, произрастающего на Дальнем Востоке России, в том числе для оценки встречаемости основных патогенов винограда и их раннего выявления, с перспективой создания биопрепаратов на основе эндофитов, активирующих защитные свойства винограда.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить состав эндофитных бактерий и грибов в тканях дикорастущих видов винограда *V. amurensis* и *V. coignetiae*, произрастающих на Дальнем Востоке России, а также широко культивируемых сортов винограда Адель, Мукузани, Альфа и Прэйри стар, возделываемых в Приморском крае. Создать коллекции чистых культур эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis*.

2. Оценить встречаемость возбудителя ложной мучнистой росы винограда *P. viticola* на Дальнем Востоке России с использованием данных высокопроизводительного секвенирования. Выявить эндофитные микроорганизмы, которые являются возможными антагонистами этого патогена, используя биоинформатические подходы.

3. Разработать метод ранней идентификации возбудителя ложной мучнистой росы винограда, основанный на количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) с применением флуоресцентного красителя SYBR Green I.

4. Изучить влияние основных эндофитов *V. amurensis* на активацию его защитных свойств.

5. Произвести поиск эндофитных микроорганизмов из амурского винограда, способных сдерживать рост широко распространенных патогенов растений, в частности возбудителя серой гнили винограда *B. cinerea*, и установить молекулярно-генетические механизмы антипатогенной активности у найденных микроорганизмов.

Научная новизна

Впервые изучен эндофитный микробиом произрастающего на Дальнем Востоке России дикого винограда *V. amurensis* и *V. coignetiae*, а также культурных сортов винограда, используемых на виноградниках Приморского края. Впервые была оценена встречаемость возбудителя милдью *P. viticola* на винограде Дальнего Востока России и *in silico* получена информация о

потенциальных микроорганизмах-антагонистах *P. viticola*. Предложен новый эффективный и недорогой метод выделения ДНК для высокопроизводительного секвенирования. Разработан новый способ ранней диагностики *P. viticola* в винограде с помощью ПЦР РВ. Впервые штаммы эндофитных грибов и бактерий *V. amurensis* были применены для индукции биосинтеза фармакологически ценных соединений – стильбенов и активации защитных свойств винограда. Впервые из *V. amurensis* был выделен штамм эндофитной бактерии *Bacillus velezensis* AMR25, обладающей выраженными антагонистическими свойствами по отношению к некоторым патогенам винограда.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты могут быть использованы для создания защитных технологий, которые будут обеспечивать переход к высокопродуктивному и экологически чистому агрохозяйству. Также результаты диссертационной работы можно использовать для проведения теоретических и практических занятий в университетах на биологических и сельскохозяйственных факультетах.

Методология и методы диссертационного исследования

Для проведения исследований были применены традиционные и современные методы биотехнологии, биохимии, микробиологии и молекулярной биологии. Условия стерилизации и микробиологический высеv эндофитных микроорганизмов винограда были выполнены, как описано (Aleynova *et al.*, 2022a). Обработка культуры клеток *V. amurensis* эндофитами винограда и биопрепаратами на их основе были выполнены по ранее описанной методике (Aleynova *et al.*, 2021; Алейнова и др., 2022). Анализ антагонистической активности *B. velezensis* AMR25 против патогенов растений проводили, как описано ранее (Leska *et al.*, 2022; Mirsam *et al.*, 2022). Выделение ДНК из штаммов эндофитов и секвенирование по Сэнгеру были сделаны, как в ранее опубликованной работе (Aleynova *et al.*, 2022a). Высокопроизводительное секвенирование метагенома винограда выполняли по технологии Illumina. Биоинформатический анализ полученных данных проводили, как описано в работах (Aleynova *et al.*, 2022a,b; Nityagovsky *et al.* 2024). Высокопроизводительное секвенирование генома *B. velezensis* AMR25 проводили по технологии Oxford Nanopore. Геномный анализ проводился с помощью «Конвейера аннотаций генома прокариот NCBI», ресурса eggNOG версии 4.5 в сочетании с eggNOG-mapper (Huerta-Cepas *et al.*, 2017), программ AntiSMASH 7.0.0 (Blin *et al.*, 2023) и OrthoVenn3 (Sun *et al.*, 2023). Выделение РНК, получение комплементарной ДНК и проведение количественного ПЦР РВ делали согласно методикам, описанным ранее (Aleynova *et al.*, 2021; Алейнова и др., 2022). Для анализа содержания вторичных метаболитов была проведена ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрией высокого разрешения, как описано в ранее опубликованной работе (Aleynova *et al.*, 2016). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью спаренного критерия Стьюдента, одностороннего дисперсионного

анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки, теста суммы рангов Уилкоксона, теста PERMANOVA, коэффициента корреляции Пирсона и алгоритма DESeq2. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0,05 как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Для анализа с помощью DESeq2 значение скорректированного $p < 0,01$ считалось статистически значимым.

Положения, выносимые на защиту

1. Ткани изученных видов и сортов винограда населены широким спектром эндофитных бактерий и грибов.
2. Возбудитель ложной мучнистой росы винограда *P. viticola* присутствует в образцах, не имеющих внешних симптомов заболевания.
3. Биопрепараты на основе эндофитных бактерий и грибов *V. amurensis* способны индуцировать биосинтез стильбенов у винограда, что повышает его защитные свойства.
4. Некоторые эндофитные бактерии из винограда *V. amurensis* обладают антагонистическими свойствами в отношении патогенных грибов растений, которые могут быть обусловлены наличием у них генов биосинтеза антимикробных соединений.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обеспечивается за счет использования апробированных методик, взаимодополняющих друг друга, статистической обработки результатов и воспроизводимостью экспериментов. Полученные результаты полностью соответствуют записям в рабочих журналах и протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде рисунков и таблиц.

Апробация работы

Результаты работы представлены на 12-ой Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», 14–20 сентября, 2020 год, Крым, Россия; Международной научно-практической конференции «Современные тенденции науки, инновационные технологии в виноградарстве и виноделии», 6–10 сентября 2021 г., г. Ялта; Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов», 19–23 сентября 2022 г., г. Владивосток; VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды», 3–7 июля 2023 г., г. Иркутск; Всероссийской научной школе-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», 3–7 октября 2023 г., Владивосток; Конференции-конкурсе молодых ученых ФНЦ «Биоразнообразие» ДВО РАН, 21–23 ноября 2023 г., г. Владивосток.

Личный вклад автора

Личный вклад автора присутствует на каждом этапе выполнения диссертации и заключается в сборе материала, в планировании экспериментов, обработке и анализе данных, обсуждении и описании полученных результатов, написании научных публикаций и представлении исследований на конференциях. Написание рукописи диссертации выполнено автором лично.

Публикации

Материалы диссертации изложены в 14 публикациях, из них 9 в журналах из списка ВАК.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение результатов), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 148 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы насчитывает 223 наименования.

Благодарности

Автор искренне благодарит научного руководителя д.б.н. Санину Н.М. и к.б.н. Алейнову О.А. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор признателен к.б.н. Киселеву К.В. за помощь в подготовке диссертации. Также автор выражает глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку на всех этапах работы. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (№20-74-00002, 22-16-00078 и 22-74-10001).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены народно-хозяйственное значение и основные возбудители болезней винограда, и методы защиты винограда от них. Особая роль в обзоре литературы выделена применению эндофитных микроорганизмов в защите растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала и условия стерилизации. На первых этапах работы для микробиологического высева эндофитов и для оптимизации метода выделения ДНК для метагеномного анализа использовали образцы винограда *Vitis amurensis* из двух лиан (P-1, P-2), собранные в июле и сентябре 2019–2021 г. в неохраняемой природной зоне в районе г. Владивостока (Kiselev *et al.*, 2023). Для дальнейшего более масштабного анализа эндофитного микробиома винограда, произрастающего на Дальнем Востоке России, в июле 2022 года были собраны образцы листьев и стеблей, как диких форм винограда *V. amurensis* и *V. coignetiae*, произрастающих на различных территориях Дальнего Востока, так и культивируемых на виноградниках Приморского края. Были собраны образцы тканей с 11-ти

растений *V. amurensis*, 3-х растений *V. coignetiae* (Aleynova *et al.*, 2023a) и 4-х растений культурного винограда: *V. vinifera* × *V. amurensis* cv. Адель (гибрид № 82-41 F³) (Адель) и *V. riparia* × *V. vinifera* cv. Мукузани (с неизвестной родословной) (Мукузани) были получены с ЛПХ «Макаревич». Образцы *V. labrusca* × *V. riparia* cv. Альфа (номер в каталоге VIVC: 346) (Альфа) и *Vitis* Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар (номер в каталоге VIVC: 23087) (Прэйри стар) были отобраны на винограднике «PRIM ORGANICA» (Aleynova *et al.*, 2023b). С каждого растения было получено от 2 до 6 образцов листьев и стеблей. Всего в общей сложности было собрано 80 образцов тканей растений. Собранный растительный материал доставлялся в лабораторию в стерильных пакетах на холоде в течение 1–2 дней. Поверхностную стерилизацию материала проводили как описано (Kiselev *et al.*, 2023).

Микробиологический высев эндофитных микроорганизмов винограда. Для определения качественного эндофитного состава бактерий и грибов винограда, а также поиска микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью против патогенов растений и стимулирующих биосинтез БАВ в растениях, в 2018-2022 годах нами проводились микробиологические высевы с образцов винограда. В 2018-2021 годах высев проводился с растений P-1 и P-2 *V. amurensis* (Aleynova *et al.*, 2022a, 2022b), в 2022 году со всех растений *V. amurensis* и *V. coignetiae* (Aleynova *et al.*, 2023a). Поверхностно стерилизованные ткани (1,5 г) *V. amurensis* и *V. coignetiae* растирали до однородной массы в стерильной ступке; полученный сок отжимали и аликвоту объемом 100 мкл растирали на чашках Петри с R2A (для бактерий) и с КДА (для грибов). Через 2 дня для бактерий и 7 дней для грибов выращенные колонии отбирали и осторожно переносили в новые стерильные чашки Петри с питательной средой для повторного культивирования.

Обработка культуры клеток V. amurensis эндофитами винограда и биопрепаратами на их основе. Каллусная культура V7 была получена в 2017 году из молодых стеблей зрелых растений *V. amurensis* сотрудниками лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН как описано ранее (Tyunin *et al.*, 2018). 2,0 г культуры клеток V7, взятой на 30 сут выращивания, культивировали в 50 мл жидкой среды W_{БАП/АНУ} (Алейнова и др., 2022), постоянно перемешивая на орбитальном шейкере в темноте в течение 7 дней. Для создания нативных и сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда были выбраны штаммы наиболее часто встречающиеся 7 родов эндофитных бактерий и 6 родов эндофитных грибов: бактерии *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*; грибы *Alternaria*, *Biscogniauxia*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Fusarium*, *Trichoderma* (Aleynova *et al.*, 2022a, 2022b). Затем влияние живых и сухих биопрепаратов на культуру клеток исследовали как описано (Aleynova *et al.*, 2021, 2022 соответственно).

Анализ антагонистической активности Bacillus velezensis AMR25 против патогенов растений. Штамм *B. velezensis* AMR25 был получен в 2022 году из листа винограда *V. amurensis* P-2. Антибактериальную активность штамма оценивали в отношении широкораспространенных бактериальных патогенов растений, таких как *Erwinia billingiae* (номер в GenBank: MZ424741), *Pantoea agglomerans* (MZ424742) и *Xanthomonas campestris* (MZ424744), с использованием метода агаровых плит (Leska *et al.*, 2022). Тест на фунгицидную активность проводили методом двойного культивирования на среде R2A против широко распространенных фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* (номер доступа в GenBank: KP151610.1), *Fusarium avenaceum* (OR591465.1) и *Alternaria tenuissima* (MZ427922) как описано (Mirsam *et al.*, 2022).

Выделение ДНК из штаммов эндофитов и секвенирование по Сэнгеру. Для классификации выделенных эндофитных микроорганизмов ДНК из отдельных штаммов эндофитов выделяли методом ЦТАБ с модификациями (Kiselev *et al.*, 2015). Последовательности гена 16S рРНК бактерий и ITS1 рРНК грибов амплифицировали, секвенировали и определяли как описано ранее (Aleynova *et al.*, 2021).

Выделение ДНК для секвенирования метагенома и биоинформатический анализ. Для оптимизации метода выделения ДНК для дальнейшего метагеномного анализа из собранных в 2021 году поверхностно стерилизованных образцов винограда ДНК выделяли с помощью ЦТАБ-спин метода (Kiselev *et al.*, 2023) и коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA miniprep («Zymo Research», США). Из собранных в 2022 году поверхностно стерилизованных образцов винограда ДНК выделяли только с помощью ЦТАБ-спин метода (Kiselev *et al.*, 2023).

Образцы ДНК 2021 года были отправлены в компанию «Евроген» (Россия), а образцы 2022 года – в компанию «Синтол» (Россия) для высокопроизводительного секвенирования с использованием технологии Illumina. Участки бактериальной 16S рРНК и межгенного спейсера ITS1 эндофитных грибов амплифицировали с использованием праймеров, описанных в работе (Aleynova *et al.*, 2023a). Контроль качества полученных библиотечных пулов проводился с помощью анализатора фрагментов, а количественный анализ выполнялся с помощью ПЦР РВ.

Пулы библиотек секвенировали на Illumina MiSeq (2 × 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). Предварительную обработку полученных данных, таксономическую идентификацию вариантов последовательностей ампликонов (ASV) и биоинформатический анализ эндофитного микробиома делали как описано (Aleynova *et al.*, 2023a, b). Данные о дифференциальной численности ASV между образцами, в которых была обнаружена *P. viticola* и в которых патоген отсутствовал, были получены с использованием статистического инструмента DESeq2 с коррекцией частоты ложных обнаружений (Love *et al.*, 2014). Последовательности ампликонов 16S и ITS1 были депонированы в

NCBI под регистрационными номерами PRJNA813962, PRJNA874841, PRJNA980748 и PRJNA998468.

Выявление P. viticola с помощью количественного ПЦР РВ. Для количественного определения патогена *P. viticola*, вызывающего ложную мучнистую росу винограда, были разработаны шесть специфических пар праймеров в соответствии с биоинформатическим анализом и литературными данными. Дизайн праймеров выполняли с использованием инструмента Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) со следующими параметрами: длина ампликона – 70-180 п.н., температура плавления (Tm) – 59-62 °С, содержание GC – 50-60%, нацелены только на последовательности *P. viticola*. Мы использовали три специфических пары праймеров PvITS1_1, PvITS1_2 и Gior (Si Ammour *et al.*, 2020), предназначенные для амплификации на ITS1 *P. viticola* (ГенБанк: ON183972.1); две специфические пары праймеров PvCox1_1, PvCox1_2 для амплификации участка ДНК субъединицы цитохром С оксидазы I (Cox1) (ГенБанк: NC_045922.1 12520-13998); две специфических пары праймеров PvCox2_1 и PvCox2_2 для субъединицы цитохром С оксидазы II (Cox2) (ГенБанк: KP684906.1). Для детекции *P. viticola* мы применили метод ПЦР РВ, используя в качестве целей последовательности ДНК ITS1, Cox1 и Cox2. Последовательности праймеров, используемых для ПЦР РВ, PvITS1_1, PvITS1_2, Gior, PvCox1_1, PvCox1_2, представлены в тексте диссертационной работы. ПЦР РВ проводили с использованием набора для ПЦР РВ (Evrogen, Россия) и красителя для ПЦР РВ SYBR Green I (Evrogen, Россия) как описано в тексте диссертационной работы.

Выделение ДНК для секвенирования полного генома V. velezensis AMR25 и биоинформатический анализ. Одиночную колонию *V. velezensis* штамма AMR25 помещали в чашку Петри, содержащую агаровую среду R2A, и выращивали в течение ночи при температуре 28 °С. Тотальную ДНК выделяли методом ЦТАБ с модификациями (Kiselev *et al.*, 2015). Затем следовало повторное осаждение в 1 М ацетате натрия. Секвенирование полного генома AMR25 проводилось компанией ООО «ГЕНОАНАЛИТИКА» (Москва, Россия) с использованием прибора Oxford Nanopore. Для создания кольцевой структуры хромосомы из отдельных фрагментов (контигов) использовали программу Unicycler версии 0.5.0 (Wick *et al.*, 2017). Для оценки качества сборки использовали программу BUSCO (Simão *et al.*, 2015). Геномный анализ проводился с помощью «Конвейера аннотаций генома прокариот NCBI», ресурса eggNOG версии 4.5 в сочетании с eggNOG-mapper (Huerta-Cepas *et al.*, 2017), программ AntiSMASH 7.0.0 (Blin *et al.*, 2023) и OrthoVenn3 (Sun *et al.*, 2023).

Выделение РНК, получение комплементарной ДНК и проведение количественного ПЦР РВ. Выделение РНК проводили из 10-суточной культуры клеток *V. amurensis* V7, что соответствовало 3 суткам после внесения нативных эндофитов и сухих биопрепаратов на основе эндофитов. Полную изоляцию РНК проводили с использованием ЦТАБ-протокола

(Kiselev *et al.*, 2017). Комплементарные ДНК были синтезированы как описано ранее (Киселёв и др., 2013). Количественный ПЦР РВ проводили как описано (Dubrovina *et al.*, 2015). Последовательности праймеров, используемых для анализа экспрессии, а также идентификационные номера генов *PAL* и *STS* в базе данных (GenBank, NCBI) представлены в ранее опубликованной работе (Shumakova *et al.*, 2011).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Стилбены из высушенных, порошкообразных образцов культуры V7 (100 мг) были экстрагированы в 2 мл 95%-ного этанола в течение 2 ч при 60 °С, затем очищены с помощью нейлоновых шприц-фильтров OlimPeak диаметром 13 мм и размером пор 0,45 мкм («Текнокрома», Испания). Идентификацию и количественную оценку стилбенов проводили с использованием аналитической системы ВЭЖХ LC-20AD XR («Shimadzu», Япония) и коммерчески доступных стандартов как описано ранее (Kiselev *et al.*, 2017).

Статистическая обработка данных. В 2021 и 2022 годах с помощью секвенирования метагенома всего было проанализировано 91 образцов тканей винограда с 11-ти растений *V. amurensis*, 3-х растений *V. coignetiae* и 4-х растений культурного винограда. В период с 2018 по 2021 год с 2-х растений *V. amurensis* (P-1 и P-2) было получено 933 штамма эндофитных бактерий и 199 отдельных штаммов эндофитных грибов. В 2022 году с 11-ти растений *V. amurensis* и 3-х растений *V. coignetiae* было получено 545 штаммов эндофитных бактерий и 77 штаммов эндофитных грибов. Статистическая обработка данных метагенома была проведена как описано ранее (Nityagovsky *et al.*, 2024).

Тесты на антибактериальную и фунгицидную активность *B. velezensis* AMR25 проводили в трех биологических повторностях. Эксперимент с добавлением эндофитов к культуре клеток винограда был выполнен в двух биологических повторностях. Измерение для каждого образца методом ВЭЖХ повторяли 3 раза. Данные ПЦР РВ были получены на кДНК из двух независимых экспериментов. Для образцов кДНК каждого эксперимента было сделано 6 аналитических повторностей на каждую пробу (3 были нормализованы к гену *Actin*, 3 к *Gapdh*). Полученные данные были проверены по спаренному критерию Стьюдента.

Значения эффективности ПЦР РВ при анализе праймеров для выявления *P. viticola* получали с использованием программного обеспечения RealTime_PCR v7.3 при построении калибровочного графика на основе используемых калибраторов (разведение ДНК из пробы «Mildew»). График корреляции Пирсона между данными ПЦР РВ и NGS был получен с использованием R пакета ggpubr (Kassambara, 2023). Для количественной оценки амплификации изучаемых последовательностей мы использовали шестнадцать технических повторов (восемь реакций ПЦР РВ, нормализованных к участку гена *VaGAPDH* и восемь реакций ПЦР РВ к *VaActin*). Статистическая проверка выполнялась с помощью одностороннего

дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки, выполненными с использованием R пакета Stats (R Core Team, 2021).

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0,05 как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Для анализа с помощью DESeq2 значение скорректированного $p < 0,01$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка метода выделения ДНК для метагеномного анализа. Образцы ДНК, выделенные методами ЦТАБ-спин (Kiselev *et al.*, 2023) и ZymoBIOMICS DNA miniprep kit («Zymo Research», США) из винограда в 2021 году, были отправлены на высокопроизводительное секвенирование на приборе Illumina MiSeq (2 \times 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). В результате предварительной обработки данных высокопроизводительного секвенирования для анализа было оставлено в общей сложности 621 975 и 272 825 последовательностей 16S рРНК в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом и набором ZymoBIOMICS соответственно. Для ITS1 после процедур биоинформатического контроля качества было идентифицировано в общей сложности 1 376 089 и 1 376 927 последовательностей в пробах, выделенных ЦТАБ-спин методом и набором ZymoBIOMICS соответственно. Согласно сравнительному анализу количество последовательностей 16S рРНК эндофитных бактерий было в 2 раза больше в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом, в то время как количество последовательностей ITS1 эндофитных грибов было примерно одинаково при использовании обоих методов выделения ДНК.

Состав и структура эндофитных бактерий и грибов винограда на Дальнем востоке России. По данным метагеномного анализа всего в эндофитном микробиоме винограда Дальнего Востока было найдено 130 родов бактерий, большинство родов которых было общим для всех видов и сортов винограда (69) (рис. 1а). Каждый вид или сорт винограда характеризуется специфическим соотношением этих родов. Больше всего родов эндофитных бактерий было найдено в дикорастущих видах *V. amurensis* (128) и *V. coignetiae* (117) (рис. 1а). Как для *V. amurensis*, так и для *V. coignetiae* наиболее многочисленны по количеству последовательностей 16S были таксоны *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylobacterium*, и *Hymenobacter* (Рисунок 1б). По сравнению с другими видами *V. amurensis* характеризуется большей относительной численностью ампликонов таких родов как *Massilia* и *Escherichia-Shigella*; *V. coignetiae* – *Sphingomonas* и *Methylobacterium-Methylobacterium*; сорт Альфа – *Pantoea*, *Neisseria* и *Abiotrophia*; сорт Адель – *Comamonadaceae* и *Stenotrophomonas*; сорт Мукузани – *Asinibacterium* и *Cutibacterium* (рис. 1б). Согласно данным микробиологического высева в *V. amurensis* было найдено 50 родов эндофитных бактерий (1376 штаммов), в *V. coignetiae* – 11 (102 штамма)

(Aleynova *et al.*, 2022a, 2023a). Согласно данным секвенирования штаммов наиболее часто встречающимися родами для *V. amurensis* и *V. coignetiae* были: *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Curtobacterium*. В *V. amurensis* более многочисленными по количеству штаммов были рода *Erwinia* и *Pantoea*, в *V. coignetiae* – *Bacillus* и *Frigobacterium* (Aleynova *et al.*, 2022a, 2023a). Была создана ценная коллекция эндофитных бактерий лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Она поддерживается на чашках Петри со средой R2A и заложена на длительное хранение при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с глицерином в качестве криопротектора.

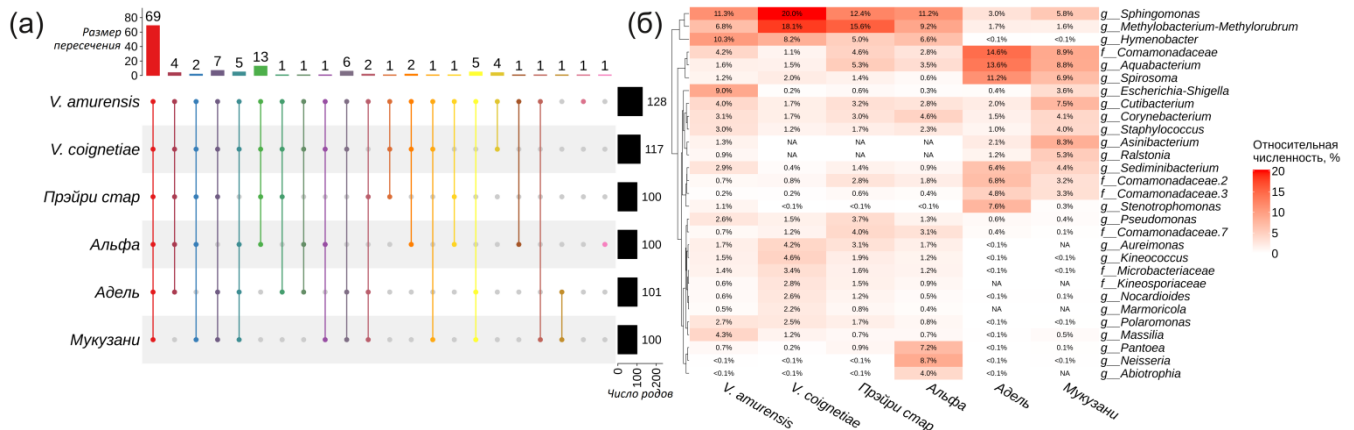


Рисунок 1. Состав эндофитных бактериальных микробиомов *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов винограда по данным секвенирования нового поколения. *V. amurensis* – усреднённые данные по *V. amurensis*; *V. coignetiae* – усреднённые данные по *V. coignetiae*; Прэйри стар – *Vitis* Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар из виноградника «PRIM ORGANICA»; Альфа – *V. labrusca* × *V. riparia* cv. Альфа из «PRIM ORGANICA»; Адель – *V. vinifera* × *V. amurensis* cv. Адель из ЛПХ «Макаревич»; Мукузани – *V. riparia* × *V. vinifera* cv. Мукузани из ЛПХ «Макаревич». (а) Диаграмма UpSet на уровне рода в данных NGS, показывающая общие таксоны между видами или сортами винограда; (б) Тепловая карта относительной численности 10 наиболее часто встречающихся согласно данным относительной численности эндофитных бактерий на уровне рода по данным NGS у *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов винограда. Рода были отфильтрованы на основе относительной численности $> 0,1\%$ как минимум у одного вида или сорта винограда. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

Согласно данным метагеномного анализа всего в эндофитном микробиоме винограда было найдено 149 родов грибов, из которых 19 были общими для всех видов и сортов винограда (рис. 2а). Для каждого вида или сорта винограда характерно уникальное соотношение этих родов. Больше всего родов было найдено в дикорастущих видах *V. amurensis* (132) и *V. coignetiae* (90) (рис. 2а). *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сорт Прэйри стар характеризуются высокой относительной численностью последовательностей ITS1 родов *Aureobasidium*, *Cladosporium* и *Vishniacozyma* (рис. 2б). По сравнению с другими видами или сортами винограда *V. amurensis* характеризуется большей относительной численностью таких родов как *Kabatina* и *Paraphoma*, *V. coignetiae* – *Ramularia* и *Taphrina* (рис. 2б). Сорта

Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» характеризуются большей относительной численностью *Malassezia* по сравнению с сортами Альфа и Прэйри стар из виноградника «PRIM ORGANICA», в которых, в свою очередь, более преобладали по количеству последовательностей ITS1 рода *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium* и *Rhodotorula* (рис. 2б). По данным микробиологического высева в *V. amurensis* было найдено 43 рода эндофитных грибов (274 штамма), в *V. coignetiae* – 6 (10 штаммов) (Aleynova *et al.*, 2022b, 2023a). Преобладающими по количеству штаммов для *V. amurensis* были рода *Cladosporium* и *Didymella*, для *V. coignetiae* – *Cladosporium* и *Filobasidium* (Aleynova *et al.*, 2022b, 2023a). Была создана коллекция эндофитных грибов лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Она культивируется на чашках Петри со средой КДА, а также длительно хранится при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с глицерином в качестве криопротектора.

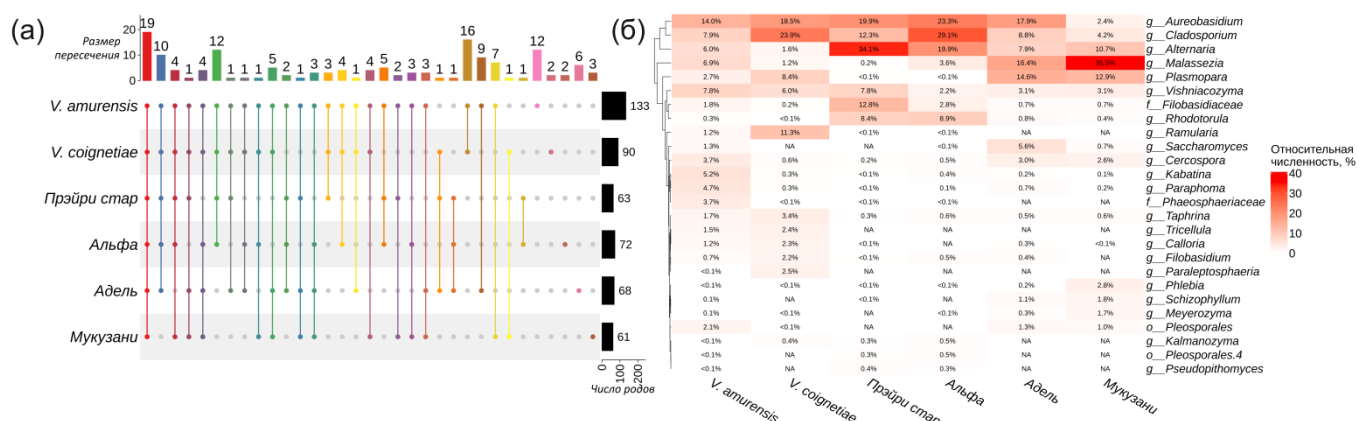


Рисунок 2. Состав эндофитных микобиомов *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов винограда по данным секвенирования нового поколения. *V. amurensis* – усреднённые данные по *V. amurensis*; *V. coignetiae* – усреднённые данные по *V. coignetiae*; Прэйри стар – *Vitis Elmer Swenson 2-7-13* cv. Прэйри стар из виноградника «PRIM ORGANICA»; Альфа – *V. labrusca* × *V. riparia* cv. Альфа из «PRIM ORGANICA»; Адель – *V. vinifera* × *V. amurensis* cv. Адель из ЛПХ «Макаревич»; Мукузани – *V. riparia* × *V. vinifera* cv. Мукузани из ЛПХ «Макаревич». (а) Диаграмма UpSet на уровне рода в данных NGS, показывающая общие таксоны между видами или сортами винограда; (б) Тепловая карта относительной численности 10 наиболее часто встречающихся согласно данным относительной численности эндофитных грибов на уровне рода по данным NGS у *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов винограда. Рода были отфильтрованы на основе относительной численности $> 0,1\%$ как минимум у одного вида или сорта винограда. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

Детектирование возбудителя ложной мучнистой росы в винограде. Был проанализирована встречаемость *P. viticola* в собранных образцах винограда. Наибольшая относительная численность последовательностей ITS1 *P. viticola* была в образцах, собранных на винограднике «Макаревич». Наивысшая численность патогена составила 15,4-60,9% в образцах винограда М-dm, у которого были видимые симптомы милдью. В других образцах, без видимых симптомов заболевания, процент последовательностей ITS1 возбудителя

болезни составлял 0-48%. В ходе анализа метагеномных данных был обнаружен большой процент *P. viticola* на о. Сахалин и о. Рикорд. В общей сложности биоинформатический анализ выявил присутствие патогена в 53,75% образцов винограда, не имеющих внешних симптомов заболевания.

Анализ in silico потенциальных микроорганизмов-антагонистов P. viticola. Согласно результатам DESeq2, здоровые образцы характеризовались повышенным содержанием ASV бактерий (40 ASV) по сравнению с образцами, пораженными *P. viticola*. На уровне рода наибольшее количество ASV принадлежало *Hymenobacter* (14), *Sphingomonas* (4), *Massilia* (4), *Methylobacterium-Methylorubrum* (2) и *Chryseobacterium* (2). В грибном эндофитном микобиоме здоровые образцы характеризовались повышенной численностью 4 ASV по сравнению с образцами, пораженными *P. viticola*. Эти ASV принадлежали к родам *Kabatina*, *Aureobasidium* и *Vishniacozyma*.

Анализ эффективности применения ПЦР PB SYBR Green I для детектирования P. viticola в винограде. На основе литературных данных и с использованием биоинформатического анализа было разработано шесть пар праймеров для детекции *P. viticola* в образцах винограда. При анализе эффективности ПЦР PB только три специфические пары праймеров: PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1, имели эффективность близкую к 100%. Средний уровень амплификации ПЦР PB с использованием праймеров PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 в резервной копии образцов ДНК винограда для метагенома имел высокую корреляцию со средней относительной численностью ITS1 *P. viticola* в образцах NGS. Уровень коэффициента корреляции Пирсона между оценками среднего относительного уровня амплификации по данным ПЦР PB и средней относительной численности *P. viticola* в образцах NGS был самым высоким для амплификации с использованием праймеров PvITS1_2 ($R = 0,86, p < 0,001$).

Влияние основных эндофитов винограда и препаратов на их основе на культуру клеток V. amurensis. По количественному соотношению выросших на чашках колоний, наиболее часто встречаются в тканях винограда *V. amurensis*, произрастающего в неконтролируемых природных условиях, бактерии, являющиеся представителями родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoeae*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, и грибы представители родов *Alternaria*, *Biscogniauxia*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Fusarium*, *Trichoderma* (Aleynova et al., 2022a, b). Поэтому штаммы-представители этих родов были отобраны для получения биопрепаратов на основе эндофитов. Для создания нативных и сухих биопрепаратов были отобраны 7 штаммов бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoeae* sp., *Pseudomonas* sp., *Xantomonas* sp. и 6 штаммов грибов *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp (Aleynova et al., 2021; Алейнова и др. 2022).

Совместное культивирование клеток *V. amurensis* с живыми биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов увеличивали

общее содержание стильбенов в культурах клеток винограда в 2,2–5,3 и в 2,6–16,3 раза соответственно (рис. 3). Наибольшее содержание стильбенов 13,63 мг/г сухой биомассы клеток в клетках винограда было при совместном культивировании с эндофитным грибом *Biscogniauxia* sp. (рис. 3).

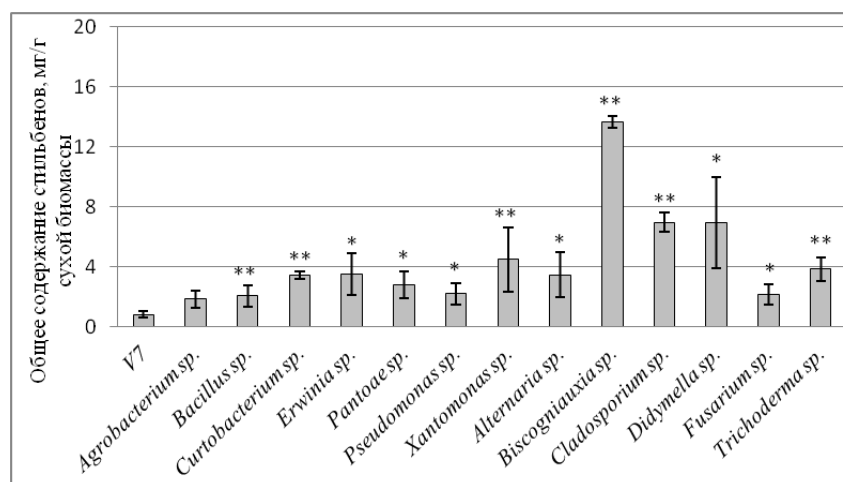


Рисунок 3. Общее содержание стильбенов (мг/г сухой биомассы клеток) в суспензионной культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3-дневного совместного культивирования с эндофитными бактериями или грибами. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в культуре клеток V7, культивируемой в контрольных условиях без бактерий и грибов.

Сухие биопрепараты на основе эндофитных бактерий и грибов увеличивали содержание стильбенов в 1,3–1,5 раза (рис. 4а) и 2,0–3,5 раза (рис. 4б) соответственно. Максимальное содержание стильбенов было определено при культивировании клеток винограда в течение 3 суток с биопрепаратами на основе *Fusarium* sp. (20 мг) и *Trichoderma* sp. (10 мг) – 2,68 и 3,07 мг/г сухой биомассы клеток V7 соответственно (рис. 4б).

Полученные данные о содержании стильбенов коррелировали со значительным повышением экспрессии большинства проанализированных генов *PAL* и *STS* в клетках винограда (Aleynova *et al.*, 2021; Алейнова и др. 2022).

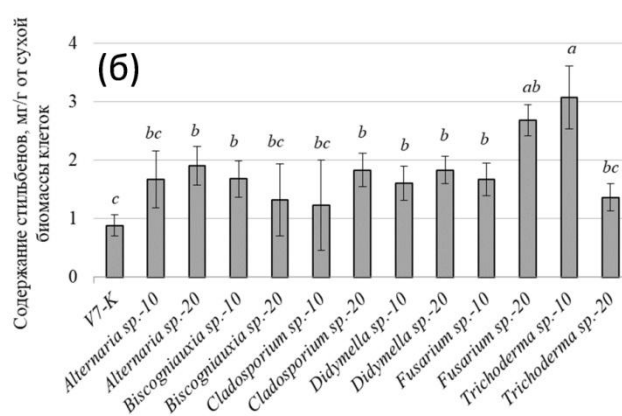
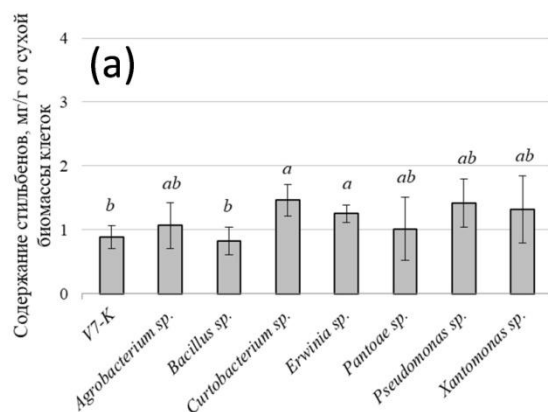


Рисунок 4. Общее содержание стильбенов (мг/г сухой биомассы клеток) в суспензионной культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3-дневного совместного культивирования с сухими биопрепаратами эндофитных бактерий (а) или грибов (б). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию Стьюдента. $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Антипатогенные свойства эндофита V. velezensis AMR25, выделенного из V. amurensis. Анализ антипатогенных свойств 15 штаммов эндофитных микроорганизмов *V. amurensis* из коллекции лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН показал, что грамположительная бактерия *Bacillus* sp. штамма AMR25 проявила наиболее сильные антагонистические свойства против часто встречающихся грибных патогенов винограда и других растений, и слабые свойства против бактериальных патогенов.

Используя метод агаровых плит для изучения антибактериальной активности *Bacillus* sp. AMR25 на *E. billingiae*, *P. agglomerans* и *X. campestris* (рис. 5), мы обнаружили, что AMR25 проявляет слабую антибактериальную активность. Зона ингибирования составила $4,33 \pm 0,33$, $3,66 \pm 0,33$ и $1,66 \pm 0,33$ мм соответственно (рис. 5). Для анализа фунгицидной активности был использован метод двойного культивирования против таких патогенов, как *A. tenuissima*, *B. cinerea* и *F. avenaceum* (рис. 5). Штамм AMR 25 продемонстрировал самую сильную ингибирующую активность в отношении *B. cinerea* на уровне 71% (рис. 5к). Против *A. tenuissima* и *F. avenaceum* фунгицидная активность была ниже и составила 65,5% и 62,8% соответственно (рис. 5з,м).

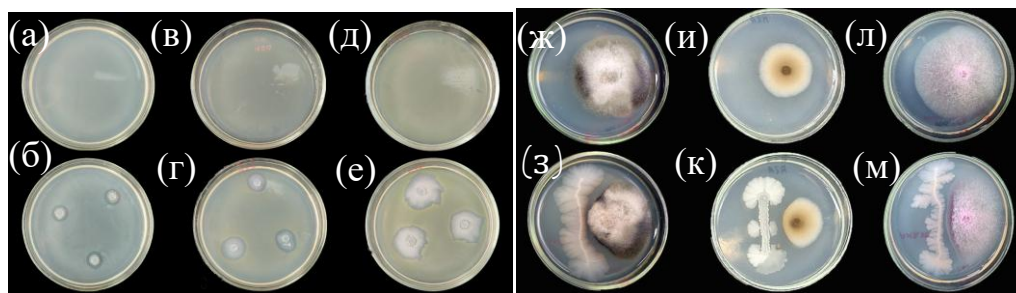


Рисунок 5. Антагонизм *Bacillus* sp. AMR25 и бактерий *E. billingiae* (а, б), *P. agglomerans* (в, г), *X. campestris* (д, е), а также грибов *A. tenuissima* (ж, з), *B. cinerea* (и, к) и *F. avenaceum* (л, м) на чашках Петри. Диаметр чашек Петри составлял 10 см.

Геномная ДНК штамма AMR25 была секвенирована по технологии Oxford Nanopore. После контроля качества было собрано и проанализировано 1,73 Гб длинных прочтений, в результате чего был получен один скаффолд. Он содержит кольцевую хромосому из 3 909 646 пар оснований со средним содержанием гуанина и цитозина в ДНК 46,61% (GC%). В результате филогенетического анализа по последовательности гена *gyrA* штамм AMR25 был идентифицирован как представитель вида *B. velezensis*.

Геномный анализ эндофитной бактерии винограда *B. velezensis* AMR25 выявил 8 кластеров генов, участвующих в биосинтезе андалузицина,

сурфактина, фенгицина, бациллибактина, бацилизина, макролактин, бациллаена, диффицидина. Также исследуемый геном содержит ряд генов, участвующих в колонизации корней, образовании биопленок и биосинтезе фитогормонов (Ananev *et al.*, 2024).

ОБСУЖДЕНИЕ

Метагеномика является мощным инструментом для изучения эндофитных микробных сообществ. Сегодня большинство существующих методов выделения ДНК растений не позволяют получить ДНК, пригодную для NGS, поэтому в этой работе был модифицирован существующий метод на основе ЦТАБ-экстракции путем добавления дополнительных этапов очистки на спин-колонках или ЦТАБ-спин метод (Kiselev *et al.*, 2023). Итоговый результат высокопроизводительного секвенирования ДНК, выделенной с помощью ЦТАБ-спин метода, показал большее количество прочтений ампликонов по сравнению с количеством прочтений, полученным при секвенировании ДНК, выделенной с помощью широко известного набора Zymo Research. Таким образом, ЦТАБ-спин метод является эффективным методом выделения ДНК для метагеномного анализа.

Результаты нашей работы показали, что дикорастущие *V. amurensis* и *V. coignetiae* и широко культивируемые на Дальнем Востоке сорта винограда характеризуются своим уникальным микробиомом эндофитных бактерий и грибов (рис. 1, 2). Эндофитные микроорганизмы винограда могут помогать ему переживать неблагоприятные условия среды, а также быть потенциальными для сельского хозяйства биопрепаратами, повышающими устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам (Reinhold-Hurek, Hurek, 2011; Aly *et al.*, 2011). Для *V. amurensis*, *V. coignetiae*, сортов Альфа и Прэйри стар наиболее многочисленны по количеству последовательностей 16S были таксоны *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, и *Hymenobacter* (рис. 1б). Известно, что некоторые виды рода *Sphingomonas* улучшают рост растений в стрессовых условиях, таких как засуха, засоление и попадание тяжелых металлов в сельскохозяйственные почвы (Asaf *et al.*, 2020). Показано, что представители рода *Methylobacterium* положительно влияют на рост растений и защищают их от патогенных микроорганизмов (Zhang *et al.*, 2021). Виды рода *Hymenobacter* часто проявляют устойчивость к ультрафиолетовому излучению, низким температурам и воздействию тяжелых металлов, однако их влияние на растения неизвестно и требует дальнейших исследований (Zhang *et al.*, 2023). Сорта Адель и Мукузани характеризуются высокой относительной численностью последовательностей 16S таксона *Comamonadaceae* (рис. 1б). Представители *Comamonadaceae* могут повышать доступность серы (Schmalenberger *et al.*, 2008) и способствовать росту у растений (Huang *et al.*, 2024). Не исключено, что бактерии *Sphingomonas*, *Methylobacterium* и *Comamonadaceae*, населяющие ткани винограда, тоже могут положительно

влиять на рост винограда и устойчивость к стрессам, что требует дальнейших исследований.

V. amurensis, *V. coignetiae*, сорта Альфа и Прэйри стар характеризуются высокой относительной численностью последовательностей ITS1 родов *Aureobasidium* и *Cladosporium* (рис. 2б). Грибы *Aureobasidium* проявляют антагонистическую активность против различных патогенов растений (особенно послеуборочных) (Bozoudi, Tsaltas, 2018). Некоторые штаммы *Cladosporium* показывают свойства антагонизма по отношению к агрессивным патогенам растений (*Rhizoctonia solani*, *F. graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *B. allii*) и повышают рост растений томата с помощью продукции 3-индолуксусной кислоты и повышения доступности цинка и фосфора для растений (Răut *et al.*, 2021). Возможно, эндофитные грибы *Aureobasidium* и *Cladosporium*, населяющие виноград, тоже обладают антагонистическими свойствами в отношении патогенов растений, для чего нужны дальнейшие исследования.

По данным высокопроизводительного секвенирования, нами была обнаружена различная численность возбудителя ложной мучнистой росы *P. viticola* в 53,75% исследуемых проб винограда. Патоген был обнаружен как на незащищенных территориях, так и на виноградниках Дальнего Востока России. Согласно данным NGS, наибольшая относительная численность *P. viticola* была обнаружена в образцах винограда из ЛПХ «Макаревич». Возможно, фунгициды, используемые в «PRIM ORGANICA» являются более эффективными против популяции *P. viticola*, характерной для Дальнего востока России. Присутствие патогена в образцах дикорастущего винограда без видимых симптомов ложной мучнистой росы может указывать на устойчивость этих видов к заболеванию.

Также не стоит исключать, что состав микробиома виноградных лоз может способствовать большей устойчивости к возбудителю милдью. Согласно нашим данным, в образцах тканей винограда, поражённых *P. viticola*, эндофитное бактериальное разнообразие снижено по сравнению с образцами, где патоген не был обнаружен. Мы обнаружили, что содержание бактерий, принадлежащих к родам *Hymenobacter*, *Sphingomonas*, *Massilia*, *Methylobacterium-Methylorubrum* и *Chryseobacterium*, было значительно выше в образцах винограда без *P. viticola* по сравнению с поражёнными патогеном образцами. Известно, что некоторые виды рода *Hymenobacter* устойчивы к ультрафиолетовому излучению (Maeng *et al.*, 2019), а возбудитель *P. viticola* очень чувствителен к ультрафиолетовому излучению (Gadouy *et al.*, 2023). Таким образом, обратно пропорциональное количество эндофитных бактерий *Hymenobacter spp.* и патогена *P. viticola*, вероятно, связано с интенсивностью воздействия ультрафиолета на отдельные образцы винограда, однако не исключено, что бактерии *Hymenobacter* имеют потенциал биоконтроля в отношении возбудителя милдью. Известно, что несколько штаммов *Methylobacterium* и *Sphingomonas* борются с распространением фитоплазмы, вызывающей пожелтение виноградной лозы

(Bulgari *et al.*, 2014). Некоторые виды *Chryseobacterium* способствуют усиленному росту растений и являются эффективным агентом биоконтроля в отношении оомицета *Phytophthora capsici* (Jung *et al.*, 2023). Также, в образцах без *P. viticola* было обнаружено повышенное содержание эндофитных грибов *Kabatina*, *Aureobasidium* и *Vishniacozyma*. Согласно литературным данным, некоторые виды грибов рода *Kabatina* могут синтезировать энфумафунгин, новое фунгицидное соединение (Peláez *et al.*, 2000). Кроме того, несколько видов грибов *Aureobasidium* обладают способностью продуцировать летучие органические соединения, которые оказывают ингибирующее действие на патогены винограда, в первую очередь на *B. cinerea* (Di Francesco *et al.*, 2020; Yalage Don *et al.*, 2020). Дрожжи *Vishniacozyma* имеют способность значительно снижать развитие инфекций, вызываемых грибами *P. expansum*, *B. cinerea* и *Cladosporium sp.* (Nian *et al.*, 2023; Gogordo *et al.*, 2022). Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования эндофитов винограда, относящихся к описанным выше родам, для выявления их способности подавлять развитие возбудителя ложной мучнистой росы винограда.

Специфическое выявление фитопатогенов сельскохозяйственных культур очень важно для прогнозирования очагов заболевания и борьбы с ними. Коэффициент корреляции между данными ПЦР РВ и высокопроизводительного секвенирования был самым высоким, когда использовались праймеры PvITS1_2. Таким образом, данные ПЦР РВ подтверждают данные анализа NGS. Кроме того, мы провели анализ стоимости детекции *P. viticola* в образцах винограда с помощью ПЦР РВ, метагеномного анализа и LAMP. Учитывая затраты на необходимые расходные материалы, приобретенные на российском рынке, предполагаемые затраты на анализ одного образца винограда с использованием ПЦР РВ составляют около 500 руб., в то время как использование NGS составляет около 6000 руб. Ранее сообщалось, что стоимость метода LAMP составляет примерно 650 руб. за один образец (Lou *et al.*, 2023). Следовательно, разработанные праймеры для ранней детекции *P. viticola* представляет весьма выгодную альтернативу методам NGS и LAMP.

Применение микроорганизмов в сельском хозяйстве обладает такими преимуществами, как экономическая эффективность, безвредность для окружающей среды и нетоксичность для животных, поэтому может быть рекомендовано в качестве многообещающей альтернативы традиционным удобрениям и пестицидам (Wang *et al.*, 2022). Кроме того, эндофиты можно считать источником биологически активных соединений (Tidke *et al.*, 2017). Также эндофиты могут усиливать системную устойчивость растений, в результате которой у растений активируются защитные гены и синтезируются свои вторичные метаболиты с антимикробными свойствами (Yu *et al.*, 2022). Например, продуцируемые виноградом стильбены обладают выраженной фунгицидной активностью против *P. viticola* и *B. cinerea* (Gabaston *et al.*, 2017; Taillis *et al.*, 2023).

В нашей работе мы показали, что эндофиты, выделенные из дикорастущего винограда *V. amurensis*, могут индуцировать биосинтез фармакологически ценных стильбенов у винограда, которые повышают его защитные свойства. Общее содержание стильбенов в клеточной суспензии V7 увеличилось в 2,2–16 раз после добавления живых эндофитов (рис. 3). Наибольшее содержание стильбенов составляло 2,2–4,5 мг/г (или 0,2–0,4%) массы тела, что происходило под влиянием бактерий *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. Однако более высокое увеличение уровня содержания стильбенов до 6,95–13,76 мг/г (или 0,7–1,4%) сухой биомассы было обнаружено после совместного культивирования клеток винограда V7 с эндофитными грибами *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp. (рис. 3).

Наибольшее содержание стильбенов при добавлении сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда наблюдалось в культуре клеток *V. amurensis* при добавлении 20 мг биопрепаратов на основе грибов *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. и *Trichoderma* sp. на 50 мл культуры клеток, что коррелировало со значительным увеличением экспрессии большинства анализируемых генов *PAL* и *STS* (рис. 4). Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при добавлении к культуре клеток винограда V7 10 мг биопрепарата *Trichoderma* sp. (рис. 4б). Это увеличение, по-видимому, связано с активацией биосинтеза олигомеров *транс*-резвератрола, виниферинов, являющейся защитной реакцией как на внедрение бактериальных, так и грибных патогенов (Yadav *et al.*, 2019; Sundin *et al.*, 2020). Вещества в составе биопрепаратов, вносимые в культуру клеток винограда, выступают в качестве имитаторов природных эндофитов, вызывая при этом быстрый иммунный ответ растительных клеток. Важно отметить, что полученный уровень стильбенов после добавления новых биопрепаратов сопоставим с ранее известными активаторами биосинтеза стильбенов в клетках растений *in vitro* (Larronde *et al.*, 2003; Ku *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015; Kiselev *et al.*, 2017). Однако содержание стильбенов в экспериментах было ниже, чем при использовании циклических олигосахаридов (циклодекстринов) отдельно или в сочетании с MeJa или некоторыми другими гормонами стресса растений (Belchí-Navarro *et al.*, 2013; Almagro *et al.*, 2015). Таким образом, культивируемые эндофитные микроорганизмы из дикорастущего *V. amurensis* обладают большим потенциалом для применения в виноградарстве для активации защитных свойств и индукции выработки перспективных БАВ у культивируемых сортов винограда.

Помимо активации защитных свойств растений, в сельском хозяйстве эндофитные бактерии и грибы используются для противодействия патогенам растений и ограничения использования агрохимикатов (Nigris *et al.*, 2018). Эндофитные бактерии *B. velesensis* AMR25 из *V. amurensis* имеют потенциал для снижения уровня патогенов у растений винограда. Штамм AMR 25

продемонстрировал самую сильную ингибирующую активность в отношении *B. cinerea* на уровне 71% (рис. 5к).

Исследование генома *B. velesensis* AMR25 показало, что данный штамм содержит много генов биосинтеза фунгицидов, а также другие гены, способствующие росту и лучшей защите растения от патогенов (Ananev *et al.*, 2024). В геноме AMR25 были найдены гены биосинтеза андалузицина, сурфактина, фенгицина, бациллибактина, бацилизина, макролактинина, бациллаена, диффицидина. Например, сурфактин активен против увядания томатов, вызываемого бактерией *Ralstonia solanacearum* (Xiong *et al.*, 2015). Фенгицин обладает антибактериальной активностью против бурой гнили картофеля, вызываемой *R. solanacearum*, и черной пятнистости у перца, вызываемой *Xanthomonas euvesicatoria* (Chen *et al.*, 2019; Rajčín *et al.*, 2020). Он также эффективен против различных грибных патогенов, таких как *F. oxysporum* и *F. graminearum*, а также против возбудителя серой гнили *B. cinerea* (Toral *et al.*, 2018). В геноме у исследуемого штамма AMR25 также были обнаружены гены биосинтеза сидерофоров, которые обладают противогрибковой активностью (Nagarajkumar *et al.*, 2004). Найденные гены могут объяснять высокую антагонистическую активность *B. velesensis* AMR25 против *B. cinerea*. Кроме того, анализ генома AMR25 выявил гены, участвующие во взаимодействии растений и микробов, биосинтезе фитогормонов, метаболизме азота и серы, солюбилизации фосфатов, адгезии и образования биопленки (Ananev *et al.*, 2024). Эти данные свидетельствуют о взаимовыгодных отношениях между бактерией *B. velezensis* AMR25 и виноградной лозой. Таким образом, *B. velezensis* AMR25 может быть использован для борьбы с грибными патогенами винограда и других растений.

ВЫВОДЫ

1. По данным метагеномного анализа в эндофитном микробиоме винограда *V. amurensis*, *V. coignetiae*, а также сортов Адель, Мукузани, Альфа и Прэйри стар, было найдено 130 родов бактерий и 149 родов грибов, относительная численность ампликонов которых $> 0,1\%$ как минимум у одного вида или сорта винограда. Из них в *V. amurensis* было обнаружено 128 родов эндофитных бактерий и 132 рода эндофитных грибов.

2. Показано, что *P. viticola* присутствует в 53,8% образцов винограда, не имеющих внешних симптомов ложной мучнистой росы винограда. Была выявлена обратная связь между присутствием *P. viticola* в образцах винограда и бактерий *Hymenobacter* spp., *Sphingomonas* spp., *Massilia* spp., *Methylobacterium-Methylorubrum* spp. и *Chryseobacterium* spp. и грибов *Kabatina* sp., *Aureobasidium* sp. и *Vishniacozyma* sp.

3. Установлено, что ПЦР РВ по технологии SYBR Green с парой праймеров PvITS1_2-real-s/a является эффективным методом для раннего выявления возбудителя милдью *P. viticola* в образцах винограда.

4. По данным микробиологического высева в *V. amurensis* было найдено 50 родов эндофитных бактерий и 43 рода эндофитных грибов. Были созданы коллекции эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis* лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

5. Совместное культивирование клеток *V. amurensis* с живыми биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов из амурского винограда увеличивали общее содержание стильбенов в культурах клеток винограда в 2,2–5,3 и в 2,6–16,3 раза соответственно, в то время как сухие биопрепараты на основе эндофитных бактерий и грибов увеличивали содержание стильбенов в 1,3–1,5 раза и 2,0–3,5 раза соответственно. Наибольшее содержание стильбенов в клетках винограда (13,6 мг/г сухой биомассы клеток) было достигнуто при совместном культивировании с эндофитным грибом *Biscogniauxia* sp.

6. Анализ антагонистической активности эндофитов *V. amurensis* показал, что бактерия *B. velezensis* AMR25 обладает наибольшей активностью против патогенных грибов растений, в частности возбудителя серой гнили винограда *B. cinerea*.

7. Геномный анализ *B. velezensis* AMR25 выявил 8 кластеров генов, участвующих в биосинтезе андалузицина, сурфактина, фенгицина, бациллибактина, бацилизина, макролактин, бациллаена, диффицидина, действующих против бактериальных и грибковых патогенов. Исследуемый геном также содержит ряд генов, участвующих в колонизации корней, образовании биопленок и биосинтезе фитогормонов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Aleynova O. A. The Influence of the Grapevine Bacterial and Fungal Endophytes on Biomass Accumulation and Stilbene Production by the *In Vitro* Cultivated Cells of *Vitis amurensis* Rupr. / O. A. Aleynova, A. R. Suprun, N. N. Nityagovsky [et al.] // Plants. – 2021. – Vol. 10. – № 7. – P. 1276.
2. Алейнова О. А. Активация биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи биопрепаратов на основе эндофитов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. / О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 1. – С. 53-65.
3. Aleynova O. A. The Biodiversity of Grapevine Bacterial Endophytes of *Vitis amurensis* Rupr. / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. S. Dubrovina [et al.] // Plants. – 2022a. – Vol. 11. – № 9. – P. 1128.
4. Aleynova O. A. The Diversity of Fungal Endophytes from Wild Grape *Vitis amurensis* Rupr / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. R. Suprun [et al.] // Plants. – 2022b. – Vol. 11. – № 21. – P. 2897.
5. Aleynova O. A. The Endophytic Microbiome of Wild Grapevines *Vitis amurensis* Rupr. and *Vitis coignetiae* Pulliat Growing in the Russian Far East

- / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. A. Anan'ev [et al.] // Plants. – 2023a. – Vol. 12. – № 16. – P. 2952.
6. Aleynova O. A. Bacterial and Fungal Endophytes of Grapevine Cultivars Growing in Primorsky Krai of Russia / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. A. Anan'ev [et al.] // Horticulturae. – 2023b. – Vol. 9. – № 12. – P. 1257.
7. Киселев К. В. Метод выделения ДНК из растений для метагеномного анализа на примере винограда *Vitis amurensis* Rupr. / К. В. Киселев, Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 3. – С. 361-367.
8. Nityagovsky N. N. Distribution of *Plasmopara viticola* Causing Downy Mildew in the Russian Far East Grapevines / N. N. Nityagovsky, A. A. Anan'ev, A. R. Suprun [et al.] // Horticulturae. – 2024. – Vol. 10. – № 4. – P. 326.
9. Anan'ev A. A. Whole Genome Sequencing of *Bacillus velezensis* AMR25, an Effective Antagonist Strain against Plant Pathogens / A. A. Anan'ev, Z. V. Ogneva, N. N. Nityagovsky [et al.] // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – P. 1533.

Работы, опубликованные в материалах международных научных конференций:

10. Нитяговский Н. Н. Биоразнообразие эндофитных бактерий винограда *Vitis amurensis* Rupr. / Н. Н. Нитяговский, К. В. Киселев, О. А. Алейнова // Сборник тезисов 12-ой Международной школы молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика», Крым, Россия, 14-20 сентября, 2020 г., С. 93.
11. Aleynova O. A. Biodiversity of endophytic bacteria and fungi of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr. / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, K. V. Kiselev // BIO Web of Conferences. – 2021. – Vol. 39. – P. 05001.
12. Алейнова О. А. Эндофиты дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. и их биотехнологический потенциал / О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун [и др.] // Тезисы докладов всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов», Владивосток, Россия, 19-23 сентября 2022 г., С. 57.
13. Нитяговский Н. Н. Распространение возбудителя ложной мучнистой росы *Plasmopara viticola* среди винограда дальнего востока России / Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова, А. А. Ананьев [и др.] // Тезисы докладов VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды», Иркутск, Россия, 3–7 июля 2023 г., С. 139.
14. Нитяговский Н. Н. Методы ранней диагностики возбудителя ложной мучнистой росы *Plasmopara viticola* среди винограда Дальнего Востока России / Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова, А. А. Ананьев [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской научной школы-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», Владивосток, Россия, 3–7 октября 2023 г., С. 82.

НИТЯГОВСКИЙ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ

**АКТИВАЦИЯ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ВИНОГРАДА
VITIS AMURENSIS RUPR. ПОСРЕДСТВОМ ЭНДОФИТНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук