

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной
Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Нитяговский Николай Николаевич

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

1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., проф. Санина Нина Михайловна

ВЛАДИВОСТОК – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 8 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 16 |
| 1.1 Народно-хозяйственное значение винограда..... | 16 |
| 1.2 Основные возбудители болезней винограда | 19 |
| 1.3 Методы защиты винограда от основных фитопатогенов | 22 |
| 1.4 Особенности колонизации эндофитных микроорганизмов и иммунный ответ растений | 25 |
| 1.5 Благоприятные воздействия эндофитов на состояние растения..... | 29 |
| 1.6 Эндофитные микроорганизмы винограда как активаторы защитных свойств винограда..... | 30 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 33 |
| 2.1 Сбор материала и условия стерилизации | 33 |
| 2.2 Микробиологический высев эндофитных микроорганизмов винограда | 37 |
| 2.3 Обработка культуры клеток <i>V. amurensis</i> эндофитами винограда и биопрепаратами на их основе | 38 |
| 2.4 Анализ антагонистической активности <i>B. velezensis</i> AMR25 против патогенов растений | 39 |
| 2.5 Выделение и анализ нуклеиновых кислот..... | 40 |
| 2.5.1 Выделение ДНК из штаммов эндофитов и секвенирование по Сэнгеру..... | 40 |
| 2.5.2 Выделение ДНК для секвенирования метагенома и биоинформатический анализ | 41 |
| 2.5.3 Выявление <i>P. viticola</i> с помощью количественного ПЦР РВ..... | 45 |
| 2.5.4 Выделение ДНК для секвенирования полного генома <i>B. velezensis</i> AMR25 и биоинформатический анализ..... | 47 |
| 2.5.5 Выделение РНК, получение комплементарной ДНК и проведение количественного ПЦР РВ..... | 49 |
| 2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография | 50 |
| 2.7 Статистическая обработка данных..... | 51 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ..... | 53 |
| 3.1 Разработка метода выделения ДНК для метагеномного анализа | 53 |

| | |
|---|-----|
| 3.2 Состав и структура эндофитов винограда на Дальнем Востоке России. | 56 |
| 3.2.1 Результаты высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК из тканей винограда | 56 |
| 3.2.2 Состав и структура эндофитных бактерий в дикорастущих <i>V. amurensis</i> , <i>V. coignetiae</i> и широко культивируемых сортах винограда, возделываемых в Приморском крае..... | 57 |
| 3.2.3 Состав и структура эндофитных грибов в <i>V. amurensis</i> , <i>V. coignetiae</i> и широко культивируемых сортах винограда, возделываемых в Приморском крае | 61 |
| 3.3 Выявление возбудителя ложной мучнистой росы в винограде | 65 |
| 3.4 Сравнительный анализ состава эндофитов в образцах винограда, пораженных <i>P. viticola</i> | 68 |
| 3.5 Анализ <i>in silico</i> потенциальных микроорганизмов-антагонистов <i>P. viticola</i> | 70 |
| 3.6 Анализ эффективности применения ПЦР PB SYBR Green I для выявления <i>P. viticola</i> в винограде..... | 72 |
| 3.7 Влияние основных эндофитов винограда и препаратов на их основе на культуру клеток <i>V. amurensis</i> | 77 |
| 3.7.1 Анализ воздействия нативных эндофитов винограда на рост клеток и содержание стильбенов в культуре клеток <i>V. amurensis</i> | 77 |
| 3.7.2 Анализ воздействия сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда на рост клеток и содержание стильбенов в культуре клеток <i>V. amurensis</i> | 84 |
| 3.8 Антипатогенные свойства эндофитной бактерии <i>B. velezensis</i> AMR25, выделенной из <i>V. amurensis</i> | 96 |
| 3.9 Секвенирование полного генома эндофитной бактерии винограда <i>B. velezensis</i> AMR 25 | 97 |
| 3.9.1 Аннотация полного генома AMR25 и сравнительный анализ | 97 |
| 3.9.2 Генетические элементы <i>B. velezensis</i> AMR25, ответственные за взаимодействие растений и бактерий | 104 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 106 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 121 |
| ВЫВОДЫ | 122 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 124 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНУ – альфа-нафтилуксусная кислота

АФК – активные формы кислорода

БАВ – биологически активные вещества

БАП – 6-бензиламинопурин

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-детекцией

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КДА – картофельно-декстрозный агар

КДБ – картофельно-декстрозный бульон

кДНК – комплементарная ДНК

КоА – кофермент А

ОТ-ПЦР – обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция

п.н. – пары нуклеотидов

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – ПЦР с детекцией результатов в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

УФ-С – Ультрафиолетовое излучение типа С

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

4CL – 4-кумарат-КоА лигаза

Actin – актин

ANI – средняя идентичность нуклеотидов

ANOVA – односторонний дисперсионный анализ

ASV – вариант последовательности ампликона

AT-PKS – ацилтрансфераза поликетидсинтазы

BLAST – средство поиска основного локального выравнивания

C4H – 4-гидроксилаза коричной кислоты
CDS – кодирующая последовательность
cheABDRWY – белки хемотаксиса
COG – кластеры ортологичных групп белков
Cox1 – цитохром С оксидаза I
Cox2 – цитохром С оксидаза II
DAMP – молекулярные структуры или паттерны, связанные с повреждением клеточной стенки растений
dapF – диаминопемлат эпимераза
ddh – ДНК-ДНК-гибридизация
dhaS – альдегиддегидрогеназа
ETI – иммунитет растений, запускаемый эффекторами
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GC – процентное содержание гуанина (G) и цитозина (C)
GO – генная онтология
GuSCN – гуанидин тиоцианат
gyrA – субъединица ДНК-гиразы A
hemAT – гемсодержащий преобразователь сигнала, ответственный за аэротаксис
IAA – индол-3-уксусная кислота
IAAT – ацетилтрансфераза индол-3-уксусной кислоты
IAM – индол-3-ацетамид
IAN – индол-3-ацетонитрил
IPyA – индол-3-пировиноградная кислота
ITS1 – внутренний транскрибируемый спейсер 1
KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов
LAMP – быстрая петлевая изотермическая амплификация
MAMP – молекулы или паттерны, связанные с микробами
msrABC – белки хемотаксиса, принимающие метил
MeJa – метилжасмонат
miaA – тРНК-димемталлилтрансфераза

miaB – 2-метилтио N6-димемталлиладеносинтаза

narGHIJ – нитратредуктаза 1

nark – нитрат/нитритный антипортер

NB-LRR – белки, содержащие сайт связывания нуклеотидов (NBS) и богатые лейцином повторы (LRR)

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США

NGS – высокопроизводительное секвенирование нового поколения

NMDS – метод неметрического многомерного шкалирования

NO – оксид азота

NRP – нерибосомальный пептид

NsrR – репрессор транскрипции НТН-типа

OTU – операционная таксономическая единица

PAL – фенилаланин-аммиак-лиаза

patB – карбоксилэстераза

phoD – щелочная фосфатаза

phy – фитаза

PKS – поликетидсинтаза

PRR – трансмембранные рецепторы растений для распознавания молекулярных паттернов

PR-белки – белки, связанные с патогенезом

pstABC – белки системы транспорта фосфатов

PTI – иммунитет растений, активируемый молекулярными паттернами, ассоциированными с патогеном

RiPP – рибосомально синтезированный и посттрансляционно модифицированный пептид

Rpv – локус устойчивости к *Plasmopara viticola*

rsbU – фосфосеринфосфатаза

STS – стильбенсинтаза

T3PKS – поликетидсинтаза III типа

Tm – температура плавления

ureABC – уреазы

uscC – декарбоксилаза фенольной кислоты

uscE – фосфатаза

yfmS – белок-преобразователь хемотаксического сигнала

yhcX – гидролаза

ysnE – N-ацетилтрансфераза

yvdD – цитокининмонофосфатфосфорибо-гидролаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Виноград является одной из самых востребованных и экономически-важных агрокультур в мире (Alston, Sambucci, 2019). Виноград используется для производства вина, шампанского, коньяка и других алкогольных напитков. Из винограда также производят сок, желе, уксус, масло, изюм и другие продукты. Широко распространённым представителем рода *Vitis* L. на Дальнем Востоке является дикорастущий виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr. У данного растения сильная и развитая корневая система, что позволяет данному виду выдерживать температуры до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ без необходимости укрывания растения, что экономит время для ухода за виноградниками. *V. amurensis* обладает высокой устойчивостью ко многим болезням, таким как мучнистая роса (Wu *et al.*, 2010), виноградная белая гниль и виноградный антракноз (Liu, Li, 2013), и поэтому этот вид винограда широко используют в качестве подвоев для прививки культурных сортов на Дальнем Востоке. Ещё одним представителем рода, произрастающим на Дальнем Востоке, является *V. coignetiae* Pulliat ex Planch. Он распространён на юге о. Сахалин, о. Монерон и Курилах (Шикотан, Кунашир, Итуруп, Юрий), на японских островах Хоккайдо, Хонсю и Сикоку, а также в Корее, и благодаря осенней багряно-красной листве лианы используется для декоративного озеленения (Усенко, 2009). На виноградниках Приморского края наиболее часто культивируются привезенные из европейской части России сорта *V. vinifera* \times *V. amurensis* cv. Адель, *V. riparia* \times *V. vinifera* cv. Мукузани, *V. labrusca* \times *V. riparia* cv. Альфа и *Vitis* Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар (Aleynova *et al.*, 2023b). Важность винограда обусловлена его питательными свойствами – он содержит много витаминов, минералов и полифенольных соединений, в частности, стильбенов, обладающих антиоксидантными свойствами (Kedage *et al.*, 2007).

Стильбены – это небольшая группа природных фенольных соединений. Основным и наиболее известным стильбеном является *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен). *Транс*-резвератрол способен предупреждать

возникновение и развитие сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, замедлять процесс старения различных живых организмов (Kiselev, 2011). *V. amurensis* и *V. coignetiae* являются богатыми источниками *транс*-резвератрола и других стильбенов (Tyunin *et al.*, 2020). Помимо полезных свойств для здоровья человека, установлено, что стильбены играют важную роль в защите растений от микробных патогенов (Dubrovina, Kiselev, 2017).

Растения винограда довольно сильно подвержены воздействию внешней среды и заболеваниям разной этиологии. Биотические и абиотические стрессы сильно влияют на рост, урожайность и качество плодов культивируемых сортов винограда, что в свою очередь приводит к экономическому урону сельскохозяйственной отрасли (Wilcox *et al.* 2015). Среди абиотических факторов, вызывающих заболевания винограда, выделяются неблагоприятные условия окружающей среды: пониженные или повышенные температуры, засоленность почвы, засуха, а также нарушение питания и токсичное действие пестицидов (Wilcox *et al.* 2015). Заболевания виноградной лозы могут быть вызваны бактериями, фитоплазмами, вирусами, вирусоподобными агентами и нематодами-паразитами. 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 развивается направление исследований, основанное на изучении влияния 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). Вторичные метаболиты, синтезируемые эндофитами, могут уменьшать количество фитопатогенных бактерий и грибов в растении. У эндофитов было обнаружено множество вторичных метаболитов с антимикробными свойствами, например, флавоноиды, пептиды, хиноны, алкалоиды, фенолы, стероиды, терпеноиды и поликетиды (Mousa, Raizada, 2013; Narayanan, Glick, 2022). Кроме того, эндофиты могут индуцировать системную устойчивость у растений, в результате которой у растения активируются защитные гены и синтезируются свои вторичные метаболиты с антимикробными свойствами (Yu *et al.*, 2022). Например, продуцируемые виноградом стильбены обладают выраженной фунгицидной активностью против возбудителя милдью *P. viticola* и возбудителя серой гнили *B. cinerea* (Gabaston *et al.*, 2017; Taillis *et al.*, 2023).

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. Некоторые микроорганизмы, населяющие виноград, имеют способность угнетать рост патогенных грибов и бактерий, а также обладают способностью синтезировать ауксины, производить минерализацию слаборастворимых солей фосфора, обладают ферментативной активностью, что в свою очередь способствует росту растения (Shcherbakov *et al.*, 2016). Кроме того, состав микробиоты винограда и вина демонстрирует региональные закономерности, которые коррелируют с химическим составом вина. Следовательно, микробиом винограда может придавать вину уникальные вкус и аромат, характерные для винодельческого региона (Bokulich *et al.*, 2016). 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 растений винограда, произрастающих на Дальнем Востоке. Ранее китайскими учеными был описан новый патогенный гриб *Fusarium avenaceum*, поражающий плоды *V. amurensis* (Wang *et al.*, 2015). Недавно была опубликована работа, где 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 высев 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.

Основные 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 объем 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 наименований.

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 «Биоразнообразие» 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Народно-хозяйственное значение винограда

Виноград относится к роду *Vitis*, семейству Vitaceae, порядку Vitales. Род включает около 70 видов, которые произрастают в умеренных и субтропических зонах. Отдельные сорта могут произрастать в холодном климате. В 2021 году в России площадь виноградников оценивалась в ~84,7 тыс. га (БГД - Сельское хозяйство в России - 2021 г.). Наибольшие площади виноградников в России расположены в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах, где климат благоприятствует выращивать теплолюбивые культуры. Однако применение более устойчивых к холоду гибридов культурных и диких сортов позволяет выращивать виноград в более суровых климатических условиях, как например юг Дальнего востока России (Шатилов, 1998; Абузов, 2009), для которого характерны холодная зима и влажное лето.

Основным представителем дальневосточного винограда является дикий виноград *V. amurensis*. Этот вид имеет сильную и развитую корневую систему, которая позволяет выдерживать температуру до -40 °С без укрытия растения, что значительно сокращает время ухода за виноградниками. *V. amurensis* обладает высокой устойчивостью ко многим болезням, таким как мучнистая роса (Wu *et al.*, 2010), виноградная белая гниль и виноградный антракноз (Liu, Li, 2013), и поэтому этот вид винограда широко используют в качестве подвоев для прививки культурных сортов Дальнего Востока. И.В. Мичурин, А.М. Негруль, Я.И. Потапенко и другие учёные широко использовали *V. amurensis* для выведения морозостойких сортов для виноградарства. К наиболее известным выведенным сортам можно отнести Фиолетовый ранний, Цветочный, Русский ранний, Саперави северный, Заря Севера, Краса Севера и другие (Шатилов, 1998; Абузов, 2009). Другим видом винограда, произрастающим на Дальнем Востоке, является *V. coignetiae*. Он распространен на юге о. Сахалин и благодаря осенней багряно-красной листве лианы используется для декоративного озеленения (Усенко, 2009).

Как известно, виноград является одной из самых важных культур в мире (Alston, Sambucci, 2019). В виноделии виноград используется для производства вина, шампанского, коньяка и других алкогольных напитков. Из винограда также производят сок, желе, уксус, масло, изюм и другие продукты. Важность винограда обусловлена его питательными свойствами – он содержит много витаминов, минералов и антиоксидантов (Kedage *et al.*, 2007). Известно, что окислительный стресс является весомым фактором, способствующим развитию многих заболеваний человека, особенно нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний (Rudrapal *et al.*, 2022). Употребление в пищу продуктов с антиоксидантной и противовоспалительной активностями способствует снижению риска развития перечисленных заболеваний (Rudrapal *et al.*, 2022). *V. amurensis* и *V. coignetiae* являются богатыми источниками стильбенов, обладающих антиоксидантной активностью (Tyunin *et al.*, 2020). Помимо винограда стильбены встречаются в ряде растений неродственных семейств, таких как арахис (Fabaceae), сорго (Poaceae), черника (Ericaceae), горец (Polygonaceae), ель (Pinaceae) и другие (Dubrovina, Kiselev, 2017).

Стильбены – это небольшая группа природных фенольных соединений. Основным и наиболее известным стильбеном является *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен) (Kiselev, 2011). Биосинтез *транс*-резвератрола и других стильбенов осуществляется фенилпропаноидным путём. Первый фермент в этом пути, фенилаланин аммиак-лиаза (PAL) производит монооксидативную деаминизацию фенилаланина, что приводит к получению коричной кислоты (Langcake, Pryce, 1977). Затем, коричная кислота преобразуется ферментом 4-гидроксилазой коричной кислоты (C4H) в *p*-кумаровую кислоту. Затем *p*-кумаровая кислота преобразуется ферментом 4-кумарат-КоА лигазой (4CL) в кофермент А (КоА) *p*-кумаровой кислоты. В заключение, ключевой фермент в биосинтезе *транс*-резвератрола и стильбенов на его основе, стильбен синтаза (STS) использует в качестве субстрата 3 молекулы малонил-КоА и 1 молекулу КоА *p*-кумаровой кислоты для образования *транс*-резвератрола (Rupprich *et al.*, 1980). Будучи токсичным для растительной клетки, *транс*-резвератрол может

подвергаться различным модификациям с образованием других стильбенов, таких как *транс*-пицеид и *транс*-резвератрол дигликозид, возникающие в результате гликозилирования *транс*-резвератрола, а также *транс*- ϵ -виниферин и *транс*- δ -виниферин, являющиеся продуктами олигомеризации *транс*-резвератрола (Aleynova *et al.*, 2016a).

Фермент STS в геноме винограда *V. vinifera* представлен мультигенным семейством, состоящем из 48 генов, 32 из которых охарактеризованы как функциональные (Parage *et al.*, 2012). Для дикорастущего винограда *V. amurensis* были охарактеризованы 10 экспрессируемых генов STS (*VaSTS1-VaSTS10*). Содержание *транс*-резвератрола и других стильбенов в культурах клеток винограда *V. amurensis* напрямую зависит от уровней экспрессии генов *VaSTS* (Shumakova *et al.*, 2011).

Транс-резвератрол способен предупреждать возникновение и развитие сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, замедлять процесс старения (Kiselev, 2011). Известно, что ϵ -виниферин обладает мощным нейропротекторным действием в отношении болезни Гентингтона, снижая уровень активных форм кислорода и предотвращая потерю мембранного потенциала в митохондриях (Fu *et al.*, 2012). Также, ϵ -виниферин эффективнее, чем *транс*-резвератрол улучшает функции сосудистых эндотелиальных клеток и сердца, повышая пролиферацию клеток за счет образования оксида азота, который защищает клетки от окислительного стресса (Zghonda *et al.*, 2012). δ -виниферин защищает эндотелиальные клетки человека от окислительного стресса, вызванного высоким содержанием глюкозы (Zhao *et al.*, 2016). Кроме того, виниферины и их синтетические аналоги имеют перспективы для производства на их основе новых антибиотиков. Известно, что ϵ -виниферин ингибирует образование биоплёнок у энтерогеморрагического штамма *Escherichia coli*, который является частой причиной пищевых отравлений, и у синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* с высокой устойчивостью к антибиотикам (Lee *et al.*, 2014). Также показано, что ϵ -виниферин, выделенный из листьев и стеблей винограда *V. amurensis* обладает сильной антибактериальной активностью против двух патогенов полости рта

Streptococcus mutans и *S. sanguis*, которые связаны с кариесом и пародонтитом (Yim *et al.*, 2010). Синтетические виниферины также обладают антибактериальной и антибиопленочной активностью против *S. pneumonia*, вызывающего различные инфекционные заболевания (Yadav *et al.*, 2019).

Помимо полезных свойств для здоровья человека, установлено, что стильбены играют важную роль в защите растений от микробных патогенов (Dubrovina, Kiselev, 2017). Например, виниферины обладают выраженными противогрибковыми свойствами в отношении патогенов винограда (Langcake, 1981).

Таким образом, виноград, в том числе и его дикорастущие дальневосточные виды, представляют собой не только важную культурную, сельскохозяйственную и экономическую ценность, но и обладают широким спектром полезных свойств для здоровья человека.

1.2 Основные возбудители болезней винограда

Виноград является одной из самых экономически значимых сельскохозяйственных культур в мире (Alston, Sambucci, 2019). В свою очередь, это растение довольно сильно подвержено воздействию внешней среды и заболеваниям разной этиологии. Биотические и абиотические стрессы сильно влияют на рост, урожайность и качество плодов культивируемых сортов винограда, что в свою очередь приводит к экономическому урону сельскохозяйственной отрасли (Wilcox *et al.*, 2015). Среди абиотических факторов, вызывающих заболевания винограда, выделяются неблагоприятные условия окружающей среды: пониженные или повышенные температуры, засоленность почвы, засуха, а также нарушение питания и токсичное действие пестицидов (Wilcox *et al.*, 2015). Заболевания виноградной лозы могут быть вызваны бактериями, фитоплазмами, вирусами, вирусоподобными агентами и нематодами-паразитами (Wilcox *et al.*, 2015). Для европейских, американских и австралийских сортов винограда собрано достаточно много сведений о патогенных микроорганизмах винограда (Bertsch *et al.*, 2013; Armijo *et al.*, 2016).

Известно, что на территории европейских государств основными заболеваниями винограда на примере возделываемого вида *V. vinifera* являются серая гниль, мучнистая роса (пепелица виноградной лозы, бель, оидиум), ложная мучнистая роса (милдью), болезнь Пирса и корончатый галл, возбудителями которых являются *B. cinerea*, *Erysiphe necator*, *P. viticola*, *Xylella fastidiosa*, *Agrobacterium vitis* соответственно (Armijo *et al.*, 2016). На американском и австралийском континентах виноделы ежегодно теряют миллионы долларов из-за болезней ствола виноградной лозы (Эска винограда, болезнь Петри и «черная нога»), которые приводят к отмиранию древесины винограда (Bertsch *et al.*, 2013). Основными возбудителями этих болезней являются грибы *Eutypa lata* и *Botryosphaeria sp.* Начиная с 2000-х данными заболеваниями все чаще стали заражаться растения винограда, произрастающие на территории европейских государств (Bruez *et al.*, 2013).

Для сортов винограда часто встречающимися патогенами являются грибы и грибоподобные организмы, являющиеся причиной таких заболеваний, как серая гниль и милдью, которые ежегодно встречаются на виноградных плантациях по всему миру (Wilcox *et al.*, 2015). Возбудителем милдью винограда является грибоподобный организм *P. viticola*, который относится к оомицетам. Этот паразит поражает исключительно растения винограда и все их зеленые части. Он наносит особенно большой ущерб виноградным плантациям в летний сезон в годы частых дождей, туманов и рос. Первичным источником заражения служат пережившие зиму в опавших листьях ооспоры, которые прорастают при температурах около 11-13 °С и влажной почвы. Образовавшиеся макроспорангии попадают в воздух с брызгами дождя и воздушно-капельным путём разносятся на листья. При наличии водной плёнки на листе и низких положительных температур (около 10 °С) из макроспорангия выходят зооспоры, которые попадают в ткани винограда через устьица, в результате чего происходит первичное заражение. Благоприятным временем для инфекции является тёмное время суток (Gessler *et al.*, 2011). При высокой влажности и температуре около 13-19 °С симптомы данного заболевания проявляются приблизительно на 5-7 день

после инфекции и включают в себя: появление спорангиев и спорангиеносцев, которые выглядят как белая или серая оболочка на нижней поверхности листа, и желтых и бурых пятен на верхней части листа. На молодых ягодах также появляются пятна, которые увеличиваются и темнеют. Ягоды не развиваются и опадают. Спорангии разносятся дождём на соседние листья, в результате чего происходит вторичная инфекция. В толще растительной ткани в результате полового процесса между совместимыми штаммами образуются ооспоры. Если инфекция не контролируется, она может привести к полному уничтожению урожая. Визуально заражённость растения данным патогеном можно обнаружить только на поздних стадиях развития, когда активно проявляются внешние симптомы (Gessler *et al.*, 2011).

Серая гниль – это одно из самых распространённых заболеваний винограда, вызываемое некротрофным грибом *B. cinerea*, который относится к отделу Ascomycota. Это заболевание поражает все части растения, включая стебли, листья, соцветия и ягоды. Источником инфекции винограда служат конидии гриба, которые образуются в конце зимы и начале весны на перезимовавшем мицелии и/или склероции на тканях хозяина и на поверхности почвы. Также источником заражения могут быть альтернативные хозяева гриба, например, обработанные гербицидами или стареющие сорняки и другие заражённые культуры поблизости. Споры гриба разносятся ветром и попадают на повреждённые ткани, где в течение 1-2 дней начинают прорастать и распространяться. Температура в пределах 15-25 °С, высокая влажность и водная плёнка на раненых тканях являются благоприятными условиями для заражения. Наибольшую опасность *B. cinerea* представляет для ягод, которые в результате заражения сморщиваются и опадают, а при достаточно влажных условиях на них образуется серый налёт. На листьях винограда грибок также образует некротические поражения и налёт. Если не принять меры, заболевание может распространиться на весь виноградник, что приведет к значительной потере урожая (Elad *et al.*, 2004).

Поэтому раннее обнаружение патогенов и эффективное применение методов борьбы с ними в виноградниках являются ключевыми факторами для снижения риска потери урожая из-за болезней и повышения качества винограда.

1.3 Методы защиты винограда от основных фитопатогенов

Для борьбы с болезнями винограда используют различные методы. Среди них можно выделить несколько групп: агротехнические, химические и биологические (Раджабов и др., 2021). Агротехнический метод является классическим, ключевым подходом к защите растений. К некоторым агротехническим приёмам для ухода за виноградом относятся соблюдение густоты и глубины заделки посадки; своевременные полив, подкормка, пасынкование и чеканка лозы; уничтожение листового опада; использование устойчивых к болезням и вредителям сортов винограда. Однако, чтобы предотвратить распространение заболевания на другие части растения, необходимы своевременная обрезка и удаление пораженных патогеном листьев, побегов и ягод винограда (Раджабов и др., 2021). К традиционным методам обнаружения ооспор *P. viticola* в листьях винограда относятся: прямые микроскопические наблюдения листьев (Burrugno, 2000; Vercesi *et al.*, 2000; Díez-Navajas *et al.*, 2007; Toffolatti *et al.*, 2007); и косвенная оценка с использованием биоанализа “плавающего диска листа винограда (floating grape leaf disc)”, где фрагменты листьев, содержащие ооспоры, погружают в воду в присутствии не зараженных плавающих листовых дисков, таким образом зооспоры, происходящие из ооспор, вызывают инфекцию у здоровых листовых дисков, тяжесть которой пропорциональна количеству ооспор (Vercesi *et al.*, 2010).

Традиционные методы оценки не позволяют количественно определить *P. viticola* в инфицированных образцах, особенно в образцах с низкой концентрацией патогена. В настоящее время существуют новые более эффективные подходы для идентификации оомицета *P. viticola* в тканях винограда: 1) спектрофотометрический метод для определения жизнеспособности спорангий и зооспор оомицета *P. viticola* (Hong, Scherm, 2020); 2) нецелевой

метаболомный подход (высокочувствительные методы на основе ВЭЖХ-МС), при котором происходит идентификация плазмоспецифичных липидных производных (Negrel *et al.*, 2018); 3) молекулярные методы с высокой специфичностью и чувствительностью для количественного определения патогена, такие как количественный ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) (Valsesia *et al.*, 2005; Si Ammour *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023) и метод петлевой изотермической амплификации (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) (Kong *et al.*, 2016). Вальсесия с коллегами (Valsesia *et al.*, 2005) разработали мультиплексный метод ПЦР РВ для относительного количественного определения ДНК *P. viticola* непосредственно из листьев *V. vinifera*, где использовали TaqMan праймеры и пробы Giор, подобранные к участку последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1) – 5,8S рДНК. Позднее был использован аналогичный анализ для определения количества ДНК *P. viticola* в зараженных, стареющих листьях (Ammour *et al.*, 2020). Метод LAMP был разработан на основе последовательности ITS1 *P. viticola*. Этот анализ обладал высокой чувствительностью и позволял обнаружить присутствие менее 33 фг геномной ДНК *P. viticola* на 25 мкл реакции в течение 30 мин (Kong *et al.*, 2016). Разработка новых и модификация уже имеющихся подходов ранней диагностики потенциально могут повысить эффективность применения агротехнического метода в виноградарстве.

Химические методы являются более современными и очень эффективными для предупреждения развития заболеваний винограда, вызванных грибами и грибоподобными организмами. Для этой цели в определённые периоды сезона на виноград распыляют фунгициды, которые относятся к группе пестицидов. Традиционным подходом является обработка листьев, стеблей и ягод виноградной лозы бордоской жидкостью, которая представляет собой раствор медного купороса в известковом молоке (Millardet, 2018). Также применяют хлорокись меди или растворы серы (Petit *et al.*, 2012). Современными фунгицидами являются пираклостробин, метирам, цимоксанил, фамоксадон, манкоцеб, мефеноксам и другие (Lewis *et al.*, 2016). Однако интенсивное

использование пестицидов оказывает неблагоприятное воздействие на людей и функционирование экосистем. Агрехимикаты вызывают химическое загрязнение окружающей среды, нарушают последовательность пищевых цепочек экосистем, снижают плодородие почв и в целом нарушают экологический баланс (Tudi *et al.*, 2021). Многократное применение бордоской жидкости и других медных фунгицидов может привести к накоплению в почве меди, которая в конечном итоге окажется токсичной для растений (Tattar, 1989). Также, применяемые в виноградарстве фунгициды, как правило, являются опасными для водных организмов (Lewis *et al.*, 2016). Например, фамоксадон считается нейротоксикантом и известен как раздражитель глаз и кожи. Он высоко токсичен для рыб и водных беспозвоночных и умеренно токсичен для дождевых червей и медоносных пчел (Lewis *et al.*, 2016). Кроме того, некоторые фунгициды являются токсичными для млекопитающих. Например, цимоксанил может оказывать неблагоприятное воздействие на репродукцию/развитие и обладает высоким потенциалом к накоплению в тканях. Также, он умеренно ядовит для большинства водных организмов, дождевых червей и пчел (Lewis *et al.*, 2016).

Серьезным негативным следствием частого использования фунгицидов является развитие устойчивости у патогенных грибов. Распространенным механизмом приобретения резистентности является изменение аминокислотной последовательности целевого для фунгицида фермента. В дополнение, грибы также могут развивать метаболические пути, которые обходят целевой белок или приобретают ферменты, которые обеспечивают метаболизм фунгицида в безвредное вещество (Deising *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2015). В некоторых случаях у патогена развивается устойчивость к нескольким фунгицидам – явление, известное как перекрестная резистентность. Эти дополнительные фунгициды обычно принадлежат к одному и тому же химическому семейству, действуют одинаково или имеют аналогичный механизм детоксикации. Известны случаи устойчивости к фунгицидам у возбудителей милдью (Massi *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2020) и серой гнили винограда (DeLong *et al.*, 2020), ежегодно встречающихся на виноградниках по всему миру.

Перспективной группой методов борьбы с заболеваниями винограда являются биологические методы. В частности, обработка растений эндофитными микроорганизмами. К эндофитам растений относят 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). В последние годы активно развивается направление, основанное на изучении влияния 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).

1.4 Особенности колонизации эндофитных микроорганизмов и иммунный ответ растений

При колонизации растения все микроорганизмы, в том числе и патогенные, сталкиваются с иммунной системой растения. Растительный иммунитет включает в себя два уровня защиты (Шафикова, Омеличкина, 2015). Первый уровень защиты является неспецифическим, и описан в литературе как иммунитет, активируемый молекулярными паттернами, ассоциированными с патогеном (Pattern-Triggered Immunity, PTI). PTI распознаёт консервативные молекулы, характерные для многих микроорганизмов. Эти молекулы известны как молекулярные паттерны, связанные с микробами (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMP) (Fadiji, Babalola, 2020). Для каждой группы микроорганизмов характерны свои MAMP, например, для бактерий – это флагеллин, фактор элонгации трансляции, пептидогликан, липополисахариды, белки холодового шока и супероксиддисмутаза, для грибов – фрагменты хитина, для оомицетов – β -1,3-глюканы и эйкозаполиеновые кислоты (Newman *et al.*, 2013; Robinson,

Bostock, 2015). Кроме МАР индикаторами атаки патогена могут служить молекулярные структуры, связанные с повреждением клеточной стенки растений (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP) (Hou *et al.*, 2019). К ним относятся олигогалактуронаты, системин, растительные элиситорные пептиды и внеклеточный АТФ (Hou *et al.*, 2019). МАР и DAMP распознаются трансмембранными рецепторами распознавания (Pattern recognition receptors, PRR), которые локализованы на плазматической мембране растительных клеток. Трансдукция сигнала запускает защитные реакции растения, которые включают в себя приток внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль, выработку активных форм кислорода (АФК) и азота (NO), экспрессию защитных генов и продукцию антимикробных соединений, изменения в клеточной стенке растений, а также биосинтез салициловой кислоты, жасмоновой кислоты и этилена, которые являются сигнальными молекулами, участвующими в развитии системной устойчивости, способствующей лучшей защите растений от биотических стрессов (Newman *et al.*, 2013).

Второй уровень защиты является специфическим, и описан в литературе как иммунитет, запускаемый эффекторами (Effector-Triggered Immunity, ETI) (Шафикова, Омеличкина, 2015). Этот уровень защиты распознаёт молекулярные структуры, которые характерны для конкретных патогенов. Как правило, эти структуры синтезируются патогеном, чтобы подавить иммунную систему растения. Для подавления защитных реакций растений и содействия развитию заболевания бактерии приобрели способность доставлять эффекторные молекулы внутрь клеток-хозяев через белки системы секреции (Green, Mecsas, 2016). Внутри растительных клеток бактериальные эффекторные белки могут быть направлены в различные субклеточные компартменты, например, компоненты плазматической мембраны, хлоропластов, ядра, компоненты сигнальных систем и транспорта везикул, чтобы манипулировать их молекулярными функциями (Deslandes, Rivas, 2012). Грибы также синтезируют эффекторы, которые могут быть либо токсичными вторичными метаболитами, либо белками, убивающими растение-хозяин (у некротрофных грибов). Также, эффекторами могут быть

секретируемые белки, которые защищают гриб, подавляют иммунный ответ или манипулируют физиологией клетки-хозяина (Lo Presti *et al.*, 2015).

Бактериальные и грибные эффекторы связываются с внутриклеточными рецепторами растительной клетки, что активирует ЕТІ. В результате чего запускается экспрессия R-генов, продукты которых опосредуют устойчивость к определенным штаммам бактерий, грибов и оомицетов (Cui *et al.*, 2015). Продукты генов R представляют собой белки, которые распознают эффекторы конкретных патогенов либо посредством прямого связывания, либо путем распознавания изменений под действием эффектора белков растительной клетки. Многие R-гены кодируют внутриклеточные нуклеотидсвязывающие белки NB-LRR, содержащие лейциновые повторы. Большинство иммунных систем растений несут репертуар из 100–600 различных гомологов гена R. Взаимодействие эффекторов патогенов и продуктов генов R приводит к более интенсивному по сравнению с РТІ образованию АФК и NO, синтезу антимикробных молекул, этилена, салициловой и жасмоновой кислот (Cui *et al.*, 2015). Также, ЕТІ индуцирует запуск программируемой клеточной гибели (апоптоз), что фенотипически проявляется как локальный некроз в месте инфицирования на поверхности листа, стебля и на кончике корня растений. Апоптоз позволяет локализовать место инфекции, что препятствует её дальнейшему распространению (Cui *et al.*, 2015).

В последнее время появились доказательства того, что эндофитные бактерии производят свои собственные МАРР, которые в отличие от фитопатогенных обычно не вызывают значительных иммунных ответов растений, чтобы избежать антагонистических эффектов растения (Trdá *et al.*, 2014). Так, например, flg22 – пептид из 22 аминокислот, присутствующий в N-концевой части флагеллина бактерий, запускает РТІ у нескольких видов растений. У винограда иммунные реакции, запускаемые flg22, сохраняются и приводят к частичной устойчивости к *B. cinerea*. В отличие от пептидов flg22, полученных из *P. aeruginosa* или *Xanthomonas campestris*, пептид flg22, полученный из стимулирующей рост эндофитной бактерии *Burkholderia phytofirmans*, вызывал лишь небольшую

продукцию АФК, слабую и временную экспрессию защитных генов, а также не ингибировал рост виноградной лозы. Эти результаты демонстрируют, что иммунная система винограда по-разному распознает flg22 из разных бактерий, и позволяют предположить, что флагеллин из эндофитной бактерии *B. phytofirmans* эволюционировал, чтобы избежать иммунного ответа растения (Trdá *et al.*, 2014).

Другая стратегия уклонения, используемая некоторыми симбиотическими микробами – это посттрансляционная модификация белка флагеллина (Hirai *et al.*, 2011). Например, флагеллин из штамма N1141 грамотрицательной фитопатогенной бактерии *Acidovorax avenae* активировал иммунные реакции у риса, тогда как флагеллин из штамма K1 *A. avenae* не обладает такими свойствами. Дегликозилированный флагеллин в штамме K1 индуцировал иммунный ответ таким же образом, как и флагеллин из штамма N1141. Таким образом, гликозилирование белка флагеллина приводит к маскировке его восприятия иммунной системой растения (Hirai *et al.*, 2011).

Кроме того, предполагается, что для снижения интенсивности иммунного ответа со стороны ЕТІ у эндофитных бактерий, по сравнению с патогенными бактериями, меньше белков системы секреции, через которые в растения проникают эффекторы, чтобы подавить иммунитет хозяина (Reinhold-Hurek, Hurek, 2011). Так, анализ геномов всех эндофитных штаммов *Herbaspirillum* показал отсутствие у них систем секреции типа IV. Кроме того, у *Herbaspirillum frisingense*, азотфиксирующего бактериального эндофита, также отсутствует система секреции типа III (Straub *et al.*, 2013). Штамм BH72 другого эндофита, *Azoarcus sp.*, был описан как «обезоруженный» штамм, поскольку у него отсутствуют некоторые белки клеточной поверхности, а также системы секреции типа III и IV, которые необходимы для патогенеза (Krause *et al.*, 2006). Таким образом, на основе секвенирования геномов различных эндофитных бактерий можно понять, что в целом системы секреции типа III и IV широко распространены в бактериальных патогенах и либо отсутствуют, либо присутствуют в меньшем количестве в бактериальных эндофитах (Reinhold-Hurek, Hurek, 2011). Однако, есть исключения. Для колонизации риса эндофиту

Bradyrhizobium sp. штамма SUTN9-2 необходимы системы секреции типа III и IV (Piromyou *et al.*, 2015).

Грибные эндофиты также могут подавлять МАР-опосредованную иммунную реакцию с помощью своих эффекторов. Так, эндофитный гриб *Rhizophagus irregularis* секретирует эффектор LysM, который защищает гриб от хитиназ и связывается с хитином, что снижает хитин-опосредованный иммунный ответ (Zeng *et al.*, 2020).

Эндофиты также могут влиять на сигнальные пути фитогормонов, чтобы преодолеть защитный ответ растения. Синтез контр-фитогормонов, таких как ауксины и гиббереллины, полезными микробами служат для ослабления сигнального пути, связанного с салициловой кислотой (Suzuki *et al.*, 2003). Например, бактерии *P. fluorescens* штамма HP72 со сниженной из-за мутаций способностью синтезировать ауксины (индолилуксусную кислоту) демонстрируют сильно сниженную способность к колонизации растения-хозяина по сравнению с диким типом *P. fluorescens* (Suzuki *et al.*, 2003).

Как упоминалось ранее, для защиты от микробов растения вырабатывают АФК, такие как супероксид, перекись водорода и гидроксильные радикалы. Уже на начальных этапах растительно-микробного взаимодействия, чтобы обезвредить АФК, эндофитные бактерии синтезируют улавливающие их ферменты. Например, штамм PAL5 эндофитной бактерии *Gluconacetobacter diazotrophicu* может продуцировать ферменты супероксиддисмутазу и глутатионредуктазу. Бактерии *G. diazotrophicu*, у которых эти ферменты были «нокаутированы», не смогли колонизировать корни риса (Alquéres *et al.*, 2013). Как и бактерии, эндофитные грибы также могут вырабатывать антиоксидантные ферменты, чтобы защищаться от АФК растения (Hamilton *et al.*, 2012).

1.5 Благоприятные воздействия эндофитов на состояние растения

Судя по результатам успешной колонизации растения, эндофитные микроорганизмы, заняв свою нишу, демонстрируют свои полезные свойства для растения. Они способствуют росту растений и повышению устойчивости к

стрессам за счет фиксации азота, выработки фитогормонов и антиоксидантов, а также увеличивают скорость усвоения питательных веществ (Santoyo *et al.*, 2016; Eid *et al.*, 2019).

Эндофиты обладают способностью системно или локально колонизировать многие ткани растений и с помощью конкуренции могут предотвращать колонизацию патогенами. Например, эндофиты могут занимать собой доступные для патогена ниши (Pal *et al.*, 2006). Помимо этого, эндофиты секретируют различные литические ферменты для гидролиза полимеров. Некоторые эндофиты выделяют хитиназы, которые могут разрушать клеточную стенку патогенных грибов (El-Tarabily, 2003). Также, вторичные метаболиты, синтезируемые эндофитами, могут уменьшать количество фитопатогенных бактерий и грибов в растении. У эндофитов было обнаружено множество вторичных метаболитов с антимикробными свойствами, например, флавоноиды, пептиды, хиноны, алкалоиды, фенолы, стероиды, терпеноиды и поликетиды (Mousa, Raizada, 2013; Narayanan, Glick, 2022). Кроме того, эндофиты могут индуцировать системную устойчивость у растений, в результате которой у растения 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).

Предполагается, что совместное культивирование растений с эндофитами является способом увеличения в них количества ценных с фармакологической точки зрения вторичных метаболитов растений, которые также повышают устойчивость растений к различным стрессам.

1.6 Эндофитные микроорганизмы винограда как активаторы защитных свойств винограда

Как и все растения, виноград является потенциальным источником «полезных» эндофитов, которые могут использоваться для улучшения роста и повышения устойчивости к стрессам у винограда и других растений. Некоторые

микроорганизмы, населяющие виноград, имеют способность угнетать рост патогенных грибов и бактерий, а также обладают способностью синтезировать ауксины, производить минерализацию слаборастворимых солей фосфора, обладают ферментативной активностью, что в свою очередь способствует росту растения (Shcherbakov *et al.*, 2016). Так, например, из стеблей винограда *V. vinifera* cv. Corvina были выделены 11 штаммов эндофитов способных ингибировать рост *B. cinerea*. Один штамм, представляющий род *Lysinibacillus*, в значительной степени ингибировал зону роста *B. cinerea* в условиях *in vitro* по сравнению с другими штаммами (Andreolli *et al.*, 2016). В другом исследовании была показана способность 26 изолятов сдерживать рост *B. cinerea* на листьях винограда, тогда как 9 штаммов проявили антифунгицидный эффект *in vitro*. Из них два штамма *Pantoea sp.* и *P. fluorescens* были выделены из листьев и стеблей соответственно (Trotel-Aziz *et al.*, 2008). Кроме того, 25 штаммов эндофитов, выделенных из одомашненных и дикорастущих растений винограда, активно подавляли рост *B. cinerea in vitro*, особенно штаммы, принадлежащие к родам *Bacillus* и *Pantoea* (Campisano *et al.*, 2015). Было показано, что способность *Bacillus phytofirmans* ингибировать заражение растений винограда *B. cinerea* была связана с индукцией временного подщелачивания внеклеточного пространства, продукцией салициловой кислоты и экспрессией транскриптов, связанных с защитой растений (Barka *et al.*, 2000). Скрининг также показал, что значительное количество эндофитных бактериальных изолятов из виноградной лозы может подавлять рост *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtuse*, *Pochonia chlamydospora* и *P. viticola in vitro* (Andreolli *et al.*, 2016; Campisano *et al.*, 2015). Бэлл с соавторами идентифицировали 24 эндофитных штамма *Enterobacter agglomerans*, *Rahnella aquatilis* и *Pseudomonas sp.*, которые обладают сильным ингибирующим действием против *Rhizobium vitis* – возбудителя корончатого галла (Bell *et al.*, 1995).

Также существует ряд исследований, где показано, что эндофитные микроорганизмы винограда способствуют устойчивости растений к абиотическим стрессам. Например, *Paraburkholderia phytofirmans* может индуцировать

различные PR-гены, кодирующие хитиназу, фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL), липоксигеназу (LOX) и глюканазу, и тем самым защищать растение от низких температур (Theocharis *et al.*, 2012). Эндوفитами высвобождаются молекулы, которые принимают участие в удалении АФК, что помогает винограду справиться с различными абиотическими стрессами, такими как холод, засуха или соленость почв. Показано, что эндوفитные бактерии винограда *Bacillus licheniformis* стимулируют выработку вторичных метаболитов, таких как монотерпены, проявляющие антиоксидантную активность, и сесквитерпены, проявляющие антибактериальное действие (Salomon *et al.*, 2014). *B. licheniformis* производят каротиноиды, которые могут выступать в качестве антиоксидантов (Cohen *et al.*, 2018). Некоторые эндوفитные грибы винограда (*Septoglomus deserticola*, *Funneliformis mosseae*, *Rhizogloium intraradices*, *R. clarum* и *Glomus aggregatum*) могут модулировать метаболизм абсцизовой кислоты у инокулированных растений винограда, что дает им преимущество перед незараженными растениями в условиях засухи (Torres *et al.*, 2018).

В настоящее время мало что известно об эндوفитах и патогенах растений винограда, произрастающих на Дальнем Востоке. Ранее китайскими учеными был описан новый патогенный грибок *Fusarium avenaceum*, поражающий плоды *V. amurensis* (Wang *et al.*, 2015). Недавно была опубликована работа, где было показано, что эндوفитный грибок *Albifimbria verrucaria*, выделенный из амурского винограда активен против *B. cinerea*, возбудителя серой гнили винограда (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 эндوفитов 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.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сбор материала и условия стерилизации

На первых этапах работы для микробиологического высева эндофитов и 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. Две лианы находились друг от друга на расстоянии 1 км. Всего с двух растений было собрано 11 образцов (4 образца листа и 4 образца стебля из двух лиан винограда, 2 образца ягоды и 1 образец семян из одной лианы винограда) (Таблица 1, Рисунок 1).

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, так и культивируемых в виноградниках Приморского края (Таблица 1, Рисунок 1). Были собраны образцы тканей с 11-ти растений *V. amurensis*, 3-х растений *V. coignetiae* и 4-х растений культурного винограда. С каждого растения были получены от 2 до 6 образцов листьев и стеблей. Первое растение *V. amurensis* (Gh) выращивали в контролируемых тепличных условиях в Федеральном научном центре наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН) во Владивостоке, Россия. Дополнительно с виноградника «Макаревич» были получены визуально здоровый образец *V. amurensis* (M) и образец с симптомами милдью (M-dm). Наконец, *V. amurensis* (S-Va) был любезно предоставлен Сахалинским филиалом Ботанического сада-института ДВО РАН г. Южно-Сахалинск. Образцы с восьми растений винограда *V. amurensis* были собраны из различных незащищенных природных популяций. Образцы из двух растений винограда, P-1 и P-2, которые использовали на первых этапах работы, были также собраны в г. Владивостоке в 2022. Образцы еще с двух растений винограда, P-3 и P-4, были собраны на островах Русский и Рикорд на юге Приморского края.

Образцы Р-5 и Р-6 получены из села Ивановка и Верхне-уссурийского лесного стационара ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, находящегося в южных отрогах Сихотэ-Алиня. Также, образцы с двух растений винограда были собраны в селе Литовко (Kh-1) и Силинском лесу (Kh-2), расположенных на юге Хабаровского края. Дополнительно из Сахалинского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН г. Южно-Сахалинск (S-1) были отобраны образцы с винограда *V. coignetiae*. Еще два растения *V. coignetiae* были обнаружены в естественной среде на о. Сахалин, в частности, вблизи городов Холмск (S-2) и Невельск (S-3). Кроме того, был собран виноград с виноградников и плодовых питомников, расположенных в Приморском крае России. Среди них были *V. vinifera* × *V. amurensis* cv. Адель (гибрид № 82-41 F³) (Адель) и *Vitis riparia* × *V. vinifera* cv. Мукузани (с неизвестной родословной) (Мукузани), полученные с плодового питомника «Макаревич». Образцы *Vitis 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» (Таблица 1). Важно отметить, что все образцы, кроме М-dm, выглядели здоровыми, без признаков заболеваний.

Таблица 1. Растения винограда, используемые в работе.

| № | Сокращение | Местоположение |
|---|-------------|--|
| <i>Vitis amurensis</i> | | |
| 1 | Gh | Теплица ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток |
| 2 | M | Плодовый питомник "Макаревич", г. Уссурийск |
| 3 | M-dm | <i>V. amurensis</i> с видимыми симптомами <i>P. viticola</i> , "Макаревич", г. Уссурийск |
| 4 | S-Va | Ботанический сад- институт ДВО РАН, г. Южно-Сахалинск |
| 5 | P-1 | Пригород г. Владивостока |
| 6 | P-2 | Пригород г. Владивостока |
| 7 | P-3 | о. Русский, г. Владивосток |
| 8 | P-4 | о. Рикорда, юг Приморского края |
| 9 | P-5 | с. Ивановка, Приморский край |
| 10 | P-6 | Верхне-уссурийский лесной стационар ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН |
| 11 | Kh-1 | с. Литовко, юг Хабаровского края |
| 12 | Kh-2 | Силинский лес, юг Хабаровского края |
| <i>Vitis coignetiae</i> | | |
| 13 | S-1 | Ботанический сад-институт ДВО РАН, г. Южно-Сахалинск |
| 14 | S-2 | г. Холмск, о. Сахалин |
| 15 | S-3 | г. Невельск, о. Сахалин |
| Сорта винограда из плодового питомника «Макаревич» | | |
| 16 | Адель | <i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i> cv. Адель |
| 17 | Мукузани | <i>V. riparia</i> × <i>V. vinifera</i> cv. Мукузани |
| Сорта винограда из коммерческого виноградника «PRIM ORGANICA» | | |
| 18 | Альфа | <i>V. labrusca</i> × <i>V. riparia</i> cv. Альфа, |
| 19 | Прэйри стар | <i>Vitis</i> Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар |

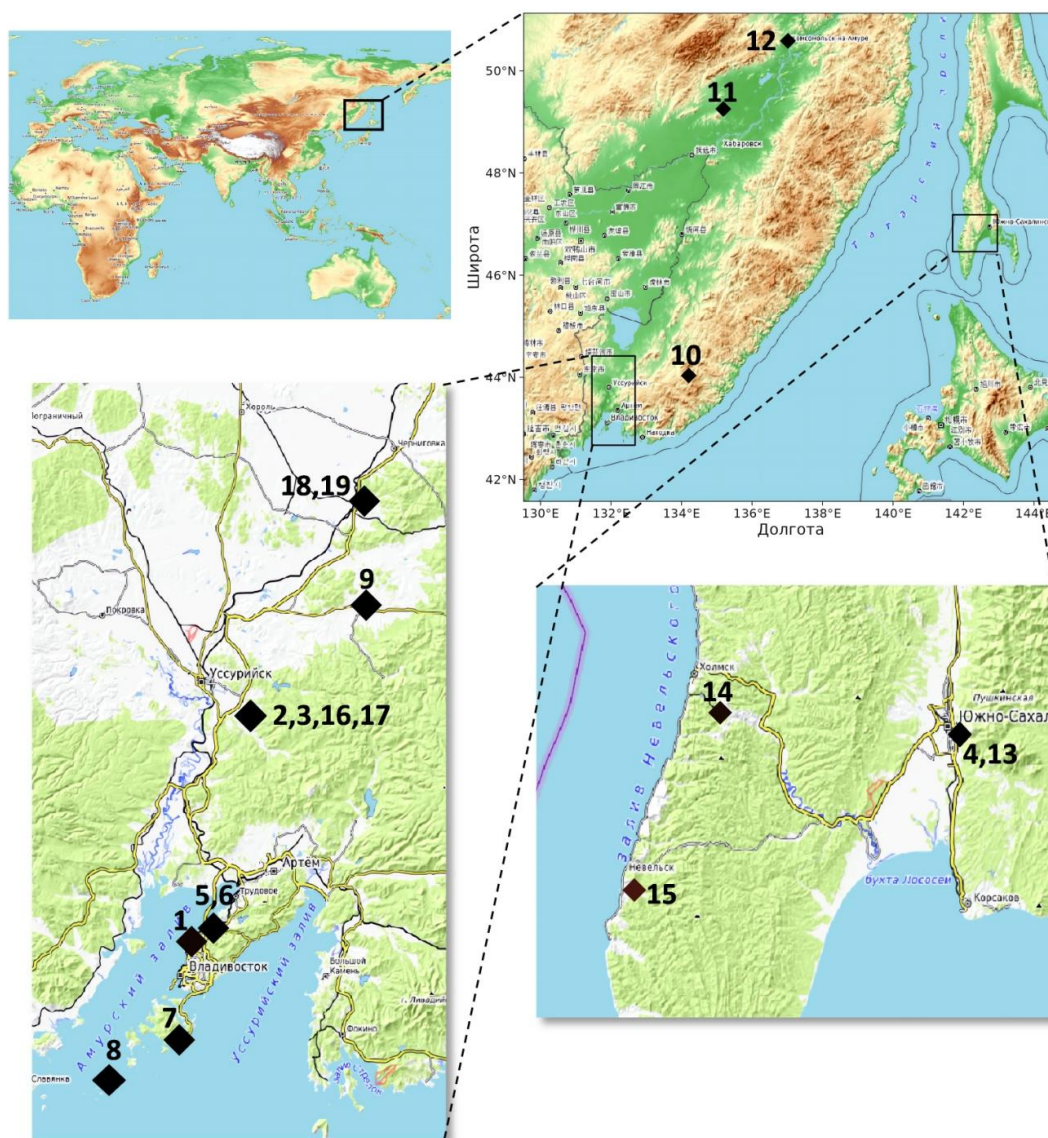


Рисунок 1. Места сбора растительного материала. Цифры указывают растения и их местоположения, которые перечислены в таблице 1.

Значения средних температур и осадков на юге Приморского края (растения М, Р-1, Р-2, Р-3, Р-4) в июле 2022 года составили 20 °С и 150 мм соответственно (по данным справочно-информационного портала "Погода и климат", по состоянию на 1 марта 2023 г.). В центральной части Приморского края (Р-5, Р-6) – 23 °С и 130 мм. На юге Хабаровского края (Kh-1, Kh-2) – 23 °С и 75 мм. На острове Сахалин (S-Va, S-1, S-2, S-3) – 18 °С, 50 мм. Собранный растительный материал доставлялся в лабораторию в стерильных пакетах на холоде в течение 1–2 дней.

Для поверхностной стерилизации образцы тканей листьев и стеблей винограда промывали под проточной водой с использованием ПАВ. В ходе оптимизации метода выделения ДНК для метагеномного анализа использовали 30, 50 и 100 мг образца, где 50 мг ткани на образец были выбраны как оптимальные для подготовки проб к проведению высокопроизводительного секвенирования. Поэтому далее в стерильных условиях взвешивали 50 мг каждого образца тканей винограда, переносили его для измельчения в стерильную ступку. Предварительно, ступки и пестик стерилизовали автоклавированием (121 °С, 0,21 МПа, 20 мин). Затем взвешенные образцы промывали в 70%-ном растворе этанола в течение 2 мин, 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и затем отмывали стерильной водой 5 раз. Для проверки эффективности этого метода поверхностной стерилизации 100 мкл последней промывной воды инкубировали на чашках Петри с агаром R2A (PanReac, AppliChem, Дармштадт, Германия) и на картофельно-декстрозном агаре (КДА, Neogene, Уотфорд (Хертфордшир), Великобритания) для проверки отсутствия высеянных с поверхности колоний бактерий и грибов, соответственно. Образцы, прошедшие проверку, считались подходящими для анализа эндофитного микробиома винограда.

2.2 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*, в 2022 году со всех растений *V. amurensis* и *V. coignetiae*, представленных в таблице 1.

Поверхностно стерилизованные ткани листьев и стеблей (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.

2.3 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 как описано ранее (Tyunin *et al.*, 2018). 2,0 г культуры клеток V7, взятой на 30 сутки выращивания (ранее было показано, что на 30-35 сутки выращивания наблюдали самые высокие показатели содержания стильбенов в каллусах винограда (Suprun *et al.*, 2019)) культивировали в 50 мл жидкой среды W_{БАП/АНУ} постоянно перемешивая на орбитальном шейкере в темноте в течение 7 дней. Питательная среда W_{БАП/АНУ} была следующего состава: NH₄NO₃ – 0,4 г/л, KNO₃ – 1,9 г/л, CaCl₂·2H₂O – 0,44 г/л, MgSO₄·7H₂O – 0,37 г/л, KH₂PO₄ – 0,17 г/л, H₃BO₃ – 6,2 мг/л, MnSO₄ – 16,9 мг/л, CoCl₂·6H₂O – 0,025 мг/л, CuSO₄·5H₂O – 0,025 мг/л, ZnSO₄·7H₂O – 8,6 мг/л, Na₂MoO₄·2H₂O – 0,25 мг/л, KJ – 0,83 мг/л, FeSO₄·7H₂O – 27,8 мг/л, Na₂ЭДТА·2H₂O – 37,3 мг/л, мезоинозит - 100 мг/л, пептон ферментативный для бактериологических питательных сред сухой - 100 мг/л, витамин В1 – 0,2 мг/л, витамин В6 – 0,5 мг/л, витамин РР – 0,5 мг/л, L-цистеин - 5 мг/л, сахароза - 25 г/л, 6-бензиламинопурин – 0,5 мг/л, альфа-нафтилуксусная кислота - 2 мг/л.

Для создания нативных и сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда были выбраны 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, b). Эндофитные бактерии и грибы выращивали в 50 мл жидких питательных сред R2A (для бактерий) и КДБ (для грибов) при 23 °С в темноте при постоянном перемешивании 130 об./мин в течение 3 суток. В случае приготовления сухих биопрепаратов полученные суспензии эндофитных бактерий

и грибов переносили в пробирки на 50 мл (типа фалькон) и центрифугировали на центрифуге СМ-6М («ELMI ltd.», Латвия) 5 мин при 2 100 g. Полученный осадок сушили в термостате при 45 °С до полного видимого испарения влаги в течение 5 суток. Полученный сухой осадок эндофитных бактерий и грибов автоклавировали 20 мин при 120 °С и 0,8 атм.

Затем в колбу с 7-ми дневной культурой V7 добавляли 100 мкл суспензии эндофитных бактерий и 100 мг эндофитного гриба. Клетки винограда V7 совместно с эндофитами культивировали для анализа дальнейшего анализа содержания стильбенов в течение 3 дней и для оценки наращивания биомассы клеток в течение 7 дней. Рекультивацию эндофитных штаммов бактерий и грибов проводили один или два раза перед совместным культивированием с клетками винограда. При изучении сухих биопрепаратов в стерильных условиях в колбу добавляли по 10 мг эндофитных бактерий, или 10 мг и 20 мг эндофитных грибов. Предварительно сухие биопрепараты были растерты в порошок в стерильных условиях в ступках. Для оценки влияния сухих биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов на рост биомассы, содержание и продукцию стильбенов клетки винограда V7 культивировали совместно с биопрепаратами в течение 3 и 7 суток (всего 10 и 14 суток соответственно). Данные по накоплению стильбенов и свежей биомассы в клеточной культуре были получены в результате трех независимых экспериментов с тремя повторениями в каждом.

2.4 Анализ антагонистической активности *B. velezensis* AMR25 против патогенов растений

Штамм *Bacillus velezensis* AMR25 был получен в 2022 году из листа винограда *V. amurensis* P-2. Антибактериальную активность штамма оценивали в отношении широко распространенных 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). Все растительные патогены были предварительно выделены из дикого винограда *V. amurensis* и добавлены в

коллекцию эндофитных микроорганизмов ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Ночную культуру *B. velezensis* AMR25 наносили на чашки Петри, содержащие среду R2A, и инкубировали в течение 12 ч при 26 °С. Затем твердые агаровые диски диаметром 0,6 см вырезали из твердой среды с помощью пробкового сверла и помещали на среду R2A, содержащую фитопатогенные штаммы бактерий. После инкубации в течение 48 ч при 26 °С измеряли зоны ингибирования роста и из результата вычитали диаметр диска. Для сравнения антагонистической активности *B. velezensis* AMR25 в отношении различных штаммов патогенов использовали следующие критерии: диаметр ингибирования роста более 16 мм – очень сильное ингибирование, 11-15,9 мм – сильное ингибирование, 6-10,9 мм – умеренное ингибирование, 1-5,9 мм – слабое ингибирование, 0 мм – отсутствие ингибирования (Leska *et al.*, 2022).

Тест на антифунгицидную 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). Изоляты патогенных грибов были получены из зараженного листа *V. amurensis*. *B. velezensis* помещали в чашку Петри на расстоянии 2 см от гриба. Зону ингибирования измеряли на 5-й день культивирования при 26 °С. Индекс ингибирования рассчитывали по формуле $(R1-R2)/R1*100$, где R1 – радиус роста колонии, направленный в противоположном направлении от бактерии, R2 – радиус роста колонии, направленный в сторону от гриба (Mirsam *et al.*, 2022).

2.5 Выделение и анализ нуклеиновых кислот

2.5.1 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 амплифицировали с использованием универсальных бактериальных праймеров для амплификации 16S ПЦР-продуктов длиной около 1500 п.н. 8F (5'AGA GTT

TGA TCM TGG CTC AG) и 1522R (5'AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA) (Lane, 1991). рНК ITS1 грибов амплифицировали с использованием универсальных праймеров для амплификации ПЦР-продуктов ITS1 длиной примерно 560 п.н. (5'AGG AGA AGT CGT AAC AAG G и 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White *et al.*, 1990). Продукты ПЦР секвенировали с использованием генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя, как описано ранее (Aleynova *et al.*, 2021). Для анализа последовательностей использовали программу Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). Множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием программы Clustal X (Altschul *et al.*, 1990). Идентичность последовательностей $\geq 99\%$ считалась достаточным пороговым значением для таксономической идентификации бактериальных родов.

2.5.2 Выделение ДНК для секвенирования метагенома и биоинформатический анализ

Для оптимизации метода выделения ДНК для метагеномного анализа из собранных в 2021 году поверхностно стерилизованных образцов винограда ДНК выделяли с помощью ЦТАБ-спин метода (Aleynova *et al.*, 2022a, b; Kiselev *et al.*, 2023) и коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA miniprep («Zymo Research», США). После измельчения каждого образца в ступке, ДНК выделяли с помощью набора ZymoBIOMICS DNA miniprep, в соответствии с протоколом производителя. В случае ЦТАБ-спин метода к измельченному образцу добавляли 800 мкл ЦТАБ-буфера (100 мМ трис рН 7,5, 1,4 М NaCl, 40 мМ ЭДТА рН 7,5, 1 % цетилтриметиламмоний бромид, ЦТАБ), перемешивали до однородного состояния и инкубировали в течение 1 ч при 60 °С в термостате «Гном» («ДНК-технология», Россия). Затем добавляли 300 мкл хлороформа, осторожно перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С и 16 100 g (5415R, «Eppendorf», Германия). Далее, 420 мкл супернатанта отбирали в отдельные пробирки и добавляли 950 мкл 96%-ного этанола, выдерживали при -20 °С в

течение ночи, а затем центрифугировали 10 мин при 4 °С и 16 100 g. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали до полного испарения этанола при комнатной температуре (30 мин).

Далее осадок растворяли в 100 мкл дистиллированной воды. Важно отметить, что полученный раствор ДНК уже можно использовать для амплификации отдельных генов в случае геноспецифических ПЦР (Kiselev *et al.*, 2015) или для изучения метилирования ДНК (Ogneva *et al.*, 2016). Однако попытки использовать ее для получения библиотек участков генов 16S и ITS1 были безуспешны, характерных ПЦР продуктов не наблюдалось, поэтому были добавлены стадии очистки ДНК на кремниевых спин-колонках (например, C1002-50 IC-XL, «Zymo Research»). Для одного образца использовали две колонки, на каждую колонку наносили по 50 мкл полученного водного раствора ДНК, центрифугировали 30 с при 4 °С и 6 900 g. Далее добавляли 200 мкл «Раствора для очистки ДНК» (GuSCN, 5 М; ЭДТА, рН 8,0, 0,1 М) и центрифугировали при тех же условиях. После удаления супернатанта к осадку добавляли 700 мкл промывочного раствора (80%-ный этанол; 10 мМ трис-НСl, рН 7,5) и снова центрифугировали. Следующим шагом переносили колонки в новые 1,5 мл пробирки и центрифугировали 1 мин при 4 °С и 6 900 g для удаления промывочного раствора. После колонки переносили в новые 1,5 мл пробирки и оставляли на столе при комнатной температуре на 5 мин для испарения остатка промывочного раствора. Далее на первую колонку наносили 50 мкл элюирующего раствора (5 мМ трис-НСl, рН 7,5), инкубировали 1 мин на столе при комнатной температуре и центрифугировали 30 с при 6 900 g, затем полученным элюатом (элюирующим раствором, прошедшим через первую колонку) промывали первую колонку еще раз. После первую колонку удаляли и в ту же пробирку ставили вторую колонку, которую промывали полученным элюатом дважды. В результате ДНК с двух колонок была очищена и элюирована в 50 мкл элюирующего раствора. Качество и количество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра P300 («IMPLEN», США). Из собранных в 2022 году поверхностно

стерилизованных образцов винограда ДНК выделяли только с помощью ЦТАБ-спин метода.

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. Библиотеки для секвенирования были подготовлены в соответствии с протоколом, описанным в руководстве «Подготовка библиотеки для метагеномного секвенирования 16S» (часть №15044223 Rev. B; Illumina). Участки бактериальной 16S рРНК амплифицировали с использованием праймеров 515F (5'GGT AAT ACG KAG GKK GCD AGC) и 806R (5'RTG GAC TAC CAG GGT ATC TAA), модифицированных для растений *Vitis sp.* (Aleynova *et al.*, 2022a). Участки межгенного спейсера ITS1 эндофитных грибов амплифицировали с использованием праймеров ITS1f (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) и ITS2 (5'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) (Deyett, Rolshausen, 2020). Контроль качества полученных библиотечных пулов проводился с помощью анализатора фрагментов, а количественный анализ проводился с помощью ПЦР РВ.

Пул библиотек секвенировали на Illumina MiSeq (2 × 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения для преобразования bcl2fastq v2.17.1.14 (Illumina). Библиотека phage PhiX использовалась для управления параметрами секвенирования. Большинство считываний, относящихся к ДНК фага, были удалены во время демультимплексирования.

Парные прочтения NGS были предварительно обработаны с использованием программ QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019) и DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). В результате предварительной обработки парные прочтения были объединены, и из данных высокопроизводительного секвенирования были удалены химерные последовательности и оставшиеся последовательности ДНК фага PhiX. Таксономическую идентификацию вариантов последовательностей ампликонов (ASV) проводили алгоритмом QIIME 2 Scikit-learn (Pedregosa *et al.*, 2011) с использованием предварительно обученных классификаторов Silva 138 (99% OTU

из области последовательностей 515F/806R) для эндофитных бактерий (Bokulich *et al.*, 2018) и UNITE (99% OTU из области последовательностей ITS1f/ITS2) для эндофитных грибов (Nilsson *et al.*, 2019). Далее, из анализа были исключены последовательности хлоропластной и митохондриальной ДНК, и последовательности ДНК, не относящиеся к бактериям, грибам и оомицетам. Для этого применялся язык программирования R с использованием пакетов qiime2R (Bisanz, 2018), phyloseq (McMurdie, Holmes, 2013) и tidyverse (Wickham *et al.*, 2019). Для столбчатых гистограмм и визуализационных диаграмм UpSet ASV были объединены на уровне рода и отфильтрованы на основе относительной численности $> 0,1\%$ как минимум у одного вида или сорта винограда. На столбчатых графиках объединяли таксономические ранги, которые были относительно малочисленны ($< 0,1\%$ по каждому виду или сорту винограда), в одну группу, называемую «другие». Данные об альфа-разнообразии на основе количества ASV и индекса Пиелоу и бета-разнообразии на основе статистики «несходство Брея-Кёртиса» были получены с использованием пакета Vegan (Oksanen *et al.*, 2020). Данные о различиях по методу Брея-Кёртиса были преобразованы в равномерную глубину выборки и представлены в виде ординационных диаграмм с помощью метода неметрического многомерного шкалирования (Non-metric multidimensional scaling (NMDS)).

Данные о дифференциальной численности ASV между образцами, в которых была обнаружена *Plasmopara viticola* и в которых патоген отсутствовал, были получены с использованием статистического инструмента DESeq2 с коррекцией частоты ложных обнаружений (Love *et al.*, 2014). Для графического представления результатов использовались библиотеки ggplot2 (Wickham *et al.*, 2019) и ComplexHeatmap (Gu *et al.*, 2016).

Последовательности ампликонов 16S и ITS1 были депонированы в NCBI под регистрационными номерами PRJNA813962, PRJNA874841, PRJNA980748 и PRJNA998468, а также в базе данных лаборатории биотехнологии Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии

Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия
(<https://biosoil.ru/downloads/biotech/Metagenoms/>).

2.5.3 Выявление *P. viticola* с помощью количественного ПЦР РВ

Для количественного анализа присутствия в собранных образцах 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 (T_m) 59-62 °C, содержание GC 50-60%, нацелены только на последовательности *P. viticola*. Были использованы три специфических пары праймеров *PvITS1_1*, *PvITS1_2* и *Giop* (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* применяли метод ПЦР РВ, используя в качестве целей последовательности ДНК ITS1, *Cox1* и *Cox2*. Благодаря этим уникальным последовательностям ДНК была достигнута необходимая точность определения *P. viticola* (Choi *et al.*, 2015; Robideau *et al.*, 2011). Праймеры, используемые для ПЦР РВ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры, используемые в ПЦР РВ для диагностики *P. viticola*. ГенБанк – регистрационный номер в ГенБанк. Tm - температура плавления праймеров; GC – процентное содержание гуанина (G) и цитозина (C) в праймере.

| | Название праймеров | Последовательности праймеров | Участок гена (ГенБанк) | Длина ампликона, пн | Tm, °C | GC, % | Ссылка |
|---|--------------------|------------------------------|---|---------------------|--------|-------|----------------------------------|
| 1 | PvITS1_1-real-s, | 5'GGCGGTTGCAGCTAATGGAT | ITS1 (ON183972.1) | 120 | 61,1 | 55 | Эта работа |
| | PvITS1_1-real-a | 5'AGCGAAGACTTTCGTCCTCACA | | | 61,9 | 50 | |
| 2 | PvITS1_2-real-s, | 5'CCACGTGAACCGTTTCAACCA | ITS1 (ON183972.1) | 83 | 61,6 | 52,4 | Эта работа. |
| | PvITS1_2-real-a | 5'CCATTAGCTGCAACCGCCAA | | | 61,6 | 55 | |
| 3 | Giop-F, | 5'TCCTGCAATTCGCATTACGT | ITS1 (ON183972.1) | 208 | 63,4 | 45 | (Si Ammour <i>et al.</i> , 2020) |
| | Giop-R | 5'GGTTGCAGCTAATGGATTCCTA | | | 63,3 | 45,5 | |
| 4 | PvCox1_1-real-s, | 5'ACCTGTTCTAGCCGGTGCTATT | <i>Cox1</i> (NC_045922.1 12520-13998) | 90 | 61,5 | 50 | Эта работа. |
| | PvCox1_1-real-a | 5'ACCGGATCACCACCTCCAGA | | | 62,5 | 60 | |
| 5 | PvCox1_2-real-s, | 5'GCGTGCTCCGGGTTTAAGTT | <i>Cox1</i> (NC_045922.1 12520-13998) | 105 | 61,2 | 55 | Эта работа. |
| | PvCox1_2-real-a | 5'ATAGCACCGGCTAGAACAGG | | | 59,3 | 55 | |
| 6 | PvCox2_1-real-s, | 5'TGGTTCCGGAAAGTGATTTAGCA | <i>Cox2</i> (KP684906.1) | 178 | 60,5 | 43,5 | Эта работа. |
| | PvCox2_1,2-real-a | 5'TGATTTAAGCGGCCCGGACA | | | 62,2 | 55 | |
| 7 | PvCox2_2-real-s, | 5'CAGATGTTTTACACTCATGGGCGA | <i>Cox2</i> (KP684906.1) | 73 | 61,4 | 45,8 | Эта работа. |
| | PvCox2_1,2-real-a | 5'TGATTTAAGCGGCCCGGACA | | | 62,2 | 55 | |

ПЦР РВ проводили с использованием набора для ПЦР в реальном времени (Evrogen, Россия) и красителя SYBR Green I (Evrogen, Россия) для ПЦР в реальном времени (Kiselev *et al.*, 2017) с использованием дополнительных образцов ДНК (второй технической повторности), которые были выделены ранее из тех же растений в то же время, но не отправлены для высокопроизводительного секвенирования (с каждого растения отбирали минимум по 2 молодых побега и 2 листа).

Для проведения ПЦР РВ использовали детектирующий амплификатор ДТ Прайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Протвино, Россия) с программным обеспечением RealTime_PCR v7.3. Для обсчета результатов амплификации использовали режим «количественного анализа со стандартами». В качестве стандартов была использована ДНК, выделенная из листа винограда *V. vinifera* с признаками ложной мучнистой росы, которую подтвердили специалисты из ФНЦ Агробиотехнологий Дальнего Востока им. АК. Чайки. Данный образец (Mildew) был получен в августе 2023 г. с Дальневосточной опытной станции филиала Института растениеводства им. Н.И. Вавилова.

ДНК из образца Mildew была разведена стерильной водой до концентрации 20, 4, 0,8 и 0,16 нг/мкл и использована по 1 мкл на реакцию в качестве калибраторов в ПЦР РВ. Схожим образом проводили ПЦР РВ как на праймерах к участкам последовательностей *P. viticola* (Таблица 2), так и на праймерах к генам «домашнего хозяйства винограда» *VaGAPDH* и *VaActin* (Kiselev *et al.*, 2017). Полученные таким образом значения последовательностей *P. viticola* делили на значения, полученные для генов *VaGAPDH* и *VaActin* из соответствующих проб.

2.5.4 Выделение ДНК для секвенирования полного генома *B. velezensis*

AMR25 и биоинформатический анализ

Одиночную колонию *B. 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. Концентрацию

полученной ДНК определяли с помощью спектрофотометра P300 («IMPLEN», США). 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). Затем, для оценки качества сборки использовали программу BUSCO (Simão *et al.*, 2015). Для автоматического аннотирования бактериального генома *B. velezensis* AMR25 использовали программу «Конвейер аннотаций генома прокариот NCBI» (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation_prok/). Функциональное описание генома было выполнено путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с известными последовательностями, доступными в базах данных, таких как “Кластеры ортологичных групп белков” (COG) и “Генная онтология” (GO). Для аннотирования генов использовали ресурс eggNOG версии 4.5 в сочетании с eggNOG-mapper (Huerta-Cepas *et al.*, 2017).

Филогенетический анализ был проведен с использованием последовательности гена субъединицы ДНК-гиразы A (*gyrA*). Программное обеспечение NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990) использовалось для определения вида *Bacillus*, наиболее близкого к AMR25. Филогенетическое дерево было построено в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) с помощью метода ближайших соседей с использованием частичных нуклеотидных последовательностей *gyrA*. Для оценки количества деревьев, на которых связанные таксоны группируются вместе, был использован бутстрэп-тест с 1000 повторностями. Средняя идентичность нуклеотидов (ANI) – это простой алгоритм, который имитирует ДНК-ДНК-гибридизацию (ddh) (Riesco *et al.*, 2018). OrthoANI учитывает концепцию ортологии, при которой обе последовательности генома были фрагментированы и для вычисления идентичности нуклеотидов использовались только пары ортологичных фрагментов. Геномы секвенированных штаммов *Bacillus* сравнивали с геномом *B. velezensis* AMR25 с использованием инструмента анализа идентичности средних нуклеотидов OrthoANI (Lee *et al.*, 2016).

Гены, ответственные за выработку транспортной РНК и рРНК, были идентифицированы с помощью программ tRNAscan-SE (версия 2.0) (Chan *et al.*, 2021) и RNAmmer (версия 1.2) (Lagesen *et al.*, 2007), соответственно. Онлайн-платформа IS Finder использовалась для определения наличия инсерционных последовательностей (Siguiet *et al.*, 2006). Онлайн-сервис PHASER использовался для поиска фагов в геноме (Arndt *et al.*, 2016). Круговые карты генома были сгенерированы с помощью генератора изображений BLAST Ring (BRIG) (Alikhan *et al.*, 2011).

Программное обеспечение Anti SMASH 7.0.0 использовалось для идентификации кластеров генов, связанных с вторичными метаболитами (Blin *et al.*, 2023). Программное обеспечение OrthoVenn3 было использовано для создания диаграммы Венна и поиска уникальных кластеров генов в AMR25 (Sun *et al.*, 2023).

2.5.5 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 с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) проводили с помощью флуоресцентного красителя EvaGreen («Biotium», США), используя набор реагентов ПЦР-комплект для ПЦР в реальном времени в соответствии с рекомендациями производителя («Синтол», Россия), как описано в работе (Dubrovina *et al.*, 2015). Для амплификации использовали прибор DT-prime с функцией детекции результатов в реальном времени («ДНК Технология», Россия).

Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения RealTime_PCR v.7.3 («ДНК Технология», Россия), обсчет по методу

$\Delta\Delta C_t$ (Livak, Schmittgen, 2001). 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*). 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).

2.6 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Стильбены 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 стильбенов проводили с использованием аналитической системы ВЭЖХ LC-20AD XR («Shimadzu», Япония) и коммерчески доступных стандартов. Данные ВЭЖХ с диодно-матричной детекцией были записаны в диапазоне 200-500 нм, хроматограммы для количественного определения были получены при 310 нм. Хроматографическое разделение проводили на колонке Shimpack GIST C18 (150 мм, 2,1 мм i.d., размер детали - 3 мкм, «Shimadzu», Япония).

Экстракты из культуры клеток разделяли с использованием 0,1%-ной муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (В) в качестве подвижных фаз со следующим профилем элюирования: от 0 до 35 мин, 0% В; от 35 до 40 мин, 40% В; от 40 до 50 мин, 50% В; от 50 до 65 мин 100% В. Экстракт образца (3 мкл) вводили при постоянной температуре колонки 40 °С и скорости потока, поддерживаемой на уровне 0,2 мл/мин.

Содержание стильбенов определяли с помощью внешних стандартов с использованием калибровочных кривых пятиточечной регрессии, построенных с использованием доступных стандартов. Были применены аналитические стандарты *транс*-резвератрола, *транс*-пицеида, *транс*-пицеатаннола фирмы

«Sigma-Aldrich» (США) и *дельта*-виниферина фирмы «Panreac AppliChem» (Германия). *Цис*-изомеры резвератрола и пицеида были получены под воздействием солнечного света на соответствующий стандартный раствор, содержащий *транс*-изомер, как сообщалось ранее (Kiselev *et al.*, 2017).

2.7 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. Для анализа данных альфа-разнообразия между группами был проведен тест суммы рангов Уилкоксона. Статистическая проверка данных о бета-разнообразии была выполнена с использованием теста PERMANOVA (999 перестановок). Оба теста были выполнены с помощью R пакета Vegan (Oksanen *et al.*, 2020).

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.

Тесты на антибактериальную и фунгицидную активность *B. velezensis* AMR25 имели 3 биологических повтора. Эксперимент с добавлением эндофитов к культуре клеток винограда был выполнен в 2-х биологических повторах. 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 проверены по спаренному критерию Стьюдента.

Значения эффективности ПЦР РВ при анализе праймеров для диагностики *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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Разработка метода выделения ДНК для метагеномного анализа

Как правило, успех выполнения высокопроизводительного секвенирования последовательностей ампликонов 16S или ITS во многом зависит от качества выделенной ДНК. Для выделения геномной ДНК растений обычно используют дорогостоящие коммерческие наборы, такие как DNeasy Plant Mini Kit (50 образцов, «Qiagen», Германия) (Fan *et al.*, 2020), QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (50 образцов, «Qiagen», Германия) (Cureau *et al.*, 2021), PowerSoil® DNA Isolation Kit (50 образцов, «MoBio Inc.», США) (Marasco *et al.*, 2018), ZymoBIOMICS DNA miniprep kit (50 образцов, «Zymo Research», США) (Deyett, Rolshausen, 2019). Поэтому нами была поставлена задача разработать доступный аналог коммерческим наборам для выделения геномной ДНК из растений на основе ЦТАБ метода. Разработанный метод был назван ЦТАБ-спин методом (Kiselev *et al.*, 2023).

В сентябре 2021 года ткани двух лиан дикорастущего винограда *V. amurensis* – молодые стебли длиной 7–8 см с тремя здоровыми листьями и зрелыми ягодами, были отобраны в неохраняемой природной зоне в районе г. Владивостока. Образцы растений были доставлены в лабораторию в течение примерно 30 мин.

Первоначально выделяли ДНК из 30, 50 и 100 мг поверхностно стерилизованного листа винограда *V. amurensis* двумя описанными способами. В итоге все пробы ДНК растворяли в 50 мкл элюирующего раствора, поэтому можно было напрямую сравнивать как концентрации, так и количества выделенной ДНК разными способами.

Оказалось, что при использовании ЦТАБ-спин метода концентрация и количество выделенной ДНК было в 2,2–3,5 раза выше, чем при использовании ZymoBIOMICS (Таблица 3). Более того, навеска 50 мг показала наилучшие результаты при использовании обоих методов, поэтому далее в работе использовали именно 50 мг образца. Затем выделяли ДНК из 50 мг стеблей, ягод

и семян винограда и было показано, что также ЦТАБ-спин метод был более эффективным (Таблица 3). Важно отметить, что во всех пробах, выделенных ЦТАБ-спин методом и ZymoBIOMICS, соотношение поглощения 260/280 было 1,9-2,0, а 260/230 – 0,4-0,6. Известно, что оптимальным соотношением 260/280 и 260/230 для работы с нуклеиновыми кислотами является 1,8-2,0 и 2,0-2,2 соответственно. Таким образом, оба метода позволяли получить довольно чистые препараты ДНК по примесям белков (260/280), но в образцах ДНК присутствовало довольно много примесей других веществ, поглощающих при 230 нм. Возможно, высокое поглощение при 230 нм объясняется наличием углеводов, что является довольно типичным для работы с растительными тканями. Дополнительная чистка на спин-колонках несколько увеличивала соотношение 260/230, но при этом уменьшалась концентрация ДНК, поэтому в работу решено было взять пробы ДНК без дополнительной очистки.

Таблица 3. Концентрация ДНК, выделенной из листьев, стеблей, ягод и семян винограда *V. amurensis* разными способами.

| Метод выделения | Орган винограда | Концентрация ДНК, мкг/мкл | Количество ДНК, мкг |
|---------------------|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| 30 мг, ZymoBIOMICS | Лист | 0,006 ±0,003 ^c | 0,30 ±0,15 ^c |
| 50 мг, ZymoBIOMICS | Лист | 0,012 ±0,005 ^{bc} | 0,60 ±0,25 ^{bc} |
| 50 мг, ZymoBIOMICS | Стебель | 0,005 ±0,002 ^c | 0,25 ±0,10 ^c |
| 50 мг, ZymoBIOMICS | Ягода | 0,005 ±0,003 ^c | 0,25 ±0,15 ^c |
| 50 мг, ZymoBIOMICS | Семена | 0,004 ±0,002 ^c | 0,20 ±0,10 ^c |
| 100 мг, ZymoBIOMICS | Лист | 0,007 ±0,004 ^c | 0,35 ±0,20 ^c |
| 30 мг, ЦТАБ-спин | Лист | 0,021 ±0,005 ^{ab} | 1,05 ±0,25 ^{ab} |
| 50 мг, ЦТАБ-спин | Лист | 0,026 ±0,007 ^a | 1,30 ±0,35 ^a |
| 50 мг, ЦТАБ-спин | Стебель | 0,028 ±0,009 ^a | 1,40 ±0,45 ^a |
| 50 мг, ЦТАБ-спин | Ягода | 0,031 ±0,011 ^a | 1,55 ±0,55 ^a |
| 50 мг, ЦТАБ-спин | Семена | 0,030 ±0,010 ^a | 1,50 ±0,50 ^a |
| 100 мг, ЦТАБ-спин | Лист | 0,024 ±0,006 ^{ab} | 1,20 ±0,30 ^{ab} |

Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Средние значения в столбцах, за которыми следует одна и та же буква, не различались по *t*-критерию Стьюдента. $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Выделенные обоими методами образцы ДНК были отправлены на высокопроизводительное секвенирование на приборе Illumina MiSeq (2 × 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов).

В общей сложности в выделенных ЦТАБ-спин методом 11 образцах для ампликонов 16S рРНК и ITS1 в результате высокопроизводительного секвенирования было получено 2 185 433 и 1 812 697 парных прочтений соответственно. В то время как, в результате секвенирования проб, выделенных коммерческим набором ZymoBIOMICS, было получено 923 019 и 1 746 605 парных прочтений для ампликонов 16S рРНК и ITS1 соответственно. В полученных данных парные прочтения были объединены в последовательности ампликонов, и среди них были удалены химерные последовательности, последовательности хлоропластной и митохондриальной ДНК, не определенные до ранга «отдел» последовательности, и последовательности ДНК, не относящиеся к бактериям и грибам. 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 (Таблица 4).

Согласно сравнительному анализу количество последовательностей 16S рРНК эндофитных бактерий было в 2 раза больше в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом (Таблица 4), в то время как количество последовательностей ITS1 эндофитных грибов было примерно одинаково при использовании обоих методов выделения ДНК.

Таким образом, выделение из тканей растений геномной ДНК ЦТАБ-спин методом даёт приемлемое качество ДНК, в результате высокопроизводительного секвенирования которой средняя глубина секвенирования на пробу не уступает ДНК, выделенной коммерческим набором ZymoBIOMICS (Таблица 4).

Таблица 4. Данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования.

| Метод выделения ДНК | Общее количество парных прочтений | Общее количество последовательностей после фильтрации | Среднее количество последовательностей на пробу после фильтрации |
|---------------------|-----------------------------------|---|--|
| ампликон 16S рРНК | | | |
| ЦТАБ-спин | 2 185 433 | 621 975 (28%) | 56 543 |
| ZymoBIOMICS | 923 019 | 272 825 (30%) | 24 802 |
| ампликон ITS1 рРНК | | | |
| ЦТАБ-спин | 1 812 697 | 1 376 089 (76%) | 125 099 |
| ZymoBIOMICS | 1 746 605 | 1 376 927 (79%) | 125 175 |

3.2 Состав и структура эндофитов винограда на Дальнем Востоке России.

3.2.1 Результаты высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК из тканей винограда

В июле 2022 года нами были собраны образцы визуально здоровых и нормально развитых тканей с 11-ти растений *V. amurensis*, 3-х растений *V. coignetiae* 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» (Таблица 1). С каждого растения были получены от 2 до 6 образцов листьев и стеблей. Всего в общей сложности были собраны 80 образцов тканей растений. Из полученных проб ЦТАБ-спин методом была выделена геномная ДНК и отправлена на высокопроизводительное секвенирование на приборе Illumina MiSeq (Aleynova *et al.*, 2023a,b).

Используя секвенирование нового поколения, было получено в общей сложности 16 315 902 парных прочтений 16S и 5 192 469 парных прочтений ITS1. После объединения парных прочтений и фильтрации всего было получено 10 102 418 последовательностей 16S и 1 348 330 последовательностей ITS1. Для

данных 16S среднее и медианное количества последовательностей среди образцов составили 126 280 и 79 912 соответственно; для данных ITS1 – 16 854 и 14 373.

3.2.2 Состав и структура эндофитных бактерий в дикорастущих *V. amurensis*, *V. coignetiae* и широко культивируемых сортах винограда, возделываемых в Приморском крае

По данным метагеномного анализа последовательностей 16S, в эндофитном бактериальном микробиоме дикорастущих *V. amurensis* и *V. coignetiae* и сортах винограда всего были представлены 11 классов с относительной численностью > 0,1% (Рисунок 2а). Наиболее часто встречающимися классами эндофитных бактерий в винограде, произрастающем на Дальнем Востоке России, были Gammaproteobacteria, за которыми следовали Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidia и Bacilli (Рисунок 2а). Для *V. amurensis*, сортов Альфа, Адель и Мукузани доминирующим классом согласно данным относительной численности ампликона 16S был Gammaproteobacteria, для *V. coignetiae* и сорта Прэйри стар – Alphaproteobacteria (Рисунок 2а). Состав эндофитных бактерий в сортах Прэйри стар и Альфа из виноградника «PRIM ORGANICA» был наиболее схожим по процентному содержанию классов бактерий, также как у винограда сортов Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» (Рисунок 2а).

Всего в эндофитном микробиоме винограда Дальнего Востока было найдено 130 родов бактерий, большинство родов которых было общим для всех видов и сортов винограда (69) (Рисунок 2б). Каждый вид или сорт винограда характеризуется специфическим соотношением этих родов. Больше всего родов эндофитных бактерий было найдено в дикорастущих видах винограда *V. amurensis* (128) и *V. coignetiae* (117) (Рисунок 2б).

Как для *V. amurensis*, так и для *V. coignetiae* наиболее многочисленны по количеству последовательностей 16S были таксоны *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, и *Hymenobacter* (Рисунок 2в). По сравнению с другими видами винограда *V. amurensis* характеризуется большей относительной численностью ампликонов таких родов как *Massilia* и *Escherichia-Shigella*;

V. coignetiae – *Sphingomonas* и *Methylobacterium-Methylorubrum*; сорт Альфа – *Pantoea*, *Neisseria* и *Abiotrophia*; сорт Адель – *Comamonadaceae* и *Stenotrophomonas*; сорт Мукузани – *Asinibacterium* и *Cutibacterium* (Рисунок 2в).

Сорта Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» характеризуются большей относительной численностью последовательностей 16S таксонов *Comamonadaceae*, *Aquabacterium* и *Spirosoma* по сравнению с сортами Альфа и Прэйри стар из виноградника «PRIM ORGANICA», в которых, в свою очередь, более многочисленны по количеству последовательностей 16S рода *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum* и *Hymenobacter* (Рисунок 2в).

Рисунок 2. 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) Таксономическая гистограмма на уровне класса для бактериальных эндофитных микробиомов; (б) Диаграмма UpSet на уровне рода в данных NGS, показывающая общие таксоны между видами или сортами винограда; (в) Тепловая карта относительной численности 10 наиболее часто встречающихся согласно данным относительной численности таксонов 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. Рода с относительной численностью < 0,1% у каждого вида или сорта винограда были удалены из диаграммы UpSet и в таксономической гистограмме помещены в категорию «другие». Количество последовательностей 16S показано над таксономическими гистограммами. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

Для анализа микробиома эндофитных бактерий дикорастущих *V. amurensis* и *V. coignetiae* классическим микробиологическим методом (высев бактерий) нами были получены и секвенированы по 16S 1376 и 102 штамма бактерий соответственно (Рисунок 3а). Эти штаммы представляют 5 классов бактерий: Gammaproteobacteria, Bacilli, Actinobacteria, Alphaproteobacteria и Bacteroidia (Рисунок 3а). По данным относительной численности ампликонов для *V. amurensis* доминирующим классом был Gammaproteobacteria, для *V. coignetiae* – Bacilli (Рисунок 3а). В *V. amurensis* было найдено 50 родов эндофитных бактерий, в *V. coignetiae* – 11 (Aleynova *et al.*, 2022a, 2023a). Согласно данным секвенирования штаммов наиболее часто встречающимися родами для *V. amurensis* и *V. coignetiae* были: *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Curtobacterium* (Рисунок 3б). В *V. amurensis* более многочисленными по количеству штаммов были рода *Erwinia* и *Pantoea*, в *V. coignetiae* – *Bacillus* и *Frigobacterium* (Рисунок 3б).

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.

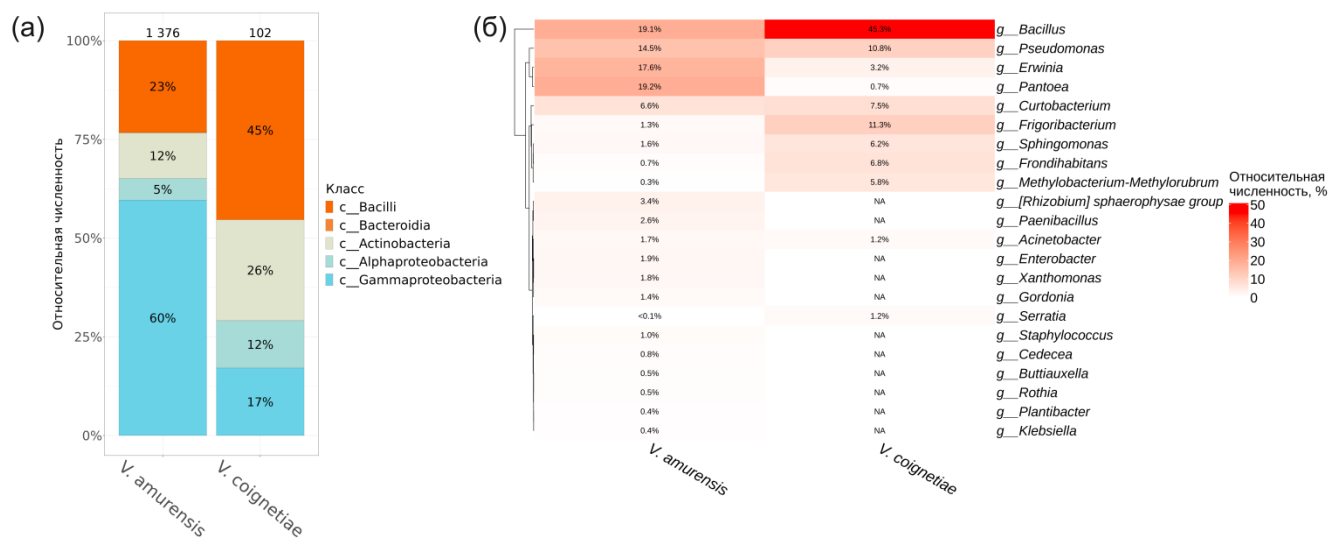


Рисунок 3. Состав эндофитных бактериальных микробиомов *V. amurensis* и *V. coignetiae* по данным микробиологического высева. *V. amurensis* – усреднённые данные по *V. amurensis*; *V. coignetiae* – усреднённые данные по *V. coignetiae*. (а) Таксономическая гистограмма на уровне класса для бактериальных эндофитных микробиомов; (б) Тепловая карта относительной численности 20 наиболее часто встречающихся согласно данным относительной численности таксонов эндофитных бактерий на уровне рода по данным микробиологического высева у *V. amurensis* и *V. coignetiae*. Количество штаммов показано над таксономическими гистограммами. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

3.2.3 Состав и структура эндофитных грибов в *V. amurensis*, *V. coignetiae* и широко культивируемых сортах винограда, возделываемых в Приморском крае

Среди 21 классов, обнаруженных у винограда Дальнего Востока России, наиболее многочисленны последовательности ITS1 пяти классов эндофитных грибов: Dothideomycetes, Malasseziomycetes, Tremellomycetes, Microbotryomycetes и Agaricomycetes (Рисунок 4а). По данным относительной численности ампликонов для *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов Прэри стар и Альфа доминирующим классами грибов были Dothideomycetes и Malasseziomycetes (Рисунок 4а), для сортов Адель и Мукузани – Dothideomycetes и Tremellomycetes

(Рисунок 4а). Разнообразие эндофитных грибов в винограде сортов Прэйри стар и Альфа из виноградника «PRIM ORGANICA» было наиболее схожим по процентному содержанию классов грибов, также как у винограда сортов Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» (Рисунок 4а).

Всего в эндофитном микобиоме винограда было найдено 149 родов грибов, из которых 19 были общими для всех видов и сортов винограда (Рисунок 4б). 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) (Рисунок 4б).

V. amurensis, *V. coignetiae* и сорт Прэйри стар характеризуются высокой относительной численностью последовательностей ITS1 родов *Aureobasidium*, *Cladosporium* и *Vishniacozyma* (Рисунок 4в). 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* (Рисунок 4в).

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* (Рисунок 4в). Стоит отметить, что в сорте Адель и дикорастущем *V. amurensis* была обнаружена более высокая численность последовательностей ITS1 дрожжей *Saccharomyces* по сравнению с другими виноградами (Рисунок 4в).

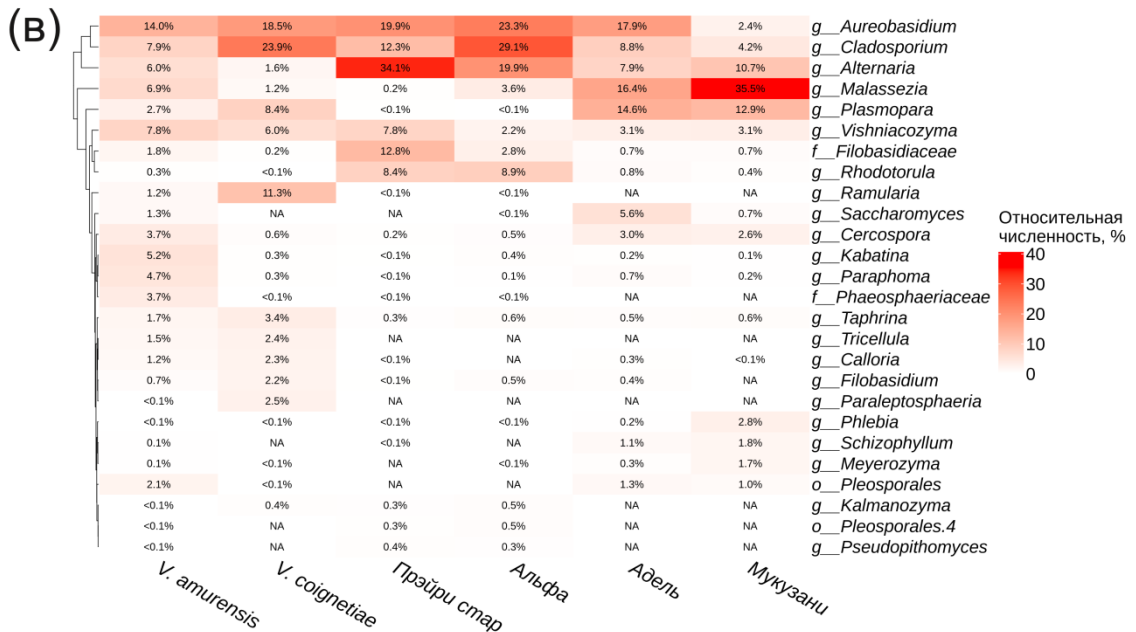
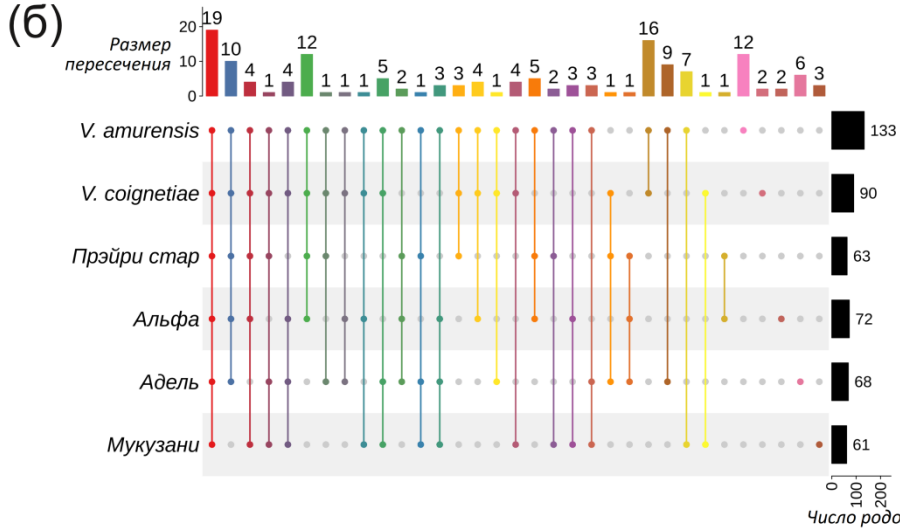
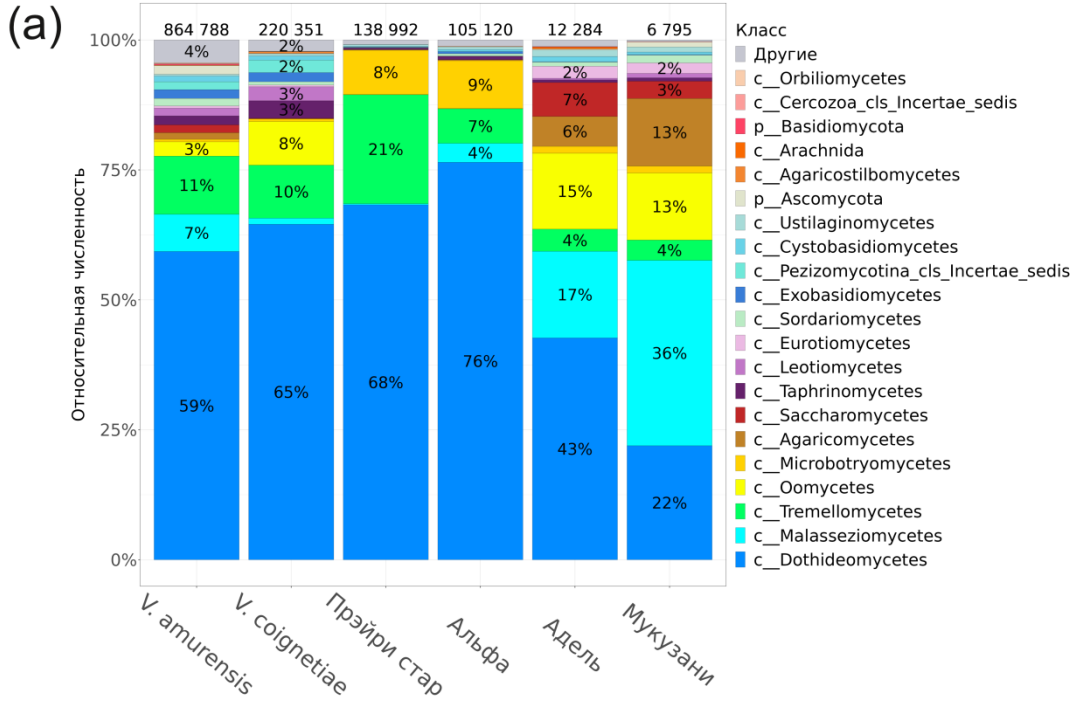


Рисунок 4. Состав эндофитных микобиомов *V. amurensis*, *V. coignetiae* и сортов винограда по данным секвенирования нового поколения. *V. amurensis* – усреднённые данные по *V. amurensis*; *V. coignetiae* – усреднённые данные по *V. coignetiae*; Прэйри стар – *Vitis* Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри стар 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) Таксономическая гистограмма на уровне класса для эндофитных микобиомов; (б) Диаграмма UpSet на уровне рода в данных NGS, показывающие общие таксоны между видами или сортами винограда; (в) 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. Рода с относительной численностью < 0,1% у всех видов и сортов винограда были удалены из диаграммы UpSet и в таксономической гистограмме помещены в категорию «другие». Количество последовательностей ITS1 показано над таксономическими гистограммами. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

Микробиологический высев был также применен для анализа эндофитного микобиома в виноградах *V. amurensis* и *V. coignetiae*. Всего было выделено и секвенировано 284 штамма (Рисунок 5а). Эти штаммы были представлены 10 классами грибов. Преобладающими по количеству штаммов классами были Dothideomycetes, Tremellomycetes и Ustilaginomycetes (Рисунок 5а). Класс Dothideomycetes был доминирующим у *V. amurensis* и *V. coignetiae* по числу штаммов (Рисунок 5а). В *V. amurensis* было найдено 43 рода эндофитных грибов, в *V. coignetiae* – 6 (Aleynova *et al.*, 2022b, 2023a). Преобладающими по количеству штаммов для *V. amurensis* были рода *Cladosporium* и *Didymella*, для *V. coignetiae* – *Cladosporium* и *Filobasidium* (Рисунок 5б).

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 °С с глицерином в качестве криопротектора.

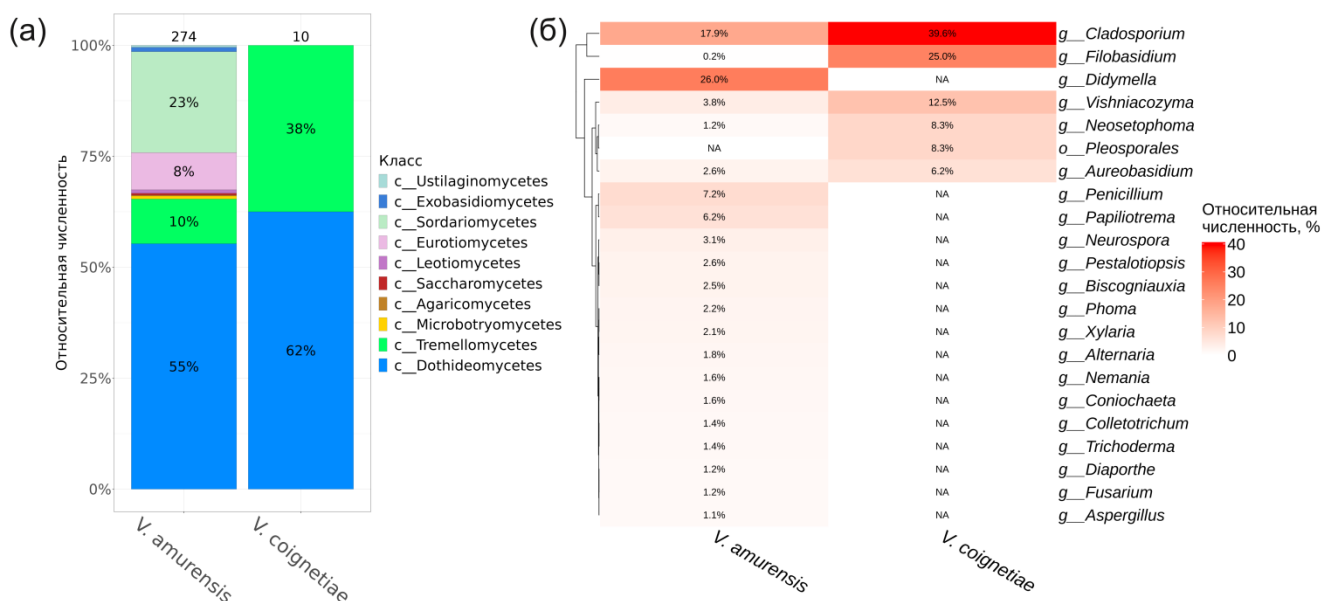


Рисунок 5. Состав эндофитных микобиомов *V. amurensis* и *V. coignetiae* по данным микробиологического высева. *V. amurensis* – усреднённые данные по *V. amurensis*; *V. coignetiae* – усреднённые данные по *V. coignetiae*. (а) Таксономическая гистограмма на уровне класса для эндофитных микобиомов; (б) Тепловая карта относительной численности 20 наиболее часто встречающихся согласно данным относительной численности родов эндофитных грибов по данным микробиологического высева у *V. amurensis* и *V. coignetiae*. Количество штаммов показано над таксономическими гистограммами. Белые квадраты (NA) обозначают отсутствие таксона.

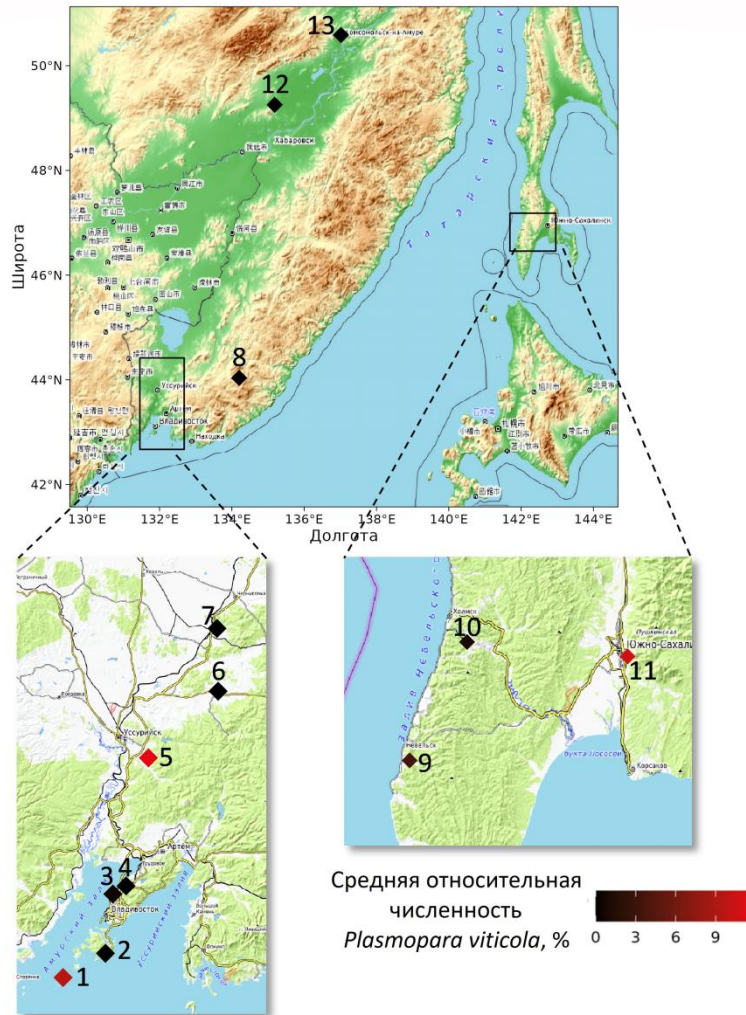
3.3 Выявление возбудителя ложной мучнистой росы в винограде

В отдельных визуально здоровых пробах дикорастущего и сортового винограда, собранного в июле 2022 года, нами была обнаружена различная относительная численность последовательностей ITS1 возбудителя ложной мучнистой росы *P. viticola*. Кроме того, нами были секвенированы лист и стебель винограда амурского, собранного с виноградника Макаревич, которые имели характерные для милдью симптомы заболевания.

Была проанализирована встречаемость *P. viticola* на Дальнем Востоке России. 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 (Рисунок 6). В других образцах, без видимых симптомов заболевания, процент последовательностей ITS1 возбудителя

ложной мучнистой росы составлял 0-48%. В ходе анализа метагеномных данных был обнаружен большой процент *P. viticola* на о. Сахалин и о. Рикорд. Наибольшая относительная численность последовательностей ITS1 *P. viticola* была в ботаническом саду о. Сахалин, и процентное соотношение патогена в образцах *V. coignetiae* было выше (34-48%) по сравнению с образцами *V. amurensis* (0,3-1,4%). Относительная численность последовательностей ITS1 возбудителя милдью в образцах, собранных на о. Рикорд, составляла 2-18%. Относительно небольшое количество патогена *P. viticola* было обнаружено в образцах вблизи г. Невельска (0,2-14%) и в Силинском лесу Хабаровского края (0,7-10%) (Рисунок 6). Последовательности ITS1 возбудителя ложной мучнистой росы винограда присутствовали в следовых количествах в образцах *V. amurensis*, собранных в теплице ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН (0-2,2%), вблизи г. Холмск на о. Сахалин (0,1-1,9%), в Верхне-уссурийском лесном стационаре (0-1,3%), в с. Литовко Хабаровского края (0-0,4 %) и в винограднике «PRIM ORGANICA» (0-0,2 %) (Рисунок 6). Образцы винограда, собранные вблизи г. Владивостока, на о. Русский и в с. Ивановка, не содержали в своем метагеноме последовательности ITS1 *P. viticola* (Рисунок 6). В общей сложности биоинформатический анализ выявил присутствие *P. viticola* в 53,75% образцов винограда, не имеющих внешних симптомов заболевания.

a)



б)

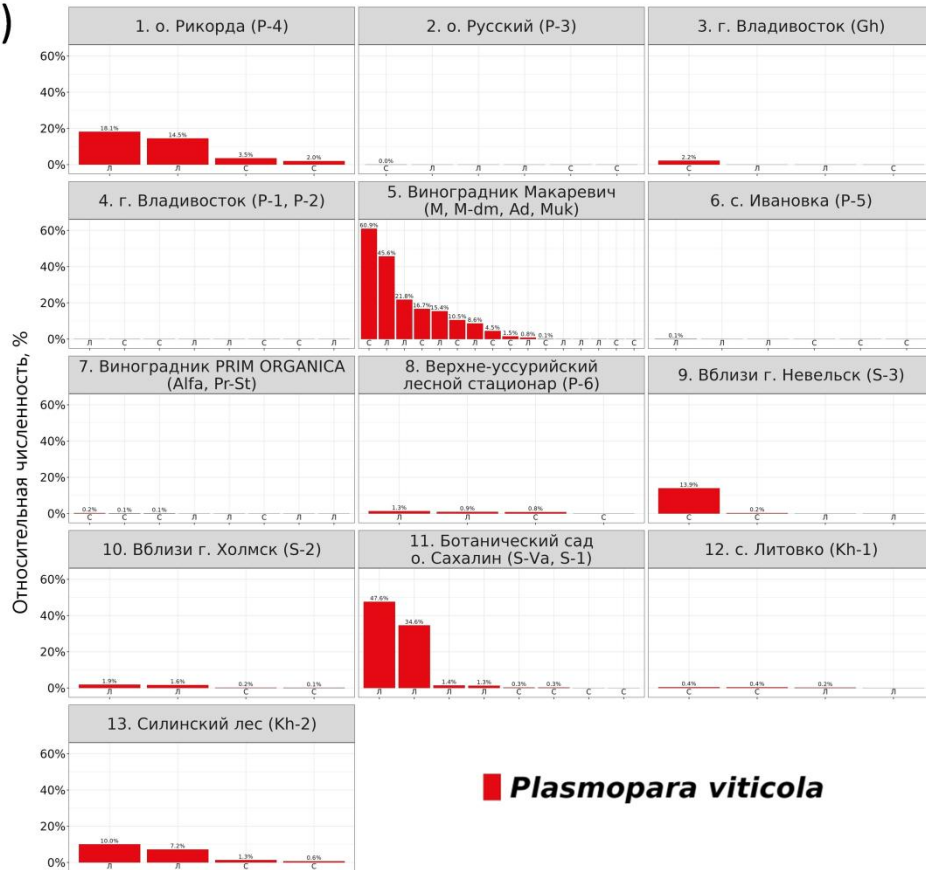


Рисунок 6. Относительная численность последовательностей ITS1 *P. viticola* в образцах винограда: (а) Географическая карта со средней относительной численностью *P. viticola* в местах отбора проб; (б) относительная численность *P. viticola* в образцах. Отметки в виде цифр на карте (а) соответствуют данным в (б). Л – лист; С – стебель. Gh – *V. amurensis* в теплице ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН; М – *V. amurensis* на коммерческом винограднике «Макаревич»; М-dm – *V. amurensis* с видимыми симптомами *P. viticola* в ЛПХ «Макаревич»; S-Va – *V. amurensis* в ботаническом саду на о. Сахалин; P-1 – *V. amurensis* в г. Владивосток; P-2 – *V. amurensis* в г. Владивосток; P-3 – *V. amurensis* на о. Русский; P-4 – *V. amurensis* на о. Рикорд; P-5 – *V. amurensis* в с. Ивановка; P-6 – *V. amurensis* в Верхне-уссурийском лесном стационаре; Kh-1 – *V. amurensis* в с. Литовко; Kh-2 – *V. amurensis* в Силинском лесу; S-1 – *V. coignetiae* в ботаническом саду на о. Сахалин; S-2 – *V. coignetiae* вблизи г. Холмск на о. Сахалин; S-3 – *V. coignetiae* вблизи г. Невельск на о. Сахалин; 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».

3.4 Сравнительный анализ состава эндофитов в образцах винограда, пораженных *P. viticola*

Результаты анализа альфа-разнообразия бактериальных и грибных эндофитных микробиомов в образцах винограда, сгруппированных по присутствию в них *P. viticola*, показаны на рисунках 7а, б и 7в, г соответственно. Исходя из количества 16S ASV, образцы, пораженные *P. viticola*, характеризуются меньшим богатством бактериальной микробиоты по сравнению со здоровыми образцами ($p = 0,011$, Рисунок 7а). Согласно индексу Пиелю, бактериальная микрофлора пораженных *P. viticola* и здоровых образцов имеют одинаковую выравненность ($p = 0,14$, Рисунок 7б). С другой стороны, пораженные *P. viticola* и здоровые образцы существенно не отличаются с точки зрения богатства микробиома ($p = 0,26$, Рисунок 7в), однако на основе индекса Пиелю пораженные патогеном образцы характеризовались более выравненной грибной микрофлорой по сравнению со здоровыми образцами ($p = 0,042$, Рисунок 7г).

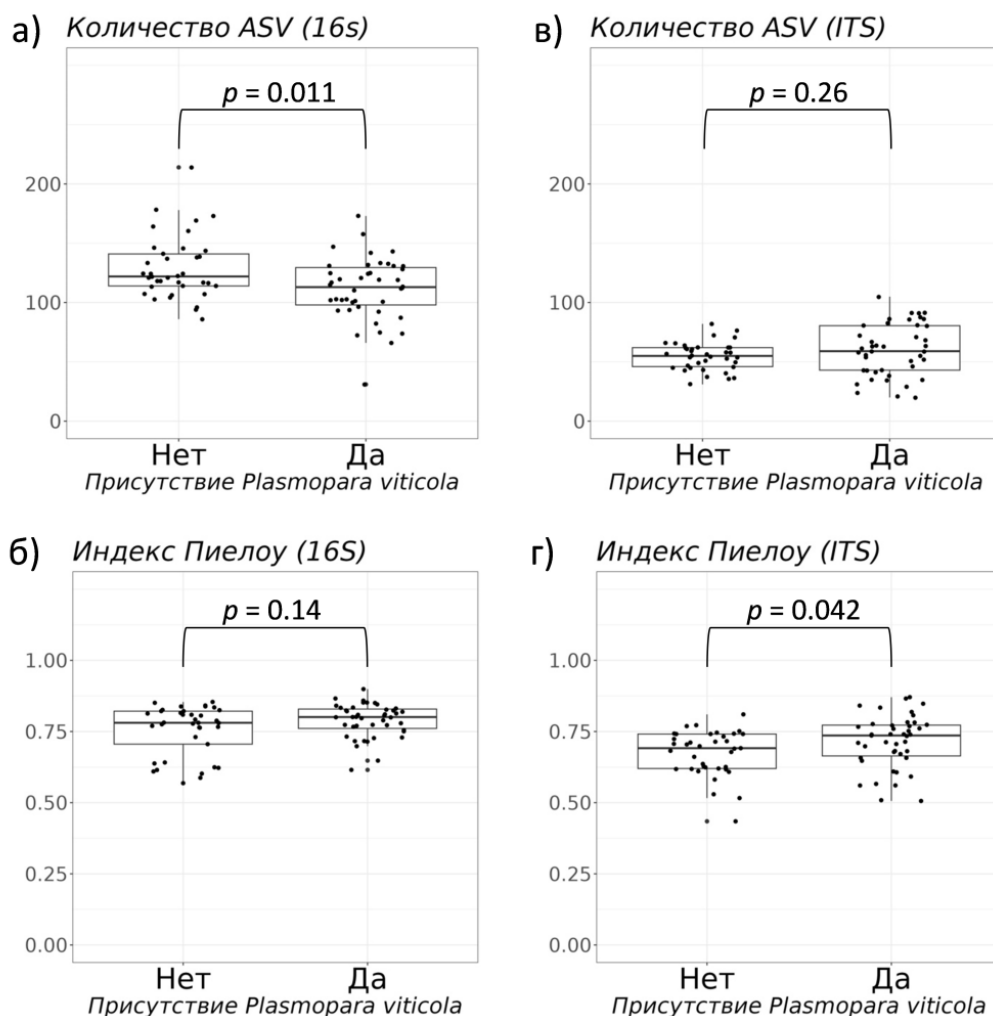


Рисунок 7. Показатели альфа-разнообразия между образцами, сгруппированными на основе присутствия *P. viticola*. Количество ASV и индекс выравненности Пиелюу для эндофитного бактериального микробиома – (а) и (б), для эндофитного микобиома – (в) и (г).

Согласно графикам бета-разнообразия NMDS, у пораженных *P. viticola* и здоровых образцов эндофитные бактериальные или грибные микробиомы в высокой степени перекрываются, но грибные перекрываются больше, чем бактериальные (Рисунок 8а, б). Тест PERMANOVA показал, что фактор наличия *P. viticola* объясняет 4,4% различий между образцами винограда в бактериальном эндофитном микробиоме (Рисунок 8а), тогда как в эндофитном микобиоме этот же фактор объясняет 3,2% различий между образцами (Рисунок 8б).

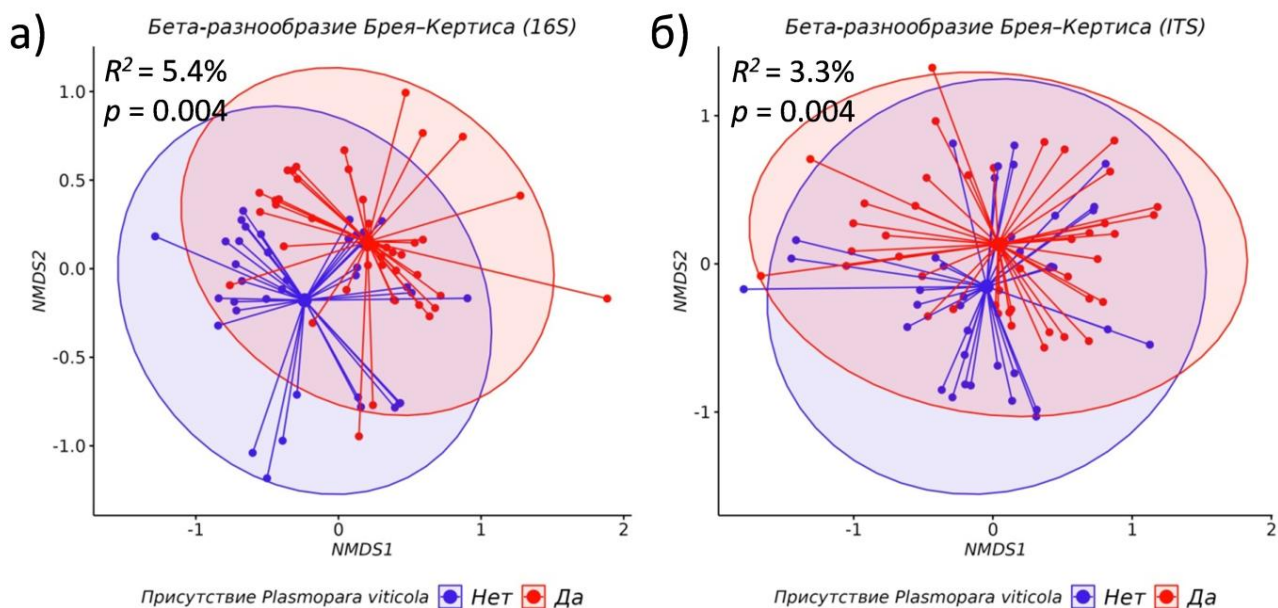


Рисунок 8. Сравнение микробиомов эндофитных бактерий и грибов в образцах винограда на основе присутствия *P. viticola*. (а) График NMDS бета-разнообразия по Брью-Кертису эндофитных бактерий винограда. (б) График NMDS бета-разнообразия по Брью-Кертису эндофитных грибов винограда. Эллипсы предполагают многомерное нормальное распределение. Центральные точки эллипсов являются средними точками.

3.5 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* (Рисунок 9). Эти ASV принадлежали к 4 классам или 18 родам. Наибольшее количество ASV принадлежало классу Bacteroidia (18), за которым следовали Alphaproteobacteria (11), Gammaproteobacteria (10) и Actinobacteria (1). Наибольшее количество ASV принадлежало родам *Hymenobacter* (14), *Sphingomonas* (4), *Massilia* (4), *Methylobacterium-Methylorubrum* (2) и *Chryseobacterium* (2), за которыми следовали *Advenella*, *Microbacteriaceae* (ASV 7), *Brevundimonas*, *Devosia*, *Sphingomonadaceae* (ASV 7), *Spirosomaceae*, *Rhizobacter*, *Phyllobacterium*, *Xanthobacteraceae* (ASV 4), *Pedobacter*, *Nevskia*, *Pseudomonas*, *Escherichia-Shigella* и *Polaromonas*. ASV рода *Cupriavidus* характеризовался повышенной встречаемостью в образцах, пораженных *P. viticola*, по сравнению со здоровыми образцами (Рисунок 9).



Рисунок 9. Выявленные с помощью DESeq2 значимые различия в количестве бактериальных ASV (скорректированный $p < 0,01$) между образцами винограда, которые сгруппированы на основе присутствия *P. viticola*. Точки означают ASV, которые идентифицированы на уровне рода.

В эндофитном микобиоме винограда, здоровые образцы характеризовались повышенной численностью 4 ASV по сравнению с образцами, пораженными *P. viticola* (Рисунок 10). Эти ASV принадлежали к 2 классам или 4 родам, а именно: *Dothideaceae* (ASV 2), *Kabatina* и *Aureobasidium* из класса *Dothideomycetes*; *Vishniacozyma* из класса *Tremellomycetes*. Однако образцы, пораженные патогеном, характеризуются повышенной численностью 2 ASV рода *Ramularia* и 1 ASV рода *Taphrina* (Рисунок 10).

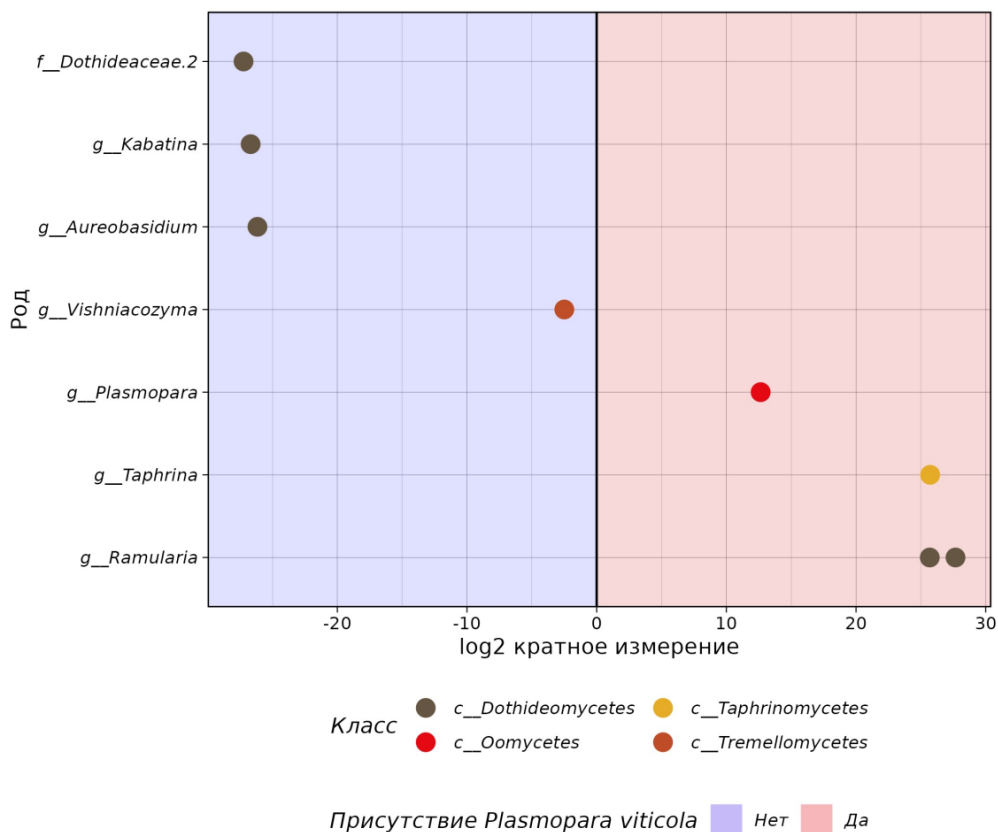


Рисунок 10. Выявленные с помощью DESeq2 значимые различия в количестве грибных ASV (скорректированный $p < 0,01$) между образцами винограда, которые сгруппированы на основе присутствия *P. viticola*. Точки означают ASV, которые идентифицированы на уровне рода.

3.6 Анализ эффективности применения ПЦР РВ SYBR Green I для выявления *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 РВ только три специфические пары праймеров: PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1, имели эффективность близкую к 100% (Таблица 5).

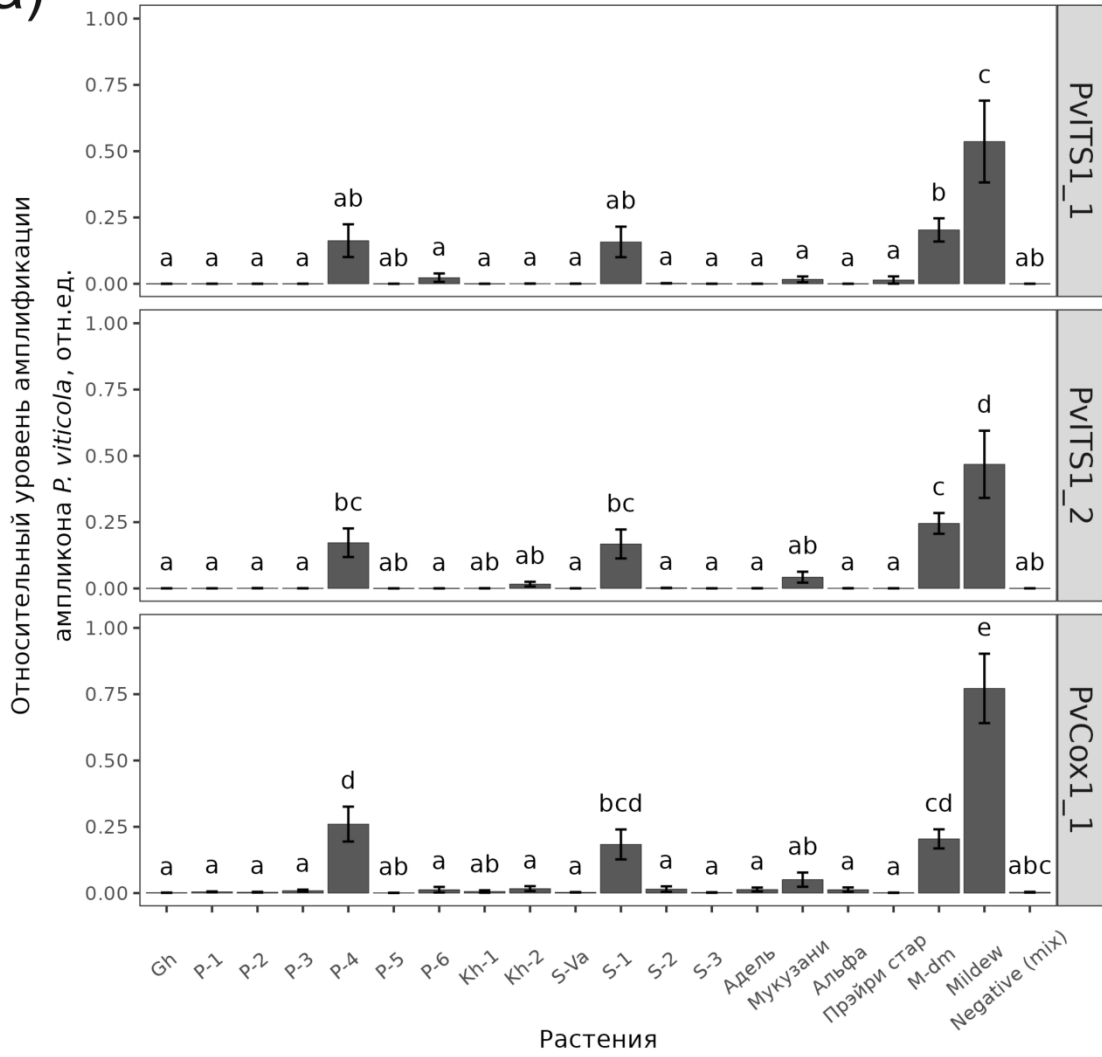
Таблица 5. Эффективность праймеров, используемых для ПЦР РВ для диагностики *P. viticola* в образцах винограда. С_t - пороговый цикл; стандарты I-IV - серия 5-кратных разведений ДНК (20, 4, 0,8 и 0,16 нг на пробу) из листьев *Vitis vinifera* с симптомами ложной мучнистой росы; Nc - отрицательный контроль.

| | Название праймеров | Эффективность ПЦР РВ, % | С _t для I и IV стандартов | С _t для Nc |
|---|---------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | PvITS1_1-real-s, PvITS1_1-real-a | 98 | 15,8-22,8 | - |
| 2 | PvITS1_2-real-s, PvITS1_2-real-a | 102 | 15,2-22,2 | 27,8 |
| 3 | Giop-F, Giop-R | 154 | 35,7-42,8 | 43,8 |
| 4 | PvCox1_1-real-s, PvCox1_1-real-a | 107 | 16,8-23,5 | 33,8 |
| 5 | PvCox1_2-real-s, PvCox1_2-real-a | 124 | 17,9-24,9 | 28,6 |
| 6 | PvCox2_1-real-s, PvCox2_1,2-real-a | 85 | 23,0-29,7 | 34,6 |
| 7 | PvCox2_2-real-s, PvCox2_1,2-real-a | 112 | 19,2-25,6 | 33,4 |

Образцы, собранные с тех же растений, но не отправленные для высокопроизводительного секвенирования, подвергали анализу ПЦР РВ SYBR Green I на наличие патогена с использованием выбранных пар праймеров. Полученные данные ПЦР РВ сравнивали с данными NGS, полученными ранее (Рисунок 11). На 3 растениях (P-4, S-1, M-dm) методом ПЦР РВ была выявлена относительно высокая средняя численность патогена (5,5-61%), сопоставимая с данными, полученными в результате NGS. Согласно данным ПЦР РВ, относительный уровень количества ампликонов в образцах винограда с видимыми симптомами ложной мучнистой росы винограда (M-dm) был выше (за исключением PvCox1_1) по сравнению с другими образцами растений без видимых симптомов (Рисунок 11а). В 15 образцах винограда (Gh-1, P-1, P-2, P-3, P-5, P-6, Kh-1, Kh-2, S-Va, S-2, S-3, Адель, Мукузани, Альфа, Прэйри стар) относительный уровень амплификации ампликонов *P. viticola* на праймерах PvITS1_2 и PvCox1_1 по данным ПЦР РВ не отличался от отрицательного

контроля. Из них у 11 образцов (Gh-1, P-1, P-2, P-3, P-5, P-6, Kh-1, S-Va, S-2, Альфа, Прэйри стар) уровень амплификации ПЦР РВ соответствовал отсутствию или низкой средней численности патогена (0-1%) по данным NGS. В 4 образцах винограда (Kh-2, S-3, Адель, Мукузани) результаты ПЦР РВ визуально не согласуются с методом NGS. Эти результаты могут быть связаны с неравномерным распределением патогена внутри растения, поскольку ПЦР РВ проводилась на резервных образцах винограда, которые не были отправлены для высокопроизводительного секвенирования.

а)

Детекция *Plasmopara viticola* с помощью ПЦР РВ

б)

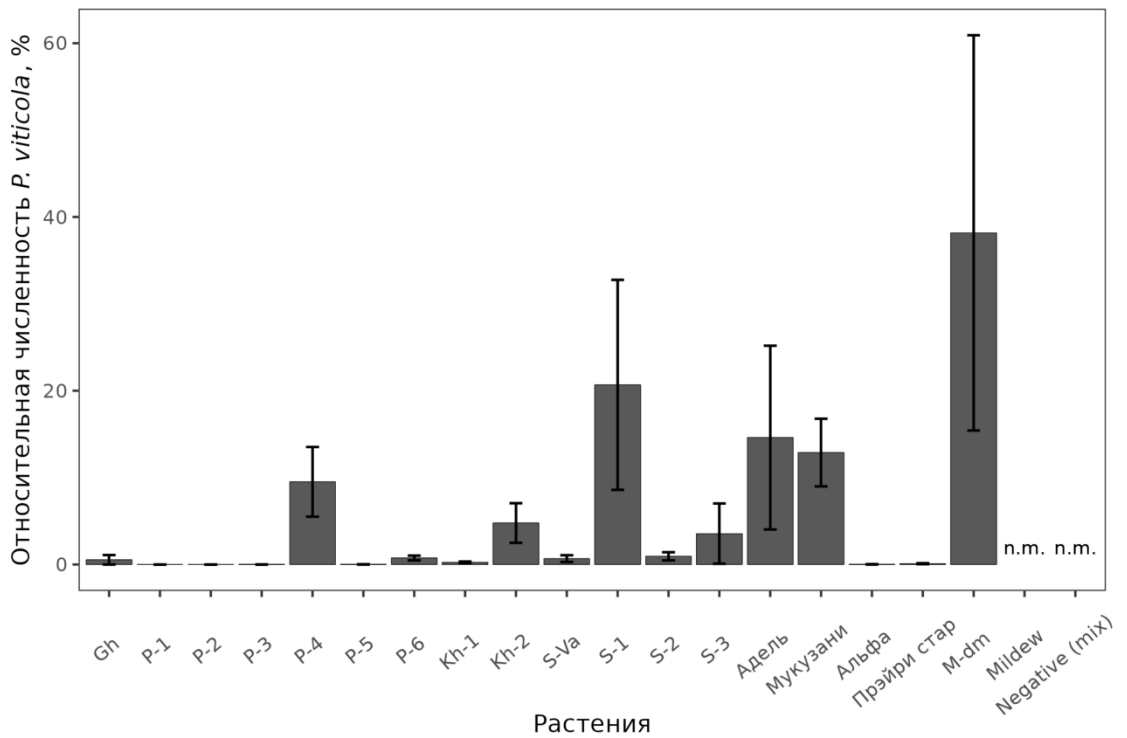
Детекция *Plasmopara viticola* с помощью NGS

Рисунок 11. Количественное определение амплификации PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 (а) в образцах ДНК винограда, выполненное методом ПЦР РВ, (б) относительная численность *P. viticola* в образцах NGS. ДНК были выделены из Gh – *Vitis amurensis* в теплице ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН; М – *V. amurensis* в ЛПХ «Макаревич»; М-dm – *V. amurensis* с видимыми симптомами *P. viticola* в ЛПХ «Макаревич»; S-Va – *V. amurensis* в ботаническом саду на о. Сахалин; P-1 – *V. amurensis* в г. Владивосток; P-2 – *V. amurensis* в г. Владивосток; P-3 – *V. amurensis* на о. Русский; P-4 – *V. amurensis* на о. Рикорд; P-5 – *V. amurensis* в с. Ивановка; P-6 – *V. amurensis* в Верхне-уссурийском лесном стационаре ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН; Kh-1 – *V. amurensis* в с. Литовко; Kh-2 – *V. amurensis* в Силинском лесу; S-1 – *V. coignetiae* в ботаническом саду на о. Сахалин; S-2 – *V. coignetiae* вблизи г. Холмск на о. Сахалин; S-3 – *V. coignetiae* вблизи г. Невельск на о. Сахалин; 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»; Mildew – лист *V. vinifera* с видимыми симптомами ложной мучнистой росы винограда, полученный в августе 2023 года из Дальневосточной опытной станции филиала Института растениеводства им. Вавилова; Nc – реакция ПЦР РВ без ДНК винограда. n.m. – не измерялась. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка (объединенные данные по образцам листьев и стеблей одного растения). Средние значения на каждой цифре, за которой следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Tukey HSD.

Средний уровень амплификации ПЦР РВ 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 (Рисунок 12). Уровень коэффициента корреляции Пирсона между оценками среднего относительного уровня амплификации по данным ПЦР РВ и средней относительной численности *P. viticola* в образцах NGS был самым высоким для амплификации с использованием праймеров PvITS1_2 ($R = 0,86, p < 0,001$) (Рисунок 12).

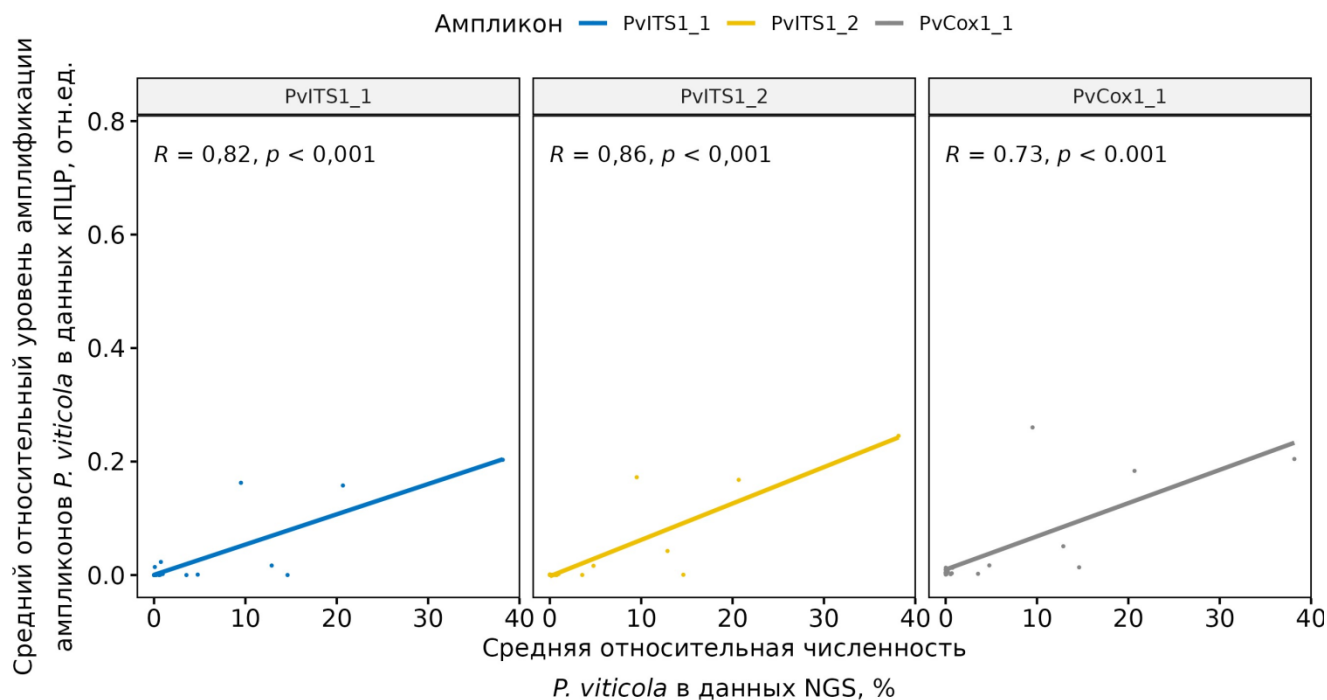


Рисунок 12. Коэффициент корреляции Пирсона. Взаимосвязь между оценками относительного уровня амплификации по данным ПЦР РВ и относительной численностью ампликонов ITS1 *P. viticola* в образцах NGS. Синие, желтые и серые линии представляют линии линейной регрессии для ампликонов PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 соответственно.

3.7 Влияние основных эндофитов винограда и препаратов на их основе на культуру клеток *V. amurensis*

3.7.1 Анализ воздействия нативных эндофитов винограда на рост клеток и содержание стильбенов в культуре 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*, *Pantoea*, *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. Были выделены образцы ДНК 7 штаммов бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* 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). Далее секвенировали участки 16S рРНК для бактерий и участок межгенного спейсера ITS1 для грибов и определяли процент идентичности с ранее известными штаммами микроорганизмов при помощи специализированной программы NCBI BLAST (Таблица 6) (Altschul et al., 1990). Представленные штаммы являются частью коллекции эндофитных микроорганизмов лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (Таблица 6).

Таблица 6. Характеристики бактерий и грибов на основе последовательностей генов 16S рРНК (бактерии) и межгенного спейсера ITS1 (грибы), используемых в экспериментах, выделенных из микробиома винограда *V. amurensis*.

| № | Последовательность | Род и идентификатор последовательности* | Близкий вид и идентификатор последовательности | % идентичности |
|----|--------------------|---|---|----------------|
| 1 | 16S рРНК | <i>Agrobacterium</i> (MZ424738) | <i>Agrobacterium rubi</i> (MN752429.1) | 99,17 |
| 2 | 16S рРНК | <i>Bacillus</i> (MZ424739) | <i>Bacillus thuringiensis</i> (KU179338.1) | 100 |
| 3 | 16S рРНК | <i>Curtobacterium</i> (MZ424740) | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AJ310414.1) | 100 |
| 4 | 16S рРНК | <i>Erwinia</i> (MZ424741) | <i>Erwinia billingiae</i> (KM408608.1) | 100 |
| 5 | 16S рРНК | <i>Pantoea</i> (MZ424742) | <i>Pantoea agglomerans</i> (MT605813.1) | 99,75 |
| 6 | 16S рРНК | <i>Pseudomonas</i> (MZ424743) | <i>Pseudomonas alkylphenolica</i> (MN813762.1) | 99,89 |
| 7 | 16S рРНК | <i>Xanthomonas</i> (MZ424744) | <i>Xanthomonas campestris</i> (MN108237.1) | 99,13 |
| 8 | ITS1 | <i>Alternaria</i> (MZ427922) | <i>Alternaria tenuissima</i> (KF308883.1) | 100 |
| 9 | ITS1 | <i>Biscogniauxia</i> (MZ427923) | <i>Biscogniauxia maritima</i> (MN341558.1) | 100 |
| 10 | ITS1 | <i>Cladosporium</i> (MZ427924) | <i>Cladosporium perangustum</i> (MT645918.1) | 100 |
| 11 | ITS1 | <i>Didymella</i> (MZ427925) | <i>Didymella negriana</i> (MK100201.1) | 100 |
| 12 | ITS1 | <i>Fusarium</i> (MZ427927) | <i>Fusarium tricinctum</i> (MT446111.1) | 100 |
| 13 | ITS1 | <i>Trichoderma</i> (MZ427928) | <i>Trichoderma harzianum</i> (MT422092.1) | 98,97 |

* – Полученные нуклеотидные последовательности собирали с помощью программы Staden Package. Процент идентичности собранных нуклеотидных последовательностей определялся с помощью программы NCBI BLAST.

Выбранные эндофитные бактерии и грибы добавляли в клеточную суспензионную культуру *V. amurensis* (V7) и оценили накопление свежей биомассы и содержание стильбенов. Добавление *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp. и *Curtobacterium* sp. существенно не повлияло на накопление свежей биомассы суспензионной культуры клеток винограда после 2 недель совместного культивирования (Рисунок 13). Однако добавление бактерий *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. и грибов *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp. и *Fusarium* sp. значительно ингибировало накопление свежей биомассы клеточной культуры в 1,7–2,7 раз (Рисунок 13). Совместное культивирование клеток V7 с эндофитными грибами *Didymella* sp. и *Trichoderma* sp. привело к гибели клеток (Рисунок 13).

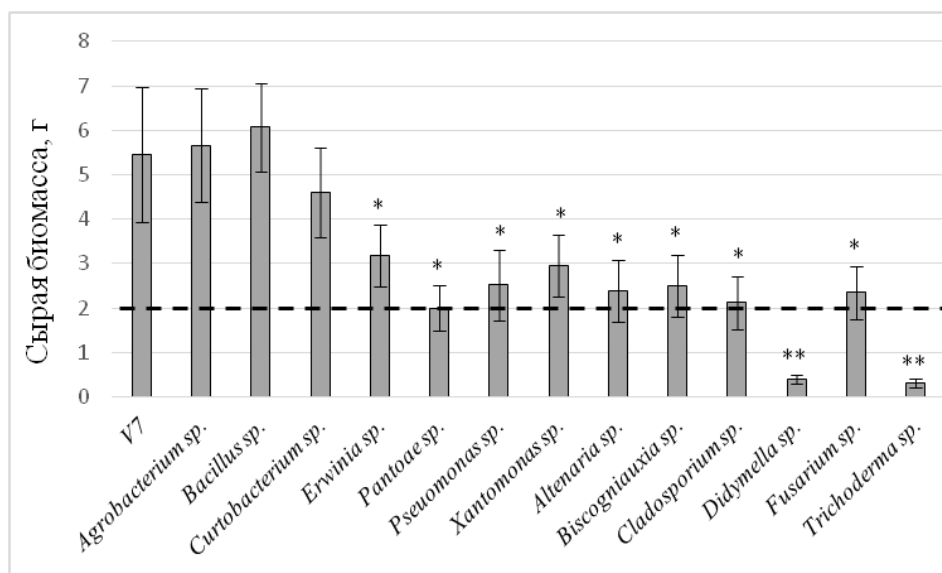


Рисунок 13. Накопление свежей биомассы в суспензионной культуре клеток *V. amurensis* V7 после недельного совместного культивирования с эндофитными бактериями или грибами *V. amurensis*. Пунктирной линией показана масса инокулята, равная 2 г. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению со значениями свежей биомассы, накопленной в культуре клеток V7 в контрольных условиях без бактерий и грибов.

Анализ методом ВЭЖХ показал, что общее содержание стильбенов в клеточной суспензии V7 увеличилось в 2,2–16 раз после добавления эндофитов (Рисунок 14). Наибольшее содержание стильбенов составляло 2,2–4,5 мг/г сухой биомассы клеток, что происходило под влиянием бактерий *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. Наибольшее

содержание стильбенов в культуре клеток V7 после бактериальной обработки составило 4,5 мг/г массы, что было достигнуто при совместном культивировании с бактериями *Xanthomonas* sp. (Рисунок 14). Однако более значительное увеличение содержания стильбенов до 6,95–13,76 мг/г сухой биомассы клеток было обнаружено после совместного культивирования культуры клеток V7 с эндофитными грибами *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp. и *Didymella* sp. (Рисунок 14).

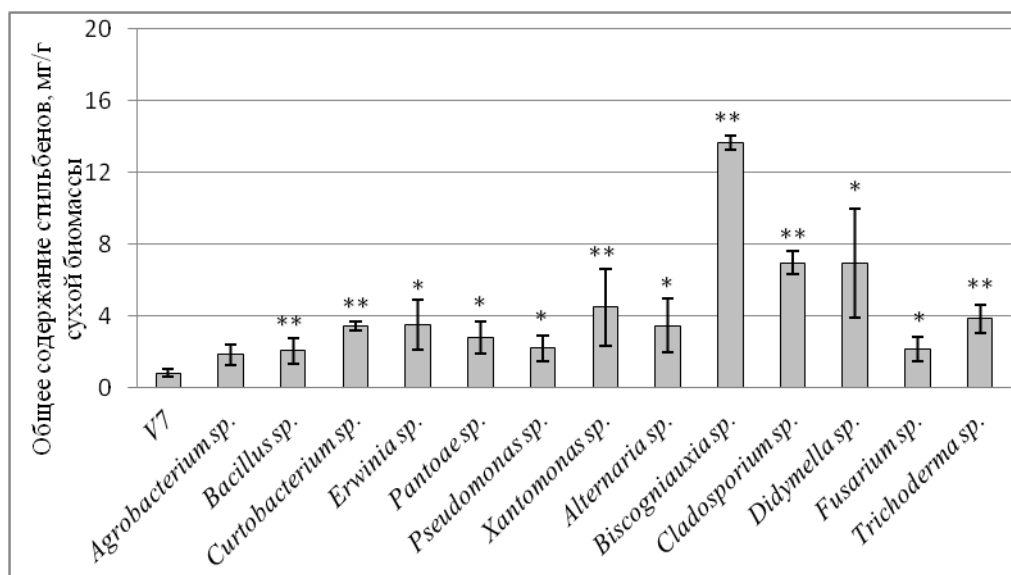


Рисунок 14. Общее содержание стильбенов (мг/г сухой биомассы клеток) в суспензионной культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3-дневного совместного культивирования с эндофитными бактериями или грибами. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в культуре клеток V7, культивируемой в контрольных условиях без бактерий и грибов.

Затем были проанализированы состав и содержание отдельных стильбенов в образцах культуры клеток винограда после совместного культивирования с эндофитами (Таблица 7). Отличительной особенностью обработки бактериями и грибами было то, что относительное содержание гликозилированных стильбенов в образцах значительно снизилось. В контрольной культуре клеток общее содержание диглюкозид-резвератрола, *транс*-пицеида и *цис*-пицеида составляло около 64% от общего количества стильбенов, в то время как при обработке бактериями оно составляло 28-57%, а при обработке грибами - только 13-31% (Таблица 7).

Таблица 7. Содержание стильбенов в культуре клеток V7 после 3 дней совместного культивирования с эндифитными бактериями или грибами, мг/г сухой биомассы клеток. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, культивируемых в контрольных условиях без бактерий и грибов.

| | Дигликозид-резвератрол | транс-пицеид | транс-резвератрол | эпсилон-виниферин | дельта-виниферин | цис-резвератрол | цис-пицеид | транс-пицетанол |
|---------------------------|------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>V7, контроль</i> | 0,432 ± 0,135 | 0,104 ± 0,022 | 0,029 ± 0,008 | 0,024 ± 0,007 | 0,255 ± 0,077 | 0,0004 ± 0,0001 | 0,0103 ± 0,0061 | 0 |
| <i>Agrobacterium sp.</i> | 0,583 ± 0,167 | 0,136 ± 0,055 | 0,140 ** ± 0,036 | 0,279 * ± 0,129 | 0,802 * ± 0,240 | 0,0010 ± 0,0004 | 0,0017 ± 0,0015 | 0 |
| <i>Bacillus sp.</i> | 0,823 ± 0,322 | 0,291 ** ± 0,053 | 0,141 ** ± 0,049 | 0,190 ** ± 0,068 | 0,575 ± 0,213 | 0,0011 * ± 0,0004 | 0,0693 ± 0,0561 | 0,0014 ± 0,0014 |
| <i>Curtobacterium sp.</i> | 3,447 * ± 0,247 | 0,348 ** ± 0,082 | 0,181 ** ± 0,043 | 0,131 ** ± 0,024 | 1,412 ** ± 0,415 | 0,0015 ** ± 0,0003 | 0,1025 ** ± 0,0674 | 0 |
| <i>Erwinia sp.</i> | 0,860 ± 0,350 | 0,243 ± 0,078 | 0,364 * ± 0,201 | 1,154 ** ± 0,535 | 0,940 * ± 0,333 | 0,0018 * ± 0,0008 | 0,0143 ± 0,0059 | 0,0249 * ± 0,0228 |
| <i>Pantoea sp.</i> | 0,602 ± 0,122 | 0,194 ± 0,074 | 0,477 ** ± 0,291 | 0,744 ** ± 0,204 | 0,770 ± 0,292 | 0,0010 ± 0,0003 | 0,0117 ± 0,0050 | 0,0013 ± 0,0013 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 0,486 ± 0,232 | 0,230 ± 0,094 | 0,167 ** ± 0,047 | 0,440 ** ± 0,158 | 0,861 * ± 0,304 | 0,0016 ± 0,0007 | 0,0084 ± 0,0045 | 0,0245 ± 0,0245 |
| <i>Xantomonas sp.</i> | 4,491 * ± 2,124 | 0,364 ** ± 0,148 | 0,433 ** ± 0,012 | 0,372 ** ± 0,220 | 1,958 * ± 1,605 | 0,0022 ** ± 0,0001 | 0,0268 ± 0,0268 | 0 |
| <i>Alternaria sp.</i> | 0,620 ± 0,255 | 0,239 ± 0,098 | 0,338 ** ± 0,117 | 1,292 ** ± 0,586 | 0,941 ± 0,469 | 0,0029 ± 0,0013 | 0,0501 ± 0,0326 | 0,0046 ± 0,0046 |
| <i>Biscogniauxia sp.</i> | 1,265 * ± 0,206 | 0,477 ** ± 0,106 | 2,861 ** ± 0,415 | 3,952 ** ± 0,664 | 4,981 ** ± 0,335 | 0,0035 * ± 0,0002 | 0,0910 ± 0,0162 | 0 |
| <i>Cladosporium sp.</i> | 1,258 ** ± 0,178 | 0,346 ** ± 0,082 | 0,882 ** ± 0,136 | 2,964 ** ± 0,132 | 1,504 * ± 0,866 | 0,0040 ** ± 0,0002 | 0,0216 ± 0,0125 | 0 |
| <i>Didymella sp.</i> | 1,035 ± 0,667 | 0,427 * ± 0,339 | 1,180 * ± 1,130 | 2,082 ** ± 1,872 | 2,222 * ± 2,060 | 0,002 ± 0,002 | 0 | 0 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 0,487 ± 0,236 | 0,147 ± 0,078 | 0,171 * ± 0,073 | 0,614 ** ± 0,163 | 0,700 * ± 0,229 | 0,0173 ** ± 0,0165 | 0,0295 ± 0,0184 | 0 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 0,682 ± 0,024 | 0,099 ± 0,001 | 0,127 ** ± 0,015 | 0,195 ** ± 0,079 | 2,706 ** ± 0,884 | 0,0025 ** ± 0,0004 | 0,0465 ± 0,0268 | 0,0094 * ± 0,0054 |

Второй особенностью было резкое увеличение содержания *транс*-резвератрола после добавления бактерий и грибов в 4,8–16,4 и 4,9–98,5 раза соответственно. Наибольшее содержание *транс*-резвератрола составило 2,9 мг/г сухой биомассы клеток, что было обнаружено в клетках винограда, культивируемых с эндофитным грибом *Biscogniauxia* sp. (Таблица 7). Среди бактерий наибольшее стимулирующее воздействие на содержание *транс*-резвератрола оказало культивирование с бактериями *Pantoea* sp., что привело к содержанию 0,5 мг/г сухой биомассы клеток (Таблица 7). Содержание виниферинов (*эпсилон*-виниферина и *дельта*-виниферина) также было существенно увеличено после добавления бактерий и грибов в 2,8–8,4 и 4,8–32,1 раза соответственно. Например, при культивировании с эндофитным грибом *Biscogniauxia* sp. количество виниферинов достигало 9 мг/г сухой биомассы клеток, что составляло 65% от всех обнаруженных стильбенов. В то же время количество виниферинов в контрольной культуре клеток V7 без обработки бактериями или грибами составило всего 33% (Таблица 7).

Затем была проанализирована экспрессия генов *VaPAL* и *VaSTS* после совместного культивирования с эндофитными бактериями и грибами. Также было проанализировано влияние *Agrobacterium* sp. на экспрессию генов *VaPAL* и *VaSTS*, чтобы использовать его в качестве отрицательного контроля, поскольку эта бактерия несущественно увеличивала содержание стильбенов в клетках виноградной лозы. Оказалось, что добавление всех отобранных эндофитных грибов приводило к значительной активации (в 2,6–44 раза) генов *VaPAL1*–*VaPAL4* по сравнению с необработанными клетками V7 (Рисунок 15а). Добавление эндофитных бактерий по-разному активировало экспрессию каждого гена *VaPAL*. Экспрессия генов *VaPAL1*–*VaPAL3* значительно увеличилась в 1,7–17 раз после добавления бактерий *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp. Добавление *Pantoea* sp. значительно увеличивало экспрессию *VaPAL4* (Рисунок 15а). Экспрессия гена *VaPAL3* была значительно повышена при добавлении эндофитных бактерий *Agrobacterium* sp. и *Pseudomonas* sp. к культуре клеток V7. Добавление бактерий *Xanthomonas* sp. привело к увеличению экспрессии гена *VaPAL2* (Рисунок 15а).

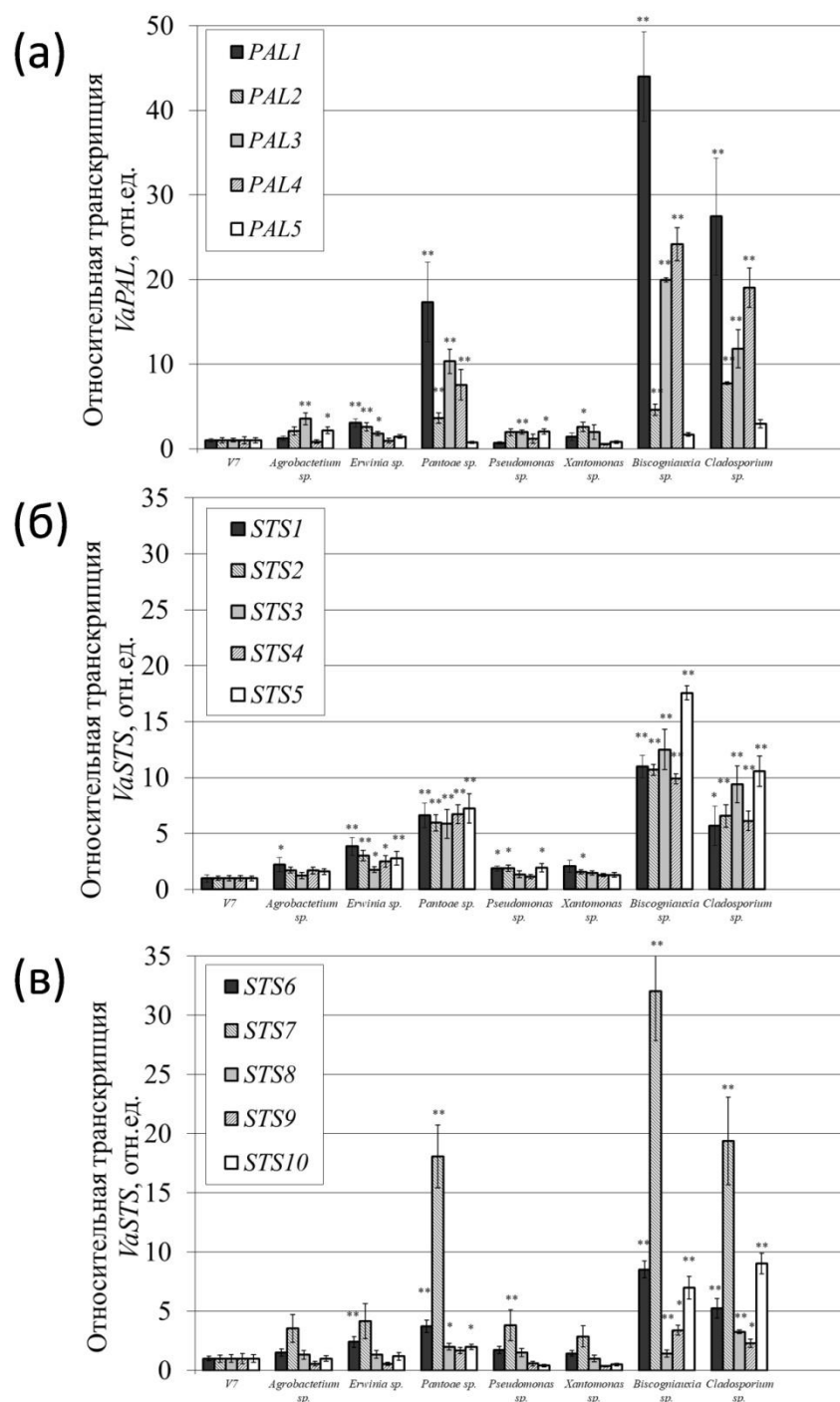


Рисунок 15. Экспрессия генов *VaPAL* (а) и *VaSTS* (б, в) в суспензионной культуре клеток V7 после 3 дней совместного культивирования с эндофитными бактериями *Agrobacterium sp.*, *Erwinia sp.*, *Pantoea sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Xantomonas sp.* или грибами *Biscogniauxia sp.*, *Cladosporium sp.* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ по сравнению со значениями в клетках V7, культивируемых в контрольных условиях без бактерий и грибов.

Экспрессия генов *VaSTS1-VaSTS5* значительно возросла после совместного культивирования с эндофитными бактериями *Erwinia sp.* и *Pantoea sp.* и всеми

выбранными эндофитными грибами (Рисунок 15б, в). Экспрессия гена *VaSTS2* значительно увеличилась при добавлении всех отобранных бактерий (Рисунок 15б). При добавлении всех отобранных эндофитов экспрессия гена *VaSTS7* увеличилась наиболее сильно по сравнению с другими генами *STS*. Наибольшая экспрессия этого гена была в 32 раза выше, чем в необработанных клетках V7, и наблюдалась после добавления гриба *Biscogniauxia* sp. (Рисунок 15в). Увеличение экспрессии гена *VaSTS8* наблюдалось при добавлении бактерий *Pantoea* sp. и гриба *Cladosporium* sp. Добавление грибов *Biscogniauxia* sp. и *Cladosporium* sp. значительно увеличивало экспрессию генов *VaSTS9* и *VaSTS10*. Также наблюдалось увеличение экспрессии гена *VaSTS10* после добавления бактерий *Pantoea* sp. (Рисунок 15в).

3.7.2 Анализ воздействия сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда на рост клеток и содержание стильбенов в культуре клеток

V. amurensis

Для анализа влияния биопрепаратов на основе эндофитов винограда на прирост биомассы культуры клеток винограда, в 7-суточную суспензионную культуру клеток *V. amurensis* V7 были добавлены биопрепараты на основе основных представителей эндофитного микробиома винограда, после чего культивирование клеток винограда продолжали в течение 3 и 7 суток. По истечению времени клетки извлекали из жидкой питательной среды, высушивали до постоянного веса и взвешивали.

После 3 суток культивирования клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий винограда биомасса высушенных клеток не изменялась (Рисунок 16а). Добавление 20 мг биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* sp. и *Fusarium* sp. снижало биомассу клеток в 1,5 и 1,2 раза (Рисунок 17а). После 7 суток совместного культивирования с биопрепаратами на основе *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp. также достоверно уменьшалась сухая масса клеток относительно контроля (Рисунок 16г). При культивировании клеток винограда с 20 мг биопрепарата на основе грибов *Alternaria* sp. и *Cladosporium* sp.

в течение 7 суток наблюдалось небольшое увеличение биомассы клеток (Рисунок 17г). В то же время добавление 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. достоверно снижало биомассу клеток. Остальные биопрепараты на основе эндофитов достоверно не влияли на прирост биомассы клеток V7 (Рисунок 16а, г и Рисунок 17а, г).

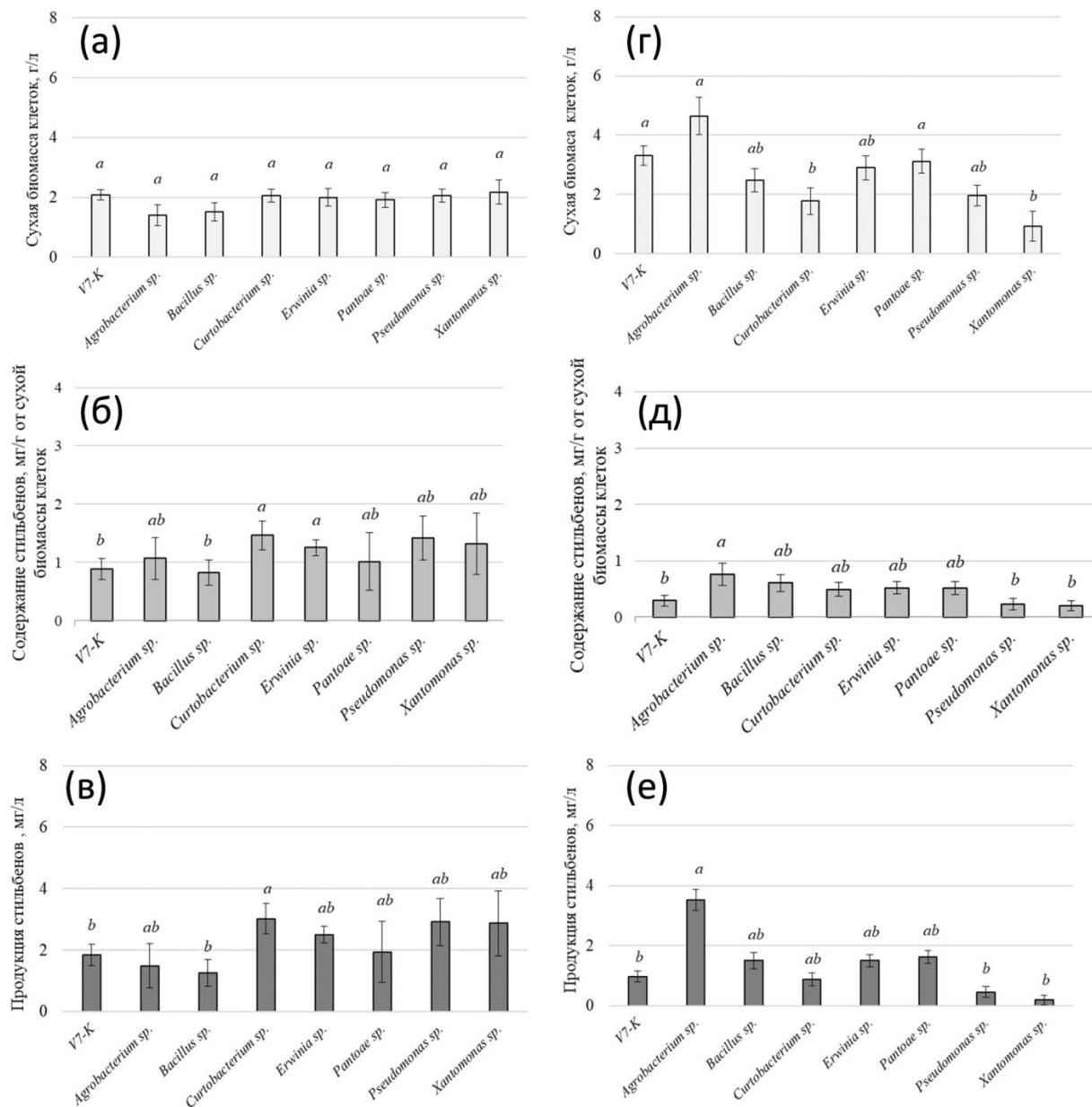


Рисунок 16. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сутки (г–е) после внесения биопрепаратов на основе эндофитных бактерий: сухая биомасса клеток (а, г, г/л), общее содержание стилбенов (б, д мг/л) и продуктивность (в, е мг/г). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не различались по критерию Стьюдента. $p < 0,05$ считали статистически значимым.

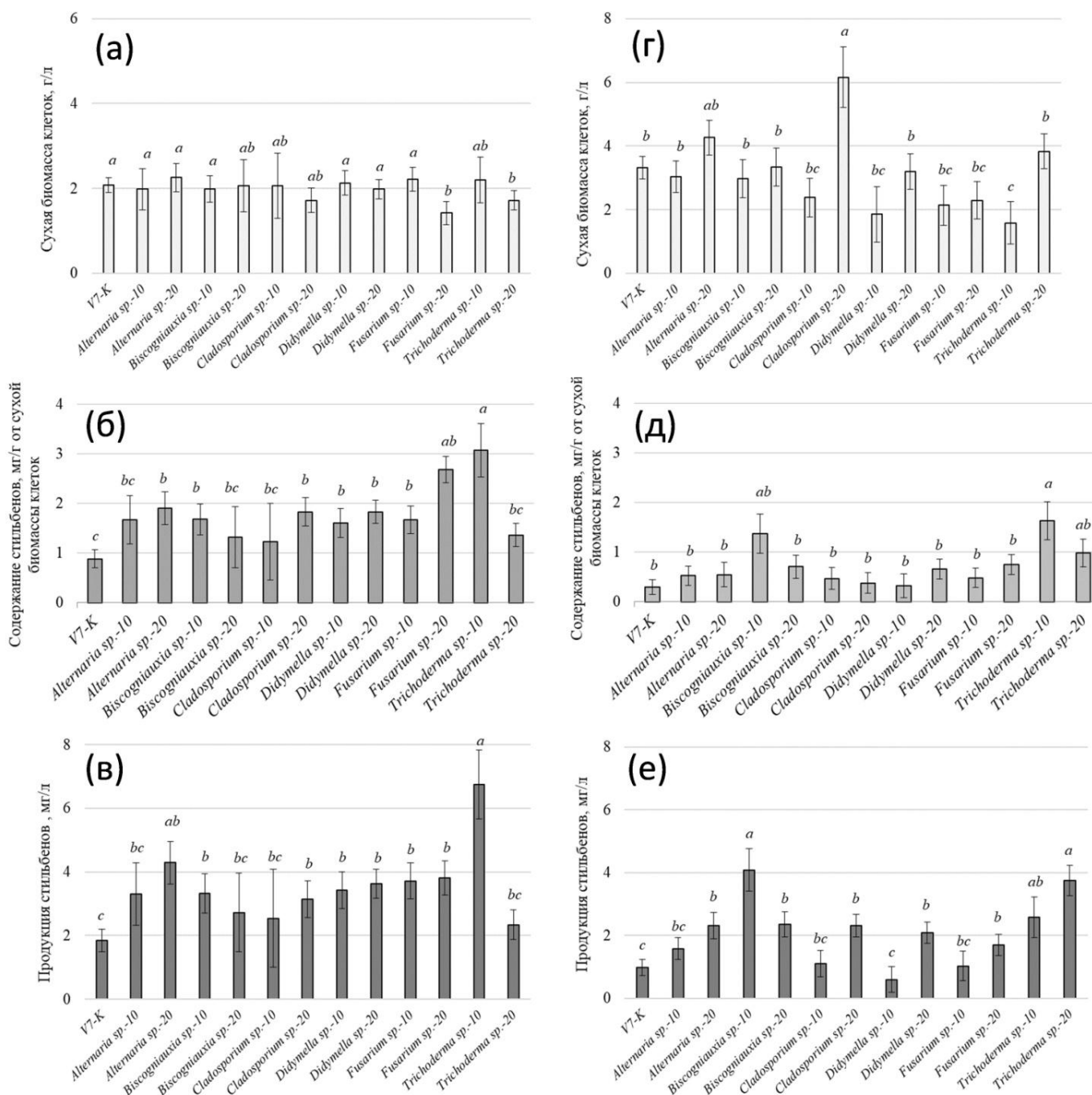


Рисунок 17. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сутки (г–е) после воздействия биопрепаратов на основе эндофитных грибов: сухая биомасса (а, г г/л), общее содержание стильбенов (б, д мг/г), продуктивность (в, е мг/л) клеток суспензионной культуры клеток винограда. Числа 10 и 20 после названия штамма означают 10 и 20 мг биопрепарата соответственно. 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.

После добавления в 7-суточную суспензию клеток винограда V7 биопрепаратов на основе эндофитов винограда через 3 и 7 суток методом ВЭЖХ

анализировали общее содержание стильбенов. При культивировании клеток V7 с внесенными биопрепаратами на основе эндофитных бактерий *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xantomonas* sp. за 3 суток общее содержание стильбенов увеличивалось в 1,3–1,5 раза относительно контроля. (Рисунок 16б). Культивирование клеток винограда в течение 7 суток совместно с биопрепаратами на основе бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp. увеличивало общее содержание стильбенов 1,7–2,6 раза относительно контроля (Рисунок 17 д).

При 3-суточном культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе отобранных эндофитных грибов достоверно увеличивалось общее содержания стильбенов в пределах 1,5–3,5 раза во всех анализируемых образцах. 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 (Рисунок 17б). Культивирование с биопрепаратами на основе *Biscogniauxia* sp. и *Trichoderma* sp. в течение 7 суток увеличивало общее содержание стильбенов в 5,6 и 4,7 раза соответственно (Рисунок 17д).

Необходимо отметить, что общее содержание стильбенов в контрольной культуре клеток значительно снижалось с увеличением времени культивирования. Максимальное значение в контрольной культуре на 10 сутки составило 0,88 мг/г сухой биомассы клеток V7, в то время как общее содержание стильбенов в 14-суточной культуре клеток уже в 3 раза меньше 0,29 мг/г. Определение количественного и качественного состава стильбенов проводили на 10 сутки (через 3 суток культивирования с биопрепаратами эндофитов) (Рисунок 16б, д и Рисунок 17б, д).

Результаты анализа показали, что при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе бактерий *Bacillus* sp. и *Erwinia* sp. содержание олигомеров резвератрола достоверно увеличивалось, а именно *эпсилон*-виниферина в 5,7 и 5,9 раза соответственно, а *дельта*-виниферина при добавлении биопрепаратов на основе *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp. в 4 раза (Таблица 8).

Достоверно увеличивалось содержание *цис*-пицеида (в 2,4 раза) при добавлении к культуре клеток винограда V7 биопрепарата на основе *Pseudomonas* sp. (Таблица 8). Таким образом, содержание виниферинов в культуре клеток винограда после добавления биопрепаратов на основе эндофитных бактерий достигало 42–71% от общего количества стильбенов в клетках, при этом количество виниферинов в контроле составляло только 20% от общего количества синтезируемых клетками стильбенов.

Таблица 8. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 дней культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий (мг/г сухой биомассы). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, культивированной в контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

| Стильбен | V7-K | <i>Agrobacterium sp.</i> | <i>Bacillus sp.</i> | <i>Curtobacterium sp.</i> | <i>Erwinia sp.</i> | <i>Pantoea sp.</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> | <i>Xantomonas sp.</i> |
|---------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Дигликозид-резвератрол | 0,32± 0,05 | 0,25± 0,08 | 0,09± 0,03 | 0,36± 0,11 | 0,54± 0,09 | 0,31± 0,26 | 0,37± 0,128 | 0,32± 0,11 |
| Пицеид | 0,17± 0,04 | 0,10± 0,04 | 0,06± 0,01 | 0,24± 0,13 | 0,12± 0,05 | 0,19± 0,16 | 0,30± 0,25 | 0,14± 0,08 |
| <i>транс</i> -резвератрол | 0,20± 0,16 | 0,06± 0,02 | 0,08± 0,02 | 0,07± 0,05 | 0,05± 0,03 | 0,06± 0,03 | 0,06± 0,03 | 0,07± 0,04 |
| эпсилон-виниферин | 0,03± 0,01 | 0,05± 0,05 | 0,18**± 0,09 | 0,09± 0,02 | 0,18*± 0,04 | 0,09± 0,01 | 0,09± 0,01 | 0,07± 0,04 |
| <i>дельта</i> -виниферин | 0,16± 0,04 | 0,60± 0,18 | 0,41± 0,14 | 0,68*± 0,08 | 0,35± 0,13 | 0,34± 0,01 | 0,57± 0,04 | 0,69*± 0,26 |
| <i>цис</i> -резвератрол | 0,003± 0,002 | 0 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,002± 0,002 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 |
| <i>цис</i> -Пицеид | 0,01± 0,01 | 0 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,02± 0,02 | 0,02*± 0,02 | 0,01± 0,01 |
| Пицеэтанол | 0,002± 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Как и при добавлении биопрепаратов на основе бактерий, внесение биопрепаратов на основе отобранных эндофитных грибов достоверно увеличивало процентное соотношение виниферинов во всех анализируемых образцах, до 41–73% от общего содержания стильбенов в культуре клеток винограда V7 (Таблица 9). Наибольшее увеличение *эпсилон*- и *дельта*-виниферинов в клетках винограда V7 было отмечено после культивирования с биопрепаратами на основе *Alternaria* sp. (10 мг), *Fusarium* sp. (20 мг) и *Trichoderma* sp. (10 мг) (Таблица 9). При добавлении 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. достоверно увеличивалось содержание *цис*-резвератрола и достигало 0,03 мг/г (Таблица 9). Содержание *цис*-пицеида и пицеэтанола увеличивалось после обработки биопрепаратами на основе *Alternaria* sp. и *Didymella* sp. (Таблица 9).

Таблица 9. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 суток культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных грибов (мг/г сухого веса клеток). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, культивированной в контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

| Стильбен | V7-К | <i>Alternaria</i> sp. | | <i>Biscogniauxia</i> sp. | | <i>Cladosporium</i> sp. | | <i>Didymella</i> sp. | | <i>Fusarium</i> sp. | | <i>Trichoderma</i> sp. | |
|---------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | | 10 мг | 20 мг | 10 мг | 20 мг | 10 мг | 20 мг | 10 мг | 20 мг | 10 мг | 20 мг | 10 мг | 20 мг |
| Дигликозид-резвератрол | 0,32± 0,05 | 0,31± 0,12 | 0,39± 0,10 | 0,22± 0,18 | 0,18± 0,16 | 0,30± 0,27 | 0,47± 0,12 | 0,41± 0,01 | 0,49± 0,05 | 0,39± 0,07 | 0,54± 0,22 | 0,42± 0,02 | 0,30± 0,05 |
| Пицеид | 0,17± 0,04 | 0,25± 0,16 | 0,24± 0,111 | 0,16± 0,13 | 0,11± 0,09 | 0,19± 0,15 | 0,21± 0,1 | 0,39± 0,01 | 0,33± 0,02 | 0,16± 0,06 | 0,26± 0,01 | 0,17± 0,063 | 0,13± 0,01 |
| <i>транс</i> -Резвератрол | 0,20± 0,16 | 0,14± 0,03 | 0,45± 0,34 | 0,13± 0,08 | 0,12± 0,10 | 0,10± 0,05 | 0,11± 0,04 | 0,08± 0,01 | 0,16± 0,03 | 0,12± 0,03 | 0,60± 0,36 | 0,20± 0,02 | 0,08± 0,05 |
| <i>эпсилон</i> -Виниферин | 0,03± 0,01 | 0,31**± 0,05 | 0,25**± 0,10 | 0,21± 0,17 | 0,33± 0,27 | 0,17± 0,07 | 0,14**± 0,04 | 0,10*± 0,05 | 0,22**± 0,06 | 0,32*± 0,13 | 0,35**± 0,25 | 0,49**± 0,24 | 0,17± 0,16 |
| <i>дельта</i> -Виниферин | 0,16± 0,04 | 0,63*± 0,11 | 0,53± 0,03 | 0,95**± 0,26 | 0,56**± 0,02 | 0,46**± 0,20 | 0,87*± 0,04 | 0,58± 0,06 | 0,56± 0,05 | 0,66**± 0,12 | 0,89**± 0,03 | 1,76*± 0,85 | 0,66**± 0,09 |
| <i>цис</i> -Резвератрол | 0,003± 0,002 | 0,01± 0,01 | 0,01*± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,013± 0,008 | 0,02± 0,01 | 0,02± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,03± 0,01 | 0,03**± 0,01 | 0,01*± 0,01 |
| <i>цис</i> -Пицеид | 0,01± 0,01 | 0,02**± 0,01 | 0,02*± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,01± 0,01 | 0,015± 0,010 | 0,02± 0,02 | 0,03**± 0,01 | 0,014± 0,009 | 0,02± 0,02 | 0,02± 0,01 | 0,01± 0,01 |
| Пицеэтанол | 0,002± 0,001 | 0,01± 0,01 | 0,02**± 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01± 0,01 | 0,02*± 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Анализ влияния биопрепаратов на основе эндофитов на рост биомассы и общее содержание стильбенов в культуре клеток винограда позволил вычислить общую продукцию стильбенов в клетках винограда V7 на 3 и 7 сутки совместного культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов. При добавлении биопрепаратов на основе бактерий продукция стильбенов на 3 сутки в культуре клеток увеличивалась в 1,3-1,6 раз (Рисунок 16в), и в 1,5-3,6 раза относительно контроля на 7 сутки (Рисунок 16е). Среди биопрепаратов на основе бактерий самая высокая продукция стильбенов была отмечена при культивировании в течение 3 суток с биопрепаратом на основе *Curtobacterium* sp. – 3,02 мг/л питательной среды (Рисунок 16в). На 7 сутки максимальная продукция стильбенов наблюдалась при внесении биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. – 3,5 мг/л питательной среды, по-видимому, ее увеличение происходило как за счет небольшого увеличения сухой биомассы клеток, так и за счет увеличения содержания стильбенов в клетках в 2,6 раза (Рисунок 16е).

Самое высокое значение продукции стильбенов было определено при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе грибных эндофитов в течение 3 суток. Продукция была выше контрольных значений в 1,4-3,7 раза, что было результатом увеличения содержания стильбенов во всех анализируемых пробах (Рисунок 17б). Максимальные значения продукции стильбенов в культуре клеток винограда были отмечены на 3 сутки культивирования с биопрепаратом на основе гриба *Alternaria* sp. (20 мг) – 4,3 мг/л питательной среды и биопрепаратом на основе *Trichoderma* sp. (10 мг) – 6,8 мг/л питательной среды (Рисунок 17в).

Биопрепараты на основе эндофитных грибов на 7 сутки культивирования увеличивали продукцию стильбенов в 1,6-4,2 раза относительно контроля. Высокие показатели продукции стильбенов на 7 сутки культивирования отмечали при внесении 10 мг биопрепарата на основе *Biscogniauxia* sp. – 4,1 мг/л питательной среды и при добавлении 10 и 20 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. – 2,6 и 3,7 мг/л соответственно (Рисунок 17е).

Для того чтобы доказать, что увеличение общего содержания стильбенов в культуре клеток после обработки биопрепаратами на основе эндофитов происходило за счет активации биосинтеза стильбенов, была проанализирована экспрессия ключевых генов биосинтеза стильбенов в клетках винограда, а именно пяти генов *PAL* и десяти генов *STS*. В эксперименте использовали препараты, которые в большей степени увеличивали общее содержание стильбенов, а именно на основе бактерий *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp., и на основе грибов *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. и *Trichoderma* sp. Биопрепарат на основе бактерий *Agrobacterium* sp. достоверно не влиял на содержание стильбенов в культуре клеток винограда при оценке на 3 сутки после его внесения (Рисунок 16б, Таблица 8), поэтому проанализированная экспрессия генов *PAL* и *STS* в этом эксперименте была использована в качестве дополнительного контроля.

Анализ экспрессии генов *PAL* после внесения биопрепаратов на основе эндофитов достоверно показал увеличение экспрессии гена *PAL1* в 1,9-9,0 раз во всех культурах клеток, кроме тех, куда были добавлены биопрепараты на основе *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (Рисунок 18а). Экспрессия гена *PAL2* была достоверно выше (в 5-16 раз) в культуре клеток V7 после добавления биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp., *Cladosporium* sp. и *Fusarium* sp. (Рисунок 18а). В трех из четырех культур клеток винограда, которые культивировали с биопрепаратами на основе грибов, а именно *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., экспрессия гена *PAL3* достоверно увеличивалась – в пределах 3,4-5,8 раза (Рисунок 18а). Добавление биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp. и *Cladosporium* sp. в культуру клеток винограда V7 достоверно увеличивали экспрессию генов *PAL4* и *PAL5* в 3,7-9,6 раз по сравнению с контролем (Рисунок 18а).

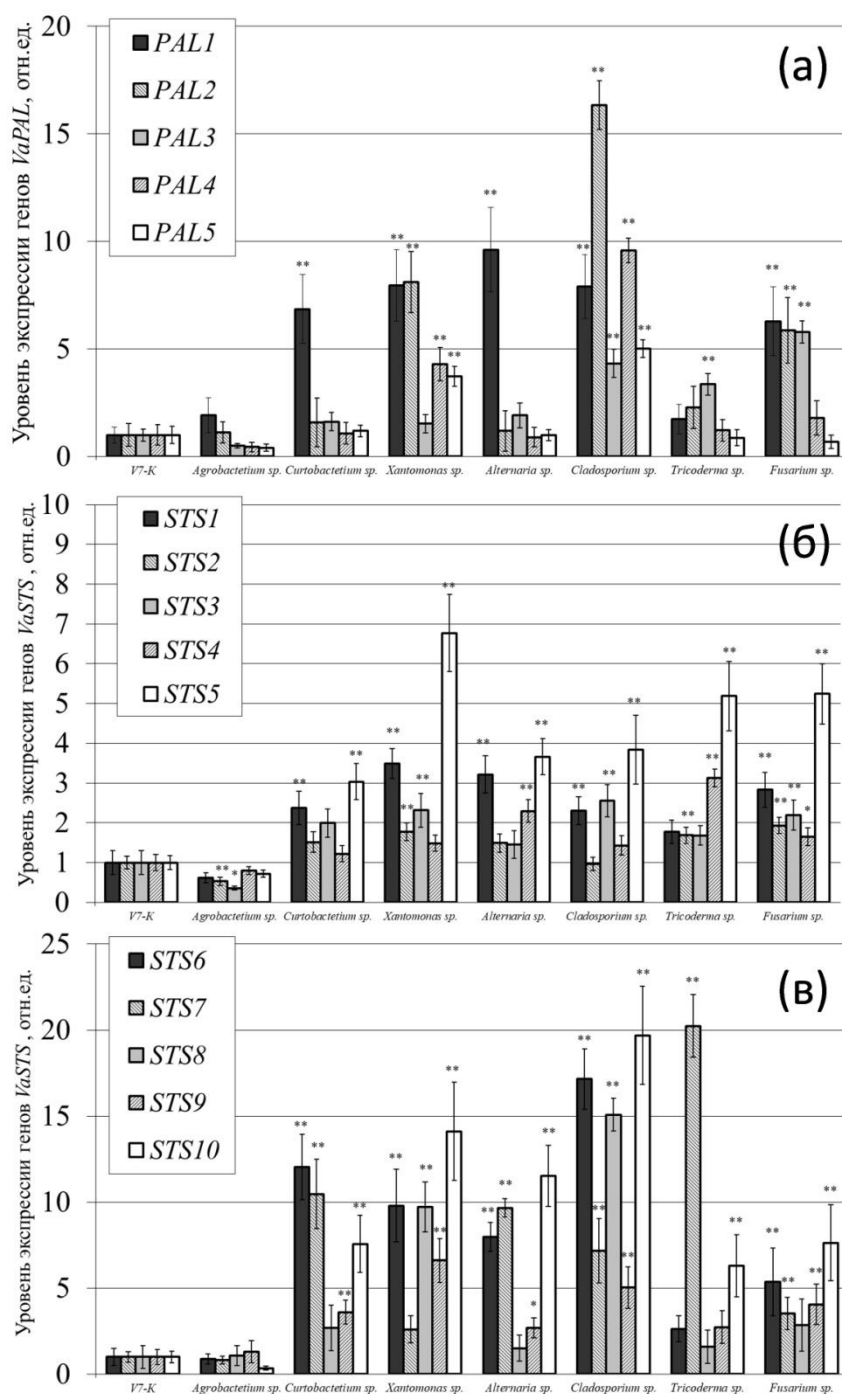


Рисунок 18. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов *PAL* (а) и *STS* (б, в) в культуре клеток винограда *V. amurensis* V7 после 3 суток культивирования с сухими биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для двух связанных выборок: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению со значениями уровня экспрессии в культуре клеток винограда *V. amurensis* V7.

Анализ экспрессии генов *STS* показал, что достоверно наблюдали увеличение экспрессии *STS1* в пределах 2,3-3,5 раза при внесении всех анализируемых

биопрепаратов, кроме биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (Рисунок 18б). Экспрессия гена *STS2* и *STS3* была выше в 1,7-2,3 раза после культивирования клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе *Xantomonas* sp. и *Fusarium* sp. Также экспрессия гена *STS2* достоверно увеличивалась при добавлении биопрепарата на основе *Trichoderma* sp., и экспрессия гена *STS3* была выше относительно контроля при добавлении биопрепарата на основе *Cladosporium* sp. (Рисунок 18б). В то же время, добавление биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. приводило к достоверному ингибированию уровня экспрессия генов *STS2* и *STS3* в клетках винограда (Рисунок 18б). Уровень экспрессии гена *STS4* достоверно возрастал в 1,6-3,0 раза при добавлении к клеткам винограда биопрепаратов на основе *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. Добавление всех анализируемых биопрепаратов, кроме биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp., достоверно увеличивало уровень экспрессии гена *STS5* (в 3,0-6,8 раз) в культуре клеток винограда V7 (Рисунок 18б).

Экспрессия гена *STS6* достоверно увеличивалась в клетках винограда при добавлении биопрепаратов на основе *Curtobacterium* sp., *Xantomonas* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. и *Fusarium* sp. в пределах 5,4-12 раз (Рисунок 18в). Добавление биопрепаратов на основе выбранных грибов и на основе бактерий *Curtobacterium* sp. достоверно увеличивали уровень экспрессии гена *STS7* в 3,5-20 раз в культуре клеток винограда V7, при этом максимальный уровень экспрессии гена *STS7* был отмечен при добавлении биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. (Рисунок 18в). Уровень экспрессии *STS8* достоверно увеличивался в 9,8-15 раз в клетках винограда при внесении биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp. и *Cladosporium* sp. (Рисунок 18в), а гена *STS9* в 2,7-6,6 раз после культивирования со всеми выбранными биопрепаратами, кроме *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (Рисунок 18в). Также во всех анализируемых образцах, кроме клеток, обработанных биопрепаратом на основе *Agrobacterium* sp., достоверно увеличивалась экспрессия гена *STS10* – в 6,2-19,7 раз (Рисунок 18в).

Таким образом, добавление биопрепаратов на основе эндофитов винограда достоверно активирует экспрессию *PAL* и *STS* – ключевых генов биосинтеза стилибенов в винограде.

3.8 Антипатогенные свойства эндофитной бактерии *B. velezensis* AMR25, выделенной 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.

Изучение антибактериальной активности *Bacillus* sp. AMR25 на *E. billingiae*, *P. agglomerans* и *X. campestris* (Рисунок 19) методом агаровых плит, показало, 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 (Таблица 10).

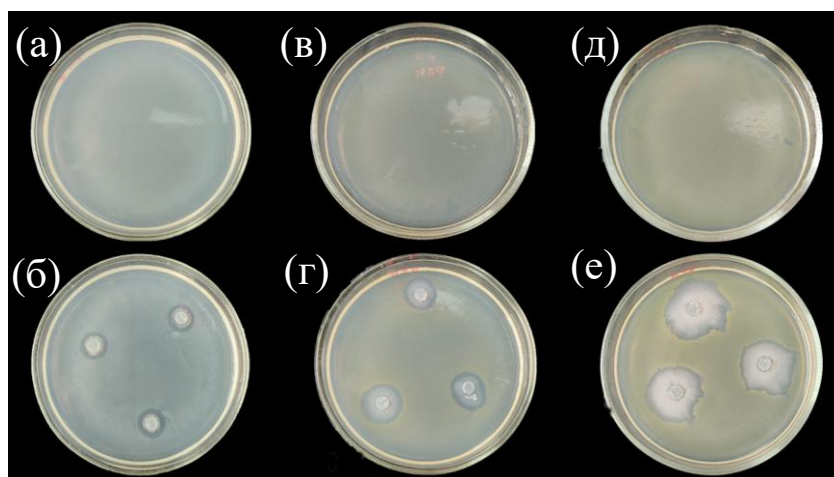


Рисунок 19. Антагонизм *Bacillus* sp. AMR25 и бактерий *E. billingiae* (а, б), *P. agglomerans* (в, г) и *X. campestris* (д, е) на чашках Петри. Диаметр чашки Петри составляет 10 см.

Таблица 10. Зона ингибирования (мм) штамма *Bacillus* sp. AMR25 в отношении некоторых бактериальных патогенов растений.

| Патогены | <i>E. billingiae</i> | <i>P. agglomerans</i> | <i>X. campestris</i> |
|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Зона ингибирования (мм) | 4,33 ± 0,33 | 3,66 ± 0,33 | 1,66 ± 0,33 |

Для анализа фунгицидной активности был использован метод двойного культивирования против таких патогенов, как *A. tenuissima*, *B. cinerea* и *F. avenaceum* (Рисунок 20). Штамм AMR 25 продемонстрировал самую сильную ингибирующую активность в отношении *B. cinerea* на уровне 71% (Таблица 11). Против *A. tenuissima* и *F. avenaceum* фунгицидная активность была ниже и составила 65,5% и 62,8% соответственно (Таблица 11, Рисунок 20).

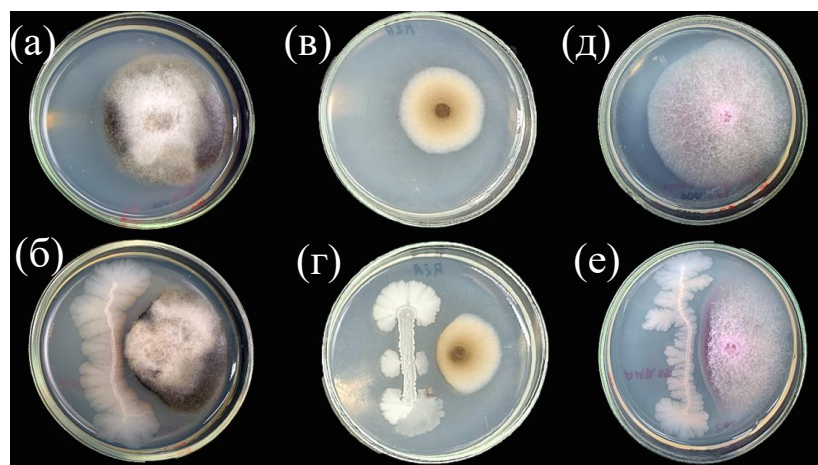


Рисунок 20. Антагонизм *Bacillus* sp. AMR25 и грибов *A. tenuissima* (а, б), *B. cinerea* (в, г) и *F. avenaceum* (д, е) на чашках Петри. Диаметр чашки Петри составляет 10 см.

Таблица 11. Индекс ингибирования (%) штамма *Bacillus* sp. AMR25 в отношении некоторых грибных патогенов растений.

| Патогены | <i>A. tenuissima</i> | <i>B. cinerea</i> | <i>F. avenaceum</i> |
|-------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| Зона ингибирования (мм) | 65,5% | 71% | 62,8% |

3.9 Секвенирование полного генома эндофитной бактерии винограда

B. velezensis AMR 25

3.9.1 Аннотация полного генома AMR25 и сравнительный анализ

Геномная ДНК штамма AMR25 была отсеквенирована по технологии Oxford Nanopore. После контроля качества было собрано и проанализировано 1,73 Гб

длинных прочтений, в результате чего был получен один скаффолд. Основные особенности генома AMR25 показаны на Рисунок 21. Он содержит кольцевую хромосому из 3 909 646 пар оснований со средним содержанием гуанина и цитозина в ДНК 46,61% (GC%). Кроме того, было обнаружено 3 464 кодирующих последовательности (CDS) со средней длиной 923 пары оснований, причем области, кодирующие белок, составляют 88,50% от общего объема генома. Было идентифицировано 86 генов тРНК и девять оперонов рРНК.

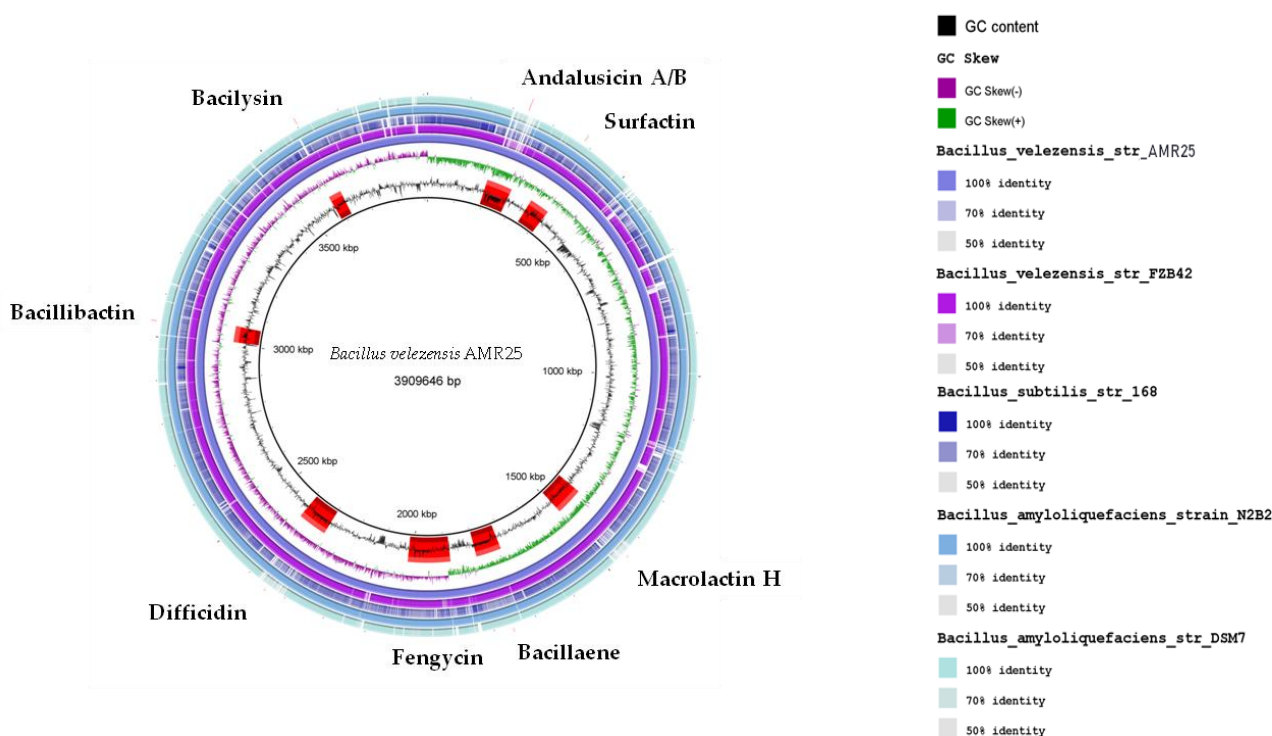


Рисунок 21. Геномное сравнение *Bacillus* sp. AMR25 с близкородственными репрезентативными штаммами *Bacillus*. Круговая карта была создана с использованием BLAST Ring ImageGenerator (BRIG). Концентрические кольца представляют последовательности каждого из репрезентативных штаммов *Bacillus* в сравнении с эталонным *Bacillus* sp. AMR25. 1-й круг (внутренний): Содержание гуанина и цитозина в ДНК в AMR25 и вторичные метаболиты с биоконтролирующей активностью также указаны на этом кольце красными дугами (андалузицин, сурфактин, фенгицин, бациллибактин, бацилизин, макролактин, бациллаен, диффицидин). 2-й круг (внутренний): Перекос гуанина и цитозина в ДНК *Bacillus* sp. AMR25 (GC skew). Круги 3-7: процент идентичности геномов *Bacillus* sp. AMR25, *Bacillus subtilis* 168, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7, *B. velezensis* FZB42 и *B. velezensis* N2B2 с геномом *Bacillus* sp. AMR25.

Ген домашнего хозяйства *gyrA*, кодирующий субъединицу А ДНК-гиразы, важен для репликации ДНК и обнаружен у всех бактерий. Анализ идентичности

gyrA обеспечивает более высокое филогенетическое разрешение, чем анализ гена 16S рРНК для видов *Bacillus* (Chun, Bae, 2000; Ménard *et al.*, 2016). Частичный анализ последовательности гена *gyrA* был использован для филогенетического анализа *Bacillus* sp. AMR25 и других штаммов *Bacillus*. Согласно анализу AMR25 был идентифицирован как представитель вида *B. velezensis* (в настоящее время *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* признаны более поздними гетеротипическими синонимами *B. velezensis*) (Рисунок 22) (Dunlap *et al.*, 2015). Ближайшим штаммом, геном которого представлен в GenBank, был *B. amyloliquefaciens* N2B2 (Рисунок 22). Эти данные были также подтверждены оценками OrthoANIu и dDDH (на основе GLM), которые составили 99,38 и 95,10% соответственно.

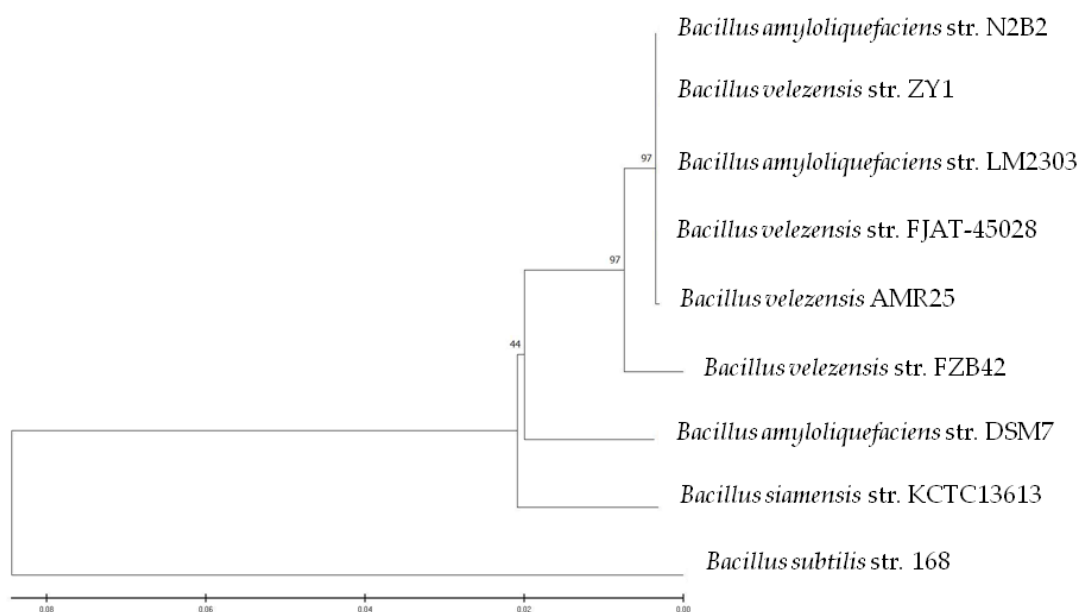


Рисунок 22. Филогенетический анализ *B. velezensis* AMR 25 на основе частичных последовательностей *gyrA* (нуклеотиды от 135 до 986) с использованием метода присоединения соседей. Ветви отображают процент деревьев, в которых родственные таксоны образовали кластеры, как определено с помощью бутстрэп-теста (1000 повторов). Длина ветвей измеряется количеством замен на позицию нуклеотида.

Штаммы *B. amyloliquefaciens* N2B2 (наиболее близкий эндофитный штамм), *B. velezensis* FZB42 (хорошо известный эндофит), DSM7 (почвенная бактерия без эндофитных свойств) и *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 (модельный штамм) были

выбраны для дальнейшего анализа. Общие характеристики этих штаммов представлены в таблице 12.

Таблица 12. Геномные особенности *B. velezensis* AMR25 и родственных представителей рода *Bacillus*. Amr25 - штамм *B. velezensis* AMR25; N2B2 - *B. amyloliquefaciens* N2B2; FZB42 – *B. velezensis* FZB42; DSM7 - *B. velezensis* DSM7; 168 - *B. subtilis* 168.

| | AMR25 | N2B2 | FZ42 | DMS7 | 168 |
|--|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Размер генома (п.н.) | 3 909 646 | 3 953 520 | 3 918 589 | 3 980 199 | 4 214 630 |
| Содержание G+C (%) | 46,6% | 46,6% | 46,4% | 46,1% | 43,5% |
| Количество последовательностей, кодирующих белок (CDS) | 3464 | 3886 | 3693 | 3921 | 4106 |
| Средний размер CDS (п.н.) | 923 | 925 | 933 | 888 | 895 |
| Процент кодирующих регионов | 88,5% | 88% | 88% | 87% | 87% |
| Количество тРНК | 86 | 65 | 89 | 94 | 86 |
| Количество оперонов рРНК | 9 | 1 | 10 | 10 | 10 |
| Мобильные элементы | 2 | 2 | 9 | - | 0 |
| Гены, связанные с фагами | 47 | 108 | 44 | 185 | 268 |

Сравнительный анализ CDS пяти штаммов *Bacillus* показал, что 3 027 кластеров генов были общими для всех пяти отобранных штаммов *Bacillus* (Рисунок 23). В общей сложности 3 197 кластеров генов были разделены между AMR25 и *B. subtilis* 168. AMR25 разделял 3 452 кластера генов с *B. velezensis* FZB42, 3 527 с *B. amyloliquefaciens* N2B и 3 396 кластеров генов с *B. amyloliquefaciens* DSM7. С другой стороны, только у штамма AMR25 был найден 1 кластер, содержащий 3 гена. AMR25 содержал 417, 87, 218 и 162 уникальных кластеров генов по сравнению с *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* N2B2, *B. amyloliquefaciens* DSM7 и *B. velezensis* FZB42 соответственно (Рисунок 23).

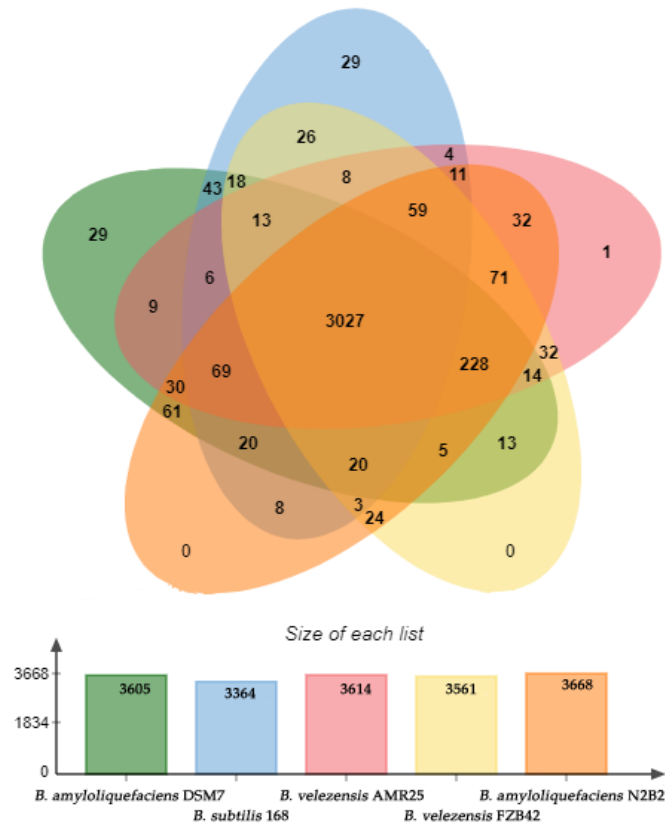


Рисунок 23. Диаграмма Венна для *B. velezensis* AMR25, *B. velezensis* FZB42, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. amyloliquefaciens* N2B2 и *B. subtilis* 168. Показано количество CDS между подмножествами генома.

С помощью программного обеспечения antiSMASH было идентифицировано 12 семейств генов, участвующих в синтезе вторичных метаболитов. Только 8 из этих семейств могут быть специфически соотнесены с генами, ответственными за синтез конкретных соединений (Рисунок 24, Таблица 13). Эти 8 соединений можно разделить на 3 основные категории: полипептиды (андалузицин, бациллибактин и бацилизин), липопептиды (сурфактин и фенгицин) и поликетиды (макролактин, бациллаен и диффицидин).

Таблица 13. Кластеры генов, участвующие в синтезе метаболитов биоконтроля у *B. velezensis* AMR25.

| Регион | Метаболит | Самый похожий известный кластер | Размер, Кб | Тип | Биоконтроль | Сходство |
|--------|-----------------|---------------------------------|------------|--|--|----------|
| 1 | Андалузицин А/В | RiPP: Лантипептид | 83,1 | Лантипептид класса III, NRPs, Транс-АТ-PKS | Подавляет рост грамположительных бактерий (Grigoreva <i>et al.</i> , 2021) | 100% |
| 2 | Сурфактин | NRP: Липопептид | 64,8 | NRPs | <i>Cochliobolus carbonum</i> ; | 82% |
| | | | | | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> | |
| | | | | | <i>Ralstonia solanacearum</i> ; | |
| | | | | | <i>F. verticillioides</i> (Chen <i>et al.</i> , 2009; Xiong <i>et al.</i> , 2015) | |
| 3 | Бутирозин А/В | Сахарид | 41,2 | PKS-подобный | - | 7% |
| 4 | Не известно | Не известно | 17,3 | Терпен | - | - |
| 5 | Макролактин Н | Поликетид | 87,8 | Транс-АТ-PKS | <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> (Romero-Tabarez <i>et al.</i> , 2006) | 100% |
| 6 | Бациллаен | Поликетид + NRP | 81,7 | Транс-АТ-PKS, ТЗPKS, NRPS | <i>E. amylovora</i> (Zeriouh <i>et al.</i> , 2011) | 85% |
| 7 | Фенгицин | NRP | 136,8 | NRPs, Транс АТ-PKS, бета-лактон | <i>R. solanacearum</i> ; | 100% |
| | | | | | <i>X. euvesicatoria</i> ; | |
| | | | | | <i>F. oxysporum</i> ; | |
| | | | | | <i>F. graminearum</i> ; | |
| | | | | | <i>B. cinerea</i> (Chen <i>et al.</i> , 2019; Pajčin <i>et al.</i> , 2020; Toral <i>et al.</i> , 2018) | |
| 8 | Не известно | Не известно | 21,9 | Терпен | - | - |
| 9 | Не известно | Не известно | 41,1 | ТЗPKS | - | - |
| 10 | Диффицидин | Поликетид | 93,8 | Транс-АТ-PKS | <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ; | 100% |
| | | | | | <i>E. amylovora</i> ; | |
| | | | | | <i>R. solanacearum</i> (Chen <i>et al.</i> , 2009) | |
| 11 | Бациллибактин | NRP | 51,8 | NRP-металлофор, NRPs, RiPP-подобный | <i>P. capsici</i> (Woo, Kim, 2008) | 100% |
| 12 | Бацелизин | Другие | 41,4 | Другие | <i>S. aureus</i> ; <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ; <i>E. amylovora</i> (Chen <i>et al.</i> , 2009) | 100% |

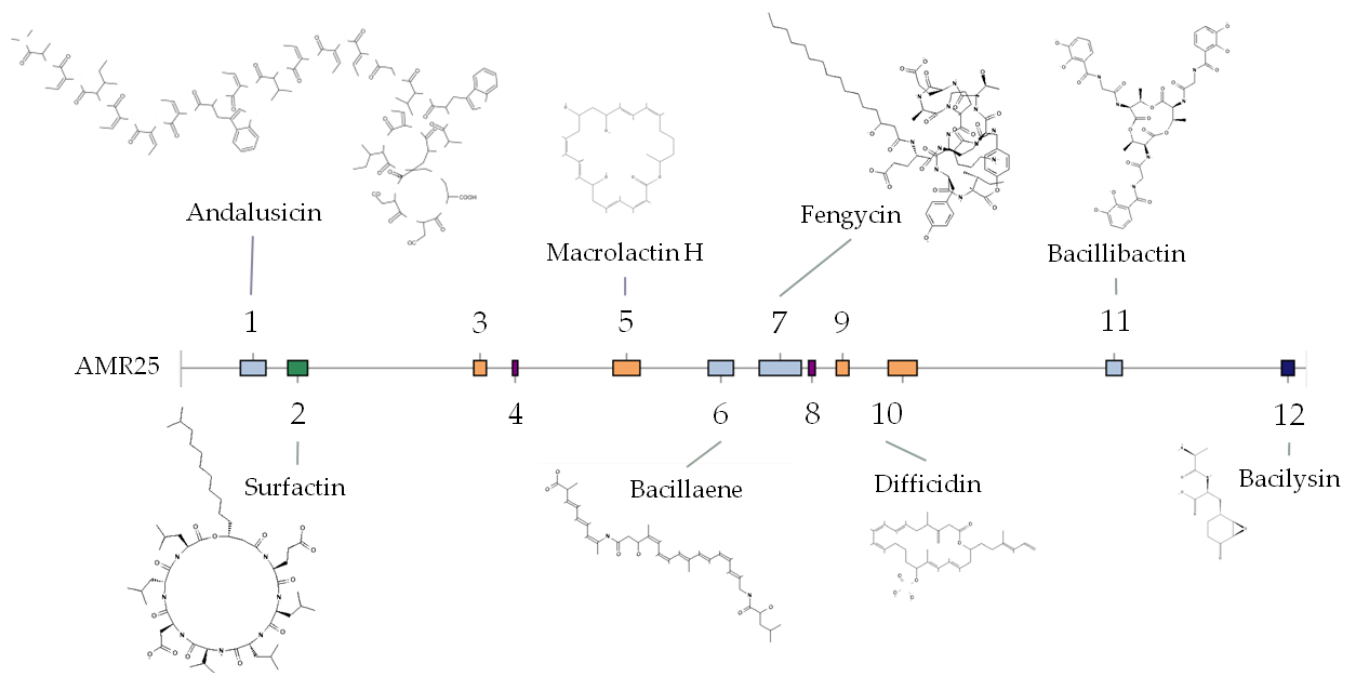


Рисунок 24. Кластеры генов, идентифицированные в геноме *B. velezensis* AMR25 с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 7.0.0. 1 – андалузицин; 2 – сурфактин; 3, 4 – неизвестное соединение; 5 – макролактин; 6 – бациллаен; 7 – фенгицин; 8, 9 – неизвестное соединение; 10 – диффицидин; 11 – бациллибактин; 12 – бацилизин.

Из 8 вторичных метаболитов, обнаруженных в штамме AMR25, каждый обладает антибактериальной активностью. Кроме того, 3 из них (сурфактин, бациллаен и фенгицин) также обладают фунгицидной активностью (Таблица 13).

Сравнительный анализ кластеров генов с использованием antiSMASH выявил незначительные различия между эндофитными штаммами AMR25, N2B2 и FZB42. Общей чертой этих штаммов было наличие макролактоина и диффицидина. Штамм AMR25 также характеризовался наличием дополнительного кластера генов для синтеза антибиотика андалузицина (Рисунок 25).

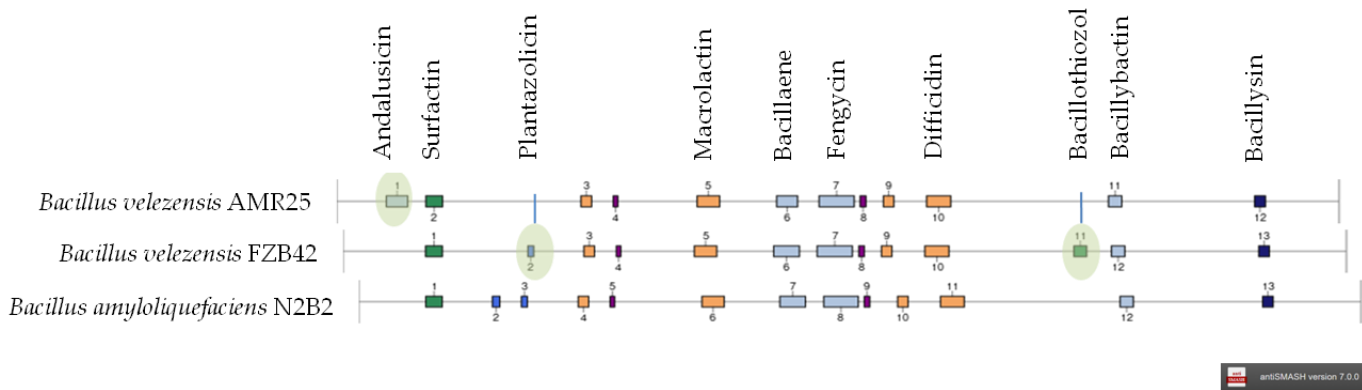


Рисунок 25. Кластеры генов, идентифицированные в геномах *B. velezensis* AMR25 и родственных представителях рода *Bacillus* с использованием программного обеспечения antiSMASH.

3.9.2 Генетические элементы *B. velezensis* AMR25, ответственные за взаимодействие растений и бактерий

Эндофитные бактерии, включая определенные штаммы рода *Bacillus*, способны продуцировать индол-3-уксусную кислоту (IAA), которая необходима для развития растений и играет важную роль во взаимодействиях растений и микробов (Dusa *et al.*, 2014). Бактерии *Bacillus* могут иметь четыре различных пути синтеза IAA, а именно путь индол-3-ацетамида (IAM), путь индол-3-пировиноградной кислоты (IPyA), путь индол-3-ацетонитрила (IAN) и путь ацетилтрансферазы IAA (IAAT) (Keswani *et al.*, 2020). Последовательность генома *B. velezensis* AMR25 содержит гены, соответствующие трем путям биосинтеза IAA, а именно IPyA (*patB*, *yclC* и *dhaS*), IAN (*yhcX*) и IAAT (*ysnE*) (Ananev *et al.*, 2024).

Кроме того, цитокинины являются группой фитогормонов, участвующих в росте и развитии растений (Wu *et al.*, 2021). Геном *B. velesensis* AMR25 содержит гены, ответственные за выработку цитокининов, такие как: *miaA* (ТРНК-димемталлилтрансфераза), *miaB* (2-метилтио N6-димемталлиладеносинтаза), *yvdD* (цитокенинмонофосфатфосфорибо-гидролаза) и *dapF* (диаминопемлат эпимераза) (Ananev *et al.*, 2024). Наличие этих генов позволяет предположить, что *B. velesensis* AMR25 способен продуцировать цитокинины.

Макроэлементы такие как фосфор, азот и сера являются необходимыми питательными веществами для роста и развития растений. Геном *B. velesensis* AMR25 содержит 15 генов, ответственных за азотистый метаболизм, включая нитратредуктазу (*narJ*, *narG*, *narH* и *narI*), транспорт нитратов/нитритритов (*NsrR* и *narK*) (Ananev *et al.*, 2024). Кроме того, были обнаружены гены, ответственные за деградацию уреазой (*ureC*, *ureB* и *ureA*). Были обнаружены гены *Cys*, участвующие в восстановлении и транспортировке сульфатов, и гены *ssu*, участвующие в транспорте и деградации сульфонов (Ananev *et al.*, 2024). Гены, ответственные за транспорт и ассимиляцию фосфатов, также присутствуют в геноме штамма AMR25 и представлены 12 генами, включая фосфатфосфатазы (*phoD*, *ucsE* и *rsbU*), гены переносчика фосфора (*pstABC*) и фитазу (*phy*) (Ananev *et al.*, 2024). Обнаруженные гены предполагают, что *B. velesensis* AMR25 может способствовать увеличению выработки питательных веществ.

Также, геном *B. velesensis* AMR25 содержит кластер генов хемотаксиса *cheABDRWY* и метилакцепторных белков хемотаксиса, таких как *mcpABC*, *hemAT* и *yfmS* (Kumar *et al.*, 2022; Ananev *et al.*, 2024). Кроме того, были обнаружены кластеры генов, ответственных за образование жгутиков, и генов, ответственных за образование биопленки, которые способствуют колонизации растений (Zaid *et al.*, 2022; Ananev *et al.*, 2024). Что подтверждает эндофитную природу *B. velesensis* AMR25.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метагеномика является мощным инструментом для изучения эндофитных микробных сообществ, однако получение высококачественной ДНК из окружающей среды, пригодной для последующего секвенирования, является сложной задачей. Качество и количество выделенной ДНК в значительной степени зависят от выбора процедуры очистки и типа образца.

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). Себестоимость предложенного в работе подхода по расчетам была в 6 раз ниже по сравнению с использованием коммерческих наборов. При использовании ЦТАБ-спин метода концентрация и количество выделенной ДНК было в 2,2–3,5 раза выше, чем при использовании ZymoBIOMICS. Стоит отметить, что во всех пробах, выделенных ЦТАБ-спин методом и ZymoBIOMICS, соотношение поглощения 260/280 было 1,9–2,0, а 260/230 – 0,4–0,6, что соответствует довольно чистым препаратам ДНК по примесям белков, но присутствием примесей других веществ, поглощающих при 230 нм.

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 (Таблица 4). Таким образом, ЦТАБ-спин метод является эффективным методом выделения ДНК для метагеномного анализа. Данный метод выделения ДНК был применён в изучении микробного сообщества растений винограда, произрастающих на Дальнем востоке России.

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 (Рисунок 2, 4). Интересно отметить, что для всего винограда, собранного в разных местах, характерно большое количество общих родов, как в бактериальных, так и в грибных эндофитных микробиомах (Рисунок 2б, 4б). Однако рассмотренные нами виды и сорта винограда характеризуются уникальным соотношением этих родов.

Данные микробиологического посева существенно отличаются от данных метагеномного анализа по количеству обнаруженных родов (Рисунок 2, 3, 4, 5). Это может быть связано с наличием в тканях винограда большого количества некультивируемых или требующих специализированных питательных сред эндофитных микроорганизмов. Тем не менее, полученные в результате посева эндофитные бактерии и грибы могут быть потенциальными для сельского хозяйства биопрепаратами, повышающими устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам.

Эндофитные микроорганизмы винограда могут помогать ему переживать неблагоприятные условия среды (Aly, Debbab, Proksch, 2011; Reinhold-Hurek, Hurek, 2011). Для *V. amurensis*, *V. coignetiae*, сортов Альфа и Прэйри стар наиболее многочисленны по количеству последовательностей 16S были таксоны *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, и *Hymenobacter* (Рисунок 2в). Известно, что некоторые виды рода *Sphingomonas* улучшают рост растений в стрессовых условиях, таких как засуха, засоление и попадание тяжелых металлов в сельскохозяйственные почвы. Эта роль объясняется их способностью вырабатывать гормоны роста растений, например, гиббереллины и индолуксусную кислоту (Asaf *et al.*, 2020). Род *Methylobacterium* состоит, в основном, из факультативных метилотрофных бактерий с розовой пигментацией, использующих органические одноуглеродные соединения в качестве единственного источника углерода и энергии для роста. 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 из ЛПХ «Макаревич» характеризуются высокой относительной численностью последовательностей 16S таксона *Comamonadaceae* (Рисунок 2в). Представители *Comamonadaceae* могут повышать доступность серы для растений (Schmalenberger *et al.*, 2008) и содержат гены, участвующие в фиксации углерода, устойчивости к мышьяку, стимулировании роста растений и микробной колонизации, что указывает на потенциал этих бактерий 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* (Рисунок 4в). Грибы *Aureobasidium* производят широкий спектр натуральных продуктов, которые хорошо описаны в международной литературе и считаются безопасными для биотехнологических и экологических применений. Кроме того, они 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 (Räut *et al.*, 2021). Возможно, эндофитные грибы *Aureobasidium* и *Cladosporium*, населяющие дикорастущий и сортовой виноград, тоже обладают антагонистическими свойствами в отношении патогенов растений, для чего нужны дальнейшие исследования. Интересно, что в *V. amurensis* и сортах Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» имел высокую относительную численность последовательностей ITS1 род *Malassezia* (Рисунок 4в). Виды *Malassezia* в природе встречаются на поверхности кожи

многих животных, включая человека. При случайных оппортунистических инфекциях некоторые виды могут вызывать у человека гипопигментацию или гиперпигментацию на туловище и других участках. Грибы рода *Malassezia* также были обнаружены в винограде “Каберне Совиньон” с органического виноградника в Китае (Zhu *et al.*, 2021). Однако, влияние этого рода на виноград не известно. Ранее было обнаружено, что бактерия *Cutibacterium acnes*, которая в значительной степени является комменсалом и частью кожной микрофлоры, была обнаружена в качестве эндофита в винограде и, по-видимому, перешла от человека к растению (Campisano *et al.*, 2014). Не исключено, грибы рода *Malassezia* могли также перейти от человека или других животных в виноград, что требует дальнейшей проверки. Кроме того, в отличие от *V. coignetiae*, род *Saccharomyces* был обнаружен у *V. amurensis* (Рисунок 4в). Известно, что дрожжи рода *Saccharomyces* регулируют кислотность вина за счет образования яблочной кислоты (Vion *et al.*, 2023). Кроме того, применение эндофитных дрожжей приводит к увеличению содержания молочной кислоты по сравнению с отборными штаммами дрожжей (Hanganu *et al.*, 2011). Яблочно-молочная ферментация имеет первостепенное значение для качества вина. Более того, использование спонтанной виноградной микробиоты приводит к неполному сбраживанию сахара, что приводит к получению более сладких вин по сравнению с ферментацией с использованием отборных штаммов (Hanganu *et al.*, 2011). Это различие важно, особенно в случае вина кустарного производства (или тех, которые производятся в домашних условиях). Вполне вероятно, что эндофитные дрожжи дикорастущего вида *V. amurensis* будут интересны виноделам для сохранения кислотности вина или получения более сладких вин при применении отобранных микроорганизмов в процессе спиртовой ферментации, что может стать многообещающим решением для сохранения качества вина и создания вин с новыми вкусовыми качествами.

По сравнению с другими видами и сортами винограда *V. amurensis* характеризуется большей относительной численностью последовательностей 16S таких родов как *Massilia* и *Escherichia-Shigella*, а *V. coignetiae* – *Sphingomonas* и

Methylobacterium-Methylorubrum (Рисунок 2в). Не исключено, что помимо климатических факторов, состав микробиома винограда может также зависеть от его генотипа. В недавнем исследовании доктора Хе и коллег показано, что адаптированные к местным условиям сорта кукурузы имеют генетические элементы, способствующие привлечению полезного микроорганизма *Massilia*, который помогает растению адаптироваться к низкой доступности азота (He *et al.*, 2024). Вероятно, дикорастущие растения винограда могут иметь уникальные генетические черты, привлекающие полезные эндофиты, которые способствуют адаптации винограда к характерным для местности условиям, что может быть выгодно для селекции. Также в работе доктора Хе и коллег была показана положительная связь содержания определённых вторичных метаболитов и численности бактерии *Massilia* в микробиоме кукурузы (He *et al.*, 2024). Предпочтения эндофитов у *V. amurensis* и *V. coignetiae*, вероятно, тоже могут быть связаны с содержанием вторичных метаболитов и другими обусловленными генетически особенностями сортов винограда, например, pH, содержание сахара. Известно, что дикорастущий виноград *V. amurensis* обладает большей устойчивостью к патогенам, а экстракты из *V. coignetiae* обладают ценными биологически активными свойствами, а именно гепатопротекторными (Oshima *et al.*, 1995), противовоспалительными (Pak *et al.*, 2012), сосудорасширяющими (Ha *et al.*, 2016), антиоксидантными (Weidner *et al.*, 2013) и противокариесными свойствами (Yano *et al.*, 2012). Возможно, способность привлекать полезные эндофиты является важным фактором в формировании описанных выше свойств дикорастущего винограда. Поэтому понимание молекулярных механизмов влияния генотипа на привлечение эндофитов у дикорастущего винограда *V. amurensis* и *V. coignetiae* требует дальнейших исследований.

Условия окружающей среды в любом винодельческом регионе могут повлиять на качество винограда и привести к различиям во вкусе и аромате вина даже для одних и тех же сортов винограда (Nataoka *et al.*, 2022). Ранее было показано, что специфические микробные сообщества, связанные с *V. vinifera*, могут быть ключевым элементом терруара, поскольку микробиологические

процессы, необходимые для выращивания винограда и производства вина, демонстрируют пространственные закономерности, связанные с участком виноградника (Nanetti *et al.*, 2023). В исследовании доктора Бокулич и коллег показано, что микробиота винограда и вина демонстрирует региональные закономерности, которые коррелируют с химическим составом вина, что позволяет предположить, что микробиом винограда может влиять на терруар (Bokulich *et al.*, 2016). Наше исследование показывает, что эндофитный микробиом выращиваемых в Приморском крае сортов винограда отличается в зависимости от местности выращивания растений (Рисунок 2а, 4а). Сорта Прэйри стар и Альфа из виноградника «PRIM ORGANICA» отличаются большей относительной численностью последовательностей ITS1 рода *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Sphingomonas* и *Cladosporium* по сравнению сортами Адель и Мукузани из ЛПХ «Макаревич» (Рисунок 2в, 4в). Доктор Бокулич и коллеги нашли корреляции численности этих микроорганизмов с изменениями метаболома вина (Bokulich *et al.*, 2016). Вероятно, эти рода могут оказывать существенное влияние на вкусовые характеристики вина, что требует дальнейших проверок. Интересно отметить, что род *Aureobasidium* имел высокую относительную численность последовательностей ITS1 в сортах Прэйри стар, Альфа и Адель (Рисунок 4в). Показано, типичные, хорошо известные вкусовые компоненты красного вина (т.е. 2-метилбутановая кислота, 3-метил-1-бутанол и этилоктаноат) могут выделяться представителями *Aureobasidium* (Verginer *et al.*, 2010). Таким образом, эндофитный микробиом винограда, выращенного на Дальнем Востоке России, может придавать винограду уникальные органолептические свойства, что требует дальнейших исследований.

По данным высокопроизводительного секвенирования, нами была обнаружена различная численность возбудителя ложной мучнистой росы *P. viticola* в 53% исследуемых проб винограда (Рисунок 6). Патоген был обнаружен как на незащищенных территориях, так и на виноградниках Дальнего Востока России. Согласно данным NGS, наибольшая относительная численность последовательностей ITS1 *P. viticola* была обнаружена в образцах винограда из

ЛПХ «Макаревич» (Рисунок 6б). Стоит отметить, что только в одном из собранных образцов винограда были обнаружены видимые симптомы ложной мучнистой росы. Вполне вероятно, что *P. viticola* циркулирует в ЛПХ «Макаревич», и регулярные обработки применяемыми там фунгицидами (хлорокись меди, манкоцеб и мефеноксам) только уменьшают количество патогена, не уничтожая его. В винограднике «PRIM ORGANICA», где используются фунгициды фамоксадон, цимоксанил и хлорид меди, присутствие этого патогена в образцах NGS было минимальным (Рисунок 6б). Возможно, фунгициды, используемые в «PRIM ORGANICA» являются более эффективными против популяции *P. viticola*, характерной для Дальнего востока России. Также нами было отмечено относительно высокое содержание *P. viticola* в образцах *V. amurensis*, собранных на острове Рикорд и в Силинском лесу Хабаровского края, а также в образцах *V. coignetiae*, выращенных в ботаническом саду на о. Сахалин и вблизи г. Невельск (Рисунок 6б). Известно, что по прошествии определенного времени на пораженных тканях винограда могут появиться признаки ложной мучнистой росы. Проявление этих симптомов в значительной степени зависит от конкретных условий окружающей среды региона, а также от восприимчивости хозяина к заболеванию (Yang *et al.*, 2023). *P. viticola* оптимально растет при высокой относительной влажности и умеренных температурах (Mouafo-Tchinda *et al.*, 2020). Вероятно, климатические особенности северных регионов и связанных с ними отдаленных островов, а именно повышенная влажность и низкие средние температуры, способствуют более активному распространению *P. viticola*. Присутствие *P. viticola* в образцах дикорастущего винограда без видимых симптомов ложной мучнистой росы может указывать на устойчивость этих видов к этому патогену. Известно, что восприимчивые виды винограда, зараженные *P. viticola*, продуцируют в основном стильбены *транс*-резвератрол, *транс*- и *цис*-пицеид (Pezet *et al.*, 1994), тогда как устойчивые виды продуцируют *транс*-резвератрол, *транс*-птеростильбен (3,5-диметокси-4'-гидроксистильбен), *транс*-эпсилон-виниферин и *транс*-дельта-виниферин (Langcake, 1981; Dercks, Creasy, 1989; Pezet *et al.*, 2003). Дикий

виноград *V. amurensis* является богатым источником стильбенов (Liu, Li, 2013), содержащий *транс*-резвератрол, *транс*- и *цис*-пицеид, *цис*-эпсилон-виниферин и *транс*-дельта-виниферин (Kiselev *et al.*, 2017), которые могут способствовать устойчивости этого вида к патогену. Предыдущие исследования показали, что биосинтез стильбенов и флавоноидов в виноградных листьях (особенно биосинтез резвератрола) значительно усиливается в ответ на ультрафиолетовое излучение (Xi *et al.*, 2015). Кроме того, генетические исследования выявили 33 локуса устойчивости к *P. viticola* (*Rpv*) у американского и азиатского видов *Vitis* и у некоторых сортов *V. vinifera* (Possamai, Wiedemann-Merdinoglu, 2022). Таким образом, высокое содержание стильбенов, наличие локусов *Rpv* и индукция биосинтеза стильбенов, вызванная ультрафиолетовым излучением, могут отрицательно влиять на уровень численности *P. viticola* в образцах дикого винограда. Вклад каждого фактора в формирование устойчивости дикорастущего винограда к этому патогену требует дальнейших исследований.

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 (Рисунок 7а). Возможно, это может свидетельствовать о дисбиозе, который приводит к негативным последствиям для растения. В недавней работе показано, что у растений винограда, переживающих упадок жизнеспособности, отмечено сниженное микробное разнообразие в корнях и ризосфере (Darriaut *et al.*, 2024). Также, генотип может оказывать существенное влияние на формирование эндофитной микробиоты в листьях (Chen *et al.*, 2020). Нокаут генов иммунной системы растения может привести к снижению разнообразия эндофитов внутри листьев, что связано с появлением на них повреждений (Chen *et al.*, 2020). В нашей работе патоген полностью отсутствовал в *V. amurensis* на о. Русский и вблизи г. Владивостока (Рисунок 6б). Возможно, растения винограда с отсутствием или низкой численностью *P. viticola* имеют генетические черты, которые приводят к накоплению полезных эндофитов, способствующих защите

растения от патогенов. С другой стороны, почвы, на которых растёт виноград, поражённый милдью, могут быть бедны полезными эндофитами.

Также было обнаружено, 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 (Рисунок 9). Известно, что некоторые виды рода *Hymenobacter* устойчивы к ультрафиолетовому излучению (Maeng *et al.*, 2019), а возбудитель *P. viticola* очень чувствителен к ультрафиолетовому излучению (Gadoury *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* (Рисунок 10). 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 возбудителя серой гнили винограда *B. cinerea* (Di Francesco *et al.*, 2020; Yalage Don *et al.*, 2020). Также, некоторые штаммы *Aureobasidium* демонстрировали свою эффективность против оомицета *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза томата (Di Francesco *et al.*, 2017). Дрожжи *Vishniacozyma* могут ингибировать развитие синей и серой плесеней, которые обычно поражают груши (Lutz *et al.*, 2013). Также, на растениях груши

показано, что дрожжи *Vishniacozyma* имеют способность значительно снижать развитие инфекций, вызываемых грибами *P. expansum*, *B. cinerea* и *Cladosporium sp.* (Gorordo *et al.*, 2022; Nian *et al.*, 2023). 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. В нашей работе мы сравнили подходы ПЦР РВ на основе флуоресцентного красителя SYBR Green I и высокопроизводительного секвенирования на базе Illumina в диагностике ложной мучнистой росы. Нами было разработано 6 пар праймеров ПЦР РВ SYBR Green I (Таблица 2). Согласно результатам эффективности ПЦР РВ, наиболее эффективными праймерами были PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 (Таблица 5). Кроме того, коэффициент корреляции между данными ПЦР РВ и высокопроизводительного секвенирования был самым высоким, когда использовались праймеры PvITS1_2 (Рисунок 12). Таким образом, данные ПЦР РВ подтверждают данные анализа NGS. Кроме того, был проведен 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.

Разработанный в этом исследовании количественный метод, основанный на ПЦР РВ модификации SYBR Green I, имеет также большие преимущества по сравнению с традиционными визуальными анализами и анализами *in vitro*, требующими относительно много времени, позволяя быстро с высокой точностью

детекции определить уровень патогенной инфекции в винограде. Применение данного метода ранней диагностики *P. viticola* на виноградниках Дальнего востока России, где относительно высокая влажность и умеренные температуры создают благоприятные условия для размножения данного оомицета (Mouafou-Tchinda *et al.*, 2021), может позволить детектировать данный патоген до появления первых симптомов, что в целом снизит серьезность эпидемии в период вегетации. Кроме того, информация об отсутствии *P. viticola* у бессимптомных растений позволит избежать дополнительной превентивной обработки химикатами, что также благоприятно скажется на качестве урожая.

Таким образом, применения разработанного метода ранней детекции *P. viticola* на основе ПЦР РВ может предоставить полезную информацию для руководства по применению фунгицидов и потенциально повысить эффективность борьбы с ложной мучнистой росой на виноградниках. Микробиомы имеют решающее значение для растений, стимулируя их рост и повышая устойчивость к стрессам (Singh *et al.*, 2023). 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, таких как: алкалоиды, бензопираноны, хиноны, флавоноиды, фенольные кислоты, стероиды, терпеноиды, тетралоны и ксантоны (Tidke *et al.*, 2017). Также эндофиты могут усиливать системную устойчивость у растений, в результате которой у растения 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 было показано, что эндофиты, выделенные из дикорастущего винограда *V. amurensis*, могут индуцировать биосинтез фармакологически ценных

стильбенов у винограда, которые повышают его защитные свойства. Были проанализированы живые и сухие биопрепараты 7 штаммов бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp. и 6 изолятов грибов *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. (Таблица 6)

Общее содержание стильбенов в клеточной суспензии V7 увеличилось в 2,2–16 раз после добавления живых эндофитов (Рисунок 14). 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. Наибольшее содержание стильбенов в культуре клеток V7 после бактериальной обработки составило 4,5 мг/г сухой биомассы, что было достигнуто при совместном культивировании с бактериями *Xanthomonas* sp. (Рисунок 14). 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. (Рисунок 14). Также нами отмечено резкое увеличение содержания *транс*-резвератрола после добавления бактерий и грибов в 4,8–16,4 и 4,9–98,5 раза соответственно. Наибольшее содержание *транс*-резвератрола в клетках винограда составило 2,9 мг/г (или 0,3%) сухой биомассы при культивации с эндофитным грибом *Biscogniauxia* sp. (Таблица 7). Стоит отметить, что содержание виниферинов (*эпсилон*-виниферина и *дельта*-виниферина) также было существенно увеличено после добавления эндофитных бактерий и грибов в 2,8–8,4 и 4,8–32,1 раза соответственно (Таблица 7). Полученные данные о содержании стильбенов коррелировали со значительным повышением экспрессии большинства проанализированных генов *PAL* и *STS* (Рисунок 15).

Наибольшее содержание стильбенов при добавлении сухих биопрепаратов на основе эндофитов винограда, особенно *эпсилон*- и *дельта*-виниферина, 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* (Рисунок 17, 18, Таблица 9). Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при добавлении к культуре клеток винограда V7 10 мг биопрепарата *Trichoderma* sp. (Рисунок 16), при этом наблюдалась самая сильная активация гена *STS7*, отвечающего за сверхпродукцию стильбенов (Aleynova *et al.*, 2016) (Рисунок 18). Общее содержание стильбенов достигало 3,07 мг/г (или 0,3%) сухой биомассы клеток (Рисунок 16). 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.

Стоит отметить, что уровень стильбенов после добавления биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. составил 3,07 мг/г от сухой биомассы клеток в культуре клеток винограда V7, что намного ниже, чем при использовании живых клеток эндофитов. Так, при добавлении живых бактерий *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. и *Xanthomonas* sp. к культуре клеток винограда *V. amurensis* приводило к достоверному увеличению содержания стильбенов от 2,2 до 4,5 мг/г сухой биомассы (Aleynova *et al.*, 2021) (Рисунок 14). Добавление живых эндофитных грибов *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp. к культуре клеток винограда также стимулировало биосинтез стильбенов в значительной степени, при этом их содержание достигало от 7,0 до 13,8 мг/г от сухой биомассы (Aleynova *et al.*, 2021) (Рисунок 14). В то же время стимуляция биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи живых эндофитов осложняется тем, скорость роста бактерий и грибов в значительной мере выше, чем культуры клеток винограда. Использование живого эндофитного гриба *Trichoderma* sp. для стимуляции биосинтеза стильбенов приводило к увеличению общего содержания стильбенов до 3,9 мг/г (Aleynova *et al.*, 2021), а

использование биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. до 3,07 мг/г сухой биомассы клеток в культуре клеток винограда V7. Таким образом использование биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. для активации биосинтеза стильбенов по эффективности немногим уступает нативному грибу *Trichoderma* sp.

Важно отметить, что полученный уровень стильбенов после добавления новых биопрепаратов сопоставим с ранее известными активаторами биосинтеза стильбенов в клетках растений *in vitro*. Например, через 18 ч после обработки ультрафиолетовым излучением электромагнитного спектра С (УФ-С) содержание стильбенов в каллусных культурах *Arachis hypogaea* достигало 0,017 мг/г сырой или около 0,3 мг/г сухой биомассы (Ku *et al.*, 2005). В культуре клеток, которая была обработана патогеном растений *Botryodiplodia theobromae*, содержание стильбенов достигало 0,023 мг/г сырой или около 0,5 мг/г сухой биомассы клеток (Yang *et al.*, 2010). В суспензионной культуре клеток *V. vinifera* уровень стильбенов составлял 2,1 мг/г сухой биомассы клеток через 2 суток после обработки УФ-С и 100 мкМ метилжасмонатом (MeJa) (Xu *et al.*, 2015).

Содержание стильбенов в культуре клеток, обработанной биопрепаратами на основе эндофитов винограда, было выше, чем в листьях дикорастущего растения винограда до и после УФ-обработки (0,04-0,95 мг/г от сухой биомассы клеток) (Kiselev *et al.*, 2017; Larronde *et al.*, 2003). 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). При использовании этих индуцирующих агентов содержание только *транс*-резвератрола в культуре клеток *V. vinifera* достигало 35–155 мг/г от сухой биомассы клеток (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. Так, *B. velesensis* AMR25 показал небольшую эффективность в ингибировании роста в отношении патогенных бактерий *E. billingiae*, *P. agglomerans* и *X. campestris* (Рисунок 19) и высокую эффективность в отношении грибных патогенов винограда *A. tenuissima*, *B. cinerea* и *F. Avenaceum* (Рисунок 20). Штамм AMR 25 продемонстрировал самую сильную ингибирующую активность в отношении *B. cinerea* на уровне 71% (Таблица 11).

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, макролактин, бациллаена, диффицидина (Рисунок 24). 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 *X. euvesicatoria* (Chen *et al.*, 2019; Pajčin *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). Было показано, что бациллаен эффективен против бактериального ожога плодовых культур, вызываемого *Erwinia amylovora* (Zerriouh *et al.*, 2011). Макролактин является эффективным антибактериальным средством против таких бактерий, как золотистый стафилококк и *Burkholderia cepacia* (Romero-Tabarez *et al.*, 2006). Как диффицидин, так и бацилизин проявляют антибактериальную активность в отношении патогенов *X. oryzae* и *E. amylovora*, вызывающих бактериальный ожог на плодовых культурах (Chen *et al.*, 2009). В геноме у

исследуемого штамма AMR25 также были обнаружены, как упоминалось ранее, 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*. Антагонистическая активность в отношении патогенов растений, обнаруженная у *B. velesensis* AMR25, сопоставима с штаммами *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* в ранее опубликованных работах (Zhao *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Toral *et al.*, 2018). 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. velesensis* AMR25 и виноградной лозой. Таким образом, AMR25 может быть использован для борьбы с грибными патогенами винограда и других растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы установлено, что эндофитный микробиом винограда *V. amurensis* является богатым источником микроорганизмов, которые можно использовать в сельском хозяйстве как для активации защитных свойств растений и повышения качества биохимического состава плодов, так и для защиты от широко распространенных инфекций винограда и других растений. Были сформированы коллекции эндофитных бактерий и грибов из амурского винограда, которые могут применяться в дальнейших исследованиях разных направлений. Данные, полученные в ходе метагеномного анализа эндофитных бактерий и грибов винограда, могут быть использованы для создания технологий инженерии микробных сообществ с целью повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.

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, бацелизина, макролактинина, бациллаена, диффицидина, действующих против бактериальных и грибковых патогенов. Исследуемый геном также содержит ряд генов, участвующих в колонизации корней, образовании биопленок и биосинтезе фитогормонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абузов М. Ф. Атлас северного винограда. – Смоленск: Питомник, 2009. – 165 с.
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. БГД - Сельское хозяйство в России - 2021 г. [Электронный ресурс]. – URL: https://rosstat.gov.ru/bgd/regl/b21_38/Main.htm (дата обращения: 20.05.24)
4. Киселёв К. В. Влияние предшественников фенольных соединений растений на биосинтез резвератрола в культурах клеток винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. / К. В. Киселёв, О. А. Шумакова, А. Ю. Маняхин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49. – № 1. – С. 61-66.
5. Раджабов А. К. Технологии внесения удобрений и система защиты виноградных насаждений от вредителей и болезней / А. К. Раджабов, Н. П. Мишуров, Т. А. Щеголихина [и др.]. – Москва: ФГБНУ Росинформагротех, 2021. – 88 с.
6. Усенко Н. В. Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока: справочная книга. – Хабаровск: Приамурские ведомости, 2009. – 271 с.
7. Чеботарь В. К. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В. К. Чеботарь, А. В. Щербаков, Е. Н. Щербакова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 648-654.
8. Шатилов Ф. Северное виноградарство России. – Оренбург: ОГУ. – 1998. – 150 с.
9. Шафикова Т. Н. Молекулярно-Генетические Аспекты Иммуитета Растений к Фитопатогенным Бактериям и Грибам / Т. Н. Шафикова, Ю. В. Омеличкина // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 5. – С. 611-627.

10. Aleynova O. A. Stilbene accumulation in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. overexpressing *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS7* genes / O. A. Aleynova, V. P. Grigorchuk, A. S. Dubrovina [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2016. – Vol. 125. – № 2. – P. 329-339.
11. 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.
12. 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.
13. 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. Ananov [et al.] // Plants. – 2023a. – Vol. 12. – № 16. – P. 2952.
14. Aleynova O. A. Bacterial and Fungal Endophytes of Grapevine Cultivars Growing in Primorsky Krai of Russia / O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky, A. A. Ananov [et al.] // Horticulturae. – 2023b. – Vol. 9. – № 12. – P. 1257.
15. 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.
16. Alikhan N. F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons / N. F. Alikhan, N. K. Petty, N. L. Ben Zakour [et al.] // BMC genomics. – 2011. – Vol. 12. – P. 402.
17. Almagro L. Enhanced extracellular production of *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine / L. Almagro, S. Belchí-Navarro, A. Martínez-Márquez [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2015. – Vol. 97. – P. 361-367.
18. Alquéres S. The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 / S. Alquéres, C. Meneses, L. Rouws [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions®. – 2013. – Vol. 26. – № 8. – P. 937-945.

19. Ananev A. A. Whole Genome Sequencing of *Bacillus velezensis* AMR25, an Effective Antagonist Strain against Plant Pathogens / A. A. Ananev, Z. V. Ogneva, N. N. Nityagovsky [et al.] // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – P. 1533.

20. Altschul S. F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215. – № 3. – P. 403-410.

21. Aly A. H. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises / A. H. Aly, A. Debbab, P. Proksch // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 90. – № 6. – P. 1829-1845.

22. Andreolli M. Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control / M. Andreolli, S. Lampis, G. Zapparoli [et al.] // Microbiological Research. – 2016. – Vol. 183. – P. 42-52.

23. Armijo G. Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios / G. Armijo, R. Schlechter, M. Agurto [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol. 7. – P. 382.

24. Arndt D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool / D. Arndt, J. R. Grant, A. Marcu [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44. – № W1. – P. W16-W21.

25. Asaf S. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth / S. Asaf, M. Numan, A. L. Khan [et al.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2020. – Vol. 40. – № 2. – P. 138-152.

26. Barka E. A. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria / E. A. Barka, A. Belarbi, C. Hachet [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2000. – Vol. 186. – № 1. – P. 91-95.

27. Belchí-Navarro S. Induction of *trans*-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv

Monastrell / S. Belchí-Navarro, L. Almagro, A.B. Sabater-Jara [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2013. – Vol. 170. – № 3. – P. 258-264.

28. Bell C. R. Endophytic bacteria in grapevine / C. R. Bell, G. A. Dickie, W. L. G. Harvey [et al.] // Canadian Journal of Microbiology. – 1995. – Vol. 41. – № 1. – P. 46-53.

29. Bertsch C. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood / C. Bertsch, M. Ramírez-Suero, M. Magnin-Robert [et al.] // Plant Pathology. – 2013. – Vol. 62. – № 2. – P. 243-265.

30. Blin K. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation / K. Blin, S. Shaw, H. E. Augustijn [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2023. – Vol. 51. – № W1. – P. W46-W50.

31. Bokulich N. A. Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics / N. A. Bokulich, T. S. Collins, C. Masarweh [et al.] // mBio. – 2016. – Vol. 7. – № 3.

32. Bokulich N. A. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin / N. A. Bokulich, B. D. Kaehler, J. R. Rideout [et al.] // Microbiome. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 90.

33. Bolyen E. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 / E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon [et al.] // Nature Biotechnology. – 2019. – Vol. 37. – № 8. – P. 852-857.

34. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Botrytis / Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski [et al.] – Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2004. – 412 p.

35. Bozoudi D. The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector / D. Bozoudi, D. Tsaltas // Fermentation. – 2018. – Vol. 4. – № 4. – P. 85.

36. Bruez E. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s / E. Bruez, P. Lecomte, J. Grosman [et al.] // Phytopathologia Mediterranea. – 2013. – Vol. 52. – № 2. – P. 262-275.

37. Bulgari D. Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process / D. Bulgari, P. Casati, F. Quaglino [et al.] // BMC Microbiology. – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 198.
38. Burruano S. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine // Mycologist. – 2000. – Vol. 14. – № 4. – P. 179-182.
39. Callahan B. J. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen [et al.] // Nature Methods. – 2016. – Vol. 13. – № 7. – P. 581-583.
40. Campisano A. Diversity in Endophyte Populations Reveals Functional and Taxonomic Diversity between Wild and Domesticated Grapevines / A. Campisano, M. Pancher, G. Puopolo [et al.] // American Journal of Enology and Viticulture. – 2015. – Vol. 66. – № 1. – P. 12-21.
41. Campisano A. Interkingdom Transfer of the Acne-Causing Agent, *Propionibacterium acnes*, from Human to Grapevine / A. Campisano, L. Ometto, S. Compant [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2014. – Vol. 31. – № 5. – P. 1059-1065.
42. Chan P. P. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes / P. P. Chan, B. Y. Lin, A. J. Mak [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 49. – № 16. – P. 9077-9096.
43. Chen M. C. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349 / M. C. Chen, J. P. Wang, Y. J. Zhu [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 126. – № 5. – P. 1519-1529.
44. Chen T. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere / T. Chen, K. Nomura, X. Wang [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 580. – № 7805. – P. 653-657.
45. Chen X. H. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease / X. H. Chen, R. Scholz, M. Borriss [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 140. – № 1-2. – P. 38-44.

46. Choi Y. J. Towards a universal barcode of oomycetes – a comparison of the *cox1* and *cox2* loci / Y. J. Choi, G. Beakes, S. Glockling [et al.] // Molecular Ecology Resources. – 2015. – Vol. 15. – № 6. – P. 1275-1288.
47. Chun J. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences / J. Chun, K. S. Bae // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2000. – Vol. 78. – № 2. – P. 123-127.
48. Cohen A. C. Carotenoid profile produced by *Bacillus licheniformis* Rt4M10 isolated from grapevines grown in high altitude and their antioxidant activity / A. C. Cohen, E. Dichiara, V. Jofré [et al.] // International Journal of Food Science & Technology. – 2018. – Vol. 53. – № 12. – P. 2697-2705.
49. Cui H. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense / H. Cui, K. Tsuda, J. E. Parker // Annual Review of Plant Biology. – 2015. – Vol. 66. – № 1. – P. 487-511.
50. Cureau N. Year, Location, and Variety Impact on Grape-Associated Mycobiota of Arkansas-Grown Wine Grapes for Wine Production / N. Cureau, R. Threlfall, D. Marasini [et al.] // Microbial Ecology. – 2021. – Vol. 82. – № 4. – P. 845-858.
51. Darriaut R. Microbial dysbiosis in roots and rhizosphere of grapevines experiencing decline is associated with active metabolic functions / R. Darriaut, T. Marzari, V. Lailheugue [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2024. – Vol. 15. – P. 1358213.
52. Deising H. B. Mechanisms and significance of fungicide resistance / H. B. Deising, S. Reimann, S. F. Pascholati // Brazilian Journal of Microbiology. – 2008. – Vol. 39. – P. 286-295.
53. DeLong J. A. Population Genetics and Fungicide Resistance of *Botrytis cinerea* on *Vitis* and *Prunus* spp. in California / J. A. DeLong, S. Saito, C. L. Xiao [et al.] // Phytopathology®. – 2020. – Vol. 110. – № 3. – P. 694-702.
54. Dercks W. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction / W. Dercks, L. L. Creasy // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 1989. – Vol. 34. – № 3. – P. 189-202.

55. Deslandes L. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets / L. Deslandes, S. Rivas // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17. – № 11. – P. 644-655.
56. Deyett E. Endophytic microbial assemblage in grapevine / E. Deyett, P. E. Rolshausen // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2020. – Vol. 96. – № 5. – P. f1aa053.
57. Deyett E. Temporal Dynamics of the Sap Microbiome of Grapevine Under High Pierce's Disease Pressure / E. Deyett, P.E. Rolshausen // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1246.
58. Di Francesco A. A preliminary investigation into *Aureobasidium pullulans* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora infestans* of tomato / A. Di Francesco, F. Milella, M. Mari [et al.] // *Biological Control*. – 2017. – Vol. 114. – P. 144-149.
59. Di Francesco A. Bioactivity of volatile organic compounds by *Aureobasidium* species against gray mold of tomato and table grape / A. Di Francesco, J. Zajc, N. Gunde-Cimerman [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 36. – № 11. – P. 171.
60. Díez-Navajas A. M. Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues / A. M. Díez-Navajas, C. Greif, A. Poutaraud [et al.] // *Micron*. – 2007. – Vol. 38. – № 6. – P. 680-683.
61. Dubrovina A. S. *VaCPK20*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., mediates cold and drought stress tolerance / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev, V. S. Khristenko [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 185. – P. 1-12.
62. Dubrovina A. S. Regulation of stilbene biosynthesis in plants / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Planta*. – 2017. – Vol. 246. – № 4. – P. 597-623.
63. Duca D. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions / D. Duca, J. Lorv, C. L. Patten [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2014. – Vol. 106. – № 1. – P. 85-125.
64. Dunlap C. A. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste / C. A. Dunlap, S. W. Kwon, A. P. Rooney [et al.] // *International Journal*

of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2015. – Vol. 65. – № 10. – P. 3487-3492.

65. El-Tarabily K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum* // Australian Journal of Botany. – 2003. – Vol. 51. – № 3. – P. 257-266.

66. Fadiji A. E. Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects / A. E. Fadiji, O. O. Babalola // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – P. 467.

67. Fan Y. Endophytic fungal community in grape is correlated to foliar age and domestication / Y. Fan, L. Gao, P. Chang [et al.] // Annals of Microbiology. – 2020. – Vol. 70. – № 1. – P. 30.

68. Fu J. *trans*-(-)- ϵ -Viniferin Increases Mitochondrial Sirtuin 3 (SIRT3), Activates AMP-activated Protein Kinase (AMPK), and Protects Cells in Models of Huntington Disease / J. Fu, J. Jin, R. H. Cichewicz [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – № 29. – P. 24460-24472.

69. Gabaston J. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. Waste: A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara Viticola* / J. Gabaston, E. Cantos-Villar, B. Biais [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2017. – Vol. 65. – № 13. – P. 2711-2718.

70. Gadoury D. M. Effects of Nighttime Applications of Germicidal Ultraviolet Light Upon Powdery Mildew (*Erysiphe necator*), Downy Mildew (*Plasmopara viticola*), and Sour Rot of Grapevine / D. M. Gadoury, S. Sapkota, L. Cadle-Davidson [et al.] // Plant Disease. – 2023. – Vol. 107. – № 5. – P. 1452-1462.

71. Gessler C. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management / C. Gessler, I. Pertot, M. Perazzolli // Phytopathologia Mediterranea. – 2011. – Vol. 50. – № 1. – P. 3-44.

72. ggpubr: «ggplot2» Based Publication Ready Plots [Электронный ресурс] / A. Kassambara. – URL: <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>. (дата обращения: 20.05.24).

73. Gorordo M.F. Biocontrol Efficacy of the *Vishniacozyma victoriae* in Semi-Commercial Assays for the Control of Postharvest Fungal Diseases of Organic Pears / M. F. Gorordo, M. E. Lucca, M. P. Sangorrín // *Current Microbiology*. – 2022. – Vol. 79. – № 9. – P. 259.
74. Green E. R. Bacterial Secretion Systems: An Overview / E. R. Green, J. Meccas // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 213-239.
75. Grigoreva A. Identification and characterization of andalusicin: N-terminally dimethylated class III lantibiotic from *Bacillus thuringiensis* sv. *andalousiensis* / A. Grigoreva, J. Andreeva, D. Bikmetov [et al.] // *iScience*. – 2021. – Vol. 24. – № 5. – P. 102480.
76. Gu Z. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data / Z. Gu, R. Eils, M. Schlesner // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32. – № 18. – P. 2847-2849.
77. Ha S. K. Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effects of Dealcoholized Wine Powder of Wild Grape (*Vitis coignetiae*) in the Rat Thoracic Aorta / S. K. Ha, H. Y. Park, M. R. Ryu [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-6.
78. Hamaoka K. Diversity of endophytic bacterial microbiota in grapevine shoot xylems varies depending on wine grape-growing region, cultivar, and shoot growth stage / K. Hamaoka, Y. Aoki, S. Takahashi [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 15772.
79. Hamilton C. E. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review / C. E. Hamilton, P. E. Gundel, M. Helander [et al.] // *Fungal Diversity*. – 2012. – Vol. 54. – № 1. – P. 1-10.
80. Hanganu A. Influence of Common and Selected Yeasts on Wine Composition Studied Using H-1-NMR Spectroscopy / A. Hanganu, C. Todasca, N. Chira [et al.] // *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-*. – 2011. – Vol. 62. – P. 689-692.

81. He X. Heritable microbiome variation is correlated with source environment in locally adapted maize varieties / X. He, D. Wang, Y. Jiang [*et al.*] // *Nature Plants*. – 2024. – Vol. 10. – P. 598-617.
82. Hirai H. Glycosylation Regulates Specific Induction of Rice Immune Responses by *Acidovorax avenae* Flagellin* / H. Hirai, R. Takai, M. Iwano [*et al.*] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 29. – P. 25519-25530.
83. Hong C. F. A spectrophotometric approach for determining sporangium and zoospore viability of *Plasmopara viticola* / C. F. Hong, H. Scherm // *Journal of Phytopathology*. – 2020. – Vol. 168. – № 5. – P. 297-302.
84. Hou S. Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants / S. Hou, Z. Liu, H. Shen [*et al.*] // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 646.
85. Huang D. Bacteria associated with *Comamonadaceae* are key arsenite oxidizer associated with *Pteris vittata* root / D. Huang, X. Sun, M. U. Ghani [*et al.*] // *Environmental Pollution*. – 2024. – Vol. 349. – P. 123909.
86. Huerta-Cepas J. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper / J. Huerta-Cepas, K. Forslund, L. P. Coelho [*et al.*] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2017. – Vol. 34. – № 8. – P. 2115-2122.
87. Jung H. Comparative genomic analysis of *Chryseobacterium* species: deep insights into plant-growth-promoting and halotolerant capacities / H. Jung, D. Lee, S. Lee [*et al.*] // *Microbial Genomics*. – 2023. – Vol. 9. – № 10.
88. Kedage V. V. A Study of Antioxidant Properties of Some Varieties of Grapes (*Vitis vinifera* L.) / V. V. Kedage, J. C. Tilak, G. B. Dixit [*et al.*] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2007. – Vol. 47. – № 2. – P. 175-185.
89. Keswani C. Auxins of microbial origin and their use in agriculture / C. Keswani, S. P. Singh, L. Cueto [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104. – № 20. – P. 8549-8565.
90. Kiselev K. V. A Method of DNA Extraction from Plants for Metagenomic Analysis Based on the Example of Grape *Vitis amurensis* Rupr. / K. V. Kiselev, N. N.

Nityagovsky, O. A. Aleynova // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. – Vol. 59. – № 3. – P. 361-367.

91. Kiselev K. V. Perspectives for production and application of resveratrol // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 90. – № 2. – P. 417-425.

92. Kiselev K. V. Salicylic acid induces alterations in the methylation pattern of the *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS10* genes in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures / K. V. Kiselev, A. P. Tyunin, Y. A. Karetin // Plant Cell Reports. – 2015. – Vol. 34. – № 2. – P. 311-320.

93. Kiselev K. V. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. / K. V. Kiselev, O. A. Aleynova, V. P. Grigorchuk [et al.] // Planta. – 2017. – Vol. 245. – № 1. – P. 151-159.

94. Kiselev K.V. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, A. P. Tyunin // Journal of Plant Physiology. – 2015. – Vol. 175. – P. 59-67.

95. Kong X. Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola* / X. Kong, W. Qin, X. Huang [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 28935.

96. Krause A. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72 / A. Krause, A. Ramakumar, D. Bartels [et al.] // Nature Biotechnology. – 2006. – Vol. 24. – № 11. – P. 1384-1390.

97. Ku K. L. Production of Stilbenoids from the Callus of *Arachis hypogaea*: a Novel Source of the Anticancer Compound Piceatannol / K. L. Ku, P. S. Chang, Y. C. Cheng [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – № 10. – P. 3877-3881.

98. Kumar P. Whole genome analysis for plant growth promotion profiling of *Pantoea agglomerans* CPHN2, a non-rhizobial nodule endophyte / P. Kumar, S. Rani, P. Dahiya [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 998821.

99. Kumar S. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [*et al.*] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – № 6. – P. 1547-1549.
100. Lagesen K. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes / K. Lagesen, P. Hallin, E. A. Rødland [*et al.*] // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – № 9. – P. 3100-3108.
101. Lane D. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics: 16S/23S rRNA sequencing // Ed. by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: Wiley, 1991. – P. 115-175.
102. Langcake P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene // *Physiological Plant Pathology*. – 1981. – Vol. 18. – № 2. – P. 213-226.
103. Langcake P. A new class of phytoalexins from grapevines / P. Langcake, R. J. Pryce // *Experientia*. – 1977. – Vol. 33. – № 2. – P. 151–152.
104. Larronde F. Airborne Methyl Jasmonate Induces Stilbene Accumulation in Leaves and Berries of Grapevine Plants / F. Larronde, J. P. Gaudillère, S. Krisa [*et al.*] // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 2003. – Vol. 54. – № 1. – P. 63-66.
105. Lee I. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity / I. Lee, Y. Ouk Kim, S. C. Park [*et al.*] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66. – № 2. – P. 1100-1103.
106. Lee J. H. Resveratrol Oligomers Inhibit Biofilm Formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* / J. H. Lee, Y. G. Kim, S. Y. Ryu [*et al.*] // *Journal of Natural Products*. – 2014. – Vol. 77. – № 1. – P. 168-172.
107. Leska A. Antagonistic Activity of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria against Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens / A. Leska, A. Nowak, J. Szulc [*et al.*] // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11. – № 11. – C. 1367.
108. Lewis K. A. An international database for pesticide risk assessments and management / K. A. Lewis, J. Tzilivakis, D. J. Warner [*et al.*] // *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. – 2016. – Vol. 22. – № 4. – P. 1050-1064.

109. Li Z. The Endophytic Fungus *Albifimbria verrucaria* from Wild Grape as an Antagonist of *Botrytis cinerea* and Other Grape Pathogens / Z. Li, P. Chang, L. Gao [et al.] // *Phytopathology*®. – 2020. – Vol. 110. – № 4. – P. 843-850.
110. Liu L. Review: Research progress in amur grape, *Vitis amurensis* Rupr. / L. Liu, H. Li // *Canadian Journal of Plant Science*. – 2013. – Vol. 93. – № 4. – P. 565-575.
111. Livak K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-408.
112. Lo Presti L. Fungal Effectors and Plant Susceptibility / L. Lo Presti, D. Lanver, G. Schweizer [et al.] // *Annual Review of Plant Biology*. – 2015. – Vol. 66. – № 1. – P. 513-545.
113. Lou D. Scalable RT-LAMP-based SARS-CoV-2 testing for infection surveillance with applications in pandemic preparedness / D. Lou, M. Meurer, S. Ovchinnikova [et al.] // *EMBO reports*. – 2023. – Vol. 24. – № 5. – P. e57162.
114. Love M. I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / M. I. Love, W. Huber, S. Anders // *Genome Biology*. – 2014. – Vol. 15. – № 12. – P. 550.
115. Lucas J. A. The Evolution of Fungicide Resistance / J. A. Lucas, N. J. Hawkins, B. A. Fraaije // *Advances in Applied Microbiology*. – 2015. – Vol. 90. – P. 29-92.
116. Lutz M. C. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear / M. C. Lutz, C. A. Lopes, M. E. Rodriguez [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2013. – Vol. 164. – № 2-3. – P. 166-172.
117. Maeng S. *Hymenobacter jejuensis* sp. nov., a UV radiation-tolerant bacterium isolated from Jeju Island / S. Maeng, M. K. Kim, G. Subramani // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2019. – Vol. 113. – № 4. – P. 553-561.
118. Marasco R. Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality / R. Marasco, E. Rolli, M. Fusi [et al.] // *Microbiome*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 3.

119. Massi F. Fungicide Resistance Evolution and Detection in Plant Pathogens: *Plasmopara viticola* as a Case Study / F. Massi, S. F. F. Torriani, L. Borghi [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 1. – P. 119.
120. McMurdie P. J. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data / P. J. McMurdie, S. Holmes // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. e61217.
121. Ménard A. The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus / A. Ménard, A. Buissonnière, V. Prouzet-Mauléon [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2016. – Vol. 39. – № 2. – P. 77-87.
122. Microbiome in Plant Health and Disease: Role of Endophytes in Plant Health and Abiotic Stress Management / A. M. Eid, S. S. Salim, S. E. D. Hassan [et al.] // Ed. by V. Kumar, R. Prasad, M. Kumar [et al.] – Singapore: Springer, 2019. – P. 119-144.
123. Millardet P. M. A. Treatment of Mildew and Rot // *The Discovery of Bordeaux Mixture: Phytopathological Classics Series* / Ed. by M. A. M. Pierre. – The American Phytopathological Society, 2018. – P. 7-25.
124. Mirsam H. Molecular characterization of indigenous microbes and its potential as a biological control agent of *Fusarium* stem rot disease (*Fusarium verticillioides*) on maize / H. Mirsam, Suriani, M. Aqil [et al.] // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8. – № 12. – P. e11960.
125. Mouafo-Tchinda R. A. Effect of temperature on aggressiveness of *Plasmopara viticola* f. sp. *aestivalis* and *P. viticola* f. sp. *riparia* from eastern Canada / R. A. Mouafo-Tchinda, C. Beaulieu, M. L. Fall [et al.] // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 43. – № 1. – P. 73-87.
126. Mousa W. K. The Diversity of Anti-Microbial Secondary Metabolites Produced by Fungal Endophytes: An Interdisciplinary Perspective / W.K. Mousa, M.N. Raizada // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 65.
127. Nagarajkumar M. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia*

solani, the rice sheath blight pathogen / M. Nagarajkumar, R. Bhaskaran, R. Velazhahan // Microbiological Research. – 2004. – Vol. 159. – № 1. – P. 73-81.

128. Nanetti E. Composition and biodiversity of soil and root-associated microbiome in *Vitis vinifera* cultivar Lambrusco distinguish the microbial terroir of the Lambrusco DOC protected designation of origin area on a local scale / E. Nanetti, G. Palladino, D. Scicchitano [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1108036.

129. Narayanan Z. Secondary Metabolites Produced by Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes / Z. Narayanan, B. R. Glick // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – № 10. – P. 2008.

130. Negrel L. Identification of Lipid Markers of *Plasmopara viticola* Infection in Grapevine Using a Non-targeted Metabolomic Approach / L. Negrel, D. Halter, S. Wiedemann-Merdinoglu [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 360.

131. Newman M. A. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants / M. A. Newman, T. Sundelin, J. T. Nielsen [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2013. – Vol. 4. – P. 139.

132. Nian L. *Vishniacozyma victoriae*: An endophytic antagonist yeast of kiwifruit with biocontrol effect to *Botrytis cinerea* / L. Nian, Y. Xie, H. Zhang [et al.] // Food Chemistry. – 2023. – Vol. 411. – P. 135442.

133. Nigris S. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera / S. Nigris, E. Baldan, A. Tondello [et al.] // BMC Microbiology. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 133.

134. Nilsson R. H. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications / R. H. Nilsson, K. H. Larsson, A. F. S. Taylor [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2019. – Vol. 47. – № D1. – P. D259-D264.

135. 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.

136. Ogneva Z. V. Age-associated alterations in DNA methylation and expression of methyltransferase and demethylase genes in *Arabidopsis thaliana* / Z. V. Ogneva, A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Biologia Plantarum*. – 2016. – Vol. 60. – № 4. – P. 628-634.
137. Oshima Y. Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae) / Y. Oshima, K. Namao, A. Kamijou [et al.] // *Experientia*. – 1995. – Vol. 51. – № 1. – P. 63-66.
138. Pacifico D. The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers / D. Pacifico, A. Squartini, D. Crucitti [et al.] // *Front. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1256.
139. Pajčin I. Pepper Bacterial Spot Control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess Solution / I. Pajčin, V. Vlajkov, M. Frohme [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 10. – P. 1463.
140. Pak W. Water extract of *Vitis coignetiae* Pulliat leaves attenuates oxidative stress and inflammation in progressive NASH rats / W. Pak, F. Takayama, A. Hasegawa [et al.] // *Acta Medica Okayama*. – 2012. – Vol. 66. – № 4. – P. 317-327.
141. Pal K. K. Biological Control of Plant Pathogens / K. K. Pal, B. McSpadden Gardener // *Plant Health Instructor*. – 2006.
142. Pedregosa F. Scikit-learn: Machine Learning in Python / F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort [et al.] // *Journal of Machine Learning Research*. – 2011. – Vol. 12. – № 85. – P. 2825-2830.
143. Peláez F. The Discovery of Enfumafungin, a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic Hormonema Species Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms / F. Peláez, A. Cabello, G. Platas [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2000. – Vol. 23. – № 3. – P. 333-343.
144. Petit A. N. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants / A. N. Petit, F. Fontaine, P. Vatsa [et al.] // *Photosynthesis Research*. – 2012. – Vol. 111. – № 3. – P. 315-326.
145. Pezet R. δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves / R. Pezet, C. Perret, J.B. Jean-

Denis [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51. – № 18. – P. 5488-5492.

146. Pezet R. Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection / R. Pezet, V. Pont, P. Cuenat // Journal of Chromatography A. – 1994. – Vol. 663. – № 2. – P. 191-197.

147. Piromyou P. The Type III Secretion System (T3SS) is a Determinant for Rice-Endophyte Colonization by Non-Photosynthetic *Bradyrhizobium* / P. Piromyou, P. Songwattana, T. Greetatorn [et al.] // Microbes and Environments. – 2015. – Vol. 30. – № 4. – P. 291-300.

148. Possamai T. Phenotyping for QTL identification: A case study of resistance to *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in grapevine / T. Possamai, S. Wiedemann-Merdinoglu // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – P. 930954.

149. qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions [Электронный ресурс] / J. Bisanz – URL: <https://github.com/jbisanz/qiime2R> (дата обращения: 20.05.24).

150. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing / R Core Team. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021.

151. Răut I. *Cladosporium* sp. Isolate as Fungal Plant Growth Promoting Agent / I. Răut, M. Călin, L. Capră [et al.] // Agronomy. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 392.

152. Reinhold-Hurek B. Living inside plants: bacterial endophytes: Biotic interactions / B. Reinhold-Hurek, T. Hurek // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – Vol. 14. – № 4. – P. 435-443.

153. Riesco R. Defining the Species *Micromonospora saelicesensis* and *Micromonospora noduli* Under the Framework of Genomics / R. Riesco, L. Carro, B. Román-Ponce [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1360.

154. Robideau G. P. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer / G. P. Robideau, A. W. a. M. De Cock, M. D. Coffey [et al.] // Molecular Ecology Resources. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 1002-1011.

155. Robinson S. M. β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant–oomycete interactions: past and present / S. M. Robinson, R. M. Bostock // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 5. – P 797.

156. Romero-Tabarez M. 7- O -Malonyl Macrolactin A, a New Macrolactin Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Resistant *Enterococci*, and a Small-Colony Variant of *Burkholderia cepacia* / M. Romero-Tabarez, R. Jansen, M. Sylla [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – № 5. – P. 1701-1709.

157. Rudrapal M. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action / M. Rudrapal, S. J. Khairnar, J. Khan [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 806470.

158. Rupprich N. Substrate specificity *in vivo* and *in vitro* in the formation of stilbenes. Biosynthesis of rhaponticin / N. Rupprich, H. Hildebrand, H. Kindl // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1980. – Vol. 200. – № 1. – P. 72–78.

159. Salomon M. V. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in *in vitro* cultured grapevine / M. V. Salomon, R. Bottini, G.A. de Souza Filho [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2014. – Vol. 151. – № 4. – P. 359-374.

160. Santos R. F. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to QoI and CAA fungicides in Brazil / R. F. Santos, B. A. Fraaije, L. da R. Garrido [et al.] // *Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 69. – № 9. – P. 1708-1720.

161. Santoyo G. Plant growth-promoting bacterial endophytes / G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda [et al.] // *Microbiological Research*. – 2016. – Vol. 183. – P. 92-99.

162. Schmalenberger A. The role of *Variovorax* and other *Comamonadaceae* in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes / A. Schmalenberger, S. Hodge, A. Bryant [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 10. – № 6. – P. 1486-1500.

163. Shcherbakov A. Bacterial endophytes of grapevine (*Vitis vinifera* L.) as promising tools in viticulture: isolation, characterization and detection in inoculated plants. / A. Shcherbakov, S. Mulina, P.Y. Rots [et al.] // *Agronomy Research*. – 2016. – Vol. 14. – № 5. – P. 1702–1712.
164. Shumakova O. A. Resveratrol Content and Expression of Phenylalanine Ammonia-lyase and Stilbene Synthase Genes in Cell Cultures of *Vitis amurensis* Treated with Coumaric Acid / O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin, K. V. Kiselev // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 165. – № 5–6. – P. 1427–1436.
165. Si Ammour M. A Real-Time PCR Assay for the Quantification of *Plasmopara viticola* Oospores in Grapevine Leaves / M. Si Ammour, F. Bove, S.L. Toffolatti [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1202.
166. Siguier P. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences / P. Siguier, J. Perochon, L. Lestrade [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – № suppl_1. – P. D32–36.
167. Simão F. A. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs / F. A. Simão, R. M. Waterhouse, P. Ioannidis [et al.] // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31. – № 19. – P. 3210–3212.
168. Singh S. Metapangenomics of wild and cultivated banana microbiome reveals a plethora of host-associated protective functions / S. Singh, S. A. Aghdam, R. M. Lahowetz [et al.] // *Environmental Microbiome*. – 2023. – Vol. 18. – № 1. – P. 36.
169. Straub D. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants / D. Straub, M. Rothballer, A. Hartmann [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 168.
170. Sun J. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes / J. Sun, F. Lu, Y. Luo [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51. – № W1. – P. W397–W403.
171. Sundin C. Exploring resveratrol dimers as virulence blocking agents – Attenuation of type III secretion in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas*

aeruginosa / C. Sundin, C. E. Zetterström, D. D. Vo [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1.

172. Suprun A. R. Effect of spruce *PjSTS1a*, *PjSTS2*, or *PjSTS3* gene overexpression on stilbene biosynthesis in callus cultures of *Vitis amurensis* Rupr / A. R. Suprun, Z. V. Ogneva, A. S. Dubrovina [et al.] // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2019. – Vol. 67. – № 2. – P. 234-239.

173. Suzuki S. Indole-3-Acetic Acid Production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and Its Association with Suppression of Creeping Bentgrass Brown Patch / S. Suzuki, Y. He, H. Oyaizu // Current Microbiology. – 2003. – Vol. 47. – № 2. – P. 138-143.

174. Taillis D. Antifungal Activities of a Grapevine Byproduct Extract Enriched in Complex Stilbenes and Stilbenes Metabolization by *Botrytis cinerea* / D. Taillis, O. Becissa, A. Pébarthé-Courrouilh [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2023. – Vol. 71. – № 11. – P. 4488-4497.

175. Tattar T.A. Diseases of Shade Trees: Soil Stress // Ed. by T. A. Tattar. – San Diego: Academic Press, 1989. – P. 250-263.

176. The Grape Genome: Grapes in the World Economy / J. M. Alston, O. Sambucci // Ed. by D. Cantu, M. A. Walker. – Cham: Springer International Publishing, 2019. – 24 p.

177. Theocharis A. *Burkholderia phytofirmans* PsJN Primes *Vitis vinifera* L. and Confers a Better Tolerance to Low Nonfreezing Temperatures / A. Theocharis, S. Bordiec, O. Fernandez [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions®. – 2012. – Vol. 25. – № 2. – P. 241-249.

178. Tidke S. A. Current Understanding of Endophytes: Their Relevance, Importance, and Industrial Potentials / S. A. Tidke, R. K. Kumar, D. Ramakrishna [et al.] // IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 3. – № 3. – P. 43-59.

179. Toffolatti S. L. Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores / S. L. Toffolatti, L. Serrati, H. Sierotzki [et al.] // Pest Management Science. – 2007. – Vol. 63. – № 2. – P. 194-201.

180. Toral L. Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea* / L. Toral, M. Rodríguez, V. Béjar [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1315.
181. Torres N. Mycorrhizal symbiosis affects ABA metabolism during berry ripening in *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grown under climate change scenarios / N. Torres, N. Goicoechea, A.M. Zamarreño [et al.] // *Plant Science*. – 2018. – Vol. 274. – P. 383-393.
182. Trdá L. The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria / L. Trdá, O. Fernandez, F. Boutrot [et al.] // *New Phytologist*. – 2014. – Vol. 201. – № 4. – P. 1371-1384.
183. Trotel-Aziz P. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea* / P. Trotel-Aziz, M. Couderchet, S. Biagianti [et al.] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2008. – Vol. 64. – № 1. – P. 21-32.
184. Tudi M. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment / M. Tudi, H. Daniel Ruan, L. Wang [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18. – № 3. – P. 1112.
185. Tyunin A. P. The comparative analysis of stilbene production in cell cultures of two East Asian grape species *Vitis amurensis* Rupr. and *Vitis coignetiae* Pulliat / A. P. Tyunin, N. N. Nityagovsky, Y. A. Karetin [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2020. – Vol. 142. – № 1. – P. 121-129.
186. Tyunin A. P. The effect of explant origin and collection season on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / A. P. Tyunin, A. R. Suprun, N. N. Nityagovsky [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2018. – Vol. 136. – № 1. – P. 189-196.
187. Valsesia G. Development of a High-Throughput Method for Quantification of *Plasmopara viticola* DNA in Grapevine Leaves by Means of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction / G. Valsesia, D. Gobbin, A. Patocchi [et al.] // *Phytopathology*®. – 2005. – Vol. 95. – № 6. – P. 672-678.

188. Vandana U. K. Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion / U. K. Vandana, J. Rajkumari, L. P. Singha [*et al.*] // *Biology*. – 2021. – Vol. 10. – № 2. – P. 101.
189. Vegan: Community Ecology Package [Электронный ресурс] / J. Oksanen, F.G. Blanchet, M. Friendly [*et al.*] – URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>. (дата обращения: 20.05.24).
190. Vercesi A. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola* / A. Vercesi, S. L. Toffolatti, G. Zocchi [*et al.*] // *European Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 128. – № 1. – P. 113-126.
191. Vercesi A. Estimating germinability of *Plasmopara viticola* oospores by means of neural networks / A. Vercesi, C. Sirtori, A. Vavassori [*et al.*] // *Medical and Biological Engineering and Computing*. – 2000. – Vol. 38. – № 1. – P. 109-112.
192. Verginer M. Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms / M. Verginer, E. Leitner, G. Berg // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58. – № 14. – P. 8344-8350.
193. Vion C. New malic acid producer strains of *Saccharomyces cerevisiae* for preserving wine acidity during alcoholic fermentation / C. Vion, M. Muro, M. Bernard [*et al.*] // *Food Microbiology*. – 2023. – Vol. 112. – P. 104209.
194. Wang C. W. *Fusarium avenaceum*: A New Pathogen Causing Amur Grape (*Vitis amurensis*) Fruit Rot in Jilin Province, China / C. W. Wang, J. Ai, Y. X. Liu [*et al.*] // *Plant Disease*. – 2015. – Vol. 99. – № 6. – P. 889-889.
195. Wang G. Contributions of Beneficial Microorganisms in Soil Remediation and Quality Improvement of Medicinal Plants / G. Wang, Y. Ren, X. Bai [*et al.*] // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – № 23. – P. 3200.
196. Weidner S. Differences in the Phenolic Composition and Antioxidant Properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* Seeds Extracts / S. Weidner, A. Rybarczyk, M. Karamać [*et al.*] // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – № 3. – P. 3410-3426.
197. White T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White, T. Bruns, S. Lee [*et al.*] // *PCR protocols: a guide to methods and applications*. – 1990. – Vol. 18. – № 1. – P. 315-322.

198. Wick R. R. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R. R. Wick, L. M. Judd, C. L. Gorrie [et al.] // PLOS Computational Biology. – 2017. – Vol. 13. – № 6. – P. e1005595.
199. Wickham H. Welcome to the Tidyverse / H. Wickham, M. Averick, J. Bryan [et al.] // Journal of Open Source Software. – 2019. – Vol. 4. – № 43. – P. 1686.
200. Wilcox W. F. Compendium of grape diseases, disorders, and pests / W. F. Wilcox, W. D. Gubler, J. K. Uyemoto // APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul, MN, USA. – 2015.
201. Woo S. M. Structural Identification of Siderophore AH18 from *Bacillus subtilis* AH18, a Biocontrol agent of *Phytophthora* Blight Disease in Red-pepper / S. M. Woo, S. D. Kim // Microbiology and Biotechnology Letters. – 2008. – Vol. 36. – № 4. – P. 326-335.
202. Wu J. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology / J. Wu, Y. Zhang, H. Zhang [et al.] // BMC Plant Biology. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 234.
203. Wu W. The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development / W. Wu, K. Du, X. Kang [et al.] // Horticulture Research. – 2021. – Vol. 8. – № 1. – P. 118.
204. Xi H. F. Differential response of the biosynthesis of resveratrols and flavonoids to UV-C irradiation in grape leaves / H. F. Xi, L. Ma, L. N. Wang [et al.] // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. – 2015. – Vol. 43. – № 3. – P. 163-172.
205. Xiong H. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* JK6 and identification of its lipopeptides surfactin for suppressing tomato bacterial wilt / H. Xiong, Y. Li, Y. Cai [et al.] // RSC Advances. – 2015. – Vol. 5. – № 100. – P. 82042-82049.
206. Xu A. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon / A. Xu, J. C. Zhan, W. D. Huang // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2015. – Vol. 122. – № 1. – P. 197-211.
207. Yadav M. K. Ruthenium Chloride—Induced Oxidative Cyclization of *trans*-Resveratrol to (±)- ϵ -Viniferin and Antimicrobial and Antibiofilm Activity Against

Streptococcus pneumoniae / M.K. Yadav, K. Mailar, J. Nagarajappa Masagalli [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – P. 890.

208. Yalage Don S. M. *Aureobasidium pullulans* volatilome identified by a novel, quantitative approach employing SPME-GC-MS, suppressed *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata in vitro* / S. M. Yalage Don, L. M. Schmidtke, J. M. Gambetta [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 4498.

209. Yang L. Use of a real-time PCR method to quantify the primary infection of *Plasmopara viticola* in commercial vineyards / L. Yang, B. Chu, J. Deng [et al.] // Phytopathology Research. – 2023. – Vol. 5. – № 1.

210. Yang M. H. Investigation of Microbial Elicitation of *trans*-Resveratrol and *trans*-Piceatannol in Peanut Callus Led to the Application of Chitin as a Potential Elicitor / M. H. Yang, C. H. Kuo, W. C. Hsieh [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – Vol. 58. – № 17. – P. 9537-9541.

211. Yano A. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans* / A. Yano, S. Kikuchi, T. Takahashi [et al.] // Archives of Oral Biology. – 2012. – Vol. 57. – № 6. – P. 711-719.

212. Ye J. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2012. – Vol. 13. – № 1. – P. 134.

213. Yim N. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens / N. Yim, D. T. Ha, T. N. Trung [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 20. – № 3. – P. 1165-1168.

214. Yu Y. Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes / Y. Yu, Y. Gui, Z. Li [et al.] // Plants. – 2022. – Vol. 11. – № 3. – P. 386.

215. Zaid D. S. Comparative Genome Analysis Reveals Phylogenetic Identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and Genomic Insights into Its Plant Growth Promotion and Biocontrol Effects / D. S. Zaid, S. Cai, C. Hu [et al.] // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. e0216921.

216. Zeng T. A lysin motif effector subverts chitin-triggered immunity to facilitate arbuscular mycorrhizal symbiosis / T. Zeng, L. Rodriguez-Moreno, A. Mansurkhodzhev [et al.] // *New Phytologist*. – 2020. – Vol. 225. – № 1. – P. 448-460.
217. Zerriouh H. The Iturin-like Lipopeptides Are Essential Components in the Biological Control Arsenal of *Bacillus subtilis* Against Bacterial Diseases of Cucurbits / H. Zerriouh, D. Romero, L. García-Gutiérrez [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. – 2011. – Vol. 24. – № 12. – P. 1540-1552.
218. Zghonda N. ϵ -Viniferin Is More Effective Than Its Monomer Resveratrol in Improving the Functions of Vascular Endothelial Cells and the Heart / N. Zghonda, S. Yoshida, S. Ezaki [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 76. – № 5. – P. 954-960.
219. Zhang C. Potentials, Utilization, and Bioengineering of Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* for Sustainable Agriculture / C. Zhang, M. Y. Wang, N. Khan [et al.] // *Sustainability*. – 2021. – Vol. 13. – № 7. – P. 3941.
220. Zhang X. *Hymenobacter endophyticus* sp. nov., isolated from wheat leaf tissue / X. Zhang, X. M. Duan, J. Cheng [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2023. – Vol. 73. – № 12. – P. 006197.
221. Zhao H. Protective effect of *trans*- δ -viniferin against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells through the SIRT1 pathway / H. Zhao, T. Ma, B. Fan [et al.] // *Free Radical Research*. – 2016. – Vol. 50. – № 1. – P. 68-83.
222. Zhao Y. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum* / Y. Zhao, J. N. Selvaraj, F. Xing [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 3. – P. e92486.
223. Zhu L. Succession of Fungal Communities at Different Developmental Stages of Cabernet Sauvignon Grapes From an Organic Vineyard in Xinjiang / L. Zhu, T. Li, X. Xu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 718261.