На правах рукописи



АНАНЬЕВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

АССОЦИИРОВАННЫЕ С *VITIS AMURENSIS* RUPR. МИКРООРГАНИЗМЫ, КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2026

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Алейнова Ольга Артуровна

Официальные оппоненты: **Максимов Игорь Владимирович**
доктор биологических наук, профессор «Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр» РАН, главный научный сотрудник лаборатории биохимии иммунитета растений, заведующий лабораторией

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

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

Защита состоится «27» октября 2026 г. в « 10-00 » часов на заседании диссертационного совета 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.
Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

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

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

Автореферат разослан « » 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Использование органических и неорганических удобрений, а также пестицидов в современном сельском хозяйстве сопровождается выраженным негативным воздействием на окружающую среду (Gnanaprakasam, Vanisree, 2022; Rashmi *et al.*, 2020). В условиях устойчивого роста численности населения ожидается, что к 2050 г. потребность в сельскохозяйственной продукции возрастёт на 60-110 %, что приведёт к увеличению объёмов применения агрохимикатов (Molotoks *et al.*, 2018). Поэтому особую актуальность приобретают альтернативные подходы, направленные на повышение продуктивности сельскохозяйственных культур, основанные на использовании полезных микроорганизмов (Kumari *et al*., 2023; Aziz, Masmoudi, 2025; Hamdan, Tan, 2025).

Растения в природных и агроэкологических системах взаимодействуют с разнообразными сообществами микроорганизмов, среди них бактерии, грибы, вирусы, а также ахреи. Хотя ассоциированный микробиом растений включает представителей разных таксономических групп, в данной работе мы сконцентрировались именно на бактериях, поскольку бактерии являются более удобной группой для дальнейшей разработки биопрепаратов и демонстрируют широкий спектр механизмов стимулирования роста растений (Glick, 2012; Tufail *et al*., 2022; Khan *et al*., 2023).

Бактерии, которые вступают в ассоциированные взаимодействия с растением и положительно влияют на его рост и развитие, объединяют в группу бактерий, стимулирующих рост растений (БСРР) (Kumari *et al.*, 2023). Данные микроорганизмы представляют значительный интерес для сельскохозяйственной практики, поскольку способны оказывать как прямое, так и опосредованное положительное влияние на растение (Gunjal, Glick, 2024). Прямые эффекты БСРР реализуются за счёт синтеза или деградации фитогормонов, включая ауксины, цитокинины и этилен, а также за счёт повышения биодоступности элементов минерального питания, в том числе азота, фосфора, калия и серы (Glick, 2012; Orozco-Mosqueda, Santoyo, Glick, 2023; Poria *et al.*, 2022).

Наряду с этим БСРР также обладают рядом косвенных механизмов, обуславливающих их ростостимулирующее действие. Одним из таких механизмов является снижение негативного влияния стрессовых факторов. Показано, что бактерии способны ослаблять последствия абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, засоление почв, токсическое воздействие тяжёлых металлов и окислительный стресс (Ajmal *et al.*, 2022; Safdarian *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2023; Mahreen *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2023; Bouremani *et al.*, 2024). Дополнительно микроорганизмы могут участвовать в ремедиации загрязнённых почв за счёт деградации углеводородов (Tara *et al.*, 2014). Существенное значение имеет и их способность повышать устойчивость растений к биотическим стрессам, это достигается как посредством синтеза фунгицидных и антибактериальных соединений, так и путём индукции системной устойчивости растений (Compant *et al.*, 2005b; Jacob *et al.*, 2020; Munif, Putri, Mutaqin, 2020; Ranjan *et al.*, 2023).

Таким образом, БСРР рассматривается как перспективная альтернатива традиционным агрохимическим подходам, поскольку обеспечивает комплексное воздействие, сочетающее стимуляцию роста и защиту растений.

В настоящее время рынок биопрепаратов, основанных на микроорганизмах, показывает устойчивый рост в Северной Америке, Европе, Азиатско-Тихоокеанском регионе, Латинской Америке, на ближнем Востоке и в Африке (Basu *et al.*, 2021). Параллельно расширяется спектр коммерческих биопрепаратов, создаваемых на основе различных микроорганизмов и их консорциумов, предназначенных для применения на сельскохозяйственных культурах различных групп. Среди них широкое распространение получили препараты на основе азотофиксирующих бактерий, такие как Азотовит («ДельтаБио», Новомосковск, Россия), AZOTER («Azoter», Дьёр, Венгрия), Bio Gold Bio Gold («Bio Power Lanka», Коломбо, Шри-Ланка) и TwinN («Mapleton Agri Biotec»,

Мэплтон, Австралия), а также препараты, содержащие бактерии, обладающие способностью к растворению фосфатов и калия, например Фосфатовит («ДельтаБио», Новомосковск, Россия), CataPult («Bio-Tech Organics», Вирджиния, Австралия), Symbion van Plus («T Stanes and Company LTD», Тамилнад, Индия) и др. (Шайхутдинов и др. 2013; Artyszak, Gozdowski, 2020; Basu *et al.*, 2021; Reed, Glick, 2023).

Особый научный интерес в контексте выделения БСРР представляют дикорастущие растения, поскольку в естественных условиях они подвергаются постоянному воздействию комплекса биотических и абиотических стрессоров. Можно предположить, что микробиом данных растений участвует в устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды, способствуя их адаптации, экологической пластичности и выживанию. В этом отношении *Vitis amurensis* Rupr., дикорастущий амурский виноград, является особенно ценным объектом исследования. Данный вид является аборигенным для Восточной Азии, и отличается исключительной холодоустойчивостью до -40 °C. При этом *V. amurensis* произрастает в экстремальных экологических условиях: на малоплодородных, каменистых почвах склонов и обрывов, где доступность питательных веществ существенно ограничена (Wu *et al.*, 2010). Кроме того, *V. amurensis* характеризуется устойчивостью к ряду опасных заболеваний винограда, включая мучнистую росу, белую гниль и антракноз (Liu, Li, 2013). Совокупность жёстких абиотических и биотических стрессовых факторов, создаёт селективное давление, способствующее формированию уникального состава ассоциированного микробиома винограда *V. amurensis*. Предполагается, что микроорганизмы, стабильно колонизирующие растение в таких условиях, обладают комплексом адаптивных свойств, в частности, способностью к ростостимуляции и биоконтролю, что делает *V. amurensis* перспективным источником микроорганизмов, обладающих значимыми ростостимулирующими свойствами.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день довольно хорошо изучены таксономическая структура и состав бактериального сообщества винограда *V. amurensis* (Aleynova, Nityagovsky, Kiselev, 2021; Aleynova *et al.*, 2022a, 2023a, 2023b), но функциональная характеристика бактериальных изолятов в отношении стимуляции роста растений, остаётся слабо изученной. Выделен и охарактеризован штамм *Bacillus velezensis* AMR25, обладающий антагонистической активностью в отношении *Erwinia billingiae, Alternaria tenuissima, Botrytis cynerea, Fusarium avenacea* (Ananev *et al.*, 2024). Получены данные *in silico* о потенциальных микроорганизмах-антагонистах *V. amurensis*, которые гипотетически способны сдерживать рост широко-распространенного патогена винограда *Plasmopara viticola* (Nityagovsky *et al.*, 2024).

В связи с этим исследование эндофитных бактерий амурского винограда с использованием комплекса современных подходов, включающих молекулярно-генетический анализ, биохимические испытания и тестирования на растениях, являются актуальным и перспективным. Данный подход позволит не только расширить представления о функциях *V. amurensis*, но и выявить потенциальные штаммы пригодные для разработки биопрепаратов сельскохозяйственного назначения.

Цель и задачи исследования

Цель работы – изучить эндофитные бактерии, ассоциированные с *V. amurensis*, и оценить их ростостимулирующий потенциал в качестве основы для разработки сельскохозяйственных биопрепаратов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Отобрать изоляты бактерий *V. amurensis*, проявляющих ростостимулирующий потенциал по признакам повышения биодоступности калия, фосфора, серы, азота и биосинтеза индолил-3-уксустой кислоты (ИУК).

2. Оценить способность выделенных изолятов бактерий *V. amurensis* к колонизации модельного растения *Arabidopsis thaliana* и их влияние на его морфометрические показатели.

3. Изучить влияние инокуляции изолятов бактерий *V. amurensis* на морфометрические показатели сельскохозяйственного растения *Oryza sativa*.

4. Определить генетические детерминанты и биологически активные соединения выбранных бактериальных изолятов *V. amurensis*, обусловливающих ростостимулирующий эффект растений.

Научная новизна

Впервые охарактеризована способность эндофитных бактерий, выделенных из *V. amurensis*, произрастающего на Дальнем Востоке России, к повышению биодоступности элементов питания и синтезу фитогормонов. Впервые из *V. amurensis* были выделены и проанализированы с использованием методов современной генетики и биохимии штаммы *Gordonia aichiensis* P6PL2, *Pseudomonas marginalis* RA62c-B2 и *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5. Впервые установлена способность к синтезу цитокининов у бактерии рода *Gordonia*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты могут лечь в основу разработки биопрепаратов, для стимуляции роста промышленно важных растений, что в целом будет способствовать развитию высокопроизводительного и экологически безопасного сельского и лесного хозяйства. Кроме того, материалы диссертационной работы могут быть использованы при проведении теоретических и практических занятий в вузах на биологических и сельскохозяйственных факультетах.

Методология и методы диссертационного исследования

В процессе исследования использовались как классические, так и инновационные методы биотехнологии, биохимии, микробиологии и молекулярной биологии. Выделение и секвенирование по Сэнгеру культивируемых изолятов бактерий, ассоциированных с *V. amurensis*, были выполнены как описано (Aleynova *et al.*, 2022a). Оценка микробиологической активности изолятов была выполнена с использованием дифференциально-диагностических сред. Оценка стимулирующего действия на рост растений *A. thaliana* и *O. sativa* проводили как описано (Aleynova *et al.*, 2026b; Ananev *et al.*, 2025). Первичную таксономическую идентификацию до рода проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. Высокопроизводительное секвенирование метагенома *A. thaliana* выполняли по технологии Illumina MiSeq. Биоинформатический анализ полученных данных проводили как описано ранее (Aleynova *et al.*, 2022a, 2022b; Nityagovsky *et al.*, 2024). Выделение ДНК и проведение количественного ПЦР РВ проводили согласно методике (Aleynova *et al.*, 2026a). Высокопроизводительное секвенирование геномов *Gordonia aichiensis* P6PL2, *Pseudomonas marginalis* RA62c-B2 и *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5 проводили по технологиям MiSeq Illumina и Oxford Nanopore. Геномный анализ проводился с помощью SPAdes (Prjibelski *et al.*, 2020), Unicycler (Wick *et al.*, 2017). Prokka (Seemann, 2014), RAST (Brettin *et al.*, 2015), mobileOG-db (Brown *et al.*, 2022), tRNAscan-SE (Lagesen *et al.*, 2007), RNAmmer (Chan *et al.*, 2021), OrthoVenn3 (Sun *et al.*, 2023) и PGPT-Pred PlaBase (Patz *et al.*, 2021). Для анализа содержания вторичных метаболитов была проведена ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрией высокого разрешения (Ananev *et al.*, 2025). Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью спаренного критерия Стьюдента, одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки, теста суммы рангов Уилкоксона, теста PERMANOVA, коэффициента корреляции Пирсона и алгоритма DESeq2. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0.05 как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Для анализа с помощью DESeq2 значение скорректированного $p < 0.01$ считалось статистически значимым.

Положения, выносимые на защиту

1. Бактериальное сообщество дикорастущего винограда *V. amurensis* включает бактерии, способные стимулировать рост растений.

2. Отдельные эндофитные бактерии *V. amurensis* способны колонизировать растения других видов и изменять состав их бактериома.

3. Некоторые штаммы выделенные из *V. amurensis*, оказывают ростостимулирующий эффект как на модельное растение *A. thaliana*, так и на сельскохозяйственную культуру *O. sativa*.

4. Ростостимулирующий эффект бактериальных штаммов винограда *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCh-B5 обусловлен молекулярно-генетическими детерминантами, а именно наличием генов биосинтеза фитогормонов – ауксинов и цитокининов, а также генов мобилизации P, K и метаболизма N.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена применением апробированных методик, их взаимодополнением, статистической обработкой данных и воспроизводимостью экспериментов. Все результаты соответствуют записям в рабочих журналах и исследовательским протоколам. Результаты, положения и выводы подкреплены экспериментальными данными, представленными в виде рисунков и таблиц.

Апробация работы

Результаты работы представлены на Всероссийской научной молодёжной 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 и пос. Большое Голоустное; Всероссийской научной школе-конференции молодых учёных и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений», 3–7 октября 2023 г., г. Владивосток; 15-ой Международной школе молодых учёных «Системная биология и биоинформатика», 25–30 ноября 2024 г., г. Новосибирск.

Личный вклад автора

Личный вклад автора охватывает все этапы выполнения диссертационного исследования и включает сбор материала, планирование экспериментов, обработку и анализ данных, обсуждение и интерпретацию результатов, подготовку научных публикаций и представление результатов на конференциях. Рукопись диссертации была написана автором самостоятельно.

Публикации

Материалы диссертации изложены в 10 публикациях, из них 3 в журналах из списка ВАК.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждение результатов), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 144 страницах, иллюстрирована 32 рисунками и содержит 13 таблиц. Список литературы насчитывает 311 иностранных наименований и одно отечественное.

Благодарности

Автор искренне благодарит научного руководителя к.б.н. Алейнову О.А. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор признателен д.б.н. Киселеву К.В. за помощь в подготовке диссертации. Также автор выражает глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку на всех этапах работы. Данная работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012200181-4) и при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (№ 22-74-10001 и 22-74-10001-П).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрена информация о бактериях, стимулирующих рост растений. Особая роль отведена раскрытию современных сведений о механизмах стимуляции роста растений посредством эндофитных бактерий. Изложена экономическая ценность винограда и его эндофитного микробиома, а также уникальные свойства винограда *V. amurensis* как потенциального источника ценных эндофитных бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор растительного материала и выделение изолятов. Образцы визуально здоровых растений *V. amurensis* собирали в пригороде г. Владивосток в летний период 2023 г. с четырех лиан, расположенных на расстоянии более 1 км друг от друга. Образцы поверхностно стерилизовали в 70 % растворе этанола в течение 2 мин, затем в 10 % растворе H_2O_2 в течение 1 мин, после чего пятикратно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные образцы взвешивали по 1,5 г и гомогенизировали в ступке, 100 мкл полученного тканевого сока высеивали на питательные среды R2A («PanReac», AppliChem, Дармштадт, Германия) и на картофельно-декстрозный агар (КДА, «HiMedia», Мумбаи, Махараштра, Индия). Инкубацию проводили при 26 °С в течение 24 ч. Чистые культуры получали путём пересева единичных колоний. Эффективность стерилизации контролировали посевом воды, используемой для промывки на те же среды, отсутствие ростра микроорганизмов подтверждало успешную стерилизацию.

Скрининг изолятов на ростостимулирующие свойства. Всего было выделено 104 бактериальных изолята, которые протестировали на способность к фиксации N с использованием среды Эшби (Ashby, 1907), растворению неорганического P на среде Пиковской (Pikovskaya, 1948), мобилизации K на среде Александровского («HiMedia», Мумбаи, Махараштра, Индия), окислению S на тиосульфатной среде (Behera *et al*., 2014) и синтезу ИУК с использованием реактива Сальковского. Штаммы, сочетающие не менее двух признаков (обязательно включающих продукцию ИУК), идентифицировали до рода по последовательности 16S рРНК. ДНК выделяли ЦТАБ-методом (Doyle *et al.*, 1987; Kiselev, Tyunin, Karetin, 2015). Амплификацию проводили с использованием праймеров 8F/1522R (Lane, 1991). Ампликоны, полученные в ходе ПЦР, очищали и секвенировали на генетическом анализаторе ABI 3130 («Applied Biosystems», Фостер-Сити, Калифорния, США), результаты анализировали с помощью программы BLAST (Camacho *et al.*, 2009). Анализ последовательностей проводили путем множественного выравнивания последовательностей с использованием программы Clustal X (Altschul *et al.*, 1990), при этом в качестве порога для таксономической идентификации использовали идентичность последовательностей ≥99 %

Оценка способности штаммов к колонизации растений. Для оценки способности бактериальных штаммов к колонизации растений использовали модельное растение *A. thaliana* экотип Columbia-0. Бактериальные штаммы выращивали в жидкой питательной среде, осаждали центрифугированием и ресуспендировали до концентрации 1×10^7 кл/мл. По 100 мкл полученной суспензии распределяли по поверхности агаризованной среды ½ MS (Murashige, Skoog, 1962). Затем на чашки высеивали стерильные семена *A. thaliana*. Через 7 дней проростки переносили в почвенный грунт и выращивали ещё 7 дней. ДНК из поверхностно стерилизованных розеток *A. thaliana* выделяли ЦТАБ-спин методом (Kiselev, Nityagovsky, Aleynova, 2023). Метабаркодирование региона 16S рРНК (V3–V4) и ITS1 выполняли на платформе Illumina MiSeq («Illumina», Сан-Диего, Калифорния, США). Биоинформатический анализ проводили с использованием программ QIIME 2 (Bolyen *et al*., 2019) и DADA2 (Callahan *et al*., 2016), таксономическую классификацию выполняли по базам SILVA (Quast *et al*., 2013) для бактерий и UNITE (Nilsson *et al*., 2019) для грибов. Альфа и бета разнообразие оценивали по индексу Шеннона и метрике Брея-Кертиса с использованием пакетов microeco (Liu *et al*., 2021), microViz (Barnett, Arts, Penders, 2021) и

tidyverse (Wickham *et al*., 2019). Подтверждение данных метабаркодирования проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) используя специфичные праймеры.

Оценка влияния штаммов на морфометрические показатели растений. Стерильные семена *A. thaliana* и *O. sativa* (сорт Дубрава) инокулировали суспензией исследуемых штаммов в концентрации 3×10^8 кл/мл в течение 1ч, затем проращивали на среде ½ MS для *A. thaliana* и на влажной фильтровальной бумаге для *O. sativa* в климатической камере. Через 7 и 30 суток измеряли длину корня и побега, сухую массу растений. Измерение числа листьев и диаметра розетки осуществляли только для *A. thaliana*. Условия выращивания: для *A. thaliana* 22 °C, 16/8 ч фотопериод, относительная влажность 65 %, интенсивность света 120 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$; для *O. sativa* 25 °C, 16/8 ч фотопериод, относительная влажность 70 %, интенсивность света 250 ммоль $м^{-2}$ $с^{-1}$.

Секвенирование и анализ полных геномов штаммов. Для трёх наиболее перспективных штаммов *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, *Pantoea* sp. P7SCH-B5 провели полногеномное секвенирование на платформе Illumina MiSeq («Illumina», Сан-Диего, Калифорния, США) для всех штаммов и MinION («Oxford Nanopore Technologies», Oxford Science Park, Оксфорд, Великобритания) для *Gordonia* sp. P6PL2. Сборку полной геномной последовательности выполняли с использованием SPAdes (Prjibelski *et al.*, 2020) для всех выбранных штаммов бактерий, для *Gordonia* sp. P6PL2 дополнительно использовали Unicycler (Wick *et al.*, 2017). Полноту и чистоту геномов оценивали с помощью BUSCO (Simao *et al.*, 2015) и CheckM (Parks *et al.*, 2015). Аннотацию проводили в Prokka (Seemann, 2014), RAST (Brettin *et al.*, 2015), функциональную аннотацию проводили с использованием BlastKOALA (Kanehisa, Sato, Morishima, 2016), PANNZER2 (Törönen, Medlar, Holm, 2018) и eggnog-mapper (Cantalapiedra *et al.*, 2021). Мобильные элементы искали с помощью mobileOG-db (Brown *et al.*, 2022), тРНК и рРНК – с tRNAscan-SE (Lagesen *et al.*, 2007) и RNAmmer (Chan *et al.*, 2021). Поиск генов, ассоциированных со стимуляцией роста растений, выявляли с помощью PGPT-Pred PlaBase (Patz *et al.*, 2021). Филогенетический анализ проводили на основе GBDP/FastME (Lefort, Desper, Gascuel, 2015; Freese *et al.*, 2026) с использованием наборов геномов типовых штаммов из GenBank (Ondov *et al.*, 2016). Таксономическую принадлежность подтверждали по значениям средней нуклеотидной идентичности (Lee *et al.*, 2016) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). Филогенетические деревья визуализировали в iTOL (Letunic, Bork, 2024). Сравнительный анализ белковых кластеров выполняли с OrthoVenn3 (Sun *et al*., 2023).

Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией. Экстракцию ночных культур *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, *Pantoea* sp. P7SCH-B5 проводили, используя в качестве растворителя этилацетат в соотношении по объему 1:2 (где 1 культуры бактерий, 2 растворитель). Экстракты концентрировали на роторном испарителе, сухой остаток ресуспендировали в метаноле и очищали твердофазной экстракцией. Хромато-масс-спектрометрический анализ выполняли на системе ВЭЖХ, сопряженной с масс-спектрометром Q-Exactive HF-X с электроспрейной ионизацией, в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 100–1500. Идентификацию соединений выполняли по MS-спектрам с использованием базы данных MS-DIAL (Tsugawa *et al.*, 2020).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием языка R (R Core Team, 2021). Оценку различий альфа-разнообразия проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), бета-разнообразия – с использованием теста PERMANOVA (999 перестановок) на основе расстояний Брея-Кертиса с помощью пакета Vegan (Oksanen *et al.*, 2020). Для выявления таксонов, дифференциально представленных между группами, применяли алгоритм DESeq2 (Love, Huber, Anders, 2014), при этом уровень значимости принимали при

скорректированном *p*-value < 0,01. Данные ПЦР-РВ обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с нормализацией по генам *Actin* и *Gapdh*. Эффективность праймеров была в диапазоне 95-105 %. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Морфометрические показатели сравнивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки выполненными с использованием R пакета Stats (R Core Team, 2021). Во всех случаях за исключением DESeq2, статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка из не менее чем трёх независимых экспериментов с несколькими техническими проворностями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение и изучение ростостимулирующих свойств эндофитных бактерий *V. amurensis*. Из тканей *V. amurensis* выделено 104 чистых бактериальных изолята. Скрининг на способность к мобилизации калия (K), фосфора (P), серы (S), фиксации азота (N) и синтезу ИУК показал, что 57 изолятов которые составляли 54,8 % от общего числа, имели не менее одного из исследуемых свойств. Наиболее часто встречалась фиксация N, данным свойством обладали 39 изолятов. Следующим свойством была мобилизация P, встречающаяся у 26 изолятов, и мобилизация K и S, которая встречалась у 8 и 6 изолятов соответственно. Способность к синтезу ИУК наблюдалась у 9 изолятов. Наличие комплекса всех исследуемых свойств наблюдалось лишь у 2 изолятов (Рисунок 1).

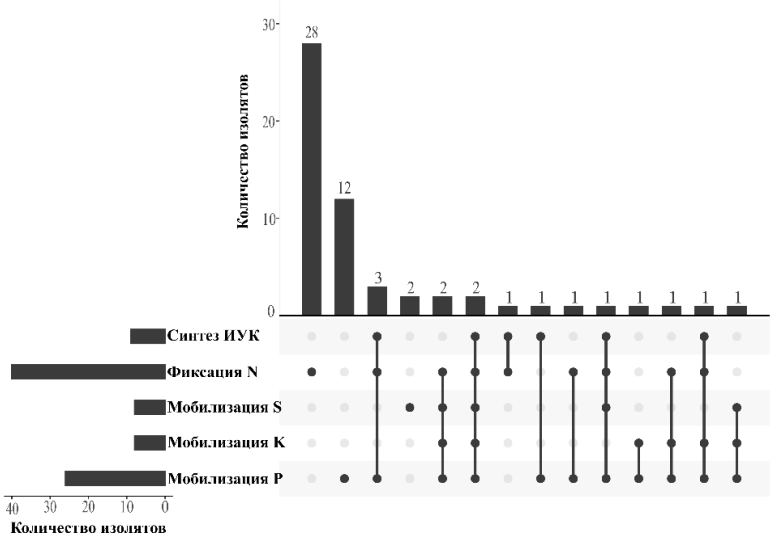


Рисунок 1 – График UpSet распределения числа свойств среди бактериальных изолятов *Vitis amurensis*

Девять изолятов сочетающих не менее двух свойств, обязательно включающих синтез ИУК, были идентифицированы до рода по 16S р РНК и использовались для дальнейших экспериментов (Таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы эндофитных бактерий *Vitis amurensis*.

Штамм	Род	Референс (номер GenBank)	Идентичность (%)	P	K	S	N	ИУК
AMR25	*Bacillus*	MH788975	100	+	-	-	+	+
P6PL2	*Gordonia*	X80633	100	+	-	-	+	+
P7SA-B3	*Curtobacterium*	MZ424740	100	+	+	-	+	+
P7SCH-B5	*Pantoea*	PZ204378	99,75	+	+	+	+	+
R7SCh-B6	*Xanthomonas*	MZ424744	99,13	-	-	-	+	+
R8SCh-B12	*Agrobacterium*	MZ424738	99,17	+	-	+	+	+
R8SCh-B3	*Erwinia*	MZ424741	100	+	-	-	+	+
RA62c-B2	*Pseudomonas*	MZ424743	99,98	+	+	+	+	+
RA62c-B5	*Sphingomonas*	PX909750	99	+	-	-	-	+

Оценка способности штаммов эндофитных бактерий *V. amurensis* к колонизации растений и влиянию на естественный микробиом. Способность к колонизации на модельном растении *A. thaliana* оценивали при помощи метабаркодирования 16S рРНК и ITS1. Инокуляция бактериальными штаммами приводила к увеличению числа вариантов ампликонных последовательностей (ASV) R8SCh-B12 (*Agrobacterium* sp.) – в 1.629 раз, P7SA-B3 (*Curtobacterium* sp.) – в 17.820 раз, P6PL2 (*Gordonia* sp.) – в 240 раз, RA62c-B2 (*Pseudomonas* sp.) – в 73 раза, RA62c-B5 (*Sphingomonas* sp.) – в 13.120 раз, R7SCh-B6 (*Xanthomonas* sp.) – в 392 раза, AMR25 (*Bacillus* sp.) – в 164 раза (Рисунок 2а). Инокуляция P7SCH-B5 (*Pantoea* sp.) и R8SCh-B3 (*Erwinia* sp.) не приводила к изменению числа ASV в исследуемых образцах (Рисунок 2а). Результаты ПЦР-РВ подтвердили, что инокуляция исследуемыми бактериальными штаммами увеличивала содержание ампликонов 16S соответствующих родов, за исключением *Sphingomonas* sp. P7SCH-B5 и *Erwinia* sp. R8SCh-B3 (Рисунок 2б).

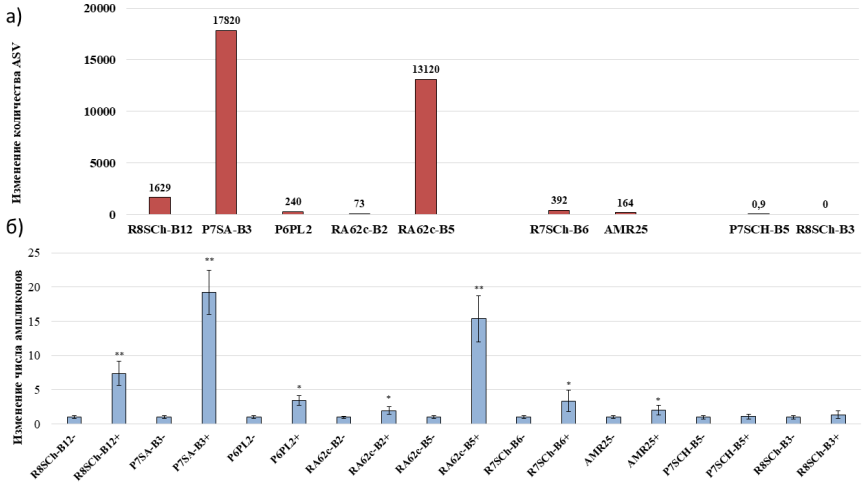


Рисунок 2 – Изменение количества ASV (а) и числа ампликонов ПЦР-РВ (б) бактериальных штаммов в 2-недельных растениях *Arabidopsis thaliana* после инокуляции отдельными бактериальными штаммами: R8SCh-B12 – *Agrobacterium* sp., P7SA-B3 – *Curtobacterium* sp., P6PL2 – *Gordonia* sp., RA62c-B2 – *Pseudomonas* sp., RA62c-B5 *Sphingomonas* sp., R7SCh-B6 – *Xanthomonas* sp., AMR25 – *Bacillus* sp., P7SCH-B5 – *Pantoea* sp., R8SCh-B3 *Erwinia* sp. «-» – код штамма при отсутствии инокуляции (контроль); «+» – код штамма у обработанных бактериальными штаммами растений.

Инокуляция штаммами *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3 и *Gordonia* sp. P6PL2 приводила к достоверному снижению альфа-разнообразия бактериального сообщества по сравнению с контролем. Остальные штаммы не вызывали значительных изменений этого показателя. Анализ главных координат (PCoA) на основе метрики Брея-Кертиса выявил четкую кластеризацию бактериальных сообществ в зависимости от обработки (PERMANOVA, $R^2 = 0{,}73$, $p < 0{,}001$), при этом образцы, обработанные *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3 и *Gordonia* sp. P6PL2, наиболее сильно отличались от контроля. На уровне родов отмечено снижение числа ASV, относящихся к семейству *Rhodobacteraceae* и родам *Nocardioides*, *Solimonas* и *Microbacterium*, после инокуляции большинством штаммов, за исключением *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12. В микобиоме *A. thaliana* инокуляция бактериальными штаммами не оказывала существенного влияния на альфа-разнообразие. Однако структура бета-разнообразия грибных сообществ значимо изменялась в зависимости от обработки (PCoA, PERMANOVA, $R^2 = 0{,}62$, $p < 0{,}01$). При рассмотрении состава на уровне родов, инокуляция всеми исследуемыми штаммами *V. amurensis* снижала количество ASV родов *Penicillium* и *Naganishia* и увеличивала относительную представленность рода *Fusarium*. Исключением было воздействие RA62c-B5, при котором изменений в количестве ASV родов *Penicillium* и *Fusarium* не наблюдалось.

Морфометрические показатели модельного растений *A. thaliana* и *O. sativa* после инокуляции эндофитными штаммами *V. amurensis*. При инокуляции семян *A. thaliana* штаммами эндофитных бактерий длина гипокотиля 7-дневных проростков была меньше в 1,1-2,9 раза (Рисунок 3а), длина корня в 8-9 раз (Рисунок 3б) по сравнению с контролем.

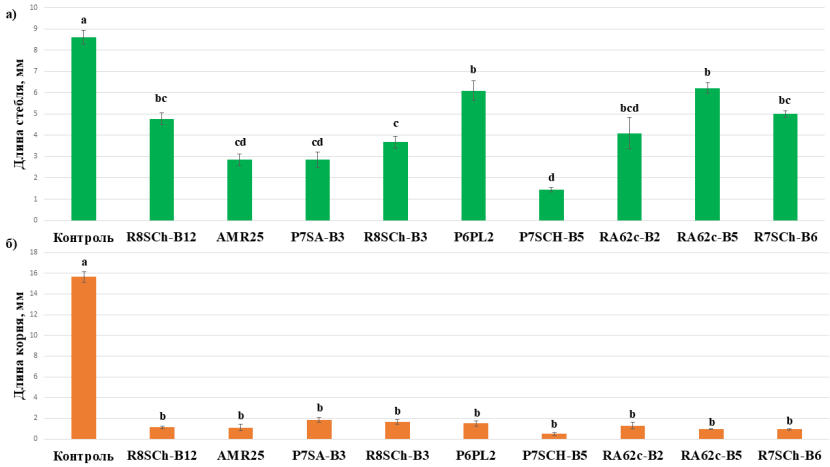


Рисунок 3 – Длина стебля (а) и корня (б) 7-дневных растений *Arabidopsis thaliana*, после обработки эндофитными бактериями. Контроль – не инокулированные растения *A .thaliana*. R8SCh-B12 – *Agrobacterium* sp.; P7SA-B3 – *Curtobacterium* sp.; P6PL2 – *Gordonia* sp.; RA62c-B2 – *Pseudomonas* sp.; RA62c-B5 – *Sphingomonas* sp.; R7SCh-B6 – *Xanthomonas* sp.; AMR25 – *Bacillus* sp; P7SCH-B5 – *Pantoea* sp.; R8SCh-B3 – *Erwinia* sp. Данные представлены как среднее значение ± средняя ошибка эксперимента из 10 независимых экспериментов с двадцатью техническими повторениями. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались в соответствии с ANOVA с последующим тестированием Тьюки. Принятый уровень значимости составил $p < 0{,}05$.

К 30-м суткам после пересадки с почвенный грунт у растений *A. thaliana*, инокулированных *Gordonia* sp. P6PL2 и *Sphingomonas* sp. RA62c-B5, диаметр розетки превышал контроль в 1,2-1,4 раза (Рисунок 4а), а масса свежих розеток в 1,5-1,8 раза (Рисунок 4в). Количество листьев у всех обработанных растений было ниже контроля (Рисунок 4б).

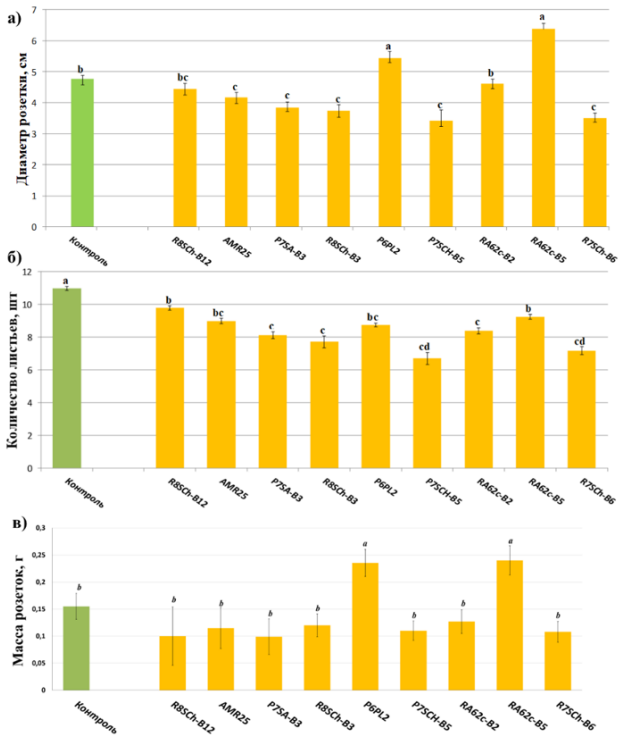


Рисунок 4 – Диаметр розеток (а), количество листьев (б) и масса розеток (в) 1-месячных растений *Arabidopsis thaliana*, растущих в горшках с почвой, после обработки эндофитными бактериями. Контроль – не инокулированные растения *A. thaliana*. R8SCh-B12 – *Agrobacterium* sp.; P7SA-B3 – *Curtobacterium* sp.; P6PL2 – *Gordonia* sp.; RA62c-B2 – *Pseudomonas* sp.; RA62c-B5 – *Sphingomonas* sp.; R7SCh-B6 – *Xanthomonas* sp.; AMR25 – *Bacillus* sp; P7SCH-B5 – *Pantoea* sp.; R8SCh-B3 – *Erwinia* sp. Данные представлены как среднее значение ± средняя ошибка.

Наиболее перспективные штаммы, отобранные по результатам скрининга и оценки влияния на рост *A. thaliana* (*Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 и *Pantoea* sp. P7SCH-B5), были протестированы на сельскохозяйственной культуре *O. sativa*. Инокуляция семян суспензией бактерий с последующим проращиванием на фильтровальной бумаге, показала, что к 7-м суткам длина корня достоверно увеличивалась при инокуляции *Gordonia* sp. P6PL2 на 12,9 % и *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 на 10 % (Рисунок 5а), а сухая масса проростков на 10,5 % и 17,4 % (Рисунок 5в) соответственно. При этом штаммы *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 и *Pantoea* sp. P7SCH-B5 вызывали снижение длины колеоптиля на 11,5-11,7 % (Рисунок 5б).

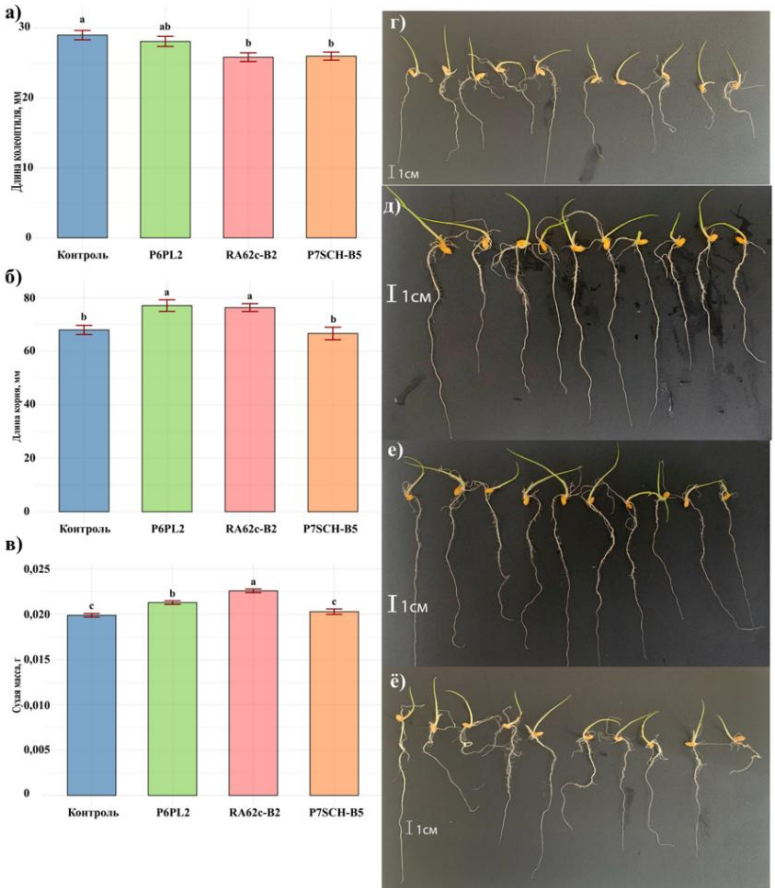


Рисунок 5 – Длина колеоптиля (а), длина корня (б) и сухая масса 7-дневных проростков риса *Oryza sativa* сорт Дубрава (в), внешний вид растений риса, замоченных стерильной водой – контроль (г), растения риса, инокулированные бактериальным штаммом *Gordonia* sp. P6PL2 (д), *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 (е), *Pantoea* sp. P7SCH-B5 (ё). Данные представлены как среднее значение ± средняя ошибка экспериментов из трех независимых экспериментов с сорока техническими повторениями. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались в соответствии с ANOVA с последующим тестированием Тьюки. Принятый уровень значимости составил $p < 0,05$.

К 30-м суткам длина стебля возрастала при инокуляции *Gordonia* sp. P6PL2 на 7,5 %, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 на 24,5 % и *Pantoea* sp. P7SCH-B5 на 25,5 % (Рисунок 6а). Длина корня увеличилась на 20,8 % и 24,1 % при воздействии *Gordonia* sp. P6PL2 и *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 соответственно (Рисунок 6б). Сухая масса стебля увеличивалась на 37 %, 63,8 % и 50,4% при воздействии *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 и *Pantoea* sp. P7SCH-B5 соответственно (Рисунок 6в). Таким образом, все три исследованных штамма проявили выраженную ростостимулирующую активность на рисе, где наиболее высокий эффект показал штамм *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, увеличивающий сухую массу корней на 63,8 % и сухую массу стеблей на 44,2 % (Рисунок 6в,г).

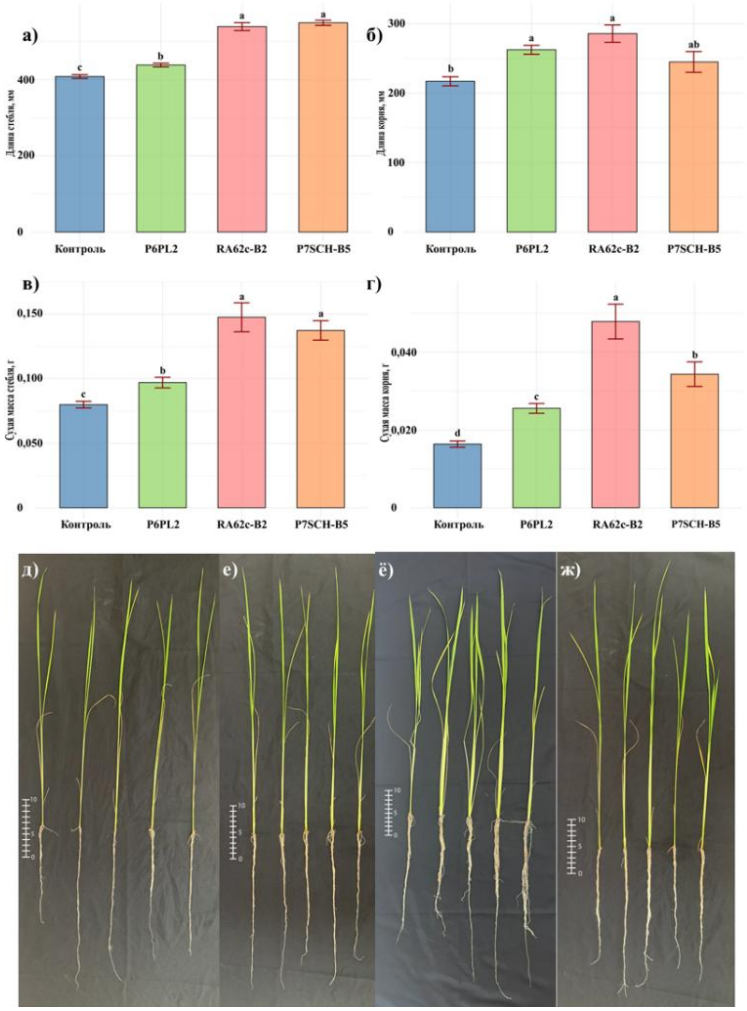


Рисунок 6 – Длина колеоптиля (а), длина корня (б) и сухая масса стебля и корня 30-дневных проростков риса *Oryza sativa* сорт Дубрава (в, г), внешний вид растений риса, замоченных стерильной водой – контроль (д), растения риса, инокулированные бактериальным штаммом *Gordonia* sp. P6PL2 (е), *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 (ё), *Pantoea* sp. P7SCH-B5 (ж). Данные представлены как среднее значение ± средняя ошибка экспериментов из трех независимых экспериментов с сорока техническими повторениями. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались в соответствии с ANOVA с последующим тестированием Тьюки. Принятый уровень значимости составил $p < 0,05$.

Характеристики геномов изолятов эндофитных бактерий *V. amurensis*. Для наиболее перспективных штаммов было произведено полногеномное секвенирование. Установлено, что геном *Gordonia* sp. P6PL2 имеет длину 5,4 млн п.н. с ГЦ-составом 65,1 %, собран в 8 скаффолдов, 5.279 белок-кодирующих генов, 79 тРНК и 6 рРНК. *Pseudomonas sp.* RA62c-B2 обладает наиболее крупным геномом 6,6 млн п.н. с ГЦ 60,6 %, собран в 81 скаффолд. *Pantoea sp.* P7SCH-B5 имеет геном 5,0 млн п.н. с самым низким ГЦ 55,1 % и числом скаффолдов 166. Все три генома характеризуются высокой полнотой (≥ 99,76 %) и низким уровнем контаминации (≤ 0,91 %) (Таблица 2).

Таблица 2 – Основные характеристики полных геномов исследованных штаммов.

Параметр	***Gordonia* sp. P6PL2**	***Pseudomonas* sp. RA62c-B2**	***Pantoea sp.* P7SCH-B5**
Размер генома (п.н.)	5.435.824	6.612.367	5.011.104
Содержание Г+Ц (мол.%)	65,1	60,6	55,1
Количество скафолдов	8	81	166
Количество белок кодирующих генов	5.279	6.545	4.989
тРНК	79	61	75
рРНК	6	9	10
Полнота (BUSCO), %	99,76	100	100
Контаминация (CheckM), %	0,91	0,43	0,36

Филогенетический анализ показал, что штамм *Gordonia* sp. P6PL2 имеет наибольшее сходство с *Gordonia aichiensis* NBRC 108223 (ANI 98,93 %, dDDH 94,1 %), что превышает пороговые значения для видовой идентификации (> 95 % и > 70 % соответственно), на основании этого штамм был идентифицирован как *Gordonia aichiensis*. Штамм *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 показал наибольшее сходство с *Pseudomonas marginalis* ICMP 3553 (ANI 98,3 %, dDDH 85,4 %) и отнесён к виду *Pseudomonas marginalis*. Штамм *Pantoea* sp. P7SCH-B5 идентифицирован как *Pantoea agglomerans* на основании сходства с *P. agglomerans* NBRC 102470 (ANI 98,65 %, dDDH 88,6 %).

Генетические детерминанты ростостимулирующего действия. Геном штамма *G. aichiensis* P6PL2 содержит гены биосинтеза ИУК по IAAld-пути (*trpABCDES, aldAB*) и цитокининов (*ipt*, *BacCYPs*, *miaB*, *hflX*, *yvdD* и *dapF*). Помимо этого, обнаружены гены мобилизации P (*phoAHPSTU*, *ppa*, *ppx* и *pstA*), K (*kdpABCDE* и *trkA*), S (*cysAWNKJDHSQ*, *sfnG*, *dmdBC*, *tauBCA*, *sseA* и *ssuED*), Fe (*dhbF*, *entABCEFS*, *hemABCDLN*, *hmoB*, *hmuO*, *iroC*, *pvdA* и *ymfEI*), а также 44 гена метаболизма N (*amtB*, *narGHIJKL*, *nirBCDA*, *ureABCDFG*, *glnABDE*, *gltBD* и др.). Также имеются гены устойчивости к осмотическому (*argBCDEHJ*, *atpABCDFG*, *dpsA*, *gdhB*, *mtnN*, *nadA*, *prdF*, *smpB*, *yobR* и *ytaB*) и окислительному (*dltE*, *dxs*, *gcpE*, *idsA*, *ispDEFH*, *katE*, *qor* и *sodC*) стрессу, биоремедиации (*adhP, badHI, benABCEK, chqB, dehI, dhaS, ethA, frmA, hapE, mdlC, mdo, mlaDEF, pcaBCDGH, pcpD, pobA, xylC* и *yiaY*) и синтеза летучих органических соединений (ЛОС) (*acuC, budBC, butA, ilvH* и *pdhCD*).

Штамм *P. marginalis* RA62c-B2 имеет гены биосинтеза ИУК по IAM-пути (*iaaM* и *iaaH*) и цитокининов (*BacCYPs*, *PpnN*, *miaAB*, *dxr*, *fni* и *ispDEFU*). Помимо этого, гены мобилизации P (*phoU* и *pstABCS*), K (*kdpABCDE*, *kup*, *kefCF*, *nhaP*, *chaA*, *mrpD* и *trkAH*), S (*cysAWTPNDHJIB*, *sfnG*, *iscSRUA*, *hscAB*, *fdx*, *iscX*, *dsrEF*, *sseA* и *ssuABCDE*), Fe (*fpvA*, *fhuA*, *fpuC* и *cntO*), N (*glnA*, *napA* и *nasD*), а также гены биосинтеза органических кислот (*pqqABCDE, gcd, aspA, fumAC, sucCD* и *pta*). Имеются гены устойчивости к стрессам (*betABIT, opuAA, opuAB, prop, katBE, sodB, ahpCF, msrAB* и *gshAB*) и биоремедиации (*antABC, pcaGHBKRF, hcaB* и *xylABFGHR*).

Штамм *P. agglomerans* P7SCH-B5 содержит в геноме гены биосинтеза ИУК (*aroFGH*, *ipdC* и *iaaH*) и цитокининов (*BacCYPs*, *miaAB*, *dxr*, *ipt* и *ispDE*). Помимо этого, выявлены гены мобилизации P (*phoBR* и *pstABC*), K (*kdpABCDE*, *kup*, *trkAH*, *kefCF*, *nhaP*, *cvrA* и *chaA*), S (*cysAPTWDNCHIJKME*, *msuD*, *sfnG*, *tauABD*, *tusABCDE* и *ssuABCDE*), Fe (*fepABCDG*, *fhuABCDE* и *entABCEF*), N (*glnA*, *gltDEK* и *narAGHIJ*), а также биосинтеза органических кислот (*pqqABCDE, gcd, pta, ackA, pflB, aspA, fumAC* и *sucCD*), стрессоустойчивости (*betABIT, proVWX, otsAB, ahpCF, katEG, trxAB* и *sodAC*) и биоремедиации (*atzEF, hcaBDR* и *xylABFGHR*).

Подтверждение продукции фитогормонов методом ВЭЖХ-МС. В экстракте ночной культуры *G. aichiensis* P6PL2 идентифицированы ИУК, её предшественник индол-3-ацетоальдегид, а также цитокинин – *транс*-зеатин (Рисунок 7). В экстракте *P. marginalis* RA62c-B2 зафиксированы метаболиты триптофана индол-3-ацетоальдегид и индол-3-карбоксальдегид, а также два цитокинина транс-зеатин и N^6-изопентениладенин (Рисунок

8). В экстракте *P. agglomerans* P7SCH-B5 выявлены метаболиты триптофана индол-3-ацетоальдегид, индол-3-карбоновая кислота и цитокинин N^6-изопентениладенин (Рисунок 9).

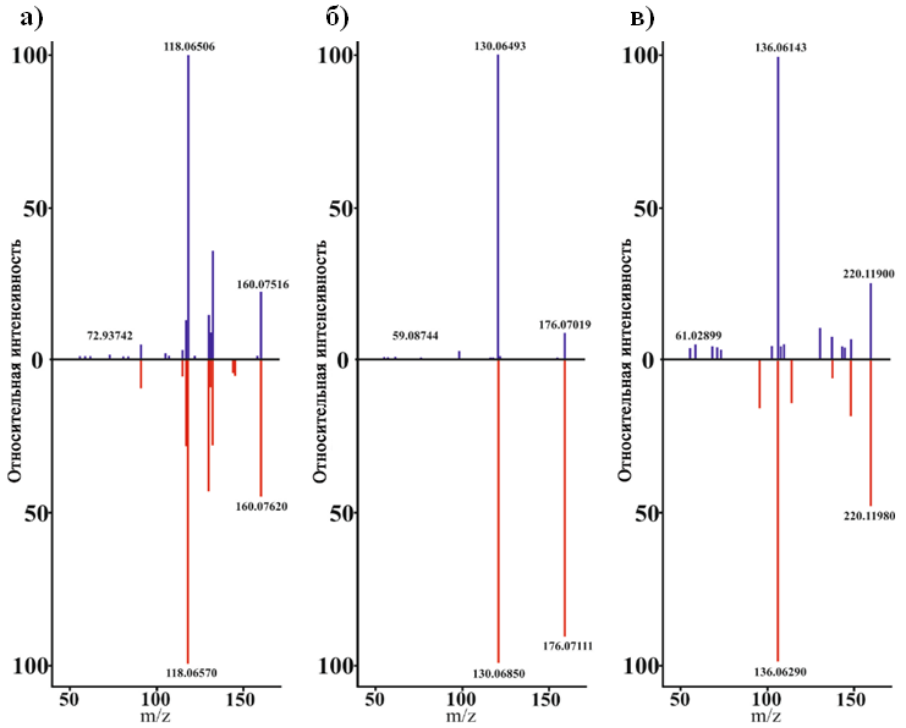


Рисунок 7 – Масс-спектр экстракта ночной культуры *Gordonia aichiensis* P6PL2. Масс-спектр индол-3-ацетоальдегида (а), масс-спектр индол-3-уксусной кислоты (б), масс-спектр *транс*-зеатина (в). Данные масс-спектрометрии представлены в относительной интенсивности (масса/заряд). Спектры, извлечённые из экстракта обозначены, синим цветом, эталонные масс-спектры красным.

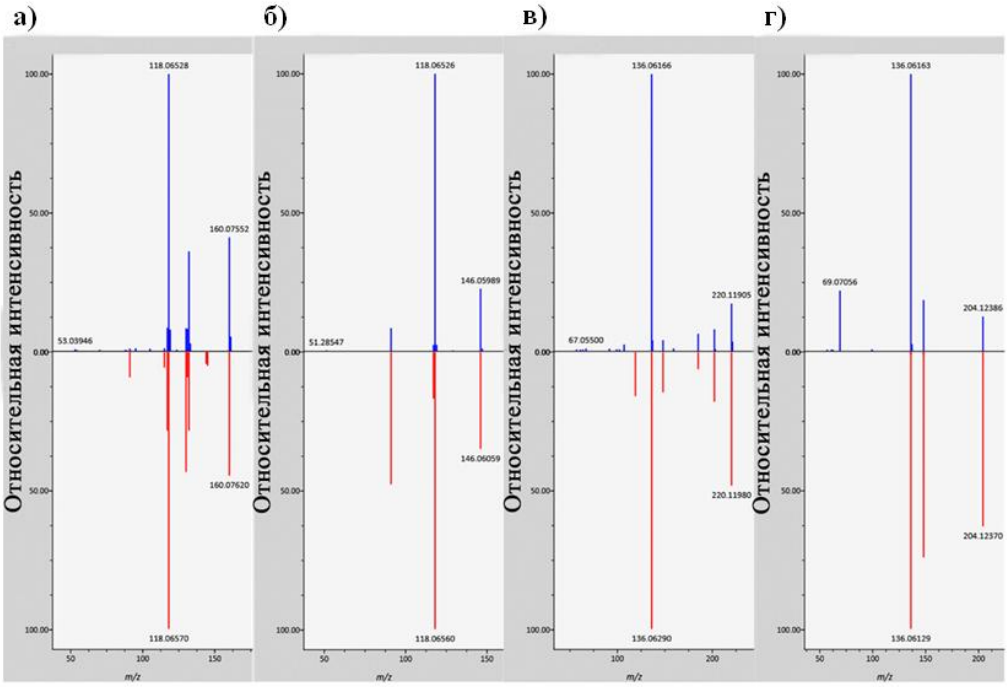


Рисунок 8 – Масс-спектр экстракта ночной культуры *Pseudomonas marginalis* RA62c-B2. Масс-спектр индол-3-ацетоальдегида (а), масс-спектр индол-3-карбоксальдегида (б), масс-спектр *транс*-зеатина (в), масс-спектр N^6- изопентениладенина

(г). Данные масс-спектрометрии представлены в относительной интенсивности (масса/заряд). Спектры, извлечённые из экстракта обозначены, синим цветом, эталонные масс-спектры красным

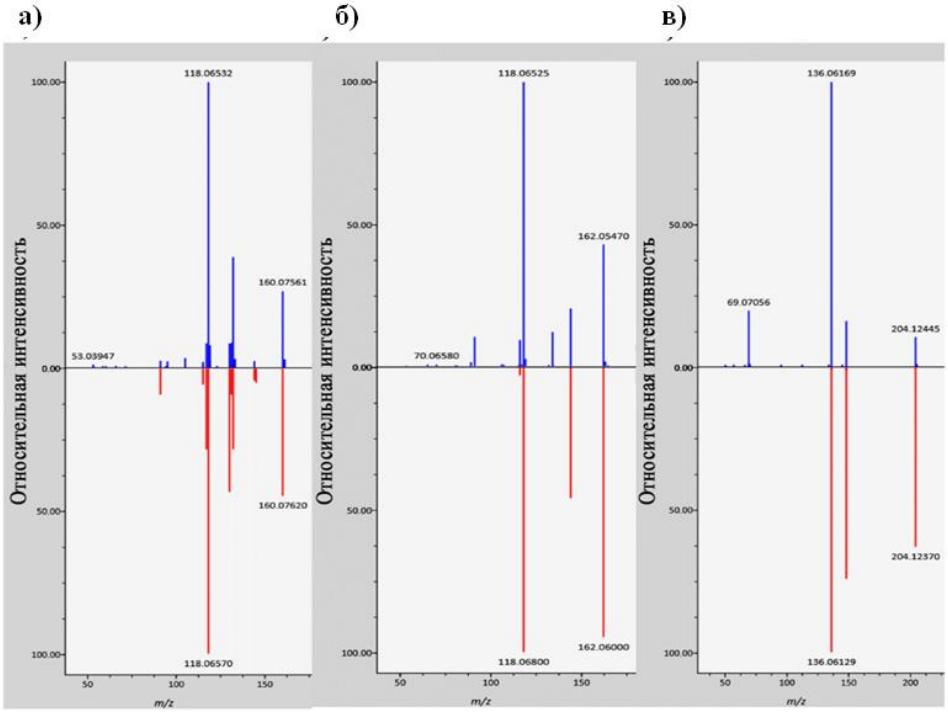


Рисунок 9 – Масс-спектр экстракта ночной культуры *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5. Масс-спектр индол-3-ацетоальдегида (а), масс-спектр индол-3-карбоновой кислоты (б), масс-спектр N^6- изопентениладенина (в). Данные масс-спектрометрии представлены в относительной интенсивности (масса/заряд). Спектры, извлечённые из экстракта обозначены, синим цветом, эталонные масс-спектры красным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение бактериального сообщества *V. amurensis* представляет особый интерес, поскольку данный вид обладает уникальными адаптивными свойствами, включая исключительную холодоустойчивость, позволяющую переносить температуры до - 40 °C, а также устойчивость к ряду опасных заболеваний винограда, таких как мучнистая роса, белая гниль и антракноз (Wu *et al*., 2010; Liu, Li, 2013). Эти особенности делают *V. amurensis* ценным объектом для поиска и изучения полезных микроорганизмов.

Относительно недавно появились данные о таксономической структуре и составе бактериального сообщества *V. amurensis* (Aleynova, Nityagovsky, Kiselev, 2021; Aleynova *et al*., 2022a, 2023a, 2023b), а также данные о влиянии эндофитных бактерий на синтез стильбенов в культурах клеток *V. amurensis* (Aleynova *et al*., 2021). Помимо этого, описан штамм *Bacillus velezensis* AMR25, обладающий антагонистической активностью против ряда фитопатогенов (Ananev *et al*., 2024). В ходе данной работы были дополнены данные о свойствах штамма, показано, что AMR25 потенциально способен увеличивать биодоступность питательных элементов, таких как N и P, а также синтезировать ИУК (Таблица 1).

В ходе исследования из тканей визуально здоровых лиан *V. amurensis* было выделено 104 эндофитных бактериальных изолята. Скрининг на наличие ключевых механизмов, ассоциированных с ростостимулирующими свойствами, такими как

фиксация N, мобилизация P и K, окисление S и синтез ИУК выявил ряд перспективных бактериальных изолятов (Рисунок 1).

Наиболее часто встречающейся способностью среди выделенных изолятов оказалась фиксация атмосферного N, хотя для окончательного подтверждения требуется анализ активности нитрогеназы и наличие *nif*-оперона (Sepp *et al*., 2023; Shi *et al*., 2023). Частота встречаемости азотофиксирующих бактерий среди изолятов, выделенных из *V. amurensis*, находится в диапазоне, сопоставимом с показателями, ранее описанными для других дикорастущих видов растений, и составляет около 30–50 % от общего числа изолятов (Mukherjee *et al*., 2017; Tian *et al*., 2023; Fei *et al*., 2025). Высокая доля изолятов, потенциально способных к фиксации атмосферного N, может отражать адаптацию *V. amurensis* к произрастанию на склонах холмов и вдоль оврагов, где почвы часто характеризуются низким содержанием доступного N (Chen, Ching, 1924). Способность к солюбилизации неорганических фосфатов была выявлена у 25 % изолятов (Рисунок 1б), что является более низким показателем чем в других исследованиях, где такую активность проявляли около 59-90 % эндофитных микроорганизмов, выделенных из растений кактусов, клубники, подсолнечника и сои (Forchetti *et al*., 2007; Puente, Li, Bashan, 2009; Mei *et al*., 2021; Moura de *et al*., 2022; Silvestrini *et al*., 2023). Способность к мобилизации калия встречалась реже около 8 % от общего числа (Рисунок 1). Более низкая частота встречаемости калий мобилизующих бактерий по сравнению с фосфат-солюбилизирующими является общей закономерностью для растений (Ahmad *et al*., 2016; Gao, Xu, Uwiringiyimana, 2025). Способность к окислению серы, обычно описывается для свободно живущих хемолитотрофных бактерий, каких как *Acidithiobacillus* (Wang *et al*., 2019; Ibáñez *et al*., 2023). Полученные нами данные расширяют представления о распространённости этого свойства среди эндофитных бактерий.

Способность к синтезу ИУК была выявлена у 9 бактериальных изолятов *V. amurensis* (Рисунок 1), частота встречаемости продуцентов ауксинов варьируется в широком диапазоне в зависимости от условий выделения, состава питательной среды и метода детекции (Khianngam *et al*., 2023; Devi *et al*., 2025; Meza *et al*., 2025). Низкая частота встречаемости продуцентов ауксинов может объясняться выбранными условиями выделения эндофитных бактерий. Тем не менее, важно отметить, что выявленные продуценты ауксинов принадлежат к родам, ранее охарактеризованным как продуценты ауксинов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Curtobacterium*, *Xanthomonas*, *Gordonia* и *Sphingomonas* (Kutáček, Rovenská, 1991; Iqbal, Hasnain, 2013; Ahmad *et al*., 2014; Kayasth, Kumar, Gera, 2014; Mayer, Dörr de Quadros, Fulthorpe, 2019; Wagi, Ahmed, 2019; Luziatelli *et al*., 2020; Batista *et al*., 2021; Park *et al*., 2021; Schillaci *et al*., 2022; Mazoyon *et al*., 2023; Melini *et al*., 2023; Rangel *et al*., 2025).

Другим из ключевых фактором, определяющих эффективность применения микроорганизмов в качестве стимуляторов роста, является их способность к колонизации растения-хозяина. Способность к колонизации штаммов оценивалась с помощью метабаркодирования V3-V4 региона 16S рРНК и количественным ПЦР-РВ на модельном растении *A. thaliana*. Из 9 исследуемых штаммов 7 успешно колонизировали растения, о чём свидетельствует значительное увеличение числа ASV, соответствующих родам бактериальных штаммов (Рисунок 2). Важно отметить, что *G. aichiensis* P6PL2 так же продемонстрировал способность к колонизации (увеличение числа ASV в 240 раз) (Рисунок 2). Насколько нам известно, это одно из первых сообщений о эффективной

колонизации *A. thaliana* представителем рода *Gordonia*. Ранее сообщалось что *G. terrae* KMP456-M40 колонизировала корни риса (Soldan *et al*., 2019).

Интереса заслуживает тот факт, что штаммы *Pantoea agglomerans* P7SCH-B5 и *Erwinia* sp. R8SCh-B3 не смогли колонизировать *A. thaliana* (Рисунок 2). Известно, что *P. agglomerans* широко распространена как эндофит многих растений, включая рис, пшеницу, цитрусовые и др. (Feng *et al*., 2003; Andreote *et al*., 2008; Quecine *et al*., 2012; Cherif-Silini *et al*., 2019). Однако колонизация *A. thaliana* этим видом может быть ограничена, что может быть обусловлена генотипом исследуемого растения (Müller *et al*., 2015; Liu *et al*., 2017). Что касается *Erwinia* sp. R8SCh-B3, многие представители данного рода являются фитопатогенами (Eastgate, 2000; Piqué *et al*., 2015; Ramachandran, Manaf, Zakaria, 2015; Tao *et al*., 2023), и их способность к колонизации растений может быть ограничена механизмами иммунитета растений.

Инокуляция штаммами *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3 и *G. aichiensis* P6PL2 привела к значительному снижению альфа-разнообразия микробиома *A. thaliana*. В микобиоме *A. thaliana* инокуляция бактериальными штаммами приводила к снижению ASV родов *Penicillium* и *Naganishia* и увеличению относительной представленности рода *Fusarium*. Поскольку представители рода *Fusarium* часто являются фитопатогенами (Arie, 2019; Beccari, Hao, Liu, 2022; Stępień, 2023), увеличение их численности может быть нежелательным эффектом, требующим дальнейшего изучения. Однако отсутствие видимых симптомов заболевания, позволяет предположить, что увеличение численности *Fusarium* не достигало патогенного уровня.

Важно отметить, что способность к колонизации растений не всегда коррелирует с положительным влиянием на его рост. Так на начальном этапе развития все исследуемые штаммы вызывали замедление роста гипокотиля и корня *A. thaliana*. Длина гипокотиля уменьшалась в 1,1 - 2,9 раза, а длина корня в 8-9 раз по сравнению с контрольными растениями (Рисунок 3). Однако после пересадки проростков в горшки к 30-дню развития у растений, инокулированных *G. aichiensis* P6PL2 и *Sphingomonas* sp. RA62c-B5, диаметр розетки *A. thaliana* увеличивался в 1,2-1,4 раза, а свежая и сухая биомасса увеличивалась в 1,5-1,8 раз выше, чем у контроля (Рисунок 4). Подобное явление можно объяснить высокой бактериальной нагрузкой, которую растение воспринимает как стрессовый фактор, что приводит к активации защитных реакций и временному торможению роста (Wang, Wang, 2014; Liu *et al*., 2025). Также некоторые ауксин-продуцирующие бактерии могут ингибировать развитие корней за счёт высокой продукции ИУК (Glick, 2012).

В отличие от *A. thaliana*, инокуляция *O. sativa* штаммами *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5 не вызывала значительного замедления роста на начальных этапах. На 7-й день после инокуляции *G. aichiensis* P6PL2 привела к увеличению длины коря на 12,9 %, а *P. marginalis* RA62c-B2 на 10 % (Рисунок 5в). К 30-му дню положительный эффект усилился: длина стебля увеличивалась на 7,5-25,5 %, длина корня на 12,9%-24,1 %, сухая масса стебля на 18-44,2 %, сухая масса корня на 37-63,8 % (Рисунок 6). Наиболее выраженный эффект показал штамм *P. marginalis* RA62c-B2, увеличивающий сухую массу корней на 63,8 % и сухую массу стеблей на 44,2 % (Рисунок 6в,г). Полученные результаты сопоставимы с данными, полученными с использование других эндофитных бактерий (Tu *et al*., 2024; Alghamdi *et al*., 2025) и превосходят некоторые почвенные бактерии (Wang *et al*., 2025).

Различия в морфометрических показателях *A. thaliana* и *O. sativa* на инокуляцию бактериальными штаммами *V. amurensis* могут быть связаны с несколькими факторами. Во-первых, принадлежность к разным семействам, а именно *A. thaliana* относится к крестоцветным с принципиально иной физиологией и механизмом иммунитета по сравнению со злаками (Hudson *et al*., 2024). Во-вторых – это условия инокуляции семян и проращивания проростков: культивирование семян *A. thaliana* на питательной среде MS совместно с бактериальными штаммами *V. amurensis*, вероятно, усиливало стресс от бактериальной нагрузки.

Исследование полных геномов *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5 показало наличие множества генов, отвечающих за их ростостимулирующий потенциал. Для каждого штамма была собрана и аннотирована геномная последовательность, а также проведён филогенетический анализ, дополненный данными о ANI и dDDH, что позволило точно определить их таксономическое положение.

Геномные последовательности штаммов содержали гены биосинтеза фитогормонов, в том числе акусинов у *G. aichiensis* P6PL2 (*trpABCDES* и *aldAB*), *P. marginalis* RA62c-B2 (*iaaM* и *iaaH*) и *P. agglomerans* P7SCH-B5 (*aroFGH*, *ipdC* и *iaaH*). Это хорошо согласуется с результатами первичного скрининга (Таблица 1). Однако данные ВЭЖХ-МС подтвердили наличие ауксина только у *G. aichiensis* P6PL2, а также его предшественника индол-3-ацетоальдегида (Рисунок 7а,б), что указывает на реализацию биосинтеза ИУК по IAAld пути (McClerklin *et al*., 2018). Положительный результат синтеза ИУК, полученный при первичном скрининге (Таблица 1), может быть обусловлен присутствием у *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5 других продуктов метаболизма триптофана (Рисунок 8,9), а также недостаточной специфичностью метода Сальковского для определения наличия ауксинов (Guardado-Fierros *et al*., 2024). Способность к синтезу ауксинов ранее была показана у многих бактериальных родов, включая *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella* и др. (García-Tabares *et al*., 1987; Molina *et al*., 2018; Karmakar *et al*., 2021; Chang *et al*., 2024). В то же время сведения о продукции ауксинов представителями рода *Gordonia* крайне ограничены, и единственным известным сообщением является описание *Gordonia* sp. JPA2, обладающего способностью синтезировать ИУК и стимулировать рост просо *Cenchrus americanus* (Kayasth, Kumar, Gera, 2014).

Кроме того, геномы исследуемых штаммов бактерий содержали гены, ответственные за биосинтез цитокининов – *G. aichiensis* P6PL2 содержал гены *ipt*, *BacCYPs*, *miaB*, *hflX*, *yvdD* и *dapF*, *P. marginalis* RA62c-B2 – гены *BacCYPs*, *PpnN*, *miaAB*, *dxr*, *ipt*, *fni* и *ispDEFU* и *P. agglomerans* P7SCH-B5 – гены *BacCYPs*, *miaAB*, *dxr*, *ipt*, *ispDE*. Способность к биосинтезу цитокининов бактериальными штаммами *V. amurensis* была подтверждена результатами ВЭЖХ-МС: экстракты *G. aichiensis* P6PL2 и *P. marginalis* RA62c-B2 содержали *транс*-зеатин, и *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans P7SCH-B5* содержали N^6- изопентениладенин (Рисунок 7-9). Предположительно, биосинтез цитокининнов у всех штаммов осуществляется по пути *de novo* из свободных нуклеотидов, поскольку выявленные наборы генов у исследуемых штаммов недостаточны для синтеза через распад тРНК (Frébortová, Frébort, 2021). Это подтверждается наличием всех исследуемых штаммов генов изопентенилтрансферазы (*ipt*) и цитохрома П450 (*BacCYPs*). Однако гены семейства LOG, отвечающие за финальный этап биосинтеза цитокининов, были обнаружены только у штаммов *G. aichiensis* P6PL2 (*yvdD*) и *P. marginalis* RA62c-B2

(*PpnN*). Несмотря на отсутствие данного гена у *P. agglomerans* P7SCH-B5, наличие цитокинина в культуральном экстракте указывает на способность данного штамма к синтезу цитокининов (Рисунок 9). Способность синтезировать цитокинины ранее описана у представителей родов *Pseudomonas* и *Pantoea* (Großkinsky *et al*., 2016; Frébortová, Frébort, 2021), тогда как для рода *Gordonia* настоящее исследование является первым сообщением о синтезе цитокининов.

В геноме всех штаммов были обнаружены гены продукции органических кислот, участвующих в растворении неорганических фосфатов, что коррелирует с данными первичного скрининга (Таблица1). Однако, способность к солюбилизации K отсутствовала у штамма P6PL2 (Таблица 1), несмотря на то что механизмы схожи с солюбилизацией фосфатов. Наличие генов метаболизма серы, так же не коррелировали с наличием способности к её окислению, поскольку в геноме *G. aichiensis* P6PL2 обнаружено множество генов метаболизма S, но способность к окислению отсутствовала (Таблица 3).

Обратный результат обнаружен с генами метаболизма N, полный *nif*-оперон не обнаружен ни у одного из исследуемых бактериальных штаммов, но в ходе экспериментов у этих трех исследуемых штаммов наблюдался рост на без азотной среды Эшби (Таблица 1). Отсутствие полного *nif* оперона при росте на среде Эшби свидетельствует о реализации альтернативных механизмов ассимиляции азота. Стоит отметить, что у штамма *G. aichiensis* P6PL2 такой механизм, вероятно, базируется на восстановлении нитрата до аммония за счёт активности нитрат- и нитритредуктаз, что подтверждается наличием гена мембранной нитратредуктазы (*narGHIJKL*) (Zhu *et al*.).

Также представляет интерес наличие у штаммов генов, связанных с устойчивостью к окислительному (*katBE, sodB, ahpCF*, *msrAB* и *gshAB*) и осмотическому (*betABIT*, *opuAA*, *opuAB* и *prop*) стрессам, а также генов, участвующих в процессах биоремедиации. Способность повышать устойчивость к абиотическим стрессовым факторам ранее была описана для представителей исследуемых родов *Pseudomonas* и *Pantoea* (Cherif-Silini *et al*., 2019; Abulfaraj, Jalal, 2021), а для рода *Gordonia* также характерно широкое распространение свойств, связанных с биоремедиацией (Kayasth, Kumar, Gera, 2014; Silva *et al*., 2019; Lin *et al*., 2024b). Наличие этих генов создаёт основу для дальнейших исследований, направленных на изучение влияния бактерий *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5 в повышении устойчивости растений к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Таким образом, исследуемые штаммы бактерий винограда *V. amurensis* могут быть основой для создания биопрепаратов для стимуляции роста растений, за счет их молекулярно-биологических особенностей. На сегодняшний день, коммерчески биопрепараты на основе *P. agglomerans* уже активно применяются в практике защиты растений, в том числе препараты на основе штаммов C9-1 и E325 известных под торговыми названиями BlightBan C9-1 и Bloomtime, данные препараты используются для повышения устойчивости растений к различным патогенам (Canada. Pest Management Regulatory Agency, 2007; U.S. Environmental Protection Agency, 2009). Однако информации о коммерчески доступных биопрепаратах, основанных на *G. aichiensis* и *P. marginalis* нами не было обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведён комплексный скрининг ростостимулирующих свойств эндофитных бактерий *V. amurensis*, выделены и охарактеризованы штаммы *G. aichiensis* P6PL2, *P. marginalis* RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5, обладающие высоким ростостимулирующим потенциалом. Используя полногеномное секвенирование и масс-спектрометрию, выявлены генетические и метаболические факторы ростостимулирующих свойств, включая гены биосинтеза ауксинов и цитокининов, мобилизации питательных элементов, устойчивости к стрессам и биоремедиации. Показано, что инокуляция риса этими штаммами приводит к значительному увеличению длины и биомассы растений.

Наиболее перспективным бактериальным штаммом для увеличения роста риса является *P. marginalis* RA62c-B2, увеличивающий сухую массу корней и стеблей на 63,8 % и 44,2 % соответственно. Полученные результаты расширяют представление о функциональном потенциале бактериального сообщества *V. amurensis* и создают научную основу для разработки новых эффективных биопрепаратов на основе бактерий винограда для устойчивого растениеводства.

ВЫВОДЫ

1. Среди 104 проанализированных бактериальных изолятов дикорастущего винограда *V. amurensis* 9 штаммов: *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Bacillus velezensis* AMR25, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3, *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, *Sphingomonas* sp. RA62c-B5 и *Xanthomonas* sp. R7SCh-B6, обладают не менее чем двумя ростостимулирующими детерминантами, включая биосинтез ИУК.
2. Бактериальные штаммы винограда *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Bacillus velezensis* AMR25, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3, *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, *Sphingomonas* sp. RA62c-B5 и *Xanthomonas* sp. R7SCh-B6 успешно колонизируют модельное растение *A. thaliana*. При этом инокуляция штаммами *Agrobacterium* sp. R8SCh-B12, *Curtobacterium* sp. P7SA-B3 и *Gordonia* sp. P6PL2 достоверно снижает альфа-разнообразие бактериального сообщества *A. thaliana*.
3. Инокуляция семян *A. thaliana* штаммами *Gordonia* sp. P6PL2 и *Sphingomonas* sp. RA62c-B5 сопровождалась наиболее выраженным ростостимулирующим эффектом, при котором биомасса 30-дневных растений увеличилась 1,5-1,8 раза. Инокуляция *O. sativa* эндофитными бактериями *Gordonia* sp. P6PL2, *Pseudomonas* sp. RA62c-B2 и *Pantoea* sp. P7SCH-B5 достоверно увеличивает длину побегов и корней, а также накопление сухой биомассы риса. Наиболее выраженный ростостимулирующий эффект выявлен у штамма *Pseudomonas* sp. RA62c-B2, увеличившего сухую массу корней и стеблей на 63,8 % и 44,2 % соответственно.
4. Молекулярно-генетический анализ позволил установить видовую принадлежность штаммов P6PL2, RA62c-B2 и P7SCH-B5 как *Gordonia aichiensis*, *Pseudomonas marginalis* и *Pantoea agglomerans* соответственно. Выявлены генетические детерминанты, ответственные за ростостимулирующее действие штаммов *G. aichiensis*. P6PL2, *P. marginalis*. RA62c-B2 и *P. agglomerans* P7SCH-B5, обусловленные наличием генов биосинтеза цитокининов и мобилизацией элементов питания, таких как P и K. Так же в геноме *G. aichiensis* P6PL2 обнаружены гены биосинтеза ИУК по IAAld пути и ассимиляции N. С помощью ВЭЖХ-МС в экстрактах подтверждена продукция ауксинов (ИУК) и цитокининов (*транс*-зеатина и N^6-изопентениладенина).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ, и в приравниваемых к ним периодических изданиях, входящих хотя бы в одну из библиографических баз цитирования (Web of Science или Scopus):

1. **Ananev A. A.** Whole Genome of *Gordonia aichiensis* P6PL2 Associated with *Vitis amurensis* That Stimulates Plant Growth / A. A. Ananev, O. A. Aleynova, N. N. Nityagovsky [*et al.*] // Horticulturae. – 2025. – Vol. 11. – № 7. – P. 735. – DOI: 10.3390/horticulturae11070735.
2. Aleynova O. A. The Influence of Wild Grapevine Endophytes on the Growth of the Model Plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / O. A. Aleynova, **A. A. Ananev**, N. N. Nityagovsky [*et al*.] // Life. – 2026. – Vol. 16. – № 4. – P. 566. – DOI: 10.3390/life16040566.
3. Aleynova O. A. Ability of Different Bacteria from Grapevine to Colonize *Arabidopsis thaliana* / O. A. Aleynova, **A. A. Ananev**, N. N. Nityagovsky [*et al*.] // Plants. – 2026. – Vol. 15. – № 8. – P. 1151. – DOI: 10.3390/plants15081151.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международной научных конференций:

4. Киселев К. В. Исследование микробиома винограда амурского и его биотехнологического потенциала / К. В. Киселев, О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов». – Владивосток, Россия, 19–23 сентября 2022 г., С. 51.
5. **Ананьев А. А.** Влияние эндофитов винограда *Vitis amurensis* Rupr. на ростовые характеристики модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / **А. А. Ананьев**, О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов». – Владивосток, Россия, 19–23 сентября 2022 г., С. 58.
6. Алейнова О. А. Перспективы использования эндофитов винограда Дальнего Востока России / О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун [и др.] // Тезисы докладов VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды». – Иркутск – пос. Большое Голоустное, Россия, 3–7 июля 2023 г., С. 153.
7. **Ананьев А. А.** Антимикробная активность эндофитных микроорганизмов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. / **А. А. Ананьев**, О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский [и др.] // Тезисы докладов VI Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды». – Иркутск – пос. Большое Голоустное, Россия, 3–7 июля 2023 г., С. 155.
8. Алейнова О. А. Перспективы применения эндофитов винограда в биотехнологии / О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский, А. Р. Супрун [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской научной школы-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений». – Владивосток, Россия, 3–7 октября 2023 г., С. 66.
9. **Ананьев А. А.** Полногеномный и метаболомный анализ эндофитной бактерии винограда *Vitis amurensis* Rupr. рода *Gordonia* sp., стимулятора роста растений / **А. А. Ананьев**, О. А. Алейнова, Н. Н. Нитяговский [и др.] // Тезисы докладов Всероссийской научной школы-конференции молодых ученых и студентов «Генетические технологии в исследованиях природных соединений». – Владивосток, Россия, 3–7 октября 2023 г., С. 67.
10. **Ананьев А. А.** Изменчивость биоразнообразия эндофитов модельного растения *Arabidopsis thaliana* при совместном проращивании с бактериями и грибами из дикорастущего винограда *Vitis amurensis* / **А. А. Ананьев**, Н. Н. Нитяговский, О. А. Алейнова // Тезисы 15-й Международной школы молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» и 4-й Школы молодых ученых «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений». – Новосибирск, Россия, 25–30 ноября 2024 г., С. 2.

АНАНЬЕВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

АССОЦИИРОВАННЫЕ С *VITIS AMURENSIS* RUPR. МИКРООРГАНИЗМЫ, КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук