

УДК 577.218

АКТИВАЦИЯ БИОСИНТЕЗА СТИЛЬБЕНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВИНОГРАДА ПРИ ПОМОЩИ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЭНДОФИТОВ ДИКОРАСТУЩЕГО ВИНОГРАДА *Vitis amurensis* RUPR.

© 2022 г. О. А. Алейнова¹, *, Н. Н. Нитяговский¹, А. Р. Супрун¹, К. В. Киселёв¹

¹Федеральный научный центр Биоразнообразия Наземной Биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 21.05.2021 г.

После доработки 04.06.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Предложен новый подход к увеличению продукции и изменению качественного состава стильбенов — ценных для здоровья человека веществ, в культуре клеток винограда при помощи 13 биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. Биопрепараты на основе эндофитных бактерий увеличивали содержание стильбенов в 1.3–1.5 раза, биопрепараты на основе эндофитных грибов — в 2.0–3.5 раза. Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при культивировании клеток винограда в течение 3 сут с 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. — 3.07 мг/г сухой биомассы клеток. Увеличение содержания стильбенов при использовании биопрепаратов на основе эндофитов в культуре клеток винограда *V. amurensis* происходило за счет достоверного увеличения экспрессии генов биосинтеза стильбенов — фенилаланин-аммиак-лиаз (*PAL*) и стильбен-синтазы (*STS*). Биопрепараты на основе природных эндофитов *V. amurensis* являются перспективным и экологичным стимулятором увеличения содержания стильбенов в культуре клеток винограда.

Ключевые слова: эндофиты винограда, биосинтез стильбенов, культура клеток винограда, ресвератрол, стильбены, стильбен-синтазы (*STS*), фенилаланин аммиак лиазы (*PAL*), эндофиты, *Vitis amurensis*

DOI: 10.31857/S0555109922010020

Стильбены — относительно небольшая группа природных фенольных соединений, которые встречаются в ряде неродственных семейств растений, таких как арахис (*Fabaceae*), сосна (*Pinaceae*) или виноград (*Vitaceae*). Известно, что виноград — лидер по содержанию ресвератрола среди растений. Ключевой и наиболее известный стильбен — это *транс*-ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен), который является основным предшественником в биосинтезе остальных стильбенов [1]. Ресвератрол способен предупреждать возникновение и развитие сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, оказывать антиаллергическое действие, замедлять процесс старения [2, 3]. Помимо полезных свойств для здоровья человека, установлено, что стильбены играют также важную роль в защите растений от микробных патогенов [4].

Содержание ресвератрола в растительном сырье не превышает сотых долей процента от сухой массы, что увеличивает стоимость производства стильбенов в промышленных масштабах. На сегодняшний день в биотехнологии существует мно-

жество способов стимуляции биосинтеза стильбенов, но в основном эти подходы основаны на использовании химических веществ, которые могут оказывать неблагоприятное действие на здоровье человека.

В последние годы активно развивается направление, основанное на изучении влияния эндофитов растений и препаратов на их основе на растения, их устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, повышение урожайности и качество плодов, в том числе на содержание вторичных метаболитов. К эндофитам растений относят эндосимбионты, бактерии, грибы, вирусы, которые населяют растение, не вызывая при этом никаких заболеваний [5].

В настоящее время есть несколько работ посвященных изучению влияния эндофитных грибов винограда на метаболизм в культуре клеток винограда. Было показано, что совместное культивирование клеток винограда с разными штаммами грибов приводило к появлению новых метаболитов (от 1 до 11) специфичных для штамма/рода эндо-

фитных грибов, ранее не характерных для культуры клеток винограда [6]. Кроме того, добавление эндофитов-грибов к культуре клеток винограда приводило к изменению профиля первичного и вторичного метаболизма. Изменялись общее содержание сахаров, титруемая кислотность, содержание общего растворимого белка, общее содержание флавоноидов и фенолов, малонового диальдегида, а также активность антиоксидантных ферментов, гваякол-зависимой пероксидазы, супероксиддисмутазы и фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) [7]. Грибы-эндофиты могут продуцировать разные элиситоры или другие сигнальные молекулы, которые в свою очередь могут вызывать различные метаболические изменения, поэтому окислительный ответ может быть обычной реакцией клеток при изменении метаболизма в растениях-хозяевах [8].

Недавно китайские ученые установили, что совместное культивирование каллусов винограда с грибами-эндофитами по-разному влияет на общую концентрацию антоцианов и активность PAL в клетках винограда. При совместном культивировании штаммов грибов *Alternaria alternata* и *Episcoccum nigrum* с клетками винограда содержание антоцианов увеличивалось на 74 и 28% соответственно, в то время как со-культивирование другого штамма *A. alternata* с каллусами винограда снижало содержание антоцианов на 19% [9]. Таким образом, совместное культивирование каллусов винограда и грибов-эндофитов индуцировало защитные реакции клеток винограда, приводящее к метаболическим изменениям.

Дикий виноград *V. amurensis*, произрастающий на Дальнем Востоке (Россия), является уникальным растением, поскольку выдерживает довольно низкие температуры, а также содержит больше всего стильбенов, по сравнению с другими видами винограда [10, 11]. Эндофиты дикого винограда *V. amurensis* в настоящее время практически не изучены, но являются интересным объектом для исследований, поскольку находятся в природной среде, и, возможно, способствуют устойчивости дикорастущего винограда к абиотическим и биотическим стрессам. Ранее [12] было показано, что добавление нативных эндофитных бактерий и грибов к культуре клеток винограда достоверно увеличивало содержание стильбенов (в 2.2–16.3 раза), но ингибировало рост клеток. Стимуляция биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи жизнеспособных клеток эндофитов неэффективна и не применима в производстве, поскольку скорость роста бактерий и грибов значительно выше, чем клеток культуры винограда. Создание для производства альтернативных элиситоров/биопрепаратов на основе эндофитов винограда в этом случае может способствовать стимуляции биосинтеза стильбенов.

Цель работы — получение новых биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis*, анализ их влияния на продукцию ресвератрола, качественный состав стильбенов и экспрессию генов биосинтеза ресвератрола и его предшественников, а именно генов *PAL* и *STS*, в культуре клеток винограда.

МЕТОДИКА

Выделение и идентификация штаммов эндофитных бактерий и грибов винограда *V. amurensis*. Стебли и листья дикорастущего винограда *V. amurensis* (молодые стебли длиной 7–8 см с тремя здоровыми листьями) были отобраны в неохраняемой природной зоне в районе г. Владивостока (Россия) в июне–сентябре 2018–2020 гг. Каждый образец растения доставлялся в лабораторию в течение 30 мин. Ткани листа и стебля (1.5 г) промывали под проточной водой с мылом, затем в стерильных условиях промывали в 75%-ном спирте в течение 2 мин, а затем 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и затем стерильной водой 5 раз. Для проверки эффективности выбранного способа поверхностной стерилизации и отсутствия микроорганизмов 100 мкл последней промывной воды растирали шпателем на чашках Петри с агаризованной картофельно-декстрозной питательной средой (PDA, “Neogene”, Великобритания) для грибов и агаризованной средой R2A для бактерий [13]. После трехдневной инкубации рассева последней промывной воды на чашках с питательными средами не было выявлено роста микроорганизмов, что подтверждало качественную поверхностную стерилизацию тканей винограда.

В стерильной ступке поверхностно стерилизованную ткань листьев и стеблей дикого винограда измельчали до однородного состояния, отжимали сок и наносили 100 мкл полученного сока на чашки Петри со средой PDA и R2A. Через три дня (для бактерий) и пять дней (для грибов) выросшие колонии бактерий и грибные изоляты отбирали и осторожно переносили на новую стерильную чашку для повторного культивирования.

Выделение ДНК отдельных колоний бактерий и грибов проводили методом с гексадецилтриметиламмония бромида (СТАВ) с модификациями [14]. Для получения последовательности генов *16S* рРНК размером приблизительно 1500 п.н. для амплификации использовали универсальные праймеры 8F, 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG и 1522R, 5'AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA [15]. Универсальные праймеры 5'AGG AGA AGT CGT AAC AAG G и 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC были использованы для амплификации последовательности межгенного спейсера ITS1 размером ~560 п.н. [16]. ПЦР-продукты секвенировали с помощью генетического анализатора

ABI 3130 (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа последовательности использовалась программа Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Множественные выравнивания последовательностей были выполнены с помощью программы ClustalX [17]. Идентичность последовательности $\geq 99\%$ считали достаточным пороговым значением для таксономической идентификации.

Получение биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis*. Для создания биопрепаратов на основе эндофитов винограда были выбраны наиболее часто встречающиеся 7 родов эндофитных бактерий и 6 родов эндофитных грибов. Эндофитные бактерии и грибы выращивали в 50 мл жидких питательных сред R2A (для бактерий) и PD (для грибов) при 23°C в темноте при постоянном перемешивании 130 об./мин. Полученные суспензии эндофитных бактерий и грибов переносили в пробирки на 50 мл (типа фалькон) и центрифугировали на центрифуге CM-6M (“ELMI ltd.”, Латвия) 5 мин при 2100 g. Полученный осадок сушили в термостате при 45°C до полного видимого испарения влаги в течение 5 сут. Полученный сухой осадок эндофитных бактерий и грибов автоклавировали при 120°C и 0.8 атм. 20 мин.

Обработка клеток винограда биопрепаратом на основе эндофитов винограда *V. amurensis*. Каллусная культура V7 была получена в 2017 г. из молодых лиан взрослого растения *V. amurensis*, как описано в работе [18]. Для получения 50 мл суспензионной клеточной культуры винограда V7 использовали 2.0 г сырой биомассы каллуса V7, взятой на 30 сут выращивания, так как ранее было показано, что на 30–35 сут выращивания наблюдали самые высокие показатели биосинтеза стильбенов в каллусах винограда [19].

Для культивирования суспензии клеток винограда использовали жидкую модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, следующего состава: NH_4NO_3 – 0.4 г/л, KNO_3 – 1.9 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.44 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.37 г/л, KH_2PO_4 – 0.17 г/л, H_3BO_3 – 6.2 мг/л, MnSO_4 – 16.9 мг/л, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 мг/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8.6 мг/л, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.25 мг/л, KI – 0.83 мг/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27.8 мг/л, $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 37.3 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, пептон ферментативный для бактериологических питательных сред сухой – 100 мг/л, витамин B1 – 0.2 мг/л, витамин B6 – 0.5 мг/л, витамин PP – 0.5 мг/л, L-цистеин – 5 мг/л, сахара – 25 г/л, 6-бензиламинопурин – 0.5 мг/л, альфа-нафтилуксусная кислота – 2 мг/л.

Культуру клеток винограда V7 выращивали в 50 мл питательной среды в темноте на орбитальном шейкере (110 об./мин) при температуре 23°C в течение 7 сут. Затем в стерильных условиях

колбу добавляли по 10 мг полученных биопрепаратов эндофитных бактерий и по 10 и 20 мг биопрепаратов эндофитных грибов. Предварительно биопрепараты растирали в ступках в порошок в стерильных условиях. Для оценки влияния биопрепаратов на основе эндофитных бактерий и грибов на рост биомассы, содержание и продукцию стильбенов клетки винограда V7 культивировали с биопрепаратами в течение 3 и 7 сут (все-го 10 и 14 сут соответственно). Эксперименты повторяли 3 раза.

Выделение РНК, получение комплементарной ДНК (кДНК) и количественная оценка экспрессии генов *PAL* и *STS*. Выделение РНК проводили из 10-суточной культуры клеток V7, что соответствовало 3 сут после внесения биопрепаратов на основе эндофитов. Полную изоляцию РНК проводили с использованием СТАВ-протокола [20]. Комплементарные ДНК были синтезированы как описано ранее [21]. 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 [22]. 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 $\Delta\Delta C_t$ [23]. 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. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах. Последовательность праймеров, используемых для анализа экспрессии, а также идентификационные номера генов *PAL* и *STS* в базе данных (GenBank, NCBI) представлены в ранее опубликованной работе [24].

Определение содержания стильбенов в клетках винограда *V. amurensis*. Высушенные, порошкообразные образцы культуры V7 (100 мг) экстрагировали 2 мл 95%-ного этанола в течение 2 ч при 60°C, затем очищали с помощью нейлоновых шприц-фильтров OlimPeak, размер пор 0.45 мкм, диаметр 13 мм (“Teknokroma”, Испания) и далее проводили анализ методом ВЭЖХ. Измерение для каждого образца повторяли 3 раза.

Идентификацию и количественную оценку всех 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 м i.d., размер детали 3 мкм, “Shimadzu”, Япония).

Экстракты из культур 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°C 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. Аналитические стандарты *транс*-ресвератрол, *транс*-пицеид, *транс*-пицеатаннол – фирмы “Sigma-Aldrich” (США), *дельта*-виниферин – фирмы “Panreac AppliChem” (Германия). *Цис*-изомеры ресвератрола и пицеида были получены под воздействием солнечного света на соответствующий стандартный раствор, содержащий *транс*-изомер, как сообщалось ранее [20].

Статистический анализ полученных результатов. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0.05. Данные по содержанию стильбенов в культуре клеток винограда V7 после обработки эндофитными биопрепаратами получены с использованием трех биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор эндофитов винограда для получения биопрепаратов на основе эндофитов. Ранее было изучено разнообразие биологического сообщества эндофитов винограда – бактерий и грибов (не опубликованные данные). Выявлено, что по количественному соотношению выросших на чашках колоний, наиболее часто встречаются в тканях винограда бактерии представители родов *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, и грибы представители родов *Alternaria*, *Biscogniauxia*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Fusarium*, *Trichoderma*. 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 изолятов грибов *Alternaria* sp., *Biscogniauxia* sp., *Cladosporium* sp., *Didymella* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp. 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 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1) [12].

Влияние биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis* на биомассу клеток винограда V7. Для анализа влияния биопрепаратов на основе эндофитов на биомассу клеток винограда, в 7-суточную культуру добавляли биопрепараты и продолжали культивирование в течение 3 и 7 сут. По окончании времени клетки извлекали из жидкой питательной среды, высушивали до постоянного веса и взвешивали.

После 3 сут культивирования клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе бактерий биомасса высушенных клеток не изменялась (рис. 1а). Добавление 20 мг биопрепаратов на основе грибов *Trichoderma* sp. и *Fusarium* sp. снижало биомассу клеток в 1.5 и 1.2 раза (рис. 2а). После 7 сут культивирования с биопрепаратами на основе *Curtobacterium* sp. и *Xantomonas* sp. также достоверно уменьшалась сухая масса клеток относительно контроля (рис. 1г). При культивировании клеток винограда с 20 мг биопрепарата на основе грибов *Alternaria* sp. и *Cladosporium* sp. в течение 7 сут наблюдалось небольшое увеличение биомассы клеток (рис. 2г). 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 (рис. 1а, 1г и рис. 2а, 2г).

Содержание стильбенов в культуре клеток винограда V7 при добавлении биопрепаратов на основе эндофитов. После добавления в 7-суточную суспензию клеток винограда V7 биопрепаратов на основе эндофитов через 3 и 7 сут 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 сут общее содержание стильбенов увеличивалось в 1.3–1.5 раза относительно контроля (рис. 1б). Культивирование клеток винограда в течение 7 сут совместно с биопрепаратами на основе бактерий *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp. и *Pantoea* sp. увеличивало общее содержание стильбенов в 1.7–2.6 раза относительно контроля (рис. 1д).

При 3-суточном культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе отобранных эндофитных грибов достоверно увеличивалось общее содержания стильбенов в пределах

Таблица 1. Характеристики бактерий и грибов на основе последовательностей генов *16S* рПНК (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	Процент идентичности
1	<i>16S</i> рПНК	<i>Agrobacterium</i> (MZ424738)	<i>Agrobacterium rubi</i> (MN752429.1)	99.17%
2	<i>16S</i> рПНК	<i>Bacillus</i> (MZ424739)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (KU179338.1)	100%
3	<i>16S</i> рПНК	<i>Curtobacterium</i> (MZ424740)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AJ310414.1)	100%
4	<i>16S</i> рПНК	<i>Erwinia</i> (MZ424741)	<i>Erwinia billingiae</i> (KM408608.1)	100%
5	<i>16S</i> рПНК	<i>Pantoea</i> (MZ424742)	<i>Pantoea agglomerans</i> (MT605813.1)	99.75%
6	<i>16S</i> рПНК	<i>Pseudomonas</i> (MZ424743)	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> (MN813762.1)	99.89%
7	<i>16S</i> рПНК	<i>Xanthomonas</i> (MZ424744)	<i>Xanthomonas campestris</i> (MN108237.1)	99.13%
8	<i>ITS1</i>	<i>Alternaria</i> (MZ427922)	<i>Alternaria tenuissima</i> (KF308883.1)	100%
9	<i>ITS1</i>	<i>Biscogniauxia</i> (MZ427923)	<i>Biscogniauxia maritima</i> (MN341558.1)	100%
10	<i>ITS1</i>	<i>Cladosporium</i> (MZ427924)	<i>Cladosporium perangustum</i> (MT645918.1)	100%
11	<i>ITS1</i>	<i>Didymella</i> (MZ427925)	<i>Didymella negriana</i> (MK100201.1)	100%
12	<i>ITS1</i>	<i>Fusarium</i> (MZ427927)	<i>Fusarium tricinctum</i> (MT446111.1)	100%
13	<i>ITS1</i>	<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 специализированной программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), используя алгоритм Nucleotide Blast (nucleotide – nucleotide BLAST) [12].

1.5–3.5 раза во всех анализируемых образцах. Максимальное содержание стильбенов было определено при культивировании клеток винограда в течение 3 сут с биопрепаратами на основе *Fusarium* sp. (20 мг) и *Trichoderma* sp. (10 мг) – 2.68 и 3.07 мг/г сухой биомассы клеток V7 соответственно (рис. 2б). Культивирование с биопрепаратами на основе *Biscogniauxia* sp. и *Trichoderma* sp. в течение 7 сут увеличивало общее содержание стильбенов в 5.6 и 4.7 раза соответственно (рис. 2д).

Необходимо отметить, что общее содержание стильбенов в контрольной культуре клеток значительно снижалось с увеличением времени культивирования. Максимальное значение в контрольной культуре на 10 сут 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 сут (через 3 сут культивирования с биопрепаратами эндофитов) (рис. 1б, 1д и рис. 2б, 2д).

Результаты анализа показали, что при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе бактерий *Bacillus* sp. и *Erwinia* sp. содержание олигомеров ресвератрола достоверно увеличивалось, а именно *ε*-виниферина в 5.7 и 5.9 раза соответственно, а *δ*-виниферина при добавлении биопрепаратов на основе *Curtobacterium* sp. и *Xanthomonas* sp. в 4 раза (табл. 2). Достоверно увеличивалось содержание *цис*-питеида (в 2.4 раза) при добавлении к культуре клеток

винограда V7 биопрепарата на основе *Pseudomonas* sp. (табл. 2). 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.

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 (табл. 3). Наибольшее увеличение *ε*- и *δ*-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) (табл. 3). При добавлении 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. достоверно увеличивалось содержание *цис*-ресвератрола и достигало 0.03 мг/г (табл. 3). Содержание *цис*-питеида и питеэтанола увеличивалось после обработки биопрепаратами на основе *Alternaria* sp. и *Didymella* sp. (табл. 3).

Продукция стильбенов в культуре клеток винограда после обработки биопрепаратами на основе эндофитов. Анализ влияния биопрепаратов на основе эндофитов на рост биомассы и общее содержание стильбенов в культуре клеток винограда позволил вычислить общую продукцию стильбе-

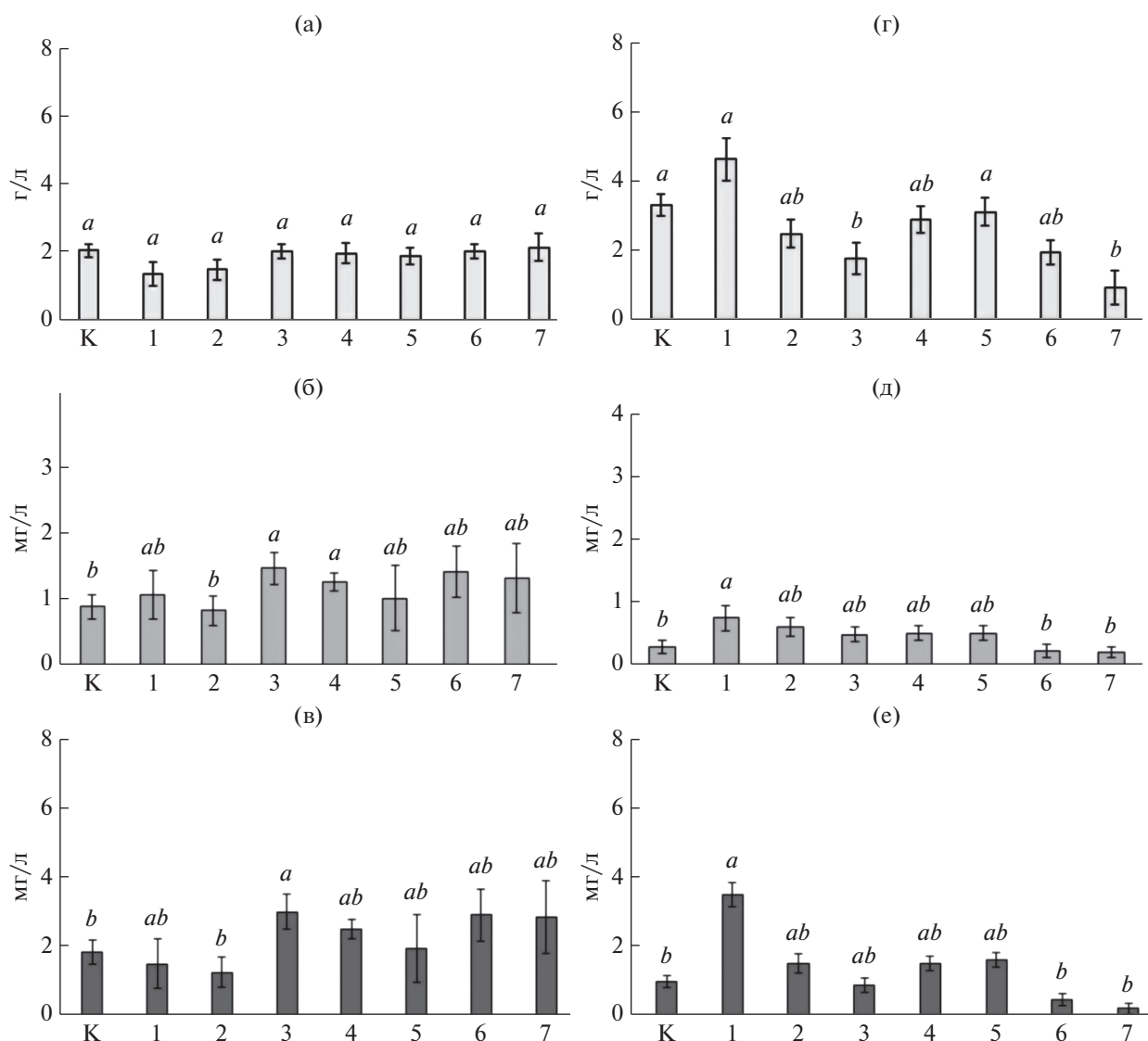


Рис. 1. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сут (г–е) после внесения биопрепаратов на основе эндофитных бактерий: сухая биомасса клеток (а, г, г/л), общее содержание стильбенов (б, д, мг/л) и продуктивность (в, е, мг/г). К – контрольная культура клеток V7 без добавления биопрепаратов, 1 – биопрепарат на основе *Agrobacterium* sp., 2 – *Bacillus* sp., 3 – *Curtobacterium* sp., 4 – *Erwinia* sp., 5 – *Pantoae* sp., 6 – *Pseudomonas* sp., 7 – *Xanthomonas* sp. 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.

нов в клетках винограда V7 на 3 и 7 сут совместно культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий и грибов.

При добавлении биопрепаратов на основе бактерий продукция стильбенов на 3 сут в культуре клеток увеличивалась в 1.3–1.6 раз (рис. 1в), и в 1.5–3.6 раза относительно контроля на 7 сут (рис. 1е). Среди биопрепаратов на основе бактерий самая высокая продукция стильбенов была отмечена при культивировании в течение 3 сут с биопрепаратом на основе *Curtobacterium* sp. – 3.02 мг/л питательной среды (рис. 1в). На 7 сут максимальная продукция стильбенов наблюдалась при вне-

сении 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 (рис. 1е).

Самое высокое значение продукции стильбенов было определено при культивировании клеток винограда V7 с биопрепаратами на основе грибных эндофитов в течение 3 сут. Продукция была выше контрольных значений в 1.4–3.7 раза, что было результатом увеличения содержания стильбенов во всех анализируемых пробах

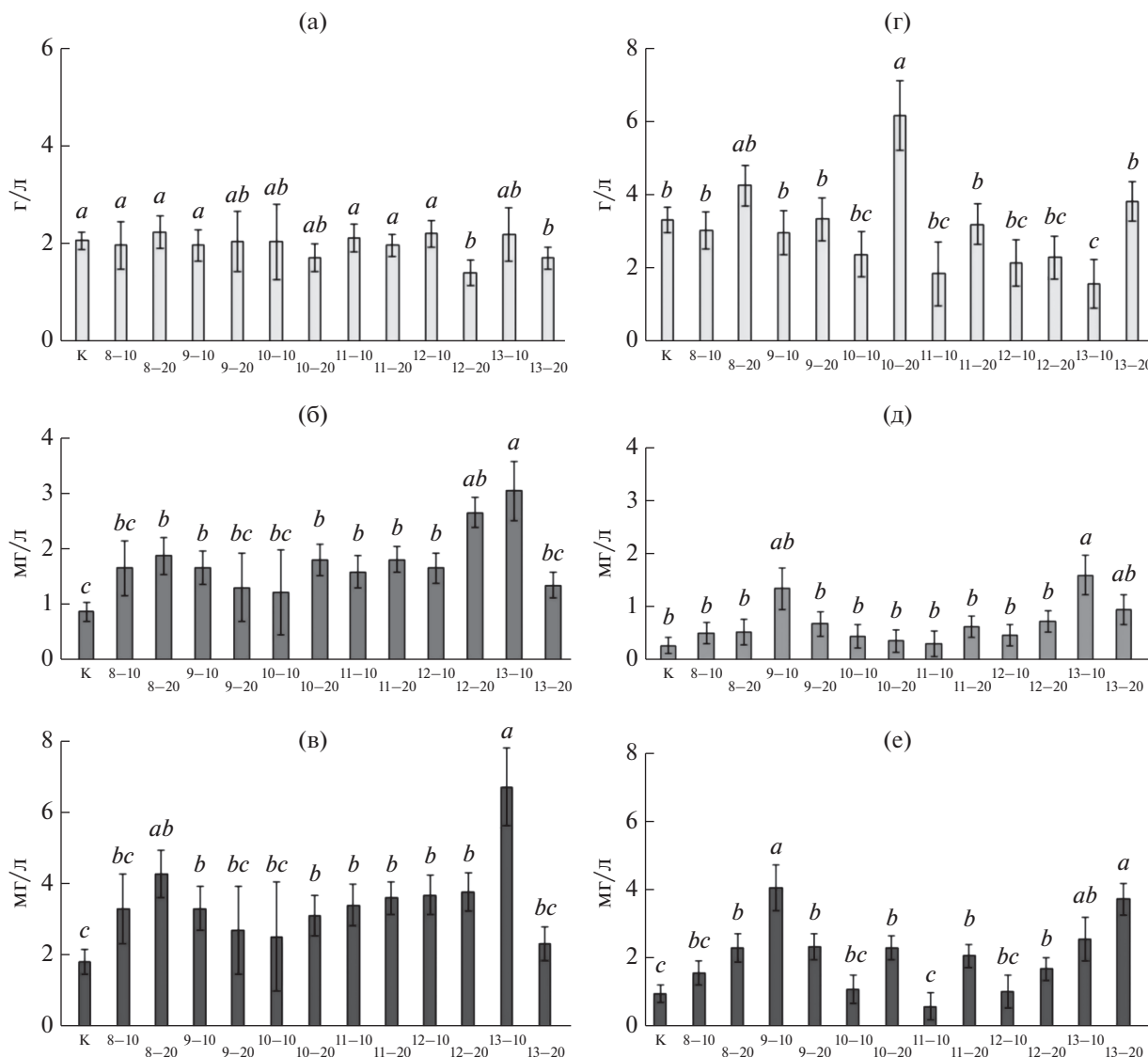


Рис. 2. Характеристика культуры клеток винограда *V. amurensis* V7 на 3 (а–в) и 7 сут (г–е) после воздействия биопрепаратов на основе эндофитных грибов: сухая биомасса (а, г/л), общее содержание стильбенов (б, д, мг/л), продуктивность (в, е, мг/л) клеток суспензионной культуры клеток винограда. К – контроль, культура клеток V7 без добавления биопрепаратов, 8 – биопрепарат на основе *Alternaria* sp., 10 и 20 мг, 9 – *Biscogniauxia* sp., 10 и 20 мг, 10 – *Cladosporium* sp., 10 и 20 мг, 11 – *Didymella* sp., 10 и 20 мг, 12 – *Fusarium* sp., 10 и 20 мг, 13 – *Trichoderma* sp., 10 и 20 мг. 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.

(рис. 2б). Максимальные значения продукции стильбенов в культуре клеток винограда были отмечены на 3 сут 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 (рис. 2в).

Биопрепараты на основе эндофитных грибов на 7 сут культивирования увеличивали продукцию стильбенов в 1.6–4.2 раза относительно контроля. Высокие показатели продукции стильбенов на 7 сут 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 (рис. 2е).

Анализ экспрессии генов *PAL* и *STS* в культуре клеток винограда после обработки биопрепаратами на основе эндофитов. 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

Таблица 2. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 дней культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий (мг/г сухой биомассы)

Стильбен	V7-K	<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Xantomonas</i> sp.
Дигликозид-ресвератрол	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> -Ресвератрол	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
<i>эпсилон</i> -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> -Ресвератрол	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
Пицезтанол	0.002 ± 0.001	0	0	0	0	0	0	0

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, культивированных контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

Таблица 3. Содержание стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* V7 после 3 сут культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных грибов (мг/г сухого веса клеток)

Стильбен	V7-K	<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-ресвератрол	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 ± 0.11	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> -Ресвератрол	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> -Ресвератрол	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
Пицезанол	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

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по сравнению со значениями накопления стильбенов в клетках V7, клетках, культивированных в контрольных условиях без биопрепаратов на основе эндофитов.

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 сут после его внесения (рис. 1б, табл. 2), 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. (рис. 3а). 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. (рис. 3а). 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 (рис. 3а). 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 (рис. 3а).

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. (рис. 3б). 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. (рис. 3б). В то же время, добавление биопрепарата на основе *Agrobacterium* sp. приводило к достоверному ингибированию уровня экспрессии генов *STS2* и *STS3* в клетках винограда (рис. 3б). 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 (рис. 3б).

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 (рис. 3в). 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. (рис. 3в). Уровень экспрессии *STS8* достоверно увеличивался в 9.8–15 раз в клетках винограда при внесении биопрепаратов на основе *Xantomonas* sp. и *Cladosporium* sp. (рис. 3в), а гена *STS9* в 2.7–6.6 раз после культивирования со всеми выбранными биопрепаратами, кроме *Agrobacterium* sp. и *Trichoderma* sp. (рис. 3в). Также во всех анализируемых образцах, кроме клеток обработанных биопрепаратом на основе *Agrobacterium* sp., достоверно увеличивалась экспрессия гена *STS10* – в 6.2–19.7 раз (рис. 3в).

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

*

Изучено влияние биопрепаратов на основе часто встречающихся представителей эндофитных бактерий и грибов дикого винограда *V. amurensis* на рост клеток, содержание и продукцию ресвератрола и его производных в культуре клеток винограда V7. Наибольшее содержание стильбенов, 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*. Максимальное увеличение общего содержания стильбенов наблюдали при добавлении к культуре клеток винограда V7 10 мг биопрепарата *Trichoderma* sp., при этом наблюдалась самая сильная активация гена *STS7*, отвечающего за сверхпродукцию стильбенов [25]. Общее содержание стильбенов достигало 3.07 мг/г (или 0.3%) сухой биомассы клеток. Это увеличение, по-видимому, связано с активацией биосинтеза олигомеров *транс*-ресвератрола, виниферинов являющейся защитной реакцией как на внедрение бактериальных, так и грибных патогенов [26, 27]. Вещества в составе биопрепаратов, вносимые в культуру клеток винограда, выступают в качестве имитаторов природных эндофитов, вызывая при этом быстрый иммунный ответ растительных клеток.

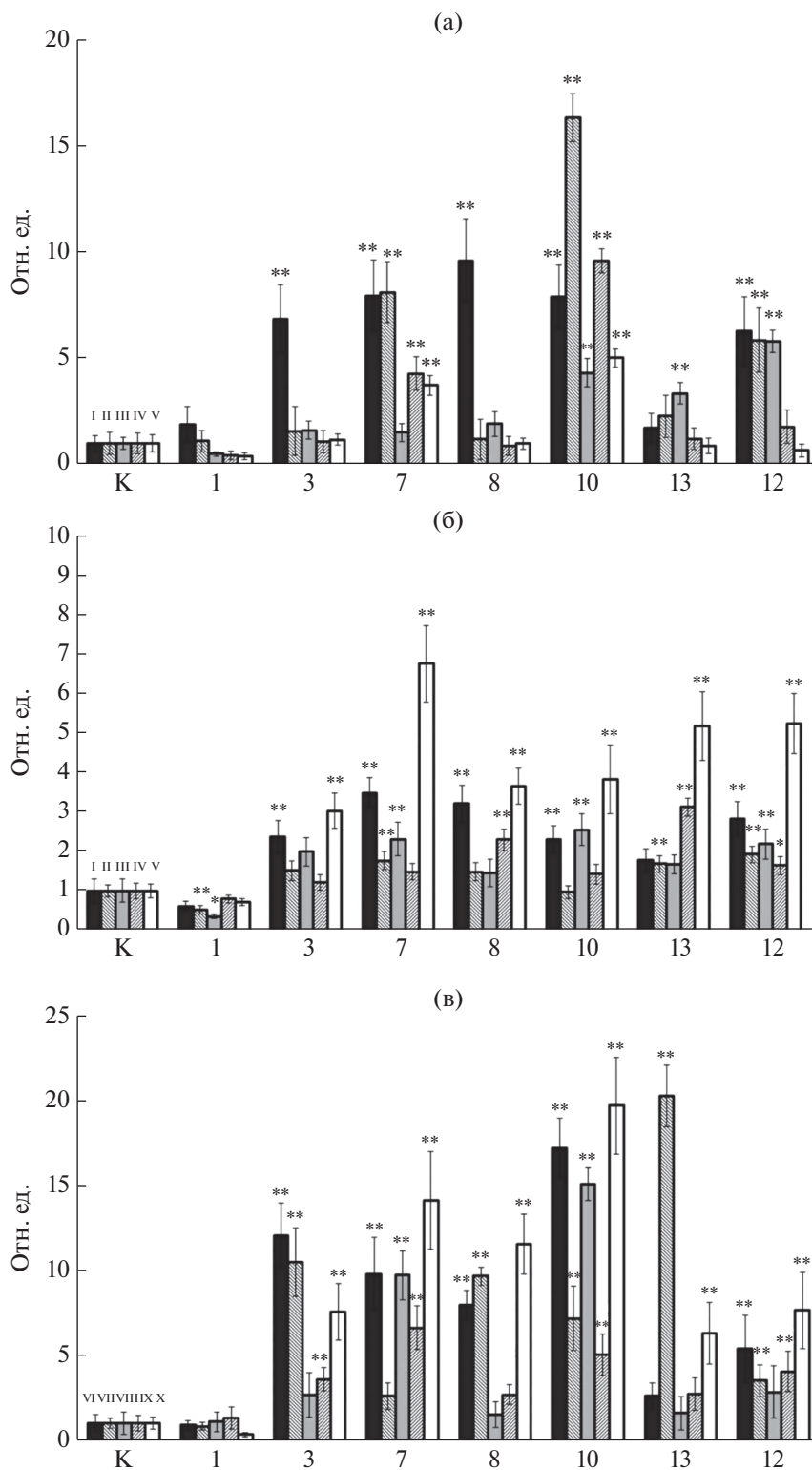


Рис. 3. Уровень экспрессии (отн. ед.) генов *PAL* (а) и *STS* (б, в) в культуре клеток винограда *V. amurensis* V7 после 3 сут культивирования с биопрепаратами на основе эндофитных бактерий: 1 – *Agrobacterium* sp., 3 – *Curtobacterium* sp., 7 – *Xantomonas* sp. и грибами 8 – *Alternaria* sp., 10 – *Cladosporium* sp., 13 – *Trichoderma* sp., и 12 – *Fusarium* sp. К – контроль, культура клеток винограда V7 без биопрепаратов. *PAL1-5*(а) – I–V; *STS1-5*(б) – I–V; *STS6-10*(в) – VI–X соответственно. 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.

Важно отметить, что полученный уровень стильбенов после добавления новых биопрепаратов соизмерим 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 [28]. 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 [29]. В суспензионной культуре клеток *Vitis vinifera* уровень стильбенов составлял 2.1 мг/г сухой биомассы клеток через 2 сут после обработки УФ-С и 100 мкМ метилжасмонатом (MeJa) [30].

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) [20, 31]. 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 [32, 33]. При использовании этих индуцирующих агентов содержание только *транс*-ресвератрола в культуре клеток *V. vinifera* достигало 35–155 мг/г от сухой биомассы клеток [32, 33].

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 *Curto-bacterium* 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 [12]. 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 [12]. В то же время стимуляция биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда при помощи живых эндофитов осложняется тем, что скорость роста бактерий и грибов в значительной мере выше, чем культуры клеток винограда. Использовании живого эндофитного гриба *Trichoderma* sp. для стимуляции биосинтеза стильбенов приводило к увеличению общего содержания стильбенов до 3.9 мг/г [12], 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.

Использование биопрепаратов на основе эндофитов винограда *V. amurensis*, в частности 10 мг биопрепарата на основе *Trichoderma* sp., для стимуляции биосинтеза стильбенов может стать эффективным, дешевым и быстрым способом увеличения продукции ресвератрола.

* * *

Биопрепараты на основе природных эндофитов винограда *V. amurensis* являются новыми природными активаторами биосинтеза стильбенов, которые можно применять для промышленного производства стильбенов в культуре клеток винограда, в частности виниферинов. Наиболее перспективным оказалось применение биопрепарата на основе *Trichoderma* sp. в концентрации 10 мг на 50 мл культуры клеток винограда, которое увеличивало содержание стильбенов до 3.07 мг/г сухой биомассы клеток и продукцию стильбенов до 6.8 мг/л питательной среды. Разработка и активное применение таких подходов позволит способствовать переходу к высокопродуктивному и экологически чистому сельскому хозяйству.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-74-00002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. // Plant Sci. 2009. V. 177. P. 143–155.
2. Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. P. 417–425.
3. Suwalsky M., Villena F., Gallardo M.J. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2015. V. 1848. P. 76–82.
4. Jeandet P., Douillt-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 2731–2741.
5. Nair D. N. and Padmavathy S. // Hindawi Pub. Corp. The Sci. W. J. 2014. Article ID 250693. <https://doi.org/10.1155/2014/250693>
6. Huang L.H., Yuan M.Q., Ao X.J., Ren A.Y., Zhang H.B., Yang M.Z. // PLoS ONE. 2018. V. 13. № 5. P. e0196996 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196996>
7. Yang M.Z., Huang L.H., Ao X.J., Ren A.Y., Yuan M.Q. and Zhang H.B. // J. Plant Biol. 2018. V. 61. P. 210–216.
8. Ramirez-Suero M., Bénard-Gellon M., Chong J., Laloue H., Stempien E., Abou-Mansour E., et al. // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 1417–1426.
9. Yu M., Chen J.C., Qu J.Z., Liu F., Zhou M., Ma Y.M. et al. // Plant Physiol. Biochem. 2020. V. 149. P. 144–152.
10. Chen Q., Diao L., Song H., Zhu X. // Phytomedicine. 2018. V. 49. P. 111–122.

11. Wang Yi., Xin H., Fan P., Zhang J., Liu Y., Dong Y. et al. // The Plant Journal. 2021. V. 105. P. 1495–1506.
12. Aleynova O.A., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // Plants. 2021. V. 10. P. 1276. <https://doi.org/10.3390/plants10071276>
13. Reasoner D.J., Geldreich E.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. № 1. P. 1–7.
14. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Karetin Y.A. // Plant Cell Rep. 2015. V. 34. P. 311–320.
15. Lane D.J. 16S/23S rRNA Sequencing/ Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. / E. Stackebrandt, M. Goodfellow. New York, NY, USA: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
16. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Inc.: Acad. Press, 1990. P. 315–322.
17. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Molecul. Biology. 1990. V. 3. P. 403–410.
18. Tyunin A.P., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2019. V. 136. P. 189–196.
19. Suprun A.R., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Biotechnol. Appl. Biochem. 2020. V. 67. P. 234–239.
20. Kiselev K.V., Aleynova O.A., Grigorchuk V.P.; Dubrovina A.S. // Planta. 2017. V. 245. P. 151–159.
21. Киселев К.В., Шумакова О.А., Маняхин А.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. С. 61–66.
22. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A. // J. Plant Physiol. 2015. V. 185. P. 1–12.
23. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
24. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1427–1436.
25. Aleynova O.A., Grigorchuk V.P., Dubrovina A.S., Rybin V.G., Kiselev K.V. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2016. V. 125. P. 329–339.
26. Yadav M.K., Mailar K., Nagarajappa M. J., Chae S.W., Song J.J. and Choi W.J. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 890. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00890>
27. Sundin Ch., Zetterström C.E., DuyVo D., Brkljača R., Urban S., Elofsson M. // Scientific Reports. 2020. V. 10. P. 2103. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58872-0>
28. Ku K.L., Chang P.S., Cheng Y.C., Lien C.Y. // J. Agric. Food. Chem. 2005. V. 53. P. 3877–3881.
29. Yang M.H., Kuo C.H., Hsieh W.C., Ku K.L. // J. Agric. Food. Chem. 2010. V. 58. P. 9537–9541.
30. Xu A., Zhan J.Ch., Huang W.D. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2015. V. 122. P. 197–211.
31. Larronde F., Gaudillère J.P., Krisa S., Decendit A., Deffieux G., Mérillon J.M. // Am. J. Enol. Viti. 2003. V. 54. P. 60–63.
32. Belchí-Navarro S., Almagro L., Sabater-Jara A.B., Fernández-Pérez F., Bru R., Pedreño M.A. // J. Plant. Physiol. 2013. V. 170. P. 258–264.
33. Almagro L., Belchi-Navarro S., Martinez-Marquez A., Bru R., Pedreno M.A. // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 97. P. 361–367.

Activation of Stilbene Biosynthesis in Grape Cell Culture Using Supplements Based of Wild Grapes *Vitis amurensis* Rupr. Endophytes

O. A. Aleynova^{a,*}, N. N. Nityagovsky^a, A. R. Suprun^a, and K. V. Kiselev^a

^a Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

A new approach is proposed to increase the production and change the qualitative composition of stilbenes – substances valuable for human health, in grape cell culture using 12 biological supplements based on sterile dried biomass of the endophytic bacteria and fungi of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr. Bacteria supplements did not significantly affect the production of stilbenes, while fungi supplements increased the content of stilbenes by 2–3. 5 times. The maximum increase in the stilbenes total content was when adding a biological product based on *Trichoderma* sp., 3.07 mg/g from dry cell biomass. The increase in resveratrol production when using biologics based on *V. amurensis* endophytes in grape cell culture was due to a significant increase in the expression of the stilbene biosynthesis genes – phenyl-alanine ammonia lyase (*PAL*) and stilbene synthase (*STS*). Thus, biological supplements based on natural endophytes of *V. amurensis* is a promising and environmentally friendly stimulator of stilbene content in grape cell culture, which in the future can serve as a good tool in activating the biosynthesis of stilbene on an industrial scale.

Keywords: bacteria, biological supplements, stilbene biosynthesis, fungi, grape cell culture, resveratrol, stilbenes, stilbene synthase (*STS*), phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), endophytes, *Vitis amurensis*