

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ» (ФГБНУ ВИЗР)

На правах рукописи

ПОЛУЭКТОВА ЕКАТЕРИНА ВИКТОРОВНА

**ФИТОТОКСИЧЕСКИЕ МЕТАБОЛИТЫ**

**ГРИБА *PARAPHOMA SP.* ВИЗР 1.46**

**И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Шифр и наименование специальности: 03.02.12 – микология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: Берестецкий А.О.

кандидат биологических наук

Санкт-Петербург  
2015

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Использование фитотоксинов в борьбе с сорными растениями .....	12
1.2 Вторичные метаболиты грибов рода <i>Phoma</i> Sacc.: структура, активность и практическое значение.....	22
1.2.1 Фитотоксины .....	25
1.2.2 Антимикробные соединения.....	25
1.2.3 Антифунгальные метаболиты.....	26
1.2.4 Микотоксины .....	27
1.2.5 Другие соединения .....	28
1.2.6 Хемосистематика <i>Phoma</i> spp.....	31
1.3 Оптимизация получения биологически активных метаболитов.....	35
1.3.1 Факторы среды, влияющие на образование биологически активных метаболитов.....	35
1.3.2 Анализ биологически активных метаболитов.....	38
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Объекты исследования .....	44
2.2. Методы исследований .....	46
2.2.1 Описание изучаемого штамма.....	46
2.2.2 Определение круга растений-хозяев гриба <i>Paraphoma</i> sp. 1.46.....	46
2.2.3 Оценка патогенных свойств гриба <i>Paraphoma</i> sp. 1.46.....	47
2.2.4 Молекулярная идентификация гриба <i>Paraphoma</i> sp. 1.46 .....	47
2.2.5 Выделение и очистка фитотоксических метаболитов.....	49
2.2.6. Идентификация фитотоксинов .....	52

2.2.7	Характеристика спектра биологической активности фитотоксинов.....	53
2.2.8	Разработка методики анализа феосфериды А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	55
2.2.9	Определение влияния различных факторов на выход феосфериды А....	58
2.2.10	Изучение влияния поверхностно-активных соединений на фитотоксическую активность феосфериды А.....	62
2.2.11	Изучение физиологического действия феосфериды А на растительную клетку.....	65
2.2.12	Статистический анализ данных .....	67
3	ОПИСАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБА-ПРОДУЦЕНТА.....	68
3.1.1	Молекулярно-филогенетическая характеристика штамма .....	68
3.1.2	Описание морфолого-культуральных характеристик штамма .....	72
3.2	Оценка патогенных свойств гриба <i>Paraphoma</i> sp. 1.46.....	75
3.2.1	Определение круга растений-хозяев <i>Paraphoma</i> sp. 1.46 .....	75
3.2.2	Оценка патогенных свойств <i>Paraphoma</i> sp. 1.46 <i>in vitro</i> .....	77
4	ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОТОКСИНОВ ГРИБА.....	79
4.1	Выделение и идентификация фитотоксина из экстракта культурального фильтрата .....	79
4.2	Выделение и идентификация фитотоксина из экстракта твердофазной культуры гриба .....	81
5	БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТОТОКСИНОВ.....	84
5.1	Изучение фитотоксических свойств выделенных метаболитов.....	84
5.1.1	Фитотоксическая активность на листовых дисках .....	84
5.1.2	Влияние фитотоксинов на рост корней .....	86
5.2	Оценка токсичности в отношении инфузорий.....	87

5.3 Антимикробная активность.....	88
6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЫХОД ФЕОСФЕРИДА А.....	94
6.1 Анализ феосфериды А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	94
6.2 Влияние условий освещения на образование феосфериды А.....	99
6.3 Влияние соотношения массы субстрата к объёму сосуда .....	103
6.4 Влияние состава субстрата на образование феосфериды А.....	105
7 ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕОСФЕРИДА А В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ.....	108
7.1 Действие на проницаемость мембран растительной клетки .....	108
7.2 Действие на концентрацию фотосинтетических пигментов .....	110
7.3 Действие на митотическую активность меристематических тканей.....	114
8 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕОСФЕРИДА А.....	117
8.1 Влияние поверхностно-активных соединений на фитотоксическую активность феосфериды А.....	117
8.2 Оценка гербицидной активности экстракта твердофазной культуры гриба на растениях бодяка полевого.....	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	126
ВЫВОДЫ .....	127
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	153

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Данная диссертационная работа посвящена проблеме поиска природных соединений, обладающих оригинальной структурой и перспективных для дальнейшего исследования.

Известно, что современные гербициды должны быть эффективны в отношении целевых объектов и не обладать сторонней активностью, их период разложения не должен превышать один вегетационный период (Мельников, 1987).

Появление устойчивости у сорных растений к гербицидам снижает их эффективность (Dayan, Duke, 2014; Amusa, 2006). Это происходит в связи с тем, что действие большей части применяемых гербицидных препаратов направлено на ограниченный набор мишеней в растительных клетках (Klausener et al., 2007). За период последних более чем 20 лет, не было введено гербицидов с новыми сайтами действия, а на территории Российской Федерации не было разработано собственных новых гербицидных препаратов (Duke, 2012; Куликова, Лебедева, 2010). В связи с этим, поиск активных химических структур гербицидных веществ, обладающих новыми механизмами действия и экологически безопасных для нецелевых объектов окружающей среды остаётся актуальной задачей для создания гербицидов.

Природные фитотоксины могут служить прототипами гербицидных веществ, безопасных для человека и нецелевых объектов окружающей среды и действующих на оригинальные мишени в растительных клетках (Duke et al., 2000; Mobius, Hertweck, 2009). В настоящее время известны коммерческие препараты, созданные на основе синтетических аналогов природных фитотоксинов, такие как гербициды трикетоновой группы и глюфосинат (Mitchell, 2001; Omura et al., 1984). Некоторые фитотоксины возможно использовать для повышения

эффективности химических и биологических гербицидов (Duke, Dayan, 2011; Vurro, 2001).

Фитопатогенные грибы являются наиболее изученными продуцентами фитотоксических соединений (Берестецкий, 2008). Так, грибы рода *Phoma* образуют вторичные метаболиты широкого спектра биологической активности, среди которых есть гербицидные соединения, перспективные для практического использования (Полуэктова, Берестецкий, 2013). На основе мицелия гриба *Ph. macrostoma* Mont. и его экстрактов запатентован способ получения препарата для борьбы с двудольными сорными растениями (Bailey, Derby, 2010). Гербарумин, метаболит *Ph. herbarum*, в низкой концентрации ингибирует прорастание некоторых сорных растений (Rivero-Cruz et al., 2000).

Гриб *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46 (ранее *Phoma sanguinolenta* 19) был выделен из поражённых листьев бодяка полевого и отобран в результате скрининга грибов-продуцентов фитотоксинов. Показано, что гриб образует фитотоксические метаболиты при культивировании на жидких и твёрдых питательных субстратах (Берестецкий, Курленя, 2014).

**Степень разработанности проблемы.** Первыми микробными метаболитами, нашедшими коммерческое применение в качестве гербицидных препаратов, были анизомицин и глюфосинат, образуемые некоторыми видами *Streptomyces* spp. На основе химической структуры анизомицина был создан гербицид НК-049. Глюфосинат – фитотоксичный метаболит *S. hygrosopicus*, *S. viridichromogenes* является прогербицидом, который переходит в L-фосфинотрицин в клетках восприимчивых растений. На его основе были созданы гербицидные препараты – «Биалафос» и «Баста» (Duke, Lydon, 1987).

На основе цинметилина – аналога природного циниола был разработан препарат для борьбы с однодольными сорными растениями на плантациях риса (Grayson et al., 1987). Соединение ингибировало меристематический рост корней чувствительных к нему растений, и в связи с этим могло использоваться для

довсходовой обработки различных культур. К преимуществам препарата относились также возможность использования в широком диапазоне климатических условий с относительно низкой нормой расхода 25-100 г/га, быстрое разложение в почве и низкий уровень токсичности для человека и животных (Grayson et al., 1987).

Известно о группе трикетоновых гербицидов, действующее вещество которых является производным лептоспермона, фитотоксичного метаболита растений рода *Callistemon*. Эта группа препаратов воздействовала на новую мишень в растительной клетке - р-гидроксифенилпируват диоксигеназу (ГФПДГ) – ключевой фермент в биосинтезе хинонов и токоферолов. Эффект воздействия данных гербицидов вызывает недостаток пластохинонов, приводящий к резкому снижению содержания каротиноидов и осветлению тканей. Этот фермент и в настоящее время считается перспективной мишенью для разработки новых гербицидов (Wu, 2011).

Известно о совместном применении некоторых природных фитотоксинов с гербицидами. Так, гидантоцидин – метаболит *S. hygroscopicus* (Duke, Dayan, 2011) применяется совместно с гербицидными препаратами химического происхождения для усиления их действия. Использование фитотоксинов транс-4-амино-D-пролина и аскаулитоксина совместно с микогербицидом на основе конидиального инокулюма *Ascochyta caulina*, позволяет повысить эффективность препарата на 30% (Vurro et al., 2001).

Известно о средствах с гербицидной активностью, созданных на основе грубых экстрактов из мицелия фитопатогенных грибов. Так, запатентован гербицидный состав на основе экстракта мицелия *Phoma macrostoma* для борьбы с двудольными сорными растениями (Bailey, Derby, 2008).

Развитие гербицидных препаратов на основе природных соединений связано с пополнением информации о вторичных метаболитах различных

организмов, изучением спектра их биологической активности и механизмов действия.

**Цель работы** – идентификация, разработка способа получения и определение перспектив практического использования фитотоксинов, образуемых грибом *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Изучить морфолого-культуральные и патогенные свойства микромицета, провести его идентификацию при помощи молекулярно-филогенетических методов.
2. Выделить и идентифицировать индивидуальные фитотоксические метаболиты гриба.
3. Изучить спектр и степень биологической активности выделенных фитотоксинов, образуемых *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46.
4. Разработать методику определения содержания наиболее активного фитотоксина в различных питательных субстратах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.
5. Определить влияние различных факторов на выход фитотоксина при твердофазном культивировании гриба.
6. Изучить влияние наиболее активного фитотоксина на физиологическое состояние растительной клетки.
7. Определить влияние поверхностно-активных веществ на гербицидную активность наиболее фитотоксичного соединения.

**Научная новизна.** На основе комплекса морфолого-культуральных свойств, патогенности и молекулярно-филогенетических данных, исследуемый гриб отнесён к роду *Paraphoma* и охарактеризован как новый патоген бодяка



полевого. Впервые у представителя рода *Paraphoma* обнаружены курвулин и феосферид А. Установлено, что феосферид А обладает фитотоксической активностью, но не проявляет антимикробных свойств. Разработана методика его количественного анализа в зерновых субстратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Показана способность коммерческих адъювантов (например, Хастен) существенно повышать гербицидную активность феосферид А.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Гриб *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46 охарактеризован как новый продуцент феосферид А. Проведено изучение спектра биологической активности выделенного соединения.

Разработан способ получения феосферид А при помощи твердофазной ферментации. Поданы заявки на патенты РФ «Штамм-продуцент феосферид А» (№ гос. рег. 2015140209) и «Способ получения состава с гербицидной активностью» (№ гос. рег. 2015140786).

Для повышения гербицидной активности феосферид А предложен способ его совместного применения с адъювантами.

**Апробация работы.** Материалы диссертации опубликованы в 9 научных работах. Результаты работы были представлены на нескольких Российских и Международных конференциях: 3-й Съезд Микологов России, Москва, 2012 г; II (X) Международной Ботанической Конференции молодых учёных Санкт-Петербург, 2012 г; Новые методы аналитической химии. Первая зимняя молодёжная школа-конференция с международным участием, Санкт-Петербург, 2013 г; 7 th World Congress on Allelopathy. Complex Interactions in a Changing Climate, Vigo (Spain), 2014 г; 3-й Микологический форум, Москва, 2015 г.

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, восьми глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована

29 рисунками и 18 таблицами. Библиография включает 209 источников, из них 169 на иностранном языке.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Гриб *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46 – патоген бодяка полевого и продуцент курвулина и феосферид А.
2. Фитотоксин феосферид А не обладает селективностью и антимикробными свойствами и слаботоксичен для инфузорий *Paramecium caudatum*.
3. Гриб *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46 при твердофазном культивировании способен образовывать феосферид А с высоким выходом (до 1.9 г/кг).
4. Гербицидная активность феосферид А и содержащих его экстрактов может быть существенно повышена при совместном применении с адьювантами.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, заведующему лабораторией фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР, кандидату биологических наук, Берестецкому Александру Олеговичу за неоценимую помощь в проведении исследований, внимание к работе, мудрость, терпение и поддержку. Особую благодарность автор выражает Токареву Юрию Сергеевичу, Сокорновой Софье Валерьевне, Казарцеву Игорю Александровичу и Ганнибалу Филиппу Борисовичу за помощь в освоении молекулярных методов идентификации грибов; автор благодарит Захарова Валентина Ивановича, Власова Петра Сергеевича, Комарову Анну Сергеевну, Чистого Леонида Сергеевича, Кочуру Дмитрия Михайловича, Фролову Галину Михайловну за помощь в определении структуры соединений; автор выражает благодарность Бойковой Ирине Васильевне, Маханьковой Татьяне Андреевне, Новиковой Ирине Игоревне, Леднёву Георгию Рэмовичу за большое внимание к работе и ценные замечания. Автор благодарит аспирантку ВИЗР Далинову Анну Александровну за помощь и поддержку.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Использование фитотоксинов в борьбе с сорными растениями

Сорные растения являются постоянным компонентом агроценозов, сопутствующим возделываемым культурам и приносящим им вред (Баздырев, 2004). Традиционный агротехнический метод борьбы, заключающийся в физическом истреблении сорных растений путем прополки, культивации и боронования почвы неэффективен в условиях интенсификации сельскохозяйственного производства (Ульянова, 2005).

Использование химических гербицидов намного облегчило задачу уничтожения сорняков, но при этом возникло множество новых проблем, таких как загрязнение среды и сельскохозяйственных продуктов, угнетение или гибель полезных растений в результате неполной избирательности гербицидов, гибель пчел и других полезных насекомых-опылителей и энтомофагов, возникновение устойчивости у сорных растений (Ижевский, 1992). Высокий уровень расхода пестицидов неизбежно влечет за собой не только загрязнение внешней среды, но и нарушение сложившихся в процессе эволюции биоценологических связей (Клинцаре, 1983).

Другая проблема, возникшая в результате применения химических средств защиты растений, связана с возникновением популяций сорных растений, устойчивых к многочисленным сайтам действия гербицидов. Её временным решением стало применение устойчивых к гербицидам культур растений. Введение трансгенных культур получило особенное распространение в США и Канаде в середине 1990-х годов, и проводилось с целью снижения нормы расхода гербицидных препаратов (Shaner, Beckie, 2014). Однако уже спустя 4 года после введения глифосат-устойчивых культур, 11 из 21 видов растений потеряли устойчивость (Неар, 2013). Ситуация существенно усложнена тем, что за период

последних более чем 20 лет, не было введено гербицидов с новыми сайтами действия в растительной клетке (Duke, 2012).

Отрицательные последствия применения гербицидов, невозможность их использования в органическом земледелии побуждают искать менее опасные для окружающей среды способы борьбы с сорной растительностью (Грапов, Козлов, 2003). Биологический метод борьбы с сорными растениями с помощью фитопатогенных грибов и их метаболитов – одно из перспективных направлений в защите растений, особенно в отношении таких широко распространенных и трудноискоренимых сорняков, как осот полевой, бодяк полевой, вьюнок полевой, марь белая и другие. На их основе могут быть созданы новые экологически малоопасные гербициды, предложены рациональные приемы использования их в системах интегрированной защиты (Хлопцева, 1996; Левитин, 2000).

Интерес к фитопатогенным грибам как биологическим агентам контроля сорной растительности обусловлен тем, что многие их виды узко специализированы, быстро распространяются в пространстве, не влияют на теплокровных животных и человека, легко поддаются воспроизводству, накоплению и хранению. Кроме того, они могут быть продуцентами веществ, обладающих гербицидными свойствами. На основании этих особенностей строится стратегия использования фитопатогенных грибов – внесение в агроценоз в виде живых культур или создание препаратов на основе их метаболитов (Burges, 1998; Левитин 2000).

В настоящее время на основе некоторых видов грибов налажен промышленный выпуск микогербицидов. Так, в США более 15-ти лет выпускаются микогербициды DeVine и Collego, которые по эффективности не уступают химическим препаратам – средняя гибель сорняков составляет 90-98% (Burges, 1998; Auld, McRae, 1997).

В основе другого направления использования фитопатогенных грибов лежит их способность образовывать фитотоксины. Фитотоксины (ФТ) –

преимущественно низкомолекулярные вторичные метаболиты различных организмов (грибов, бактерий, растений и некоторых насекомых-фитофагов), способные проявлять фитотоксичность в низких концентрациях ( $<10^{-3}$  М). Симптомы действия ФТ на растения выражаются в их увядании или общем угнетении роста, а также в хлорозах, некрозах и пятнистостях их надземных частей (Берестецкий, 2008). Многие низкомолекулярные ФТ фитопатогенных грибов играют ключевую роль в проявлении первичной инфекции, развитии симптомов заболевания и вирулентности продуцента. За последние несколько лет было изучено большое количество новых факторов вирулентности фитопатогенных грибов и определены их механизмы действия (Mobius, Hertweck, 2009).

Некоторые ФТ в пределах одного рода или вида фитопатогенных грибов являются хозяино-специфичными и определяют круг растений-хозяев для гриба-продуцента, воздействуя на специфичные ферменты или пути метаболизма. Такие ФТ вызывают патогенные свойства только на определённых видах растений, в которых есть гены – сайты прямого или косвенного действия токсинов (Friesen et al., 2008). Известно, что многие грибы – продуценты специфичных ФТ (*Alternaria*, *Cochliobolus*, *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Ascochyta*, *Pyrenophora*) принадлежат к порядку *Pleosporales* и имеют тенденцию к горизонтальному переносу генов (Mobius, Hertweck, 2009; Oliver, Solomon, 2008).

Кроме того, по мнению некоторых авторов, ФТ служат для взаимодействия микроорганизма-продуцента с другими организмами (Macías, 2008). В результате такого взаимодействия появляются новые пути биосинтеза метаболитов и образуется большое число биологически активных соединений разнообразных по структуре (Duke et al., 2002; Dayan, Duke, 2014).

В 2005-м году число вторичных метаболитов с установленной структурой составило около 200 тысяч веществ, при этом предполагается, что существует ещё большее число неизвестных новых соединений (Tulp, Bohlin, 2005). Лишь у

небольшой части этих метаболитов оценена фитотоксическая активность, для ещё меньшей доли соединений известны механизмы действия (Dayan, Duke, 2014). В то время как коммерческие гербициды имеют около 20-ти различных механизмов действия (Duke, 2012), по мнению многих авторов, предполагаемое число механизмов действия природных фитотоксинов значительно больше (Dayan, Duke, 2014).

ФТ могут воздействовать на многочисленные мишени в клетках растений, изменять экспрессию генов, вызывать разрушение мембран, ингибировать действие различных ферментов и таким образом нарушать биосинтез необходимых метаболитов (Mobius, Hertweck, 2009).

Интересным примером ФТ, действующих на ферменты растений является 5-метилтриптофан (рисунок 1.1), индольное соединение, выделенное из плодовых тел и мицелия гриба *Catharellus cibarius* (Muszynska et al., 2013). Этот фитотоксин является ингибитором фермента триптофансинтазы, который встречается только в клетках растений, поэтому этот сайт действия представляется перспективным для развития коммерческого препарата (Dayan, Duke, 2014).

Действие некоторых ФТ вызывает нарушения в энергетическом обмене клетки. Тентоксин (рисунок 1.2) – циклический тетрапептид, образуемый фитопатогенным грибом *Alternaria tenuissima*, ингибирует развитие хлоропластов за счёт прямого воздействия на фермент CF1 АТФ-аза (Saad et al., 1970, Dayan, Duke, 2014). Это соединение обладает селективной гербицидной активностью и особенности его уникальной структуры рассматриваются в различных программах комбинаторного синтеза (Jimenez et al., 2003).

Необычными свойствами обладают фитотоксические метаболиты – структурные аналоги циперина (рисунок 1.3), продуцентами которых являются многие виды фитопатогенных грибов. Гербициды подобной структуры, например, лактофен, известны как ингибиторы протопорфириноген оксидазы, их действие разобщает процесс фотосинтеза, и является светозависимым. В отличие от

известных структурных аналогов, действие циперина направлено на фермент еноилредуктазу, в результате чего нарушается биосинтез липидов и происходит разрушение мембран, при этом действие соединения не зависит от наличия света (Dayan et al., 2008).

Другими примерами фитотоксинов, ингибирующих ферменты, ответственные за биосинтез липидов, являются фумонизины (*Fusarium* spp.) (рисунок 1.4) и AAL-токсин (*Alternaria alternata*) (рисунок 1.5). Эти соединения действуют как аналоги сфингозинов и ингибируют ферменты сфинганин-N-ацетилтрансферазу и керамидсинтазу. В таких условиях нарушается биосинтез липидов, что приводит к нарушению упорядоченной структуры мембраны и повышает её проницаемость (Mobius, 2009).

Прегельминтоспорол – фитотоксический метаболит *Bipolaris sorokiniana* (рисунок 1.6), является ингибитором  $H^+$  – АТФ-азы плазматической мембраны. Действие ФТ вызывает нарушение минерального питания растения, и вызывает негативные последствия в процессах его дыхания и фотосинтеза (Olbe et al., 1995; Dayan, Duke, 2014).

Фузикоцин (рисунок 1.7) – известный фитотоксичный метаболит гриба *Fusicoccum amigdale* вызывает увеличение проницаемости мембран клеток, что провоцирует усиленное растяжение клеток, нарушение транспирации и открытие устьиц (Cleland, 1976; Dayan, Duke, 2014).

Некоторые ФТ вызывают нарушения гормональной регуляции в растении. Так, многие фитопатогенные грибы образуют соединения, которые имитируют действие гормонов растений, вызывая угнетение их роста и развития. Такие виды как *Ustilago maydis*, *Trichoderma* spp., *Moniliophthora perniciosa* в больших количествах образуют ауксин – индолил-3-уксусную кислоту, избыток которого приводит к разрушению клеток растений из-за образования активных форм кислорода (Boelker, 2008). Возбудитель болезни риса «баканоз», гриб *Gibberella fujikuroi*, является продуцентом гиббереллинов (рисунок 1.8) – гормонов роста



растений. Эти вещества рассматриваются как потенциальные регуляторы роста растений (Dayan, Duke, 2014).

Известно о фитотоксинах, которые являются индукторами апоптоза в клетках растений. Например, викторин – циклический пентапептид, продуцентом которого является гриб *Cochliobolus victoriae* – возбудитель ожога овса. Попадая в митохондрии, токсин связывается с белком митохондриального матрикса, в результате чего происходит окисление липидов и ингибируется процесс дыхания в клетках растений (Mobius, Hertwick, 2009).

Некоторые фитотоксины являются фотосенсибилизаторами, действуют на специфичные белки, разобщая их нормальное функционирование. В результате этого эффекта, под действием света образуются активные формы кислорода, приводящие к разрушению липидов мембран и последующему апоптозу клетки. Такой механизм действия наблюдается у некоторых соединений, имеющих 3,10-дигидрокси-4,9-периленаквихиноновый хромофор, например, церкоспорин (рисунок 1.9) (*Cercospora spp.*) и эльсинохром (*Elsinoe fawcettii*) (Mobius, Hertwick, 2009).

ФТ группы эпиполитиодиоксопиперазинов содержат в своей молекуле характерный ди- и трисульфидный мостик. Эта структурная особенность необходима для воздействия на конъюгацию белков и последующего образования активных форм кислорода в окислительно-восстановительном цикле (Chai, 2000). Наиболее известными соединениями этой группы являются сиродесмин PL (*Leptosphaeria maculans*) и глиотоксин (рисунок 1.10) (*Trichoderma spp.*, *Aspergillus fumigatus*) (Howlett et al., 2001).

В некоторых случаях на основе химической структуры ФТ возможен синтез более стабильных и активных аналогов (Dayan et al., 2012; Cantrell et al., 2012). Лептоспермон (рисунок 2.1) – ФТ растений рода *Callistemon*, действующий на фермент р-гидроксифенилпируват диоксигеназа, необходимый для синтеза хинонов и токоферолов в растительной клетке (Duke, Dayan, 2011). Коммерческий

аналог лептоспермона – сулкотрион (рисунок 2.2), является первым представителем гербицидов трикетоновой группы (Mitchell, 2001). Другим примером служит глюфосинат (рисунок 2.3), производное фосфинотрицина, продукта деградации биолафоса (*Streptomyces viridochromogenes*, *S. hygrosopicus*). Препарат на его основе зарегистрирован под названием "Баста" и используется как гербицид сплошного действия и десикант в Японии и Германии (Omura et al., 1984; Duke, Dayan, 2011).

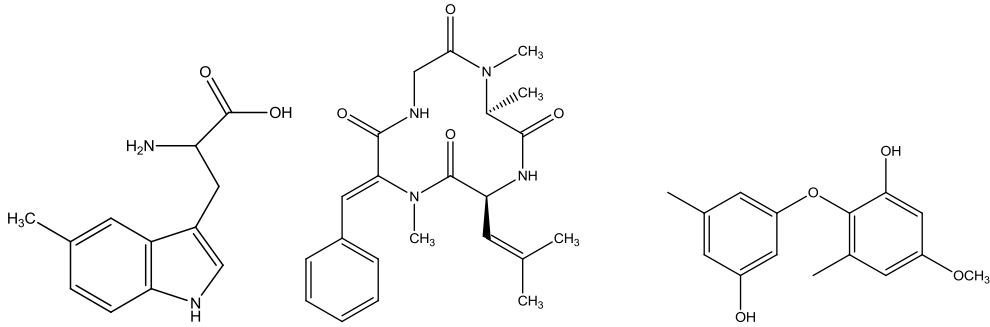
Для некоторых природных соединений возможно получить структурные аналоги, необходимые для изучения взаимосвязи химической структуры и биологической активности (Petroski, Stanley, 2009). Некоторые природные соединения могут стать прототипом, основой для коммерческого препарата. В настоящее время этот подход поддерживается повышением уровня инвестиционных вложений в комбинаторный химический синтез и широкомасштабный скрининг соединений (Pillmoor, 1998).

Так, известно, что макулозин – хозяиноспецифичный метаболит *A. alternate* рассматривается в качестве прототипа для создания экологически безопасного селективного гербицида для борьбы с сорным растением *Centaurea maculosa*. Получено 18 синтетических аналогов этого соединения, многие из которых обладали высокой гербицидной активностью на целых растениях *Centaurea* и перспективны для создания препарата (Bobylev et al., 1996).

Известно о применении некоторых ФТ косвенным путём. Так, гидантоцидин (рисунок 2.4) – фитотоксичный метаболит *S. hygrosopicus* (Duke, Dayan, 2011) применяется совместно с гербицидами химического происхождения для усиления их действия.

В работе M. Virgo изучено влияние одновременного применения некоторых ФТ гриба *Ascochyta caulina* совместно с конидиальным инокулюмом патогена на растениях *Ambrosia artemisiifolia in vitro*. При этом отмечалось более раннее появление и развитие симптомов заболевания. Такой способ использования ФТ

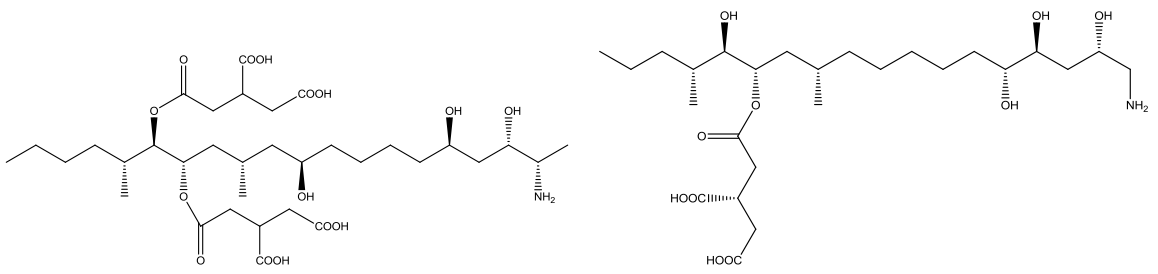
может уменьшить зависимость патогенного организма от природных условий, что расширяет возможности применения микогербицидов (Vurro, 2007).



1

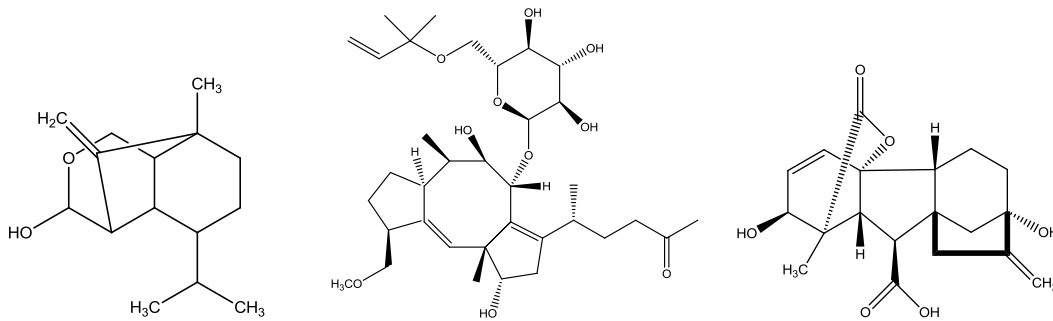
2

3



4

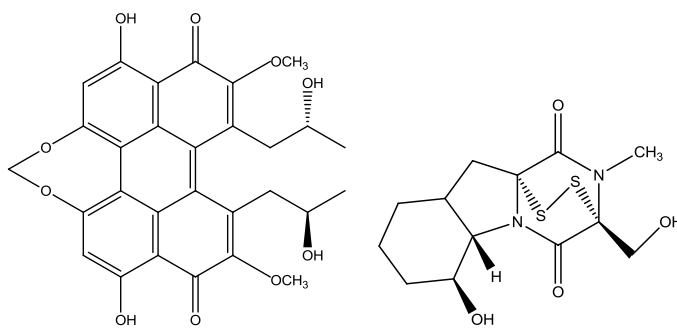
5



6

7

8



9

10

## Рисунок 1 - Структура некоторых фитотоксинов

1 – 5-метилтриптофан; 2 – тентоксин; 3 – циперин; 4 – фумонизин;  
5 – AAL-токсин; 6 – прегельминтоспорол; 7 – фузикоцин; 8 – гиббереллин;  
9 – церкоспорин; 10 – глиотоксин

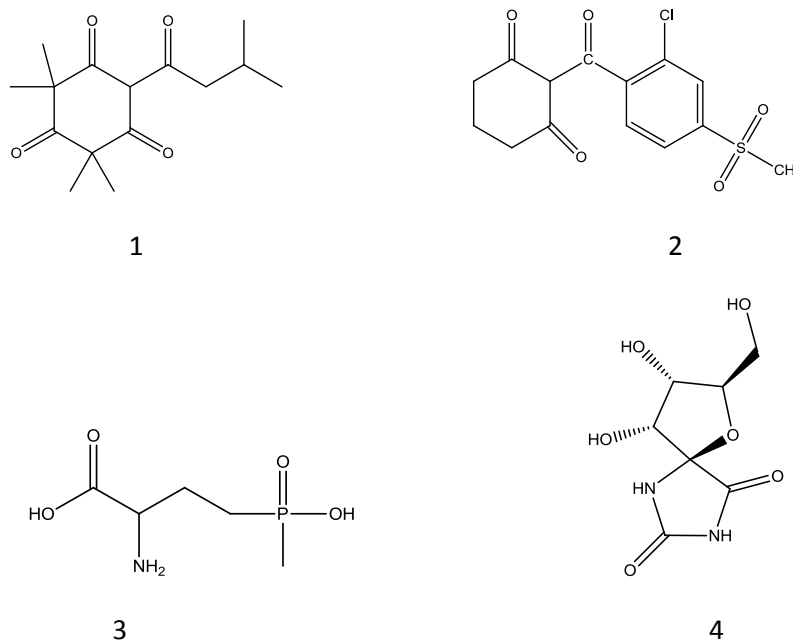


Рисунок 2 – Структуры некоторых природных фитотоксинов и их синтетических аналогов и производных

1 – лептоспермон; 2 – сулкотрион; 3 – глюфосинат; 4 – гидантоцидин

Ещё одно направление использования ФТ - исследование молекулярных мишеней их действия в клетках растений (Dayan, Duke 2000). В свете эволюции устойчивых к гербицидам популяций сорняков, необходимо создание препаратов с новыми механизмами действия (Duke, Owens, Dayan, 2002). Удивительное структурное разнообразие природных фитотоксинов открывает возможности для изучения новых путей биосинтеза и регуляции фитотоксических метаболитов. Исследование механизмов действия ФТ и их связи с вирулентностью гриба-продуцента может предоставить ключевую информацию для объяснения клеточных процессов и, возможно, дать направление для создания и развития новых более эффективных и экологичных способов защиты растений (Mobius, Hertwick, 2009).

Важно отметить, что стремительное развитие науки и технических подходов, возможность и доступность их применения способствует ускорению и упрощению работы по изучению природных соединений. Развитие хроматографических и спектрометрических методов, появление новых реагентов и усовершенствование технологий статистической обработки данных, - всё это способствовало ускорению процесса идентификации структуры соединений в метаболитных комплексах и возможности проведения масштабных скринингов соединений широкого спектра активности (Petroski, Stanley, 2009). По мнению многих авторов, новые усовершенствованные подходы, способствуют установлению преобладающего положения зелёной химии в ближайшем будущем (DeSimone, 2002; Petroski, Stanley, 2009; Mobius, Hertweck, 2009).

В середине 20 века серьезные скрининговые программы велись на основе коллекций фитопатогенных грибов, таких как *Helminthosporium* (Ishibashi, 1961, 1962), *Cercospora* (Assante et al., 1977). В литературе можно встретить обзоры метаболитов фитопатогенных грибов из родов *Alternaria* (Coulombe, 1991), *Ascochyta* (Strange, 1997), *Fusarium* (Билай, 1977), *Colletotrichum* (Garcia-Pajon, Collado, 2003), *Drechslera* (Kachlicki, 1995), *Phomopsis* (Tsantrizos, 1995). В последнее время большое внимание уделяется скринингу биологически активных соединений среди эндофитных и морских видов грибов (Zhang et al., 2006; Schulz et al., 2008).

Грибы рода *Phoma* представляют собой уникальную группу микроорганизмов, в которой могут быть обнаружены почвенные и морские, эндофитные и фитопатогенные виды, биодеструкторы (Aveskamp et al., 2008). Не случайно у большинства изученных видов этого рода выявлены интересные биологически активные метаболиты (Rai et al., 2009).

## 1.2 Вторичные метаболиты грибов рода *Phoma* Sacc.: структура, активность и практическое значение

Вторичные метаболиты грибов рода *Phoma*, обладающие биологической активностью, представлены соединениями из различных классов природных веществ среди которых часто встречаются терпеноиды, поликетиды и полипептиды.

Из алифатических соединений, образуемых грибами этого рода известны производные жирных кислот, например, фомалениевая кислота С (*Phoma* sp.(MF7018, CBS118751)) (рисунок 3.1) (Devys et al, 1984). Среди терпеноидов встречаются сесквитерпены (фомалаирденон А из *Ph. lingam* (Tode) Desm.) (рисунок 3.2), (Pedras et al., 2007), дитерпены (афидиколан-16- $\beta$ -ол из *Ph. betae* A. V. Frank (Oikawa et al., 2001) (рисунок 3.4). Некоторые метаболиты представляют собой азотсодержащие производные терпеноидов (поланразин из *Ph. lingam*) (рисунок 3.3).

Среди метаболитов *Phoma* spp. часто выделяют распространённые вторичные метаболиты с ароматической структурой: фенолы и их производные. В качестве примеров фенольных соединений можно привести фомалон (*P. etheridgei* L. J. Hutchison, Y. Hirats) (Osterhage et al., 2002) (рисунок 3.5) и 2-хлоро-6-гидроксиметилбензол-1,4-диол (*Phoma* sp.) (рисунок 3.6) (Qin et al., 2010). Филлостин (*Ph. sorghina* ((Sacc.) Boerema, Dorenb, Kesteren) (Venkatasubbaiah et al, 1992) (рисунок 3.7) и фомарин (Borges, Pupu, 2006) (*Phoma* sp.) (рисунок 3.8) – примеры многочисленных биоактивных хинонов, образуемых фомоидными грибами.

Многие метаболиты грибов рода *Phoma* имеют гетероциклическую структуру. Среди кислородсодержащих соединений следует отметить макролиды: гербарумин I из *Ph. herbarum* Westend (Rivero-Cruz et al., 2000) (рисунок 3.9), пиренофорин из *Ph. sorghina* ((Sacc.) Boerema, Dorenb, Kesteren (Zhang et al., 2008) (рисунок 3.10), гипотемицин (*Phoma* sp.) (Hussain et al., 2007) (рисунок 3.11).

Для многих видов рода *Phoma* характерно образование таких производных аминокислот, как цитохалазанов и полипептидов, в то время как алкалоиды у фомоидных грибов обнаруживают нечасто. Один из них – изохинолиновый алкалоид – хризантон, выявлен у *Phoma liguicola* (= *Ascochyta chrysanthemi* F. Stevens 1907) (Albinati et al., 1989). Цитохалазаны характерны для вида *P. exigua* Desm. и его вариаций (цитохалазин В-3) (Cimmino et al., 2008) (рисунок 3.12). У многих *Phoma* spp. выявлены депсипептиды и циклические пептиды. Так, у *Ph. lingam* обнаружены разнообразные по структуре пептиды: циклический полипептид фомалид (рисунок 3.13) (Howlett et al., 2001) и депсипептид депсилаирдин (Pedras et al., 2004) (рисунок 3.14). Типичным метаболитом изолятов *Ph. lingam*, вирулентных для рапса, является эпиполитиодиоксопиперазин сиродесмин PL (Howlett et al., 2001) (рисунок 3.15). Липодепсипептид – фомафунгин (рисунок 3.16) выявлен у неидентифицированного штамма *Phoma* sp. (Herath et al., 2009)

Недостаточно информации о высокомолекулярных соединениях у грибов этого рода. Фитотоксичный белок массой 7551 Да выделен из *Ph. rabiei* (Pass.) Khune (= *Ascochyta rabiei*) (Chen, Strange, 1994). Биоактивные глюканы были выделены из культур морских видов *Ph. herbarum* (Yang et al., 2005) и *Ph. glomerata* (Corda) Wollenw, Hochapfel (Пивкин и др., 2006).

Некоторые биологически активные метаболиты грибов этого рода обладают фитотоксической, антимикробной активностью, а также являются микотоксинами.

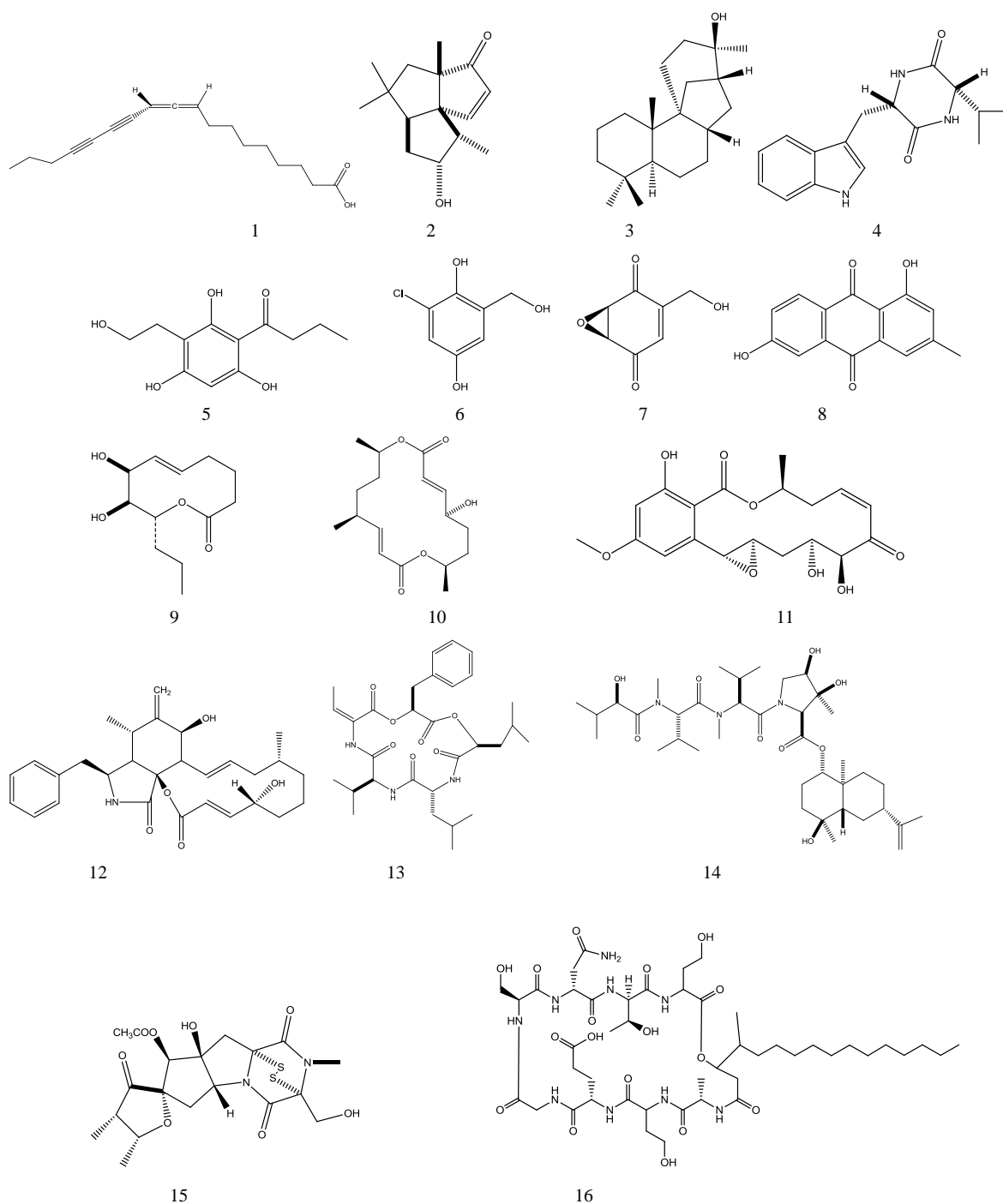


Рисунок 3 - Некоторые метаболиты грибов рода *Phoma*

1 – фомалениевая кислота С; 2 – фомалаирденон А; 3 – поланразин А;  
 4 – афидиколан-16-β-ол; 5 – фомалон; 6 – 2-хлоро-6-гидроксиметилбензол-  
 1.4-диол; 7 – филостин; 8 – фомарин; 9 – гербарумин 1; 10– пиренофорин;  
 11 – гипотемицин; 12 – цитохалазин В-3; 13 – фомалид; 14 - депсилаирдин;  
 15 – сиродесмин PL; 16 – фомафунгин



### 1.2.1 Фитотоксины

Гербарумин I (*Ph. herbarum* Westend) (рисунок 3.9) проявляет сильную фитотоксическую активность, ингибируя рост корней *Amaranthus hypochondriacus* в концентрации  $5,43 \times 10^{-5}$  М. Причём действие токсина оказалось эффективнее известного гербицида 2,4-Д, концентрация которого для достижения того же эффекта составляла  $1,92 \times 10^{-4}$  М (Rivero-Cruz et al., 2000).

В патенте США № 7772155 описан способ получения гербицидного препарата для борьбы с двудольными сорными растениями на основе мицелия гриба *Ph. macrostoma* Mont. и его экстрактов (Bailey, Derby, 2010). Из экстрактов мицелия этого гриба были выделены фитотоксичные метаболиты с необычной структурой – макроцидин А (рисунок 4.1) и макроцидин В, представляющие собой циклическую тетрааминовую кислоту. Макроцидин А вызывал хлороз листьев чувствительных к нему растений (Graupner et al., 2003).

Фитотоксины грибов можно использовать для скрининга устойчивых к ним сортов культурных растений (Берестецкий, 2008). Так, была разработана и запатентована методика скрининга растений (культура клеток) *Sinapis alba* и *Brassicae juncea* на устойчивость к *Alternaria brassicae* и *Ph. lingam* с использованием фитотоксинов (деструкцина и фомалида) указанных видов грибов (Pedras, Ward, 2000).

### 1.2.2 Антимикробные соединения

Некоторые метаболиты грибов рода *Phoma* проявляют антибиотические свойства. Фомалениевая кислота С (*Phoma* sp.) (рисунок 3.1) проявляет сильные антибактериальные свойства в отношении дикого и метициллин-устойчивого штамма *Staphylococcus aureus* в минимальной ингибирующей концентрации (МИК) 3,9 мкг/мл. Важно отметить, что активность фомалениевой кислоты оказалась в 5–32 раза выше известных антибиотиков тиолактомицина и церуленина. Фомалениевая кислота С является сильным ингибитором биосинтеза

жирных кислот в бактериях, в результате чего замедляется рост бактериальной клетки и снижается её жизнеспособность (Ondeyka et al., 2006).

Фомадекалин В (*Phoma* sp. (NRRL 25697)) (рисунок 4.2) ингибирует рост грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*): в концентрации 200 мкг/диск диаметр зон ингибирования роста бактерий составлял 12 и 10 мм соответственно (Che et al., 2002).

Фомодион (рисунок 4.3) (*Phoma* sp.) – новое производное усниновой кислоты, характерной для лишайников семейства *Usneaceae*, которое обладает активностью в отношении *S. aureus* в МИК 1,6 мкг/диск и грибов (*Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonium solani*) в МИК 10 мкг/мл. Препараты на основе усниновой кислоты применяются для лечения туберкулёза и дифтерии (Hoffman et al., 2008).

### 1.2.3 Антифунгальные метаболиты

Фомафунгин (*Phoma* sp.) (рисунок 3.16) подавляет рост таких патогенов человека как *Candida spp.*, *Aspergillus fumigatus* и *Trichophyton mentagrophytes* в МИК 2–8 мкг/мл (Herath, 2009). Фомалон (*Ph. etheridgei*) (рисунок 3.5) – сильный ингибитор роста гриба *Phellinus tremulae*, вызывающего разрушение древесины деревьев осины (*Populus tremula*). В концентрации  $1 \times 10^{-3}$  М фомалон полностью ингибирует рост гриба (Ayer, Jimenez, 1994). Ксантепинон, выделенный из *Ph. medicaginis* Malbr., Roum. (рисунок 4.4), ингибирует прорастание конидий *Magnaporthe grisea* (в концентрации 2 мкг/мл), *Phytophthora infestans* (5 мкг/мл), и *Botrytis cinerea* (10 мкг/мл) (Liermann et al., 2009).

(+) Флавипуцин (*Phoma* sp.) (рисунок 4.5) – соединение с фунгицидной активностью против *P. infestans* (7,81 ppm) и *Septoria tritici* (31,3 ppm). Кроме того, вещество проявляет антибактериальные свойства (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*). В концентрации 15 мкг/диск соединение вызывало зоны ингибирования роста бактерий в диаметре 16, 17 и 11 мм соответственно (Loesgen, 2011).

Из культуры почвенного изолята *Phoma* sp. SANK 13899 выделен циклический полипептид (рисунок 4.6), подавляющий развитие ряда патогенных грибов. На его основе составлена фармацевтическая композиция (патент США № 6818614) для лечения микозов (аспергиллеза, криптококкоза и кандидоза), в том числе и системных инфекций (Yano et al., 2004). На основе метаболита *Phoma* sp. FERMBP-6461 (рисунок 4.7) разработана фунгицидная композиция для борьбы с грибными заболеваниями растений, например, *B. cinerea* устойчивого к фунгицидам из группы бензимидазолов (Wakui et al., 2001).

#### 1.2.4 Микотоксины

Гриб *Ph.exigua* Desm. является продуцентом веществ группы цитохалазанов (рисунок 3.12). Эти соединения способны проникать через клеточную мембрану, связываясь с сократительными системами клетки – микрофиламентами (Bonder et al., 1986; Brown et al., 1982; Maclean-Fletcher et al., 1980). Поскольку *Ph. exigua* является возбудителем фомоза картофеля, образуемые им микотоксины могут быть опасны для человека и животных (Sherlach et al., 2010). В наибольших количествах гриб образует цитохалазины А и В. Известно, что цитохалазин В (рисунок 3.12) вызывает дефект формирования нервной трубки у куриных эмбрионов (Linvilleg, Shepardt, 1972), в связи с чем это вещество может быть тератогенным агентом (Shepardt, 1973). Кроме того, сравнительная токсичность цитохалазина В для крыс составляет 10,6 – 15 мг/кг (Glinsukon, Lekutai, 1979).

Секалониевые кислоты – токсичные пигменты, образуемые различными грибами (*Aspergillus*, *Claviceps*, *Phoma* и др.) (Hanumegovda et al., 2002). Наиболее токсичной является секалониевая кислота D, попадая с различными зерновыми культурами (ячмень, рис) в организм человека и животных, вещество может вызывать тяжёлые отравления (LD<sub>50</sub> для крыс составляет 24,6 мг/кг) (Weidenborner, 2001).

Тенуазоновая кислота (ТК) – один из важнейших микотоксинов, образуемых грибами рода *Alternaria* и *Phoma* (Rai et al., 2009). Часто ТК может быть

обнаружена в различных фруктах и овощах, злаках и продуктах из них (Asam et al., 2012, Siegel et al., 2010). При попадании в организм млекопитающих, вещество вызывает коллапс сердечно-сосудистой системы и тяжёлую или умеренную форму дисплазии у мышей (Yekeler et al., 2001). ТК обладает цитотоксическим действием в отношении 3Т3 фибропластов мыши, клеток лёгких хомяка и гепатоцитов человека (L-O2) в концентрации  $EC_{50} = 41,64$  мкг/мл;  $59,33$  мкг/мл и  $85,98$  мкг/мл соответственно (Zhou et al., 2008).

### 1.2.5 Другие соединения

Массарилактон Н из *Ph. herbarum* (рисунок 4.8) проявляет умеренную ингибирующую активность на фермент нейраминидазу, который входит в состав оболочек некоторых вирусов (например, вируса гриппа) и способствует проникновению вируса через секреты слизистых и высвобождению вирусных частиц с поверхности заражённых клеток (Zhang, 2012). Ингибирующую активность в отношении обратной транскриптазы ВИЧ проявляет 5-гидроксирамулозин - соединение, выделенное из *Ph.tropica* R. Schneid., Воерема (Osterhage, 2002).

Эквизетин запатентован компанией Merck как ингибитор ВИЧ-интегразы (патент США № 5759842). Его продуцентом является штамм *Fusarium heterosporum* Nees. Его аналог – эпи-эквизетин (рисунок 4.9) был выявлен у неидети *Phoma* sp. Этот фермент необходим ретровирусам для встраивания в геном хозяина – необходимый шаг для репликации вируса СПИДа в клетках Т-лимфоцитов (Chu et al., 1994; Dombrowski et al., 1998; Ghisalberti, 2003).

*Phoma* sp. (штамм MF 6118) является продуцентом фузидиенола А (рисунок 4.10) – представителя семейства фузидиенольных ингибиторов, содержащих трициклические кислородсодержащие гетероциклы с системой колец 7/6/6. Это соединение ингибирует рост и деление опухолевых клеток (Raietal., 2009). Фомацин С (*Phoma* sp.) (рисунок 4.11) – ингибирует пролиферацию клеток линии HT29 и, в отличие от других родственных по структуре соединений, не проявляет

токсичности для других клеточных линий (Alvi et al., 1997). Эпоксифомалин А, метаболит *Phoma* sp., выделенного из морской губки *Ectyplasia perox* (рисунок 4.12) проявляет сильную цитотоксическую активность на опухолевые клетки человека линий 12 и 36 в  $ИК_{50}=0,010-0,038$  мкг/мл. Избирательность этого соединения не похожа на действие известных противоопухолевых препаратов, поэтому эпоксифомалин А представляет собой потенциальную основу для создания лекарственного препарата (Mohamed et al., 2009).

Известно, что противоопухолевое соединение таксол (рисунок 4.13), которое используют во всём мире для лечения некоторых видов раковых заболеваний, является также и вторичным метаболитом *Ph. betae*. Ранее таксол получали в небольших количествах из корней тисового дерева (*Taxus spp.*), сегодня существует химический синтез этого соединения, однако ввиду высокой стоимости это лекарственное средство недоступно многим больным. *Ph. betae* образует таксол с выходом 795 мкг/л среды (Kumaran et al., 2012).

Из мицелия и культурального фильтрата штамма *Phoma* sp. MF 6118 (ATCC74347), выделенного в чистую культуру из листовой подстилки пустынного кустарника *Zygophyllum staffii*, получена группа веществ (патент США № 5663193), обладающих способностью ингибировать фарнезил-протеин трансферазу (ФПТ). Блокирование ФПТ прерывает передачу пролиферативного сигнала от трансмембранного рецептора (онкогенного белка Ras) к ядру (Поповская, 1995; Cascales et al., 1997).

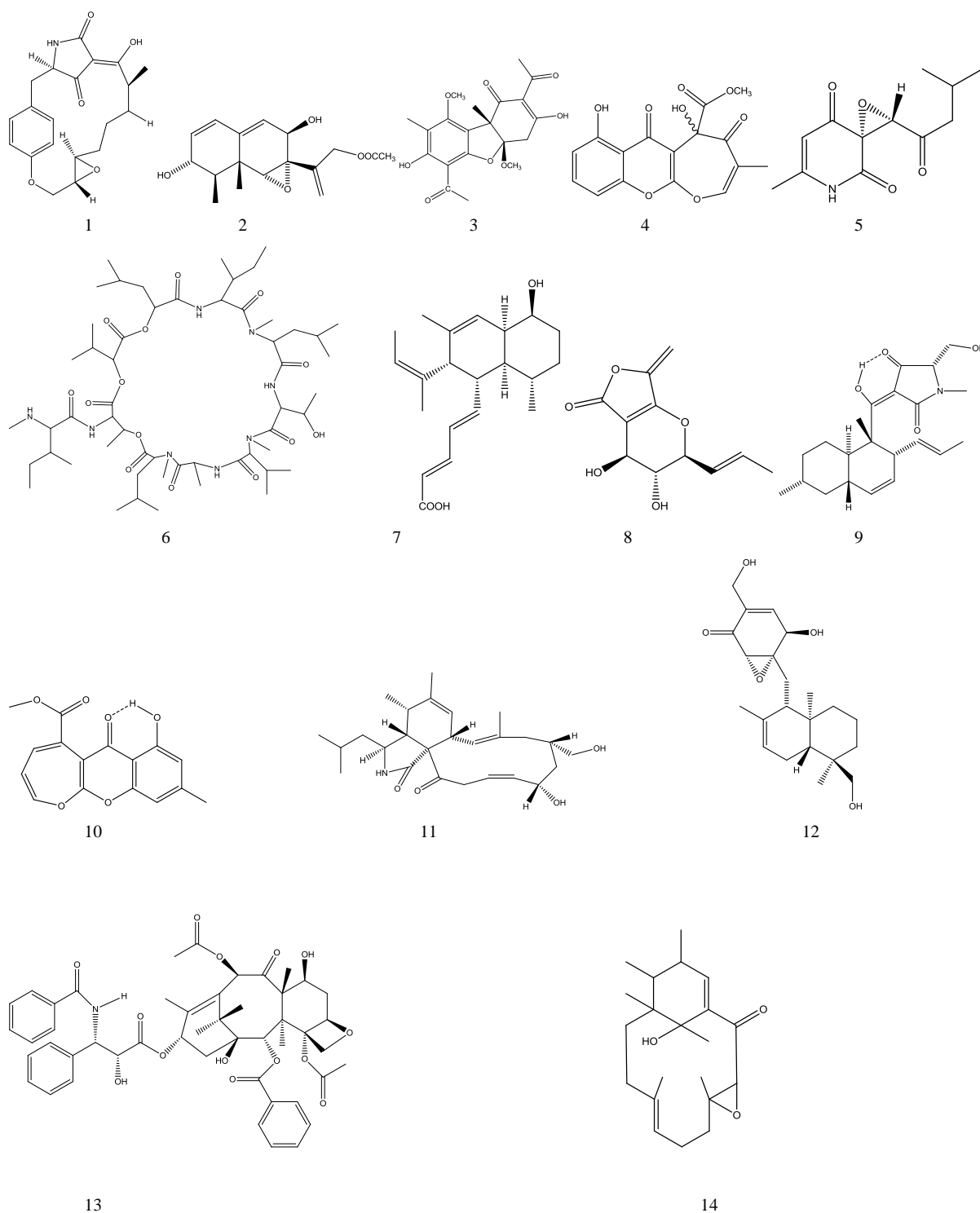


Рисунок 4 – Некоторые биологически активные метаболиты грибов рода *Phoma*

1 – макроцидин А; 2 – фомадекалин В; 3 – фомодион; 4 – ксантепинон; 5 – (+) флавипуцин; 6 – F-15078; 7 – метаболит *Phoma* sp. FERMBP-6461; 8 – массарилактон Н; 9 – эпи-эквизетин; 10 – фузидиенол-А; 11 – фомацин С; 12 – эпоксифомалин А; 13 – таксол; 14 – фомактин

Одно из этих соединений, фомактин (рисунок 4.14) может быть применено в составе химиотерапевтической композиции для лечения опухолевых заболеваний.

### 1.2.6 Хемосистематика *Phoma* spp.

Пересмотр системы фомоидных грибов Boerema с соавторами (2004) привел к значительному укрупнению рода *Phoma* за счет вливания в него многих представителей близкородственных родов *Ascochyta*, *Phyllosticta* и *Stagonosporopsis*. Согласно морфологическим признакам и наличию совершенной стадии (*Didymella*, *Leptosphaeria* или *Pleospora*) род *Phoma* был подразделен на 9 секций. Современная идентификация видов *Phoma* основана на анализе морфологических характеристик *in vitro*, включающих форму и размеры конидиомы, конидий и хламидоспор, особенности роста колоний (Aveskamp, 2008).

На основании анализа последовательностей нуклеотидов, полученных в результате секвенирования трех участков ядерной рибосомальной ДНК (28S, 18S и ITS), а также участка TUB гена  $\beta$ -тубулина Aveskamp с соавторами (2010) провели новую ревизию грибов этой группы. В работе авторы использовали 324 штамма из 206 таксонов, из которых 54 относились к плеоспоровым грибам, а остальные – к роду *Phoma* (159 таксонов). Результаты этого исследования показали, что разделение видов по секциям (Boerema et al., 2004), некорректно с эволюционной точки зрения и, что род является высоко полифилетичным. Так, фомоидные грибы эволюционно могли бы быть отнесены в 6 семейств порядка *Pleosporales*. При этом филогенетический анализ самой многочисленной клады, относящейся к семейству *Didymellaceae*, позволил раздробить изученные штаммы еще на 18 ветвей, каждой из которых можно придать статус рода (Aveskamp et al., 2010).

Видовая идентификация *Phoma* spp. – удел узких специалистов. Это подтверждает и то, что значительное число вторичных метаболитов, имеющих потенциальное практическое значение, выделено из штаммов, идентифицированных до рода *Phoma*. Для облегчения видовой идентификации, помимо морфологических признаков и филогенетических данных, для разделения видов возможно использование и биохимических маркеров. Достаточно скупо они (образование кристаллов, цветная реакция на добавление щелочи на край колонии) использовались и в системе Воегема с соавторами (2004). Е. Monte с соавторами (1991) показал, что электрофоретические профили белков и профили вторичных метаболитов, разделенные методом тонкослойной хроматографии, оказались полезными для дифференциации 55 штаммов из 18 таксонов рода *Phoma*. Это позволило выделить вид *P. sambuci-nigrae* (Sacc.) Monte, Bridget Sutton от *Ph. herbarum* f. *sambuci-nigrae* Sacc. Однако эта работа развития не получила (Monte et al., 1991).

Профили вторичных метаболитов с использованием стандартов известных веществ и библиотек спектральных данных с успехом применялись для разделения близкородственных видов из родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*. Метаболитный фингерпринтинг был успешно применен для дифференциации *Ph. lingam* (Tode) Desm. (*Leptosphaeria maculans* Ce set de Not.) и *L. biglobosa* (Pedras et al., 2007), *Ph. pomorum* от других видов *Phoma* из секции *Peyronellaea* (Sorensen et al., 2010), а также для групповой дифференциации наземных и морских *Phoma* spp. (Osterhage et al., 2000). Возможно, этот подход будет успешно использован в разработке системы фомоидных грибов. Так, в таблице показано, что метаболиты изучены всего у 5 из 9 типовых видов, представляющих секции рода *Phoma*. При этом они образуют различные по структуре метаболиты.



Таблица 1 - Секции рода *Phoma* (Voerema et al., 2004) и метаболиты типовых видов

Секция	Типовой вид	Род с телеоморфой	Мажорные метаболиты
<i>Heterospora</i>	<i>Ph. heteromorphospora</i>	-	Не изучены
<i>Macrospora</i>	<i>Ph. zeaе-maydis</i>	<i>Didymella</i>	Не изучены
<i>Paraphoma</i>	<i>Ph. radicina</i>	-	Не изучены
<i>Peyronellaea</i>	<i>Ph. glomerata</i>	-	Эпоксидон, диапортиниевая кислота, и другие
<i>Phoma</i>	<i>Ph. herbarum</i>	<i>Didymella</i>	Макролиды
<i>Phyllostictoides</i>	<i>Ph. exigua</i> var. <i>exigua</i>	<i>Didymella</i>	Цитохалазины
<i>Pilosa</i>	<i>Ph. betae</i>	<i>Pleospora</i>	Дитерпены-производные афидиколина
<i>Plenodomus</i>	<i>Ph. lingam</i>	<i>Leptosphaeria</i>	Эпиполитиодиоксопиперазины
<i>Sclerophomella</i>	<i>Ph. complanata</i>	<i>Didymella</i>	Не изучены

Интересно отметить также, что грибы рода *Phoma* образуют метаболиты, которые известны как у близкородственных плеоспоровых грибов, так и других аскомицетов. Например, упомянутые выше цинниол, брефельдин А и тенуазоновая кислота – характерные метаболиты видов рода *Alternaria*, пиренофорин – *Pyrenophora*, цитохалазины – *Drechslera*, *Diaporthe* (Белякова, Левкина, 1990, 1992; Kachlicki, 1995; Tsantrizos, 1995). Это указывает на родственные связи с этими грибами либо на возможность горизонтального обмена генетической информации.

\*\*\*

В настоящий момент известно более 2000 видов грибов рода *Phoma*, однако их действительное количество может быть значительно выше. Вторичные метаболиты изучены лишь у небольшой части из них. Поэтому грибы этого рода остаются перспективными продуцентами БАВ. Очень много публикаций и патентов по метаболитам грибов этого рода основано на неидентифицированных до вида изолятов. Дальнейший прогресс в направленном поиске новых БАВ у грибов рода *Phoma*, несомненно, будет связан с пополнением коллекций чистых культур и их точной идентификацией при помощи традиционных и молекулярно-филогенетических методов, а также с развитием системы фомоидных целомицетов.

Одной из основных задач в области изучения БАВ грибов является выявление условий их максимального биосинтеза (Поликсенова, 2004). Известно, что при подборе оптимальных условий культивирования возможно добиться значительного увеличения выхода интересных метаболитов.

## 1.3 Оптимизация получения биологически активных метаболитов

### 1.3.1 Факторы среды, влияющие на образование биологически активных метаболитов

На образование БАВ могут влиять различные факторы: состав питательной среды, сроки, условия культивирования микроорганизма (Берестецкий, 2008; Cannell, 1998). Необходимо учитывать, что биосинтез вторичных метаболитов связан с дифференциацией и развитием клеток организма-продуцента (Calvo et al., 2002). В связи с этим, питательные среды должны содержать основные вещества, обеспечивающие оптимальный рост микроорганизма (Поликсенова, 2004; Яковлев, 2005).

По мнению некоторых авторов вторичный метаболизм связан с процессом спороношения гриба. Так, в работе Calvo и соавторов вторичные метаболиты условно подразделяют на три группы: метаболиты, активирующие процесс спороношения (например, производные линолевой кислоты в случае *Aspergillus nidulans*); пигменты, необходимые для защиты структур спороношения от воздействия ультрафиолетового излучения (например, меланины, необходимые для сохранения и защиты оболочки спор полового и бесполого размножения); токсичные метаболиты, образуемые растущей колонией непосредственно в период спороношения (например, микотоксины) (Calvo et al., 2002).

Существует два основных способа культивирования микроорганизмов: жидкофазный и твердофазный. Культивирование фитопатогенных грибов на твёрдом субстрате позволяет исследовать рост гриба в условиях близких природным. Преимуществами этого способа являются низкая себестоимость субстрата и простота исполнения по сравнению с глубинным способом (MasDiego et al., 2003).

К примеру, для культивирования *Trichoderma reesei* оптимальным субстратом является смесь выжимки сахарного тростника (80%) и

измельчённого риса (20%) (MasDiego et al., 2003). При оптимизации твёрдой среды для роста *Streptomyces lateritius* 19/97 М в качестве субстратов были выбраны древесная зелень после спиртовой экстракции, кора лиственницы, после экстракции, кора пихты и некондиционное зерно пшеницы. Максимальное накопление биомассы было отмечено на зерне и составляло  $18,6 \cdot 10^{11}$  КОЕ/г (Гайдашева, 2011).

В работе М. Masi и соавторов рассматривается влияние условий культивирования на образование цитохалазина В штаммами *Pyrenophora semeniperda*. Авторами определено, что все 10 изучаемых штаммов образуют метаболит с выходом 535-2256 мг/кг на твёрдой питательной среде на основе семян пшеницы, при этом на картофельно-декстрозном бульоне цитохалазин В не образуется (Masi et al., 2014).

Наиболее важными физическими факторами, определяющими рост гриба на твёрдой питательной среде, являются размер и пористость частиц субстрата. Именно от этих параметров зависит площадь доступной для гриба поверхности, а следовательно, степень и скорость колонизации субстрата мицелием гриба. Также от размера частиц зависит проникновение воздуха и выделение  $\text{CO}_2$  во время культивирования микроорганизма (Manpreet et al., 2005).

Другим фактором, оказывающим влияние на образование метаболитов во время культивирования грибов является освещение (Берестецкий, 2008; Яковлев, 2005). Существуют примеры, когда при изменении условий освещения изменялся метаболитный профиль экстрактов. Так, под воздействием ультрафиолетового света на конидии *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 происходят изменения в биосинтезе охратоксина и пеницилловой кислоты, в результате чего могут быть получены новые активные метаболиты (Awad et al., 2005). Для образования некоторых токсинов например, церкоспорина, наличие света является необходимым условием (Daub et al., 2009).

Влажность субстрата оказывает значительное влияние на рост и развитие продуцента и образование вторичных метаболитов. В работе Atalla и соавторов изучено влияние флуоресцентного и ультрафиолетового света на образование микотоксинов *Aspergillus parasiticus* при различном уровне влажности. Культуру гриба на твёрдом зерновом субстрате помещали в условия различной влажности в диапазоне 50-80% и условий освещения на 21 день (Atalla et al., 2004). В результате исследований было выявлено, что воздействие коротковолнового ультрафиолета в случае *A. parasiticus* стимулирует накопление ДОН, НИВ, Т-2 токсина, афлатоксина G2 и ингибирует биосинтез таких микотоксинов как афлатоксины, охратоксины, стеригматоцистин и зеараленон (Atalla et al., 2004).

Различные исследования показали, что температура является одним из основных факторов, определяющих рост грибов-антагонистов (Kok et al., 2002). К примеру, для гриба *Rhizoctonia solani* температура оптимального роста мицелия находится в диапазоне 20-25°C (Ritchie et al., 2009), а для гриба *Aspergillus terreus* максимальный выход антимикробных метаболитов зафиксирован при культивировании в условиях 25°C (Jain et al., 2011). В некоторых случаях температура является фактором, стимулирующим образование определённых метаболитов. По данным Р. И. Щекочихиной, при культивировании *Bipolaris sorokiniana* в жидкой среде Чапека обнаружено, что накопление фитотоксических метаболитов гриба происходило быстрее при температурах 7-17°C по сравнению с 20-27°C (Щекочихина, 1977).

Длительность культивирования является другим важным параметром для определения оптимальных условий накопления метаболитов. При исследовании оптимального периода роста *Aspergillus* штамм tsf 146 выяснилось, что максимальное накопление антимикробных метаболитов в культуре гриба на жидкой среде происходит на 10-е сутки, а после 14-ти суток культивирования значительно снижается (Bhattacharyya et al., 2011). В работе J. F. Alberts и соавторов отмечено влияние длительности культивирования *Fusarium moniliforme* на образование фумонизина В1.

Выяснилось, что микотоксин начинает образовываться на 12-тые сутки роста гриба, затем концентрация микотоксина продолжает увеличиваться до 91 дня культивирования, после чего резко уменьшается (Alberts et al., 1990).

Таким образом, существует комплекс факторов, оказывающих влияние на рост и развитие гриба-продуцента и оказывающих влияние на процессы метаболизма, состав и количественное соотношение метаболитов. Учитывая наиболее важные факторы, возможно подобрать и оптимизировать условия культивирования микроорганизма, при которых возможно увеличить выход искомого активного метаболита (Vanot et al., 2005).

Для подбора оптимальных условий культивирования необходимо проводить аналитическое определение содержания различных метаболитов. В разделе 1.3.2 рассмотрены наиболее распространённые методы анализа биологически активных соединений.

### *1.3.2 Анализ биологически активных метаболитов*

Физико-химические методы анализа биологически активных соединений объединяют в себе совокупность аналитических методов количественного определения веществ (высокоэффективная (ВЭЖХ) и тонкослойная (ТСХ) хроматография, ультрафиолетовая (УФ) и инфракрасная (ИК) спектроскопия, масс-спектрометрия (Liras et al., 1989; Gibbons et al., 2005)).

Методы ТСХ позволяют сравнивать метаболитные профили экстрактов, определять качество разделения и чистоту колоночных фракций, и т.д. (Микеш, 1982; Шаповалова и др., 2007). Этот метод часто используют для скрининга метаболитов: для подбора условий разделения метаболитов (Kumar et al., 2011), анализа микотоксинов в экстрактах грибов (Cigic et al., 2009).

В связи с тем, что микотоксины фитопатогенных грибов представляют опасность для здоровья человека и сельскохозяйственных животных, в последнее время происходит активная разработка различных методов их анализа. Для определения микотоксинов в различных матрицах используются методы проточной цитометрии, иммуноферментного анализа и ВЭЖХ.

Метод проточной цитометрии позволяет определить одновременно множественные параметры клетки, такие как рост и жизнеспособность, активность метаболизма, состояние мембран в клетке. Этот метод является быстрым, высоко чувствительным и точным. В литературе можно встретить исследования по анализу микотоксинов грибов рода *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium* с применением данного метода. При этом можно не только определять содержание микотоксинов в анализируемой матрице, но и оценивать влияние токсичных метаболитов на жизнедеятельность клетки. Однако существенными недостатками метода проточной цитометрии являются высокая стоимость оборудования, необходимого для анализа, и высококвалифицированная подготовка оператора (Juan-Garcia et al., 2013).

Другим методом определения содержания микотоксинов в различных матрицах является метод иммуно-ферментного анализа. К числу достоинств метода можно отнести экспрессность, высокую специфичность и чувствительность, простоту проведения анализа, что объясняет широкое распространение метода для первичного скрининга низкомолекулярных соединений (Бондаренко, Еремин, 2012). В работе Бондаренко и Еремина предложена методика определения зеараленона и охратоксина А, позволяющая проводить до 10 анализов образцов зерна за 20 минут с пределами обнаружения 15 и 10 мкг/кг, соответственно, методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (Бондаренко, Еремин, 2012). Существуют экспресс-методы иммуноанализа с использованием регенерируемых микрочипов для анализа микотоксинов в злаковых продуктах (Oswald et al., 2013).

Аналитические методики с помощью ВЭЖХ были разработаны для большинства основных микотоксинов в зерновых культурах и другой сельскохозяйственной продукции (ГОСТ Р 53162-2008, ГОСТ Р 51435-99) и совершенствуются по настоящее время. Так, разработан метод ВЭЖХ анализа секалониевой кислоты в биологических жидкостях человека (Reddy et al., 1981) и ВЭЖХ-МС анализа для определения тенуазоновой кислоты в злаках (Siegel et al., 2009). А в работе Kong и соавторов предложен способ определения контаминации пищевых продуктов и специй микотоксинами грибов *Aspergillus* и *Penicillium* методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором (Kong et al., 2013).

Метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) получил наибольшее распространение в анализе микотоксинов (Амелин и др., 2013). Во многих случаях этот метод позволяет повысить чувствительность детектирования по сравнению с другими методами. Так, пределы обнаружения зеараленона в зерне методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа составляют 15 мкг/кг (Бондаренко, Еремин, 2012), в то время как метод ВЭЖХ-МС позволяет повысить чувствительность до 30-140 нг/кг (Li et al., 2013).

В настоящее время в литературе сообщается о разработке методов ВЭЖХ-анализа для одновременного нахождения нескольких соединений. В работе Walravens и соавторов разработан способ одновременного определения 10-ти микотоксинов *Alternaria* spp. в зерне и зерновых продуктах методом ВЭЖХ-МС с пределом обнаружения 0.1-10 мкг/кг для различных матриц (Walravens et al., 2014). В работе Curticapean и соавторов рассматривается метод одновременного определения афлатоксина В<sub>1</sub>, охратоксина А и зеараленона в зерне кукурузы (Curticapean et al., 2011). А в работе Liao и соавторов разработан метод одновременного определения 26-ти микотоксинов включая афлатоксины, охратоксины, фумонизины, трихотецены и алкалоиды спорыньи методом ВЭЖХ-МС (Liao et al., 2013).



Метод ВЭЖХ – анализа широко применяется для определения содержания остаточных количеств пестицидов в почве, природных водах, продуктах питания и кормах для животных, для контроля качества фармацевтической и пищевой продукции. Так, в работе Амелина и соавторов разработан метод ВЭЖХ - определения 11 гербицидных веществ - производных мочевины в воде с диапазоном определения 0.3-20 мкг/л (Амелин и др., 2012). Так, в работе Чиркина и соавторов методом ВЭЖХ с фотодиодной матрицей разработана методика определения жирорастворимых витаминов в сложных биологических объектах, на одном из этапов которой проведена оптимизация условий твердофазной экстракции для максимального извлечения и концентрирования витаминов (Чиркин и др., 2013). Некоторые авторы рассматривают применение хроматографических профилей биологически активных соединений с последующей обработкой хемометрическими методами в разработке экспресс-диагностики различных заболеваний (Карцова, Объедкова, 2013).

Другой областью применения ВЭЖХ - анализа можно назвать скрининг биологически активных вторичных метаболитов грибов (Amber et al., 2012). В работе Frisvad и соавторов методом ВЭЖХ - анализа оценивается уровень чистоты активных метаболитов, проводится анализ экстрактов с целью определения содержания метаболитов в них (Frisvad et al., 1989). В работе Nielsen и соавторов проводится скрининг микроорганизмов-продуцентов активных соединений (Nielsen et al., 2001; Landreau et al., 2002). В работе Mottier методом ВЭЖХ проведён сравнительный анализ 10-ти штаммов *Phomopsis* sp., вызывающих болезни винограда, в результате чего были определены 3 наиболее продуктивных продуцента, отобранные для дальнейшего изучения активных метаболитов (Mottier, 2005). В работе P. Amden были изучены метаболиты 9-ти изолятов *Sclerotium rolfsii* Sacc., выделенных из поражённых растений нута. В результате анализа было определено, что токсическое воздействие гриба обусловлено образованием

галловой и щавелевой кислот, найденных во всех изолятах (Amder et al., 2012).

В некоторых случаях метод ВЭЖХ является наиболее чувствительным и достоверным способом сравнения различных штаммов грибов по признаку образования химических соединений-маркеров (Carasso et al., 1984). Так, в работе Soledade и коллег методом ВЭЖХ анализа был изучен метаболитный профиль 26 изолятов гриба *Leptosphaeria maculans*. В итоге, набор изолятов был разделен на 3 основные группы: продуценты фоламида и сиродесмина, изоляты, образующие индолил диоксопиперазины и продуценты поликетидов (Soledade et al., 2000). А в работе Masi и соавторов разработана методика определения цитохалазина В в экстрактах в такой низкой концентрации как  $1 \times 10^{-3}$  мкг (Masi et al., 2014).

Следует отметить, что приведённые аналитические методы требуют разной по сложности пробоподготовки образцов. Так, для методов ВЭЖХ-определения соединений, требуется более тщательная очистка от посторонних соединений в пробе, в сравнении с методами иммуноферментного анализа. Так, в случае анализа зерна на содержание охратоксина методом ВЭЖХ-МС, проводят экстракцию образца системой растворителей, с последующей переэкстракцией, после чего проводят очистку полученных экстрактов хроматографическими методами (Soleimany et al., 2012). В случае анализа зеараленона и охратоксина А методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа пробы зерна экстрагируют смесью растворителей, после чего центрифугируют и анализируют надосадочную жидкость (Бондаренко, Еремин, 2012).

В связи с этим, при выборе методики анализа биологически активных метаболитов, необходимо подбирать наиболее оптимальные условия пробоподготовки и анализа метаболита, в то же время учитывая чувствительность и воспроизводимость метода.

Таким образом, в настоящее время известны фитотоксические метаболиты различной химической структуры, наиболее изученными продуцентами которых являются фитопатогенные грибы. Фундаментальные знания о природе и механизмах действия фитотоксинов могут быть использованы в разработке средств защиты растений от сорняков, а также в идентификации и хемосистематике грибов (Берестецкий, 2008).

Грибы рода *Phoma* известны как продуценты соединений широкого спектра биологической активности, среди которых есть и метаболиты с сильными фитотоксическими свойствами и оригинальной структурой. Некоторые из этих метаболитов перспективны для создания средств защиты растений от сорняков.

В связи с тем, что род *Phoma* является полифилетичным, для облегчения видовой идентификации его представителей, помимо морфологических признаков и филогенетических данных, возможно использование и биохимических маркеров. В настоящее время метаболиты изучены всего у 5 из 9 типовых видов, представляющих секции рода *Phoma*, при этом установлено, что они образуют различные по структуре метаболиты.

Использование современных хроматографических и спектрометрических методов анализа соединений позволяет ускорить процесс идентификации структуры соединений в метаболитных комплексах, открывает возможности проведения масштабных скринингов соединений (Petroski, Stanley, 2009) и последующего подбора условий культивирования продуцента для максимального образования интересных метаболитов. Это позволяет выделять активные метаболиты в количестве, достаточном для дальнейших исследований.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

#### *Культура гриба*

Гриб был выделен в чистую культуру из гербаризированных листьев бодяка полевого, пораженных пятнистостью. Гербарный материал собран в Хабаровском крае (п. Восточное, Хабаровский р-н, 24 августа 2006, образец 15-11). Штамм гриба был получен клонированием из кончиков гиф и депонирован в коллекции чистых культур Всероссийского института защиты растений (Санкт-Петербург, Пушкин) под номером 1.46. Его хранение осуществляется на скошенном КГА в пробирках при температуре 5°C.

#### *Тест-организмы*

#### *Определение фитотоксической активности*

Для исследований фитотоксической активности экстрактов, хроматографических фракций и очищенных веществ использовали хорошо развитые листья бодяка полевого (*Cirsium arvense*) и пырея ползучего (*Elytriga repens*). В исследованиях специфичности фитотоксинов использовали листья 3–4 недельных растений различных семейств: бодяка (*C. arvense*, *Asteraceae*), подсолнечника (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*), артишока (*Cynara algarbiensis*, *Asteraceae*), арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*, *Brassicaceae*), борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi*, *Umbelliferae*), гороха (*Pisum sativum*, *Fabaceae*), мари (*Chenopodium album*, *Chenopodiaceae*), тыквы (*Cucurbita pepo*, *Cucurbitaceae*), пырея (*E. repens*, *Poaceae*) и пшеницы (*Triticum aestivum*, *Poaceae*). Растения выращивали в условиях переменного освещения 12 ч/день и температуре 24°C.

### Определение круга растений-хозяев гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Для предварительной оценки круга растений-хозяев использовали листья растений различных семейств: бодяка полевого (*Cirsium arvense*), осота полевого (*Sonchus arvensis*), артишока (*Cynara algarbiensis*), маргаритки (*Bellis perennis*), полыни (*Artemisia absinthium*, *Asteraceae*); базилика (*Ocimum basilicum*) и мяты (*Mentha piperita*, *Lamiaceae*); перца (*Capsicum annuum*) и томата (*Solanum lycopersicum*, *Solanaceae*); арабидопсиса (*Cynara algarbiensis*) и капусты (*Brassica oleracea*, *Brassicaceae*); борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi*, *Umbelliferae*), сельдерея (*Apium graveolens*, *Apiaceae*); пырея (*Elytriga repens*, *Poaceae*).

### Определение токсичности в отношении инфузорий

Определение токсичности в отношении инфузорий проводили на культуре *Paramecium caudatum*. Культуру инфузорий поддерживали при комнатной температуре и искусственном освещении.

### Определение антимикробной активности

Для определения антибиотической активности выделенных соединений использовали бактерии, хранящиеся в лаборатории микробиологической защиты ВИЗР. В исследовании использовали штаммы грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis*), грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas corrugate*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) и грибов (*Candida tropicalis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*). Бактерии *B. subtilis* и *X. campestris* культивировали на КГА, фитопатогенные бактерии на питательной среде СПА (Сухой питательный агар 35.3 г (Микроген, РФ), глюкоза 200 г, дистиллированная вода 1 л) при 30°C. Грибы культивировали на КГА при 24°C.

## 2.2 Методы исследований

### 2.2.1 Описание изучаемого штамма

Гриб культивировали на четырех стандартных агаризованных питательных средах: картофельно-глюкозном агаре (картофель - 200 г, глюкоза - 10г, агар - 15 г, вода - 1 л), мальтозном агаре (мальтозныйэкстракт - 40 г,агар - 15 г, вода - 1л), овсяном агаре (овсяная крупа - 100 г, вода дистиллированная - 1л, агар - 15 г) и агаризованной среде Чапека с витаминами ( $\text{NaNO}_3$  - 4 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2 г,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  - 1 г,  $\text{KCl}$  - 1 г,  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  - 0,02 г,сахароза 15 г,агар - 15 г, вода дистиллированная - 1 л, тиамин – 100 мкг, биотин – 5 мкг) (ЧА). Посев проводили блоками мицелия диаметром 5 мм на чашку Петри.

Через 2 недели инкубации гриба в темноте и температуре 24°C сравнивали диаметр и морфологию колоний. Поскольку через этот период спороношения гриба не наблюдали, часть чашек далее инкубировали при постоянном освещении лампами ЛЭ-30 (Лисма, Россия, диапазон 280–315 нм) и переменном освещении лампами ближнего УФ (Phillips TLD 18/08, Голландия, диапазон 300 – 400 нм) до 7-ми недель. Для описания культуры использовали методику, предложенную Воегема с соавторами (Воегема et al., 2004).

### 2.2.2 Определение круга растений-хозяев гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Для определения круга растений-хозяев гриба *Paraphoma* sp. 1.46 было проведено заражение листьев 14 видов растений в лабораторных условиях. Листья, поверхностно простерилизованные 70%-ным этанолом и стерильной водой заражали блоком (5 мм в диаметре), вырезанным с края колонии гриба на среде КГА. В качестве контроля на поверхность листьев помещали блок, вырезанный из чашки Петри со стерильной средой КГА.

### 2.2.3 Оценка патогенных свойств гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Для определения патогенных свойств изучаемого гриба проводили обработку растений бодяка полевого в фазе розетки мицелиальной суспензией гриба *Paraphoma* sp. 1.46.

Для приготовления суспензии культуру гриба *Paraphoma* sp. 1.46 получали на картофельно-глюкозном бульоне. В 100-мл конические колбы, содержащие 20 мл среды, помещали 3 блока диаметром около 5 мм, вырезанные с края колонии *Paraphoma* sp. 1.46. Гриб культивировали на качалке при 180 об/мин в течение 3-х дней. Мицелий отделяли от культурального фильтрата и измельчали с помощью блендера. Суспензию готовили на основе измельчённых фрагментов мицелия с добавлением адьюванта Tween-80, конечная концентрация которого адьюванта составила 0.01%.

Заражение растений проводили путём опрыскивания мицелиальной суспензией *Paraphoma* sp. 1.46 (2 мл/раст.). Концентрация мицелия составляла  $4 \times 10^4$  КОЕ/мл. Продолжительность периода повышенного увлажнения растений суспензией на основе глубинного мицелия *Paraphoma* sp. 1.46 составляла 24 часа при 24 °С. Оценку развития заболевания оценивали по соотношению площади некрозов к общей площади листа.

Реизоляцию патогена в чистую культуру проводили общепринятыми фитопатологическими методами (Хохряков, 1974).

### 2.2.4 Молекулярная идентификация гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Для молекулярной идентификации анализировали нуклеотидные последовательности полученные по локусам внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS4) (White et al., 1990), большой субъединицы рРНК 28S (LR5, LROR) и фактора элонгации трансляции TEF (EF1-728f, EF1-986R). Для выделения ДНК использовали мицелий двухнедельных колоний гриба на

среде КГА. Экстракцию ДНК проводили смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) по стандартной методике (Sambrook, 1989). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Каждая реакционная смесь (25 мкл) содержала 0.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Хеликон, Россия), буфер для Taq полимеразы (Хеликон, Россия), по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), по 0.5 мкМ прямого и обратного праймера. ПЦР проводили в режиме Touch 54.1. Программа амплификации содержала следующие этапы: преденатурация — 94 °С,- 2 мин 30 с; затем 30 циклов: денатурация —92 °С,50 с, отжиг— 57°С,40 с, элонгация — 72 °С,- 30 с; финальная элонгация — 72 °С,- 3 мин. Продукты ПЦР были разделены при помощи электрофореза в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием в 0.5% трисборатном буфере. Выделение ампликонов из геля и их очистку проводили посредством адсорбции на частицах оксида кремния Silica (Хеликон, Россия) в присутствии хаотропного агента (5М гуанидин тиоционат) и последующей элюацией в воде (Malferrari et al., 2002). Определение нуклеотидных последовательностей было осуществлено на секвенаторе ABI Prism 3500 (Hitachi, Япония). Для редактирования и первичного анализа данных использовали приложение BioEdit (Hall, 1999). Длина анализируемых фрагментов составила: для 28S рРНК – 854, ITS – 575, Tef – 459 пар нуклеотидов. Для нахождения сходных нуклеотидных последовательностей и определения степени их идентичности использовали программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетического дерева проводили на базе частичных последовательностей участка LSU. Для построения филогенетических деревьев были использованы нуклеотидные последовательности из материалов статей с описаниями и данные NCBI. Выбор модели для филогенетического анализа осуществляли в приложении jModelTest 0.1 (Posada, 2008). На основе Байесовского информационного критерия была



выбрана модель GTR+I+G с коэффициентами 2128.84246, 70, 4728.605141, 20.291870,  $3.34 \times e^{-005}$ , 0.999923. Дальнейший филогенетический анализ проводили в приложении MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Отображение филограммы редактировали с помощью программы Dendroscope.

### *2.2.5 Выделение и очистка фитотоксических метаболитов*

#### *Выделение фитотоксина культуры гриба на жидкой питательной среде*

Гриб культивировали на жидкой питательной среде ДМГ (дрожжевой экстракт 4 г, мальтозный экстракт 10 г, глюкоза 10 г, вода до 1 л, pH 5.8). Посевную культуру получали в 500-мл конических колбах, содержащих 250 мл среды, на качалке при 180 оборотах в минуту. Ферментер объемом 20 л, содержащий 15 л среды, инокулировали суспензией 7-суточного мицелия. Через 10 суток ферментации нативный раствор отделяли от мицелия фильтрованием через бумажные фильтры «Красная лента» с использованием вакуумного насоса. Фильтрат экстрагировали двумя порциями этилацетата по 10 л. Остаток воды в экстракте удаляли безводным серноокислым натрием. Растворитель упаривали при помощи ротационного испарителя при температуре 40° С. Масса сухого остатка составила 970 мг (выход около 65 мг/л).

Разделение экстракта проводили при помощи колоночной хроматографии. Стеклянную колонку 2.5×70 см заполняли 60 мл силикагеля Merck 60 (0.040–0.063 mm) в *ц*-гексане. Сухой остаток, растворенный в хлороформе, адсорбировали на 2 мл силикагеля, высушивали и вносили в колонку в гексане. Колонку элюировали смесью *ц*-гексан–этилацетат в градиентном режиме (от 100:0 до 0:100), в результате чего было получено 10 хроматографически гомогенных групп фракций объемом 200 мл. Фракции упаривали на ротационном испарителе при температуре не более 40°С. Фитотоксическую активность проявили фракции 3, 4 и 5, полученные в

системе *n*-гексан–этилацетат в соотношении 80:20, 70:30 и 60:40, соответственно. Анализ фракций проводили по результатам тонкослойной хроматографии на пластинках (TLC Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Германия) в системе *n*-гексан–ацетон 6:4. Наиболее активной оказалась фракция 4, с массой сухого остатка 150 мг, содержащая один мажорный метаболит. Чистое вещество было выделено при помощи препаративной тонкослойной хроматографии на пластинках (PLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2 мм, Merck, Германия) в системе *n*-гексан–ацетон 6:4 ( $R_f = 0,6$ ) в виде бесцветных кристаллов (15 мг, выход 1 мг/л).

#### *Выделение фитотоксина культуры гриба на твёрдой питательной среде*

В качестве субстрата для твердофазного культивирования гриба использовали перловую крупу. Этот субстрат наиболее часто используют для твердофазного культивирования грибов (Bhargav et al., 2008; Alani et al., 2009; Subramaniyam, Vimala, 2012). В 25 1-литровых конических колб вносили по 150 г крупы и 100 мл воды. Стерилизацию зернового субстрата проводили автоклавированием в течение 30 минут при 121°C. Относительная влажность субстрата составила 40±5%. Субстрат инокулировали 2-мя блоками (5 мм в диаметре), вырезанными из края колонии *Paraphoma* sp. 1.46. Гриб культивировали 30 суток в темноте при температуре 24°C. Колбы встряхивали каждые 2 суток для предотвращения слипания субстрата. Колонизированный грибом субстрат высушивали током стерильного воздуха. Объединенный сухой материал (3.75 кг) измельчали с помощью лабораторной мельницы и экстрагировали 50%-ным водным ацетоном (10 л). Полученный экстракт отделяли фильтрованием через бумажный фильтр «Красная лента» и упаривали на ротационном испарителе до полного испарения ацетона при температуре не более 40°C. Водную фазу экстрагировали последовательно гексаном (5 л) и этилацетатом (2,5 л×3). По предварительным данным экстракт, полученный в этилацетате, обладал

фитотоксическим эффектом на листовых дисках бодяка полевого и пырея ползучего, в то время как гексановая фракция была не активна. Объединённый экстракт обезвоживали фильтрованием через сернокислый натрий и упаривали на ротационном испарителе до полного удаления растворителя. Выход экстракта составил 2.84 г/кг субстрата.

Фракционирование экстракта проводили на концентрирующих патронах Chromabond C-18 ec (Macherey-Nagel, Германия) с массой сорбента 10000 мг. Непосредственно перед использованием патроны промывали последовательно 20 мл ацетонитрила и 30 мл 0.1%-ной муравьиной кислоты. Разделяемую смесь веществ (1 г), растворённую в 500 мкл ацетонитрила, вносили в патрон со скоростью пропускания раствора 1-2 капли в секунду. Фракционирование экстракта проводили системой растворителей ацетонитрил – 0.1%-ная муравьиная кислота в соотношении 0:100; 25:75; 50:50; 100:0, объём каждой смеси составил 70 мл. Образцы упаривали на ротационном испарителе при температуре не более 40°C. Фракция, полученная в системе ацетонитрил – 0.1%-ная муравьиная кислота в соотношении 50:50, содержала одно мажорное соединение и обладала фитотоксической активностью на сегментах листьев бодяка полевого и пырея ползучего. Дальнейшую очистку токсина проводили методом полупрепаративной колоночной хроматографии на хроматографе среднего давления BUCHI Sepacore, оснащённом УФ-детектором. Фракционирование проводили на патроне PuriFlash-25 SiHC (Interchim, Франция) с массой сорбента 40 г с использованием предпатрона. Сухой остаток разделяемой фракции, растворённый в ацетоне, сорбировали на силикагеле (Merck, Silica gel 60 (0.040–0.063 мм)). Разделение производили в системе гексан-этилацетат (в градиенте от 0 до 80% этилацетата) со скоростью потока 50 мл/мин, собирая фракции объёмом 10 мл. Детектирование фитотоксина проводили на длине волны 260 нм. Фракции 50–79, содержащие фитотоксин,

были объединены и упарены на ротационном испарителе. Выход феосфериды А составил 130 мг/кг субстрата.

### *2.2.6 Идентификация фитотоксинов*

Съёмку ультрафиолетовых спектров фитотоксинов осуществляли в ацетонитриле на приборе Beckman Coulter DU 800 (Приложение А, Ж).

Масс-спектры выделенных фитотоксинов получали на приборе Thermo Scientific TSQ Quantum Access (тройной квадрупольный масс-спектрометр), после их ВЭЖХ разделения. Регистрировались положительно заряженные ионы после электроспрей-ионизации. Хроматографирование осуществляли в градиентном режиме в системе ацетонитрил–0.1% трифторуксусная кислота 0.1–80% по объёму на колонке Hypersil GOLD C18 (10×100 мм, 3µм, Thermo Scientific). Образец растворяли в метаноле. Сканирование осуществляли в режиме положительной полярности сканирования с диапазоном сканирования 25-800 M/Z и частотой 0.5 секунды (Приложение Б, Е).

Для идентификации фитотоксинов осуществляли съёмку  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров веществ, растворенных в дейтерированном хлороформе, на спектрометре WM 400 (Bruker, Германия) на частотах 400,1 и 100,6 МГц, соответственно (Приложение В, Г). Для уточнения структуры феосфериды А осуществляли съёмку  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров вещества, растворенного в дейтерированном диметилсульфоксиде, на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 400 Ultrashield Plus на частотах 400.1 и 100.6 МГц, соответственно (Приложение З, И). Были сняты следующие виды спектров: углеродный спектр  $^{13}\text{C}$  DEPT (Приложение К); двумерные спектры  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Приложение Л),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (Приложение О),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC (Приложение М),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Приложение Н).

## 2.2.7 Характеристика спектра биологической активности фитотоксинов

### Оценка фитотоксической активности

Определение фитотоксической активности экстрактов, хроматографических фракций и очищенных веществ проводили методом надколотых дисков (Берестецкий и др., 2010). Перед проведением биотестов экстракты, хроматографические фракции и чистые вещества растворяли в небольшом объеме 96%-ного этанола. Конечная концентрация этанола составляла 5%, в которой он был нетоксичен. Экстракты оценивали в концентрации 5 мг/мл, хроматографические фракции – 2 мг/мл, чистые вещества – от 125 мкг/мл до 2 мг/мл. Селективность действия феосфериды А и курвулина была оценена при концентрации 1 и 2 мг/мл, соответственно. Объем тест-образца составлял 10 мкл.

Для биотестов использовали отсеченные листья мелколиственных растений (арабидопсис и горох), листовые высечки диаметром 1 см, вырезанные пробочным сверлом из листьев среднего яруса широколиственных растений, а также отрезки листьев злаков длиной примерно 2 см и шириной около 0,5 см. Листовые высечки помещали на увлажненную водой фильтровальную бумагу в прозрачных пластиковых контейнерах. Перед нанесением капли тест-образца на сегменты листьев растений, в их центре делали надкол острой иглой. Учет симптомов (диаметр некроза для двудольных растений и длину некроза для однодольных растений) проводили через 48 ч инкубирования при температуре 24°C и переменном искусственном освещении (12 ч в день).

### Влияние фитотоксинов на рост корней проростков

Семена салата *Lactuca sativa*, цикория *Cichorium endivia* и редиса *Raphanus sativus*, поверхностно стерилизованные 70%-ным раствором спирта и стерильной водой, раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри и проращивали в течение суток в термостате при температуре

25°C. Проростки с длиной корня 1-2 мм замачивали на 1 час в растворе фитотоксинов в концентрации 1, 0.1, 0.01 и 0.001 мг/мл. В контрольном варианте проростки замачивали в 5%-ном водном этаноле. После замачивания в растворе фитотоксина, проростки промывали стерильной водой и выдерживали в течение 48 часов в темноте при 25°C. Длину корней проростков измеряли через 24 и 48 часов. Фитотоксическую активность ингибирования роста корней (%) рассчитывали по формуле:

$$A_f = 100 - \left( \frac{D_x - D_n}{D_k - D_n} \times 100 \right) \text{ (Берестецкий, 1982),}$$

где  $D_x$  – средняя длина корней проростков через 48 ч в опыте (мм);

$D_k$  – средняя длина корней проростков через 48 ч в контроле (мм);

$D_n$  – начальная длина корней проростков (мм).

#### *Оценка токсичности в отношении инфузорий*

Определение токсичности соединений проводили на культуре инфузории-туфельки (*Paramecium caudatum*) (ГОСТ Р 52337-2005). Сухой остаток веществ растворяли в небольшом количестве 96%-ного этилового спирта и доводили до необходимой концентрации (0.01, 0.1 и 1 мг/мл) дистиллированной водой. При этом конечная концентрация спирта составила 5%. В 24-луночный планшет помещали 900 мкл культуры инфузорий в растворе Лозина-Лозинского, приготовленного согласно ГОСТ Р 52337-2005, и 100 мкл раствора феосфериды А и курвулина в указанных выше концентрациях. В контроле в культуру инфузорий добавляли 100 мкл 5%-ного этанола. Планшет с растворами инкубировали при постоянном искусственном освещении и температуре 24° С. Учёт результатов эксперимента проводили через 3 минуты, 30 минут, 3 часа и 24 часа. Критерием для определения чувствительности парамеций к токсическим веществам служило время от начала воздействия испытуемого вещества до полной гибели простейших, которую констатировали на основании прекращения их движения.

### *Оценка антимикробной активности*

Оценку антимикробной активности веществ проводили методом бумажных дисков (Егоров, 2004). На диски наносили от 1 до 100 мкг испытуемых соединений. Диски раскладывали на культуры микроорганизмов и инкубировали при 30°C. Наличие зоны лизиса определяли на 1 и 2 сутки инкубации.

### *Анализ феосфериды А методом тонкослойной хроматографии*

Для анализа феосфериды А методом ТСХ образец растворяли в ацетоне в концентрации 10 мг/мл и наносили на пластину (TLC Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Германия). В качестве элюента использовали систему хлороформ–изопропиловый спирт 90:10.  $R_f$  феосфериды А составляло 0.65.

### *2.2.8 Разработка методики анализа феосфериды А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии*

Методика основана на определении феосфериды А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после его извлечения из образцов ацетонитрилом и очистке экстрактов на патронах для твердофазной экстракции.

Идентификация феосфериды А проводилась по времени удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки. Избирательность метода обеспечивалась сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

При соблюдении всех условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность результатов измерений при доверительной вероятности  $P=0,95$  не превышает значений, приведённых в таблице 6 для соответствующих диапазонов концентраций.

### *Условия хроматографирования феосфериды А*

Анализ образцов и фракций экстрактов из культуры гриба *Paraphoma* sp. 1.46, содержащих фитотоксин, проводили на приборе UPLC Acquity H-Class (Waters) с диодно-матричным детектором. Аналитическая колонка Acquity UPLC BEH C18 (2.1×50) мм, 1.7 мкм (Waters). Температура колонки 30±1°C. Подвижная фаза: ацетонитрил – 5 мМ ортофосфорная кислота в соотношении 40:60 (по объёму). Скорость потока элюента составила 250 мкл/мин. Детектирование при длине волны 260 нм. Объём вводимой пробы 10 мкл. Время удерживания вещества составляло 1.9±0.1 минуты.

### *Подготовка материала*

Для изучения влияния субстрата на извлечение фитотоксина были сопоставлены 3 крупы: рисовая, перловая и пшённая. В 100-мл конические колбы помещали 10 г крупы и добавляли 7 мл воды. Стерилизацию зернового субстрата проводили автоклавированием в течение 30 минут при 121°C, затем крупу высушивали под током стерильного воздуха в течение суток.

### *Приготовление стандартного раствора*

Для приготовления стандартного раствора феосфериды А использовали образец вещества, чистота которого по данным ВЭЖХ-анализа составила 96%. В пробирку Эппендорфа, объёмом 1,5 мл, помещали точную навеску феосфериды А (1± 0.01 мг) и растворяли в 1 мл ацетонитрила. Хранение стандартного раствора осуществляли в морозильной камере. Раствор использовали для приготовления проб с внесением для оценки полноты извлечения анализируемого вещества методом «внесено-найдено». Градуировочные растворы с концентрациями феосфериды А 100, 50, 20 и 10 мкг/мл готовили методом последовательного разбавления по объёму, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрил - 5 мМ ортофосфорная кислота в соотношении 40:60).



### *Техника внесения*

Для внесения в субстрат делали серию разведений стандартного раствора феосферид А в ацетонитриле в концентрациях 100, 50, 20 и 10 мкг/мл. Полученные растворы использовали для внесений соответствующих 10, 5, 2 и 1 мкг/г.

Для внесения 10 мкг/г в 1 г измельчённой крупы наносили 100 мкл раствора концентрацией 100 мкг/мл. Внесения меньших количеств феосферид А осуществляли этим же способом.

### *Экстракция и очистка образца*

Образец 1 г измельчённой крупы помещали в центрифужные пробирки типа Falcon объёмом 50 мл, добавляли 30 мл ацетонитрила и интенсивно перемешивали на встряхивающем устройстве в течение 10 минут. Полученные образцы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5-ти минут, после чего отбирали надосадочную жидкость в испарительные колбы. Экстракцию повторяли с 20 мл ацетонитрила. Объединённый экстракт упаривали на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C.

Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила. К полученному раствору добавляли 9 мл бидистиллированной воды и помещали в ультразвуковую ванну на 30 секунд. Растворённый экстракт вносили в патрон Диапак С 16, кондиционированный последовательно 2 мл ацетонитрила, 2 мл бидистиллированной воды и 2 мл 10%-ного раствора ацетонитрила в воде. Скорость пропускания раствора при внесении в патрон составляла 1-2 капли в секунду. После внесения пробы колбу обмывали последовательно 2 мл 10% ацетонитрила в воде и 2 мл 25% водного ацетонитрила и вносили в патрон. Затем концентрирующие патроны Диапак С 16 (БиоХимМак СТ, Россия) подсушивали током воздуха в течение 5-ти минут до полного удаления воды. Феосферид А элюировали 10 мл смеси ацетонитрил – 5мМ ортофосфорная кислота в соотношении 40:60,

полученный раствор тщательно перемешивали и анализировали методом ВЭЖХ.

### 2.2.9 Определение влияния различных факторов на выход феосфериды А

#### *Стабилизирующий отбор клонов *Paraphoma* sp. 1.46 по признаку образования феосфериды А*

Стабилизирующий отбор изучаемого штамма проводили по признаку образования феосфериды А. Для этого использовали двухнедельные колонии на КГА, полученные рассевом из кончиков гиф *Paraphoma* sp. 1.46. Для количественного анализа содержания фитотоксина в вариантах колоний гриба экстракты получали по методу J. Smedsgaard (1997). Из колоний гриба, вырезали с помощью пробочного сверла 10 агаровых дисков диаметром 5 мм и переносили их в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл. В качестве экстрагента использовали 1 мл ацетонитрила, содержащего 1% муравьиной кислоты. Экстракцию проводили в течение 30-ти минут в ультразвуковой ванне. Остатки мицелия осаждали центрифугированием (5 минут при 14 000 об/мин), надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку Эппендорфа, растворитель упаривали при пониженном давлении. Для определения содержания феосфериды А экстракты растворяли в 500 мкл подвижной фазы, пропускали через нейлоновую мембрану Millex 0.2  $\mu\text{m}$  и анализировали по п. 2.2.8.

Максимальный выход феосфериды А составил 38.4 мкг/г питательной среды. Этот вариант колонии гриба был отобран для дальнейшей работы по оптимизации условий культивирования *Paraphoma* sp. 1.46.

*Влияние соотношения массы субстрата к объёму культурального сосуда*

Для изучения влияния массы субстрата к объёму культурального сосуда на выход феосфериды А и определения оптимальной влажности субстрата были исследованы 6 вариантов соотношения массы субстрата к объёму культурального сосуда. В качестве субстрата использовали перловую крупу. Для каждого варианта субстрат инокулировали блоками диаметром 5 мм, вырезанными из края колонии *Paraphoma* sp. 1.46. Схема эксперимента представлена в таблице 2. Для каждого варианта опыт проводили в 4-х повторностях. В качестве контроля использовали автоклавированный субстрат. Гриб культивировали в темноте при 24 °С. Колбы встряхивали каждые 2 суток для предотвращения слипания субстрата. Отбор субстрата, колонизированного мицелием, проводили на 20-е сутки культивирования. Образец 1 г сухого материала экстрагировали ацетонитрилом и очищали на патронах Диапак С 16, после чего анализировали содержание феосфериды А в полученных пробах по п. 2.2.8.

Таблица 2 - Схема эксперимента по изучению влияния массы субстрата к объёму культурального сосуда

Количество агаровых дисков с колонии гриба	Масса перловой крупы, г	Объём воды, мл	Соотношение массы субстрата к объёму культурального сосуда	Объём сосуда, мл
1	10	7	5.9	100
2	20	13.5	3.0	100
2	20	13.5	7.5	250
4	40	27	3.7	250
6	60	40	2.5	250
15	150	100	4.0	1000

*Влияние состава субстрата и длительности культивирования гриба на образование феосфериды А*

В качестве субстрата использовали перловую, пшённую и рисовую крупы. В конические колбы объёмом 250 мл помещали 40 г зерна и добавляли 27 мл воды. Субстрат инокулировали 4-мя блоками (5 мм в диаметре), вырезанными из края культуры *Paraphoma* sp. 1.46. Для каждого вида субстрата опыт проводили в 4-х повторностях. Отбор субстрата, колонизированного мицелием, проводили на 10-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сутки культивирования. Образец 1 г сухого материала экстрагировали ацетонитрилом и очищали на патронах Диапак С 16, после чего анализировали содержание феосфериды А в полученных пробах по п. 2.2.8.

### *Влияние различных условий освещения на образование феосфериды А*

Для изучения влияния условий освещения на рост гриба и выход ФА, в качестве субстрата использовали перловую крупу. В конические колбы объёмом 250 мл помещали 25 г перловой крупы, добавляли 15 мл дистиллированной воды. Субстрат инокулировали 2-мя блоками (5 мм в диаметре), вырезанными из края колонии *Paraphoma* sp. 1.46. Колбы с инокулированным зерном культивировали в темноте, при переменном освещении (12 ч в день), в условиях переменного освещения лампами ультрафиолетового света (Phillips TLD 18/08, Голландия, диапазон 300–400 нм) и при постоянном освещении лампами ЛЭ-30 (Лисма, Россия, диапазон 280–315 нм) при температуре 24°C. Для каждого варианта условий освещения опыт проводили в 3-х повторностях. В качестве контроля использовали неинокулированную крупу.

Колбы встряхивали каждые 2-е суток для предотвращения образования комков субстрата. Колонизированный грибом субстрат отбирали на 10-е и 17-е сутки культивирования. К 10 г высушенного измельчённого зерна добавляли 75 мл смеси ацетон-вода 1:1 и экстрагировали с использованием ультразвуковой ванны в течение 10 минут. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр «красная лента» в испарительные колбы. Экстракцию повторяли с оставшимся в колбе зерном. Объединённый экстракт упаривали на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C до полного испарения ацетона.

Водную фазу доводили до 100 мл дистиллированной водой, добавляли 20 мл насыщенного раствора хлорида натрия и переносили в делительную воронку на 250 мл. Раствор в делительной воронке экстрагировали 100 мл гексана, после разделения смеси органическую фазу отбрасывали. ФА из водного раствора экстрагировали этилацетатом порциями 50 мл 2 раза и 100 мл 1 раз. Объединённый экстракт, осушенный безводным сульфатом натрия, упаривали на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C.

Сухой остаток растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл и анализировали методом тонкослойной хроматографии по п. 2.2.7.

Для количественного анализа содержания ФА, 2.5 мг экстракта растворяли в 1 мл ацетонитрила с использованием ультразвуковой ванны, затем отбирали 10 мкл раствора, добавляли 990 мкл подвижной фазы (конечная концентрация экстракта составляла 25 нг/мл) и анализировали по п. 2.2.8.

#### *2.2.10 Изучение влияния поверхностно-активных соединений на фитотоксическую активность феосфериды А*

Для повышения активности наиболее фитотоксичного метаболита использовали 5 видов коммерческих адъювантов различного химического состава (таблица 3). На основании предварительного эксперимента был подобраны их нефитотоксичные концентрации: 0.1% Твин-20 (Croda Crop, полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат), 0.1% БиоПауэр, 0.01% (Bayer, 3,6-диоксооктадецил-сульфат натрия), 0.01% Тренд 90 (DuPont, этоксилат изодецилового спирта), 0.01% Сильвет Голд (Chemtura, трисилоксан аоксилат), 0.1% Хастен (BASF, этиловый эфир рапсового масла) (таблица 3).

Гербицидная активность феосфериды А с добавлением адъювантов была оценена при концентрации 1 мг/мл (0.1%). В пробирки Эппендорфа отбирали 0.2 мг феосфериды А, растворяли в 10 мкл 96%-ного этанола или диметилсульфоксида (ДМСО) и добавляли 190 мкл раствора ПАВ в дистиллированной воде. Раствор фитотоксина в 5%-ном этаноле и диметилсульфоксиде без ПАВ использовали в качестве контроля. Объем тест-образца составлял 10 мкл. Оценку фитотоксической активности проводили методом листовых дисков по п. 2.2.7, используя повреждённые и интактные листовые высечки бодяка полевого и сегменты листьев пырея ползучего.

*Оценка гербицидной активности грубого экстракта из твердофазной культуры Paraphoma sp. 1.46*

Для опыта использовали растения бодяка полевого и пырея ползучего в фазе розетки. По итогам предварительного исследования были выбраны адъюванты БиоПауэр и Хастен в концентрации 0.1%. Дополнительно исследовали фитотоксичность экстракта без добавления адъювантов. Навеску экстракта из твердофазной культуры *Paraphoma sp. 1.46* массой 240 мг, полученного по п. 2.2.5, растворяли в 2400 мкл ДМСО. Полученный раствор разделяли на 3 части по 800 мкл. Отобранные аликвоты экстракта доводили до 16 мл водными растворами адъювантов до конечной концентрации экстракта 5 мг/мл. В качестве контроля использовали 5%-ный водный раствор ДМСО без адъювантов, а также с добавлением БиоПауэр и Хастен без экстракта. Заражение растений проводили путём опрыскивания. Для каждого варианта опыт проводили на 3-х растениях в 3 повторностях, в расчёте 2 мл испытываемого раствора на одно растение.

Учёт симптомов проводили через 48 часов по площади некрозов листьев и изменению массы надземной части растений.

Таблица 3 - Краткое описание применяемых поверхностно-активных веществ и адъювантов

Наименование	Производитель	Действующее вещество	Рекомендуемая концентрация, %	Применение
Тренд 90	DuPont	Этоксилат изодецилового спирта	0,1	С гербицидами на основе сульфонилмочевин (Кордус, Карибу) и дикамбы (Титус)
Хастен	BASF	Этиловый эфир рапсового масла	0,5-1	С гербицидами на основе сульфонилмочевин и дикамбы (Certo Plus)
БиоПауэр	Bayer	3,6-диоксооктадецил-сульфат натрия	1	С гербицидными препаратами на основе сульфонилмочевин (МайсТер, Вердикт)
Твин 20	Croda Crop	Полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат	0,1	С гербицидами на основе глифосата (Глифоган)
Сильвет Голд	Chemtura	Трисилоксан аоксилат	0,025-0,15	С гербицидами на основе глифосата (Ураган Форте, Глифос), гербициды на основе сульфонилмочевин (Сатир)



### *2.2.11 Изучение физиологического действия феосфериды А на растительную клетку*

#### *Действие на проницаемость мембран растительной клетки*

Действие 0.2%-ного раствора фитотоксина на выход электролитов из клетки определяли на листовых дисках бодяка полевого диаметром 1 см и отрезках листьев пырея ползучего длиной 2 см по п. 2.2.7. Образцы сегментов листьев с нанесённым раствором фитотоксина инкубировали при 24°C в условиях переменного искусственного освещения (12 ч/день) и в темноте в течение 24 и 48 часов. Для определения проницаемости клеточных мембран брали навеску сегментов листьев растений, массой 100 мг, измельчали ножницами и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Полученный раствор выдерживали 1 час при 25°C, после чего измеряли его электропроводность с использованием кондуктометра S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Швейцария). В качестве отрицательного контроля на листовые высечки растений наносили 5%-ный водный раствор этанола. Для положительного контроля, водный экстракт из листовых высечек, не обработанных фитотоксином, выдерживали при 95°C в течение 5-ти минут. Для каждого варианта обработки использовали 3 повторности по 6 дисков. Опыт проводили 3 раза.

#### *Влияние феосфериды А на содержание фотосинтетических пигментов*

Исследование влияния феосфериды А на содержание хлорофиллов и каротиноидов в растительной клетке проводили на листовых высечках бодяка полевого и пырея ползучего, подготовленных по п. 3.2.4. Учет симптомов и определение содержания пигментов проводили через 24 и 48 ч инкубирования при температуре 24 °С и переменном искусственном освещении (12 ч в день). Навеску сегментов листьев 100 мг помещали в пробирки, заливали 7 мл ДМСО и выдерживали при 65 °С на водяной бане в

течение 15 минут, полученные растворы доводили до 10 мл (Hiscox, Israelstam, 1979). Содержание хлорофиллов а, b и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом на приборе Beckman Coulter DU 800, на длинах волн 663, 646 и 470 нм, соответственно. Полученные данные пересчитывали по методике (Arnon, 1949), согласно следующим уравнениям:

$$\text{Chl}_a \text{ (г/л)} = 0.0127 \times D_{663} - 0.00269 \times D_{645}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (г/л)} = 0.0029 \times D_{663} - 0.00468 \times D_{645}$$

$$C_{\text{кар}} \text{ (мг/л)} = \frac{1000 \times D_{470} - 3.27 \times \text{Chl}_a - 100 \times \text{Chl}_b}{229}$$

$$\text{Chl} \text{ (г/л)} = 0.0202 \times D_{663} + 0.00802 \times D_{645}$$

#### *Влияние феосфериды А на митотическую активность меристематических тканей*

Влияние феосфериды А на митотическую активность исследовали на меристематической ткани корней лука репчатого *Allium cepa* (Rank, 2003). Лук проращивали в воде при 25 °С. От корней длиной 2 см отсекали часть около 0,5 см и помещали в раствор фитотоксина с концентрацией 0.5, 1, 2 мг/мл. В качестве контроля использовали раствор 5%-ного водного этанола. Через 1, 2 и 24 часа замачивания в растворах, образцы корней помещали в раствор фиксатора Кларка и оставляли на сутки при 4°С. Затем фиксированные образцы тщательно промывали деионизированной водой и помещали в раствор ацетоорсеина на 5 минут. Полученный препарат промывали водой от остатков красителя и помещали на предметное стекло с каплей 45%-ной уксусной кислоты. Из образцов готовили препарат монослоя клеток и микроскопировали. Для образцов определяли митотический индекс, частоту профазы, метафазы, анафазы и телофазы. Для каждого варианта было исследовано около 4-х корневых меристем, около 1000 клеток в каждом образце. Образцы корней лука, помещённые в 5%-ный водный раствор этанола без токсина использовали в качестве контроля.

### *2.2.12 Статистический анализ данных*

Все опыты выполнены в 3–6 повторностях. Влияние факторов на исследуемые показатели оценивали с помощью однофакторного и многофакторного дисперсионного анализа. Достоверность различий между средними значениями определяли с использованием критерия наименьшей существенной разности (НСР) при уровне значимости 0.05. Расчеты проведены при помощи программ StatSoft Statistica 8.0 и Microsoft Excel.

### 3 ОПИСАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБА-ПРОДУЦЕНТА

#### 3.1.1 Молекулярно-филогенетическая характеристика штамма

Идентификация изучаемого гриба была осложнена в связи с отсутствием спороношения.

Идентификация молекулярными методами была проведена по анализу локусов внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), гена большой субъединицы рРНК 28 S (LSU) и гена фактора элонгации трансляции (TEF). Показано, что данные локусы наиболее часто используют для идентификации грибов, а последовательности по ним наиболее широко представлены в базе данных GenBank (White et al., 1990).

Анализ региона ITS изучаемого штамма выявил максимальный уровень гомологии (99%) с неидентифицированным аскомицетом *Ascomycete* sp. AY787738.2 (77\* / 99\*\*). Другими ближайшими родственными видами оказались *Paraphoma chrysanthemicola* JX077009.1 (82 / 98), *Paraphoma* cf. *chrysanthemicola* KC180716.1 (89 / 98), а также неидентифицированные до вида *Phaeosphaeriopsis* sp. JX401935.1 (89 / 98), *Paraphoma* sp. JX401946.1 (92 / 98) и *Paraphoma* sp. KF802456.1 (80 / 98). При этом, уровень гомологии культуры изучаемого гриба с видом *Paraphoma chrysanthemicola* CBS 172.70 по данному локусу был недостаточно высоким – 97%. На основании полученных результатов, было определено, что изучаемый микромицет близок к роду *Paraphoma*, который ранее являлся одной из секций рода *Phoma* (таблица 1).

Следует отметить, что по результатам сравнения по региону ITS изучаемый штамм значительно отличался от известных видов *Phoma* на бодяке полевом.

Примечание: \* - уровень гомологии между последовательностями, %

\*\* - уровень перекрытия между последовательностями, %

Так, максимальный уровень гомологии по локусу ITS с видами *Phoma herbarum* CSS11768, *Boeremia exigua* var. *exigua* CBS 118.94 (старое название – *Ph. exigua*) и *Phoma macrostoma* составил 87%, а с видами *Boeremia hedericola* CBS 366.91 (старое название – *Ph. hedericola*) и *Phoma destructiva* var. *destructiva* CBS 133.93 – 84%, соответственно.

Анализ последовательности гена 28S LSU исследуемого штамма выявил высокий уровень сходства (99–100%) с видами *Paraphoma chrysanthemicola* CBS 52266 (98 / 99) и *Paraphoma radicina* CBS 102875 (98 / 99) (таблица 4). Важно отметить, что вид *P. radicina* считается типовым для рода *Paraphoma* (de Gruyter et al., 2010).

Сравнение нуклеотидных последовательностей гена LSU, выявило, что участок ДНК видов *P. chrysanthemicola* CBS 522.66 и *P. radicina* CBS 102875 идентичен, в то время как последовательность изучаемого штамма отличается от них на 4 нуклеотидные замены (рис. 2). Это предполагает наличие уникального гаплотипа для вида, к которому принадлежит изучаемый штамм.

Paraphoma sp. 1.46	A C T T G C C T G T A G T T G C T T A T C T A G A C T T T T G T C T A G T G C A C T C I
Paraphoma chrysanthemicola CBS 52266	.....CG.....CG.....
Paraphoma radicina strain CBS 102875	.....CG.....CG.....

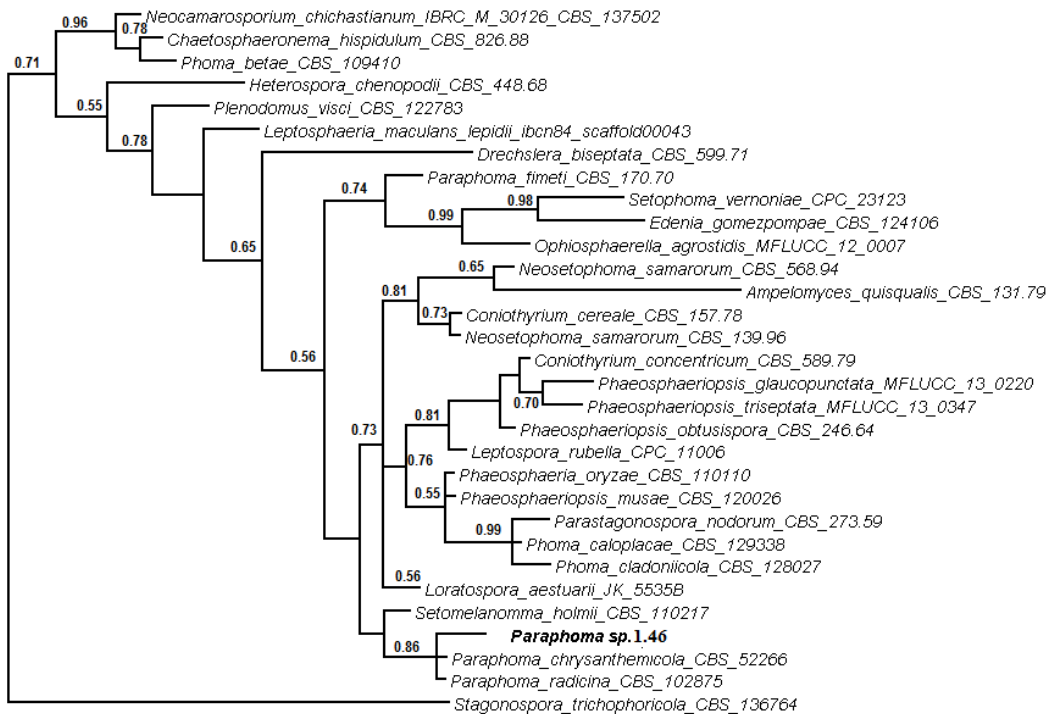
Рисунок 5 – Точечные различия нуклеотидных последовательностей ДНК по локусу LSU изучаемого штамма *Paraphoma* sp. 1.46 и штаммов *Paraphoma chrysanthemicola* CBS 52266 и *Paraphoma radicina* CBS 102875.

На матрице идентичности видно, что виды *P. chrysanthemicola* и *P. radicina*, а также *Phaeosphaeria oryzae* и *Phaeosphaeriopsis musae* по данному локусу сходны на 100%. При этом с таксонами из других родов по данному локусу виды *Paraphoma* могут иметь сходство 99.5%, также как и с изучаемым штаммом (таблица 4). В связи с этим, изучаемый штамм с наибольшей вероятностью может быть отнесён к роду *Paraphoma*.

Таблица 4 – Матрица идентичности по локусу LSU гриба *Paraphoma* sp. 1.46 и наиболее близких к нему видов

	<i>Paraphoma</i> sp. 1.46	<i>Paraphoma</i> <i>chrysanthemicola</i> CBS 52266	<i>Paraphoma</i> <i>radicina</i> CBS 102875	<i>Neosetophoma</i> <i>samarorum</i> CBS 568.94	<i>Setomelanomma</i> <i>holmii</i> CBS 110217	<i>Coniothyrium</i> <i>concentricum</i> CBS 589.79	<i>Phaeosphaeriopsis</i> <i>obtusispora</i> CBS 246.64	<i>Phaeosphaeria</i> <i>oryzae</i> CBS 110110	<i>Phaeosphaeriopsis</i> <i>musae</i> CBS 120026
<i>Paraphoma</i> sp.1.46	ID	0.995	0.995	0.992	0.990	0.989	0.988	0.988	0.988
<i>Paraphoma chrysanthemicola</i> CBS 52266	0.995	ID	1.00	0.988	0.995	0.989	0.988	0.990	0.990
<i>Paraphoma radicina</i> CBS 102875	0.995	1.00	ID	0.988	0.995	0.989	0.988	0.990	0.990
<i>Neosetophoma samarorum</i> CBS 568.94	0.992	0.988	0.988	ID	0.988	0.991	0.990	0.990	0.990
<i>Setomelanomma holmii</i> CBS 110217	0.990	0.995	0.995	0.988	ID	0.988	0.991	0.990	0.990
<i>Coniothyrium concentricum</i> CBS 589.79	0.989	0.989	0.989	0.991	0.988	ID	0.998	0.991	0.991
<i>Phaeosphaeriopsis obtusispora</i> CBS 246.64	0.988	0.988	0.988	0.990	0.988	0.998	ID	0.990	0.990
<i>Phaeosphaeria oryzae</i> CBS 110110	0.988	0.990	0.990	0.990	0.992	0.991	0.990	ID	1.00
<i>Phaeosphaeriopsis musae</i> CBS 120026	0.988	0.990	0.990	0.990	0.992	0.991	0.990	1.00	ID

На основе нуклеотидной последовательности исследуемого штамма по локусу LSU и 30-ти референсных последовательностей из базы данных GenBank, было построено филогенетическое дерево родства/сходства (рисунок 6). Разделение на кластеры поддержано достоверными критериями на основе Байесовского заключения. Соответственно, виды, объединённые в пределах одного кластера, являются близкородственными. Изучаемый микромицет находится в одном кластере с видами *P. chrysanthemicola* CBS 522.66 и *P. radicina* 102875 с высоким коэффициентом поддержки для ветви – 0.86 (рисунок 6).



### 0.1

Рисунок 6 – Филогенетическое положение изучаемого штамма *Paraphoma* sp. 1.46 (по анализу гена LSU). Филограмма построена методом байесовского заключения. Числовые метки на узлах обозначают постериорные вероятности.

По результатам анализа нуклеотидных последовательностей изучаемого штамма по гену TEF был отмечен максимальный уровень гомологии 97% с видом *Phoma radicina* CBS 111.79 (96 / 97). Важно отметить, что этот вид в настоящее время относится к секции *Paraphoma*. С меньшим уровнем идентичности были отмечены виды *Parastagonospora avenae* DQ677885.2 (99 / 95) и *Phaeosphaeria nodorum* XM 001801850.1 (99 / 96), а также *Phaeosphaeria eustoma* DQ677906.1 (96 / 95).

В связи с недостаточно высоким уровнем гомологии изучаемого штамма с видами из базы данных GenBank, видовую идентификацию гриба провести невозможно. Недостаточно высокий уровень гомологии изучаемого микромицета с видом *Paraphoma chrysanthemicola* CBS 172.70 по локусу ITS подтверждается наличием чётких отличий в сиквенсе изучаемого микромицета по локусу LSU с наиболее близкими ему видами *Paraphoma chrysanthemicola* CBS 522.66 и *Paraphoma radicina* CBS 102875 (рисунок 6) и относительно невысоким уровнем идентичности по гену TEF. На основании полученных результатов, гриб предварительно отнесён к роду *Paraphoma*. Однако, учитывая полифилетичность и сложность идентификации видов рода *Phoma*, родовая принадлежность изучаемого гриба может быть пересмотрена в будущем. Секвенированные участки ДНК изучаемого штамма (ITS, LSU, TEF) депонированы в базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), где им присвоены номера: KT289378, KT289379, KT289380.

### 3.1.2 Описание морфолого-культуральных характеристик штамма

Изучаемый микромицет характеризовался умеренным ростом на использованных синтетических и полусинтетических агаризованных питательных средах (рисунок 7).



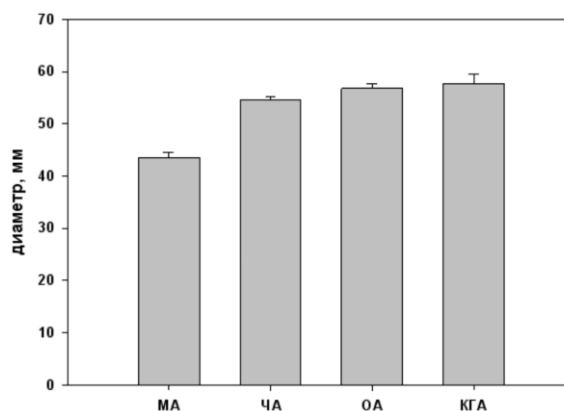


Рисунок 7 – Диаметр колоний гриба *Paraphoma* sp. 1.46  
в зависимости от состава питательной среды

Примечание - КГА – картофельно – глюкозный агар, ЧА – агаризованная среда Чапека, МА – мальтозный агар, ОА – овсяный агар НСР=9.7

На графике представлены значения со стандартным отклонением, n=4

На КГА колонии гриба слегка приподнятые оливково-серые бархатистые с ровными краями серо-голубого цвета. Реверс оливково-коричневого цвета (рисунок 6.1). Средний диаметр колонии 58 мм.

На среде ОА колонии распротёртые, паутинисто-бархатистые светло-серого цвета с ровными краями. По краю наблюдался красный пигмент. Реверс светло-серый с багряным пигментом по краю (рисунок 6.1 – 6.4). Средний диаметр колонии 57 мм.

Колонии, образовавшиеся на МА оливково-серого цвета, слегка приподнятые, с пушистым мицелием (рисунок 6.1 – 6.4). Края колонии ровные, тёмно-оливкового цвета. Реверс тёмно-оливкового цвета. Средний диаметр колонии 44 мм.

На агаризованной среде Чапека наблюдали слегка приподнятые бархатистые колонии серого цвета, с ровными краями светло-серого цвета. Реверс оливково-серого цвета по краям тёмно-оливковый (рисунок 6.1 – 6.4). Средний диаметр колонии 55 мм.

По морфолого-культуральным свойствам исследуемый штамм был близок фомоидным грибам. По наличию красного пигмента на среде ОА

(рисунок 8.1 и 8.3), гриб был близок к виду *Phoma sanguinolenta* и отличался от видов *Phoma*, распространённых на бодяке полевом, таких как *Ph.cirsii*, *Ph.herbarum*, *Ph.destructiva*, *Ph. hedericola*, *Ph. macrostoma* и *Ph. exigua* var. *exigua* (Boerema et al., 2004; Kluth et al., 2005).

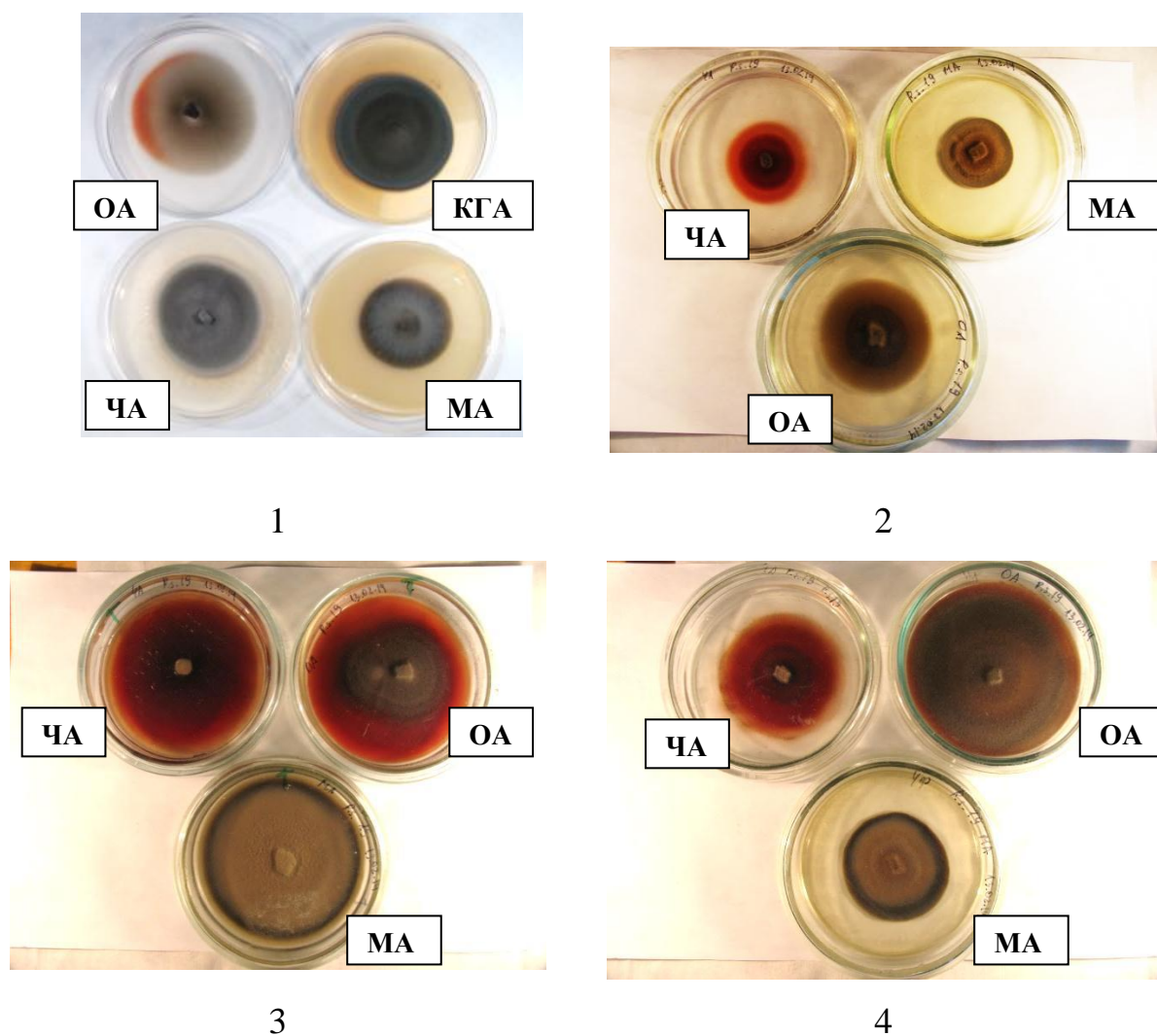


Рисунок 8 – Морфология колоний *Paraphoma* sp. 1.46 на различных средах в различных условиях освещения на 14-е и 28-е сутки: 1 – Темнота, 14 сутки; 2 – УФ свет (280-315 нм), 14 сутки; 3 – Переменное освещение, 28 сутки; 4 – УФ свет (280-315 нм), 28 сутки.

### 3.2 Оценка патогенных свойств гриба *Paraphoma* sp. 1.46

#### 3.2.1 Определение круга растений-хозяев *Paraphoma* sp. 1.46

Для определения круга растений-хозяев изучаемого гриба было проведено заражение листьев 14-ти видов растений в лабораторных условиях. Гриб *Paraphoma* sp. 1.46 проявил вирулентность на листьях бодяка полевого. Первые симптомы заболевания в виде некротических повреждений на листьях были отмечены на 5-6-е сутки после заражения (рисунок 9.1), на 12-е сутки после заражения размер некротических повреждений составил 60-70% от площади листа (рисунок 9.2). Гриб был реизолирован с заражённых листьев бодяка полевого.

Следует отметить, что некрозы были выявлены и на листьях других растений (арабидопсис, борщевик Сосновского, маргаритка, пырей и томат), но гриб их них реизолирован не был. При этом в контрольном варианте этих растений были также отмечены некротические повреждения (таблица 5). Некрозы могли быть вызваны токсическим действием метаболитов фитопатогенных грибов и бактерий, колонии которых развились на блоке среды КГА, помещённом на листовую поверхность растений.



Рисунок 9 – Симптомы, образующиеся в результате заражения листьев бодяка полевого: 1– на 5-6 сутки; 2 – на 12 сутки после заражения

Таблица 5 – Вирулентность мицелия на изолированных листьях растений на 10-е сутки после заражения *Paraphoma* sp. 1.46

Вид тестируемого растения	Развитие некрозов, % ± доверительный интервал (P = 0.95), n = 4		Реизоляция
	инокуляция	контроль	
Бодяк полевой	35 ± 5,3	0	+
арабидопсис	74,2 ± 4,3	81 ± 4,6	-
Борщевик Сосновского	20,5 ± 5,5	23,2 ± 2,7	-
Маргаритка	32,3 ± 3,5	34,1 ± 2,23	-
Пырей	11,2 ± 1,24	10,4 ± 1,43	-
Томат	37,4 ± 2,87	34,6 ± 3,25	-
Артишок	-	-	-
Базилик	-	-	-
Капуста	-	-	-
Мята	-	-	-
Перец	-	-	-
Полынь	-	-	-
Осот полевой	-	-	-

На основании данного эксперимента было определено, что гриб *Paraphoma* sp. 1.46 является патогеном бодяка полевого. Для подтверждения патогенности гриба было проведено заражение растений бодяка полевого инфекционным материалом на основе фрагментов мицелия.

### 3.2.2 Оценка патогенных свойств *Paraphoma* sp. 1.46 *in vitro*

Через 5-7 дней после искусственного заражения растений бодяка полевого суспензией мицелия *Paraphoma* sp. 1.46 было отмечено проявление первых симптомов заболевания (рисунок 10). Площадь некротических повреждений растений в результате заражения грибом составила около 17%, в контрольном варианте – около 2% от общей площади листа. Невысокий уровень поражения растений может быть связан с низкой концентрацией мицелия *Paraphoma* sp. 1.46 и относительно жесткими условиями инокуляции – недостаточно долгим периодом повышенного увлажнения листьев (Сокорнова, 2011).



Рисунок 10 – Листья бодяка полевого, после заражения растений суспензией гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Гриб был реизолирован из инфицированной ткани листьев бодяка полевого (рисунок 10), на основании чего были доказаны его патогенные свойства.

Известно, что грибы рода *Paraphoma* относятся к фомоидным грибам, многие представители которых являются фитопатогенами. Среди патогенов бодяка полевого известны *Ph. destructiva*, *Ph. hedericola*, *Ph. nebulosa*, *Ph. macrostoma* Mont., *Ph. exigua*, *Ph. herbarum* (Guske et al., 2004; Bailey, Derby, 2010). Для некоторых представителей этих видов изучены фитотоксичные метаболиты. Их более подробное описание представлено в разделе 1.2.1.

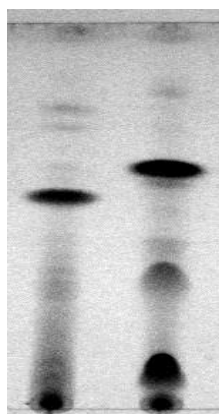
Важно отметить, что изучаемый микромицет отличался от вышеназванных видов по морфолого-культуральным признакам и молекулярно-филогенетическим данным. Это согласуется с тем, что грибы рода *Paraphoma* не были известны как патогены бодяка полевого. Недостаточно информации в литературе о вторичных метаболитах видов *Paraphoma*. Известно, что из экстрактов *P. radicina* выделены и охарактеризованы 9 соединений группы изохроменонов, изобензофуранонов и тетрагидронафталинов, одно из которых обладает антимикробными свойствами (El-Elimat et al., 2014).

Знания о вторичных метаболитах, образуемых *Paraphoma* sp. 1.46, могут быть использованы в хемосистематике фомоидных грибов. В таблице 1 показано, что метаболиты изучены всего у 5 из 9 типовых видов, представляющих секции рода *Phoma*.

В работе Берестецкого и Курлени за 2014 год было показано, что экстракты из культуры гриба *Paraphoma* sp. 1.46 обладают фитотоксической активностью. Для дальнейшей характеристики продуцента необходимо было изучить фитотоксичные метаболиты изучаемого гриба.

#### 4 ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОТОКСИНОВ ГРИБА

Изучение метаболитных профилей экстрактов из культурального фильтрата и твердофазной культуры гриба методом тонкослойной хроматографии показало различие в хроматографической подвижности их мажорных метаболитов (рисунок 11). Поэтому выделение фитотоксинов было проведено из обоих экстрактов.



1 2

Рисунок 11 – Метаболитные профили экстрактов, полученных из культуры *Paraphoma* sp. 1. 46, элюированные в системе хлороформ–изопропанол в соотношении 90:10 (по объёму):

- 1 –экстракт из твердофазной культуры ( $R_f=0.54$ );
- 2 – экстракт из культурального фильтрата ( $R_f=0.62$ )

##### 4.1 Выделение и идентификация фитотоксина из экстракта культурального фильтрата гриба

После разделения экстракта культурального фильтрата методами колоночной и тонкослойной хроматографии (ход работы описан в разделе 2.2.5) был выделен метаболит, проявивший фитотоксическую активность. Анализ масс-спектра соединения выявил наличие иона  $[M + H]^+$  со значением  $(M/Z) = 238.97$  (Приложение Б). В  $^1H$  ЯМР спектре (Приложение В) были

выявлены сигналы, соответствующие наличию в молекуле 2-х метильных групп, одна из которых находилась ближе к кислородсодержащему заместителю ( $\delta$  1.257 t и 2.584 s), 2-х метиленовых групп ( $\delta$  4.187 q и 6.277 d, 6.338 d) и двух протонов ароматических СН-групп ( $\delta$  7.259 s и 8.185 s) (Приложение В). В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре (Приложение Г) были обнаружены сигналы, соответствующие 12-ти типам магнитно-эквивалентных атомов углерода, среди которых были: 2 метильных ( $\delta$  13.94 и 31.68), 2 метиленовых ( $\delta$  41.683 и 61.160), 6 ароматических ( $\delta$  102.97, 112.661, 115.661, 137.27, 161.57, 165.636), четвертичный атом углерода карбонильной группы ( $\delta$  170.64) и атом углерода карбоксильной группы ( $\delta$  203.3) (Приложение Д). В ультрафиолетовом спектре соединения были выявлены 3 максимума поглощения: при 220, 275 и 310 нм, что подтверждало ароматическую структуру соединения (Приложение А). На основании анализа данных  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров, УФ и масс-спектров выделенного фитотоксина и анализа данных литературы, вещество было идентифицировано как курвулин (Varma et al., 2006).

Курвулин (рисунок 12.1) известен как вторичный метаболит некоторых видов грибов родов *Curvularia* и *Drechslera* (Kamal et al, 1963; Kenfield et al, 1989). По литературным данным курвулин имеет молекулярный вес 238.1 и структурную формулу  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ .

Курвулин (этил-2 (2-ацетил-3,5-дигидроксифенил) ацетат) является ацилрезорцинолом, представителем семейства циклических поликетидов, образуемых несколькими видами грибов. Впервые этот фитотоксин был выделен из экстрактов *Curvularia siddiqui* (Kamal et al., 1963). Позднее, это соединение было описано для грибов *C. ellisii* (Coombe et al., 1967), *C. pallescens* DSM 62482 (Abraham et al., 1995), *C. lunata* (Varma et al., 2006) и *Drechslera indica*, патогена портулака (*Portulaca oleracea* L.) и щирицы запрокинутой (*Amaranthus spinosus* L.) (Kenfield et al., 1989).



## 4.2 Выделение и идентификация фитотоксина из экстракта твердофазной культуры гриба

В результате фракционирования экстракта при помощи колоночной хроматографии и последующей очистки активной фракции был выделен один мажорный метаболит (130 мг/кг) (рисунок 11.1), проявивший фитотоксическую активность.

Анализ масс-спектра вещества выявил наличие иона  $[M+H]^+$  со значением  $(M/Z) = 297.7$ . При этом в спектре также наблюдались пики  $(M/Z)$ : 279.7  $[M+H-H_2O]^+$  и 261.6  $[M+H-2H_2O]^+$  (Приложение Е).

Максимум поглощения в ультрафиолетовом спектре был отмечен при 260 нм (Приложение Ж). В  $^1H$  ЯМР спектре (Приложение З, П) были выявлены сигналы, соответствующие наличию в молекуле 3-х метильных групп ( $\delta$  0.86 t, 1.19 и 3.79 t), 5 метиленовых ( $\delta$  1.28, 1.27, 1.44, 1.82 и 4.07, 3.86 и 5.44), 2 протона СН-группы ( $\delta$  1.5, 4.91). В  $^{13}C$  ЯМР спектре (Приложение И, П) были обнаружены сигналы, соответствующие 15-ти типам магнитно-эквивалентных атомов углерода, среди которых наблюдали: 3 метильных ( $\delta$  13.9, 20.4, 63.8), 4 метиленовых ( $\delta$  26.1, 27.6, 30.9 и 90.8), 2 ароматических ( $\delta$  64.3 и 86.3) и 5 четвертичных атомов углерода ( $\delta$  71.6, 104.8, 137.1, 155.3, 165.4). Данные были подтверждены спектром  $^{13}C$  DEPT (Приложение К). На основании анализа полученных спектральных характеристик и данных литературы, выделенный фитотоксин был предварительно идентифицирован как феосферид А (рисунок 12.2) (Maloney et al, 2006).

Феосферид А был впервые выделен из экстрактов эндофитного гриба FA 39 и охарактеризован как специфический ингибитор белка STAT3 – фактора транскрипции. Известно, что у феосферид А есть неактивный диастереомер – феосферид В (рисунок 12.3) (Maloney et al, 2006).

Химический синтез феосферида А был проведён дважды независимыми группами химиков (Kobayashi et al., 2011; Chatzimpaloglou et al., 2012), однако воспроизвести стереохимическую структуру фитотоксина, предложенную первыми авторами (Maloney et al., 2006; рисунок 12.2) не удавалось (рисунок 12.4).

Структуры синтетических (феосферид С, рисунок 12.4) и природного феосферидов А отличались пространственным расположением ОН- и СH<sub>3</sub>- групп в положении С-7 по отношению к плоскости кольца (рисунок 10.4) (Kobayashi et al., 2011; Chatzimpaloglou et al., 2012).

Для определения пространственной конфигурации структуры были получены двумерные ЯМР спектры фитотоксина: протон-протонного <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, протон-углеродного <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМВС, протон-углеродного <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМQC, протон-протонного <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY (Приложение Л-О).

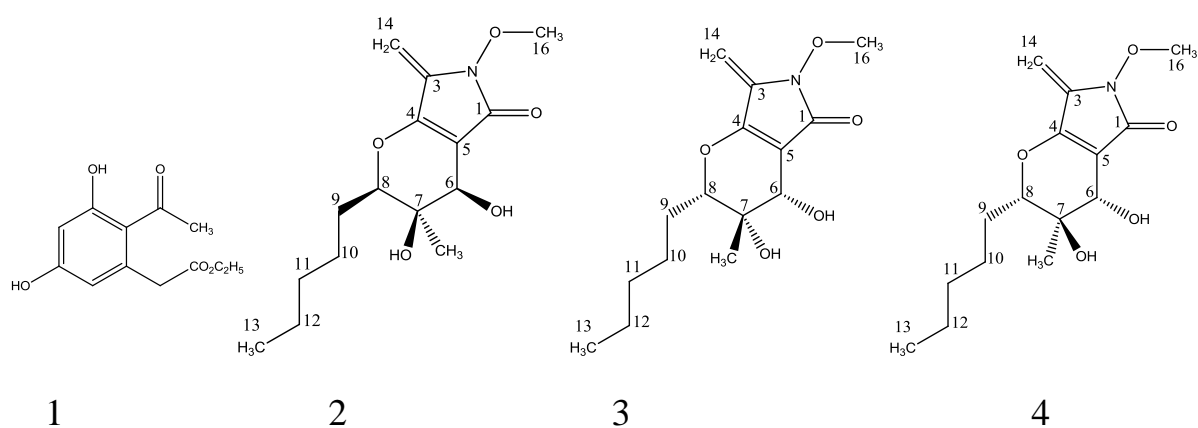


Рисунок 12 – Химическая структура курвулина и феосферида

1 - курвулин; 2 - феосферид А; 3 - феосферид В (Maloney et al., 2006); 4 - феосферид С (Kobayashi et al., 2011; Chatzimpaloglou et al., 2012)

Примечание: нумерация атомов в молекуле феосферида указана согласно Maloney et al., 2006

Анализ спектров <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМВС, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМQC и <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY позволил определить, что протон ОН-группы при атоме С-6, протон при атоме С-9 и СH<sub>3</sub>-группа при атоме С-7 расположены с одной стороны от плоскости кольца, в то время как ОН-группа при атоме С-7 лежит в другой

плоскости (рисунок 12.4, Приложение М, Н, О). Информация о молекулярной структуре феосферида А, полученная в результате обработки данных ЯМР анализа, масс-спектрометрического анализа и данных УФ-спектров была подтверждена данными рентгеноструктурного анализа. Было установлено, что феосферид в кристалле существует в виде энантиомерной пары (Abzianidze et al., 2015) (Приложение Р) и его пространственная структура соответствует структуре синтетического феосфериды (рисунок 12.4).

Таким образом, структура выделенного нами фитотоксина соответствовала структуре, предложенной Chatzimpalougli и соавторами в 2012 году (рисунок 12.4) (Chatzimpalougli et al., 2012). В результате проведённых исследований впервые была точно определена пространственная структура природного феосфериды А (Abzianidze et al., 2015).

## 5 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТОТОКСИНОВ

### 5.1 Изучение фитотоксических свойств выделенных метаболитов

#### 5.1.1 Фитотоксическая активность на листовых дисках

Оба фитотоксина проявили фитотоксическую активность на листовых высечках бодяка полевого и пырея ползучего. Испытанные тест-растения были значительно более чувствительны к действию феосферида А, чем курвулина. Минимальная концентрация феосферида А, вызывающая некрозы на листовых дисках бодяка, составила 250 мкг/мл ( $0.84 \times 10^{-4}$  М или 2.5 мкг/диск), на отрезках листьев пырея – 125 мкг/мл ( $0.42 \times 10^{-4}$  М) (рисунок 13.1 – 13.2). Достоверное поражение бодяка полевого курвулином наблюдали при его использовании в концентрации 1 мг/мл ( $4.2 \times 10^{-4}$  М) и выше, для пырея ползучего в концентрации  $\geq 2$  мг/мл ( $8.4 \times 10^{-4}$  М) (рисунок 12).

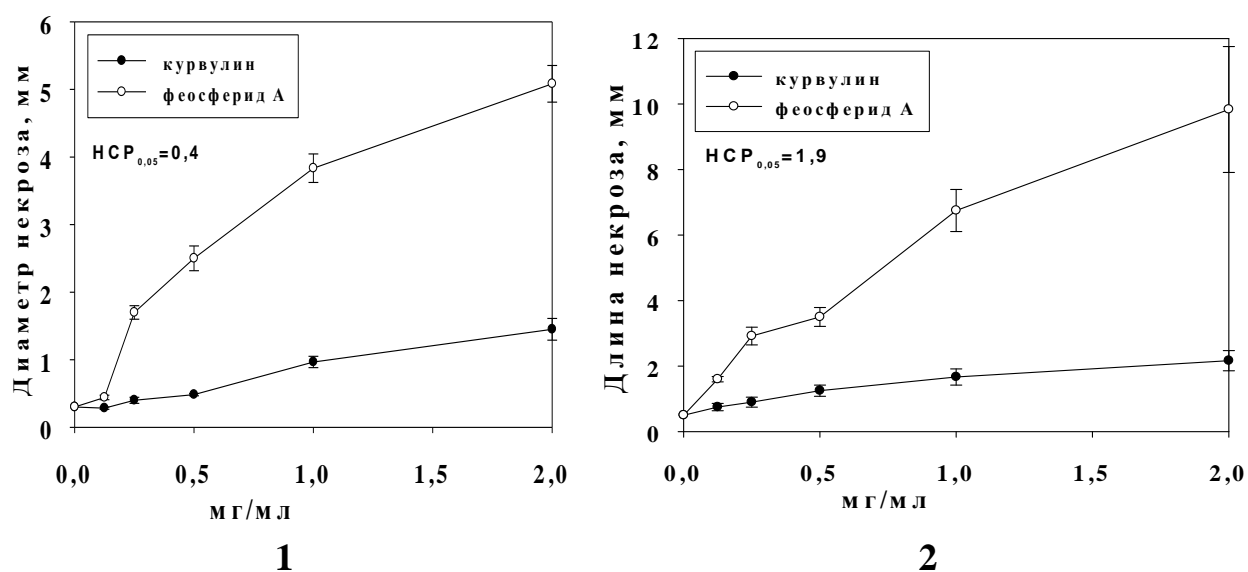


Рисунок 13 – Влияние концентрации феосферида А и курвулина на развитие некрозов на сегментах листьев растений  
1 - бодяк полевой; 2 - пырей ползучий

Примечание: приведены значения со стандартным отклонением

Выделенные фитотоксины были неселективны в отношении испытанных 10-ти видов растений из разных семейств. Наиболее чувствительными к действию феосферид А в концентрации 1 мг/мл ( $3.35 \times 10^{-4}$ ) из однодольных растений оказались пшеница и пырей, среди двудольных – подсолнечник и бодяк. Наименьший уровень фитотоксичности феосферид А был отмечен для борщевика Сосновского (рисунок 14).

Фитотоксическая активность курвулина, испытанного в концентрации 2 мг/мл, была значительно ниже. Статистически существенный уровень поражения токсином был отмечен на 5 видах растений: горох, бодяк, пшеница, пырей и арабидопсис (рисунок 14).

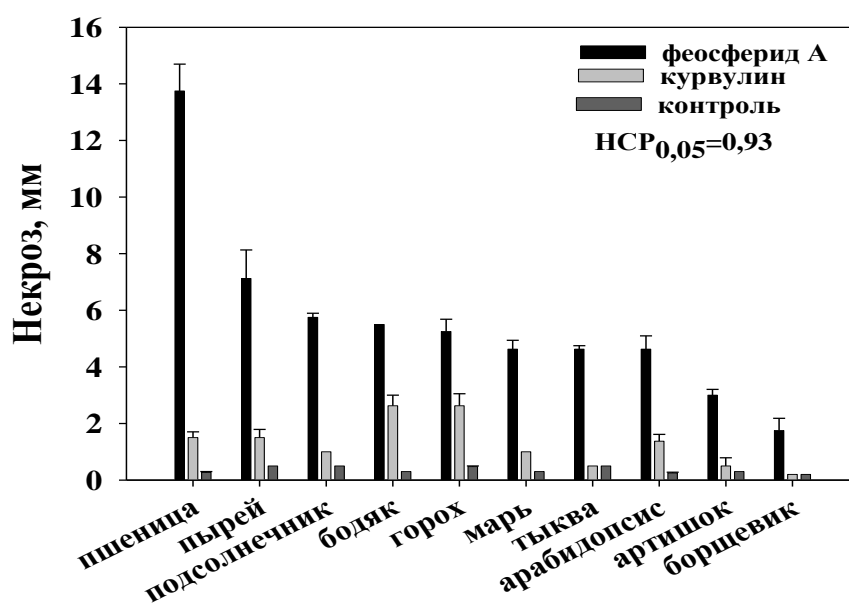


Рисунок 14 – Спектр фитотоксической активности феосферид А и курвулина

Примечание: приведены значения со стандартным отклонением

### 5.1.2 Влияние фитотоксинов на рост корней

Феосферид А в максимальной испытанной концентрации 1 мг/мл ( $3.35 \times 10^{-4}$  М) ингибировал рост корней проростков салата, цикория и редиса на 48, 57 и 43%, соответственно (рисунок 16). В концентрации 0.1 мг/мл фитотоксин ингибировал рост корней тест-растений на 7–11%, в меньших концентрациях активность феосферид А была слабой (рисунок 16). В контроле для обработки проростков растений использовали 5%-ный водный раствор этанола, ингибирующего действия на рост корней в этом варианте отмечено не было.

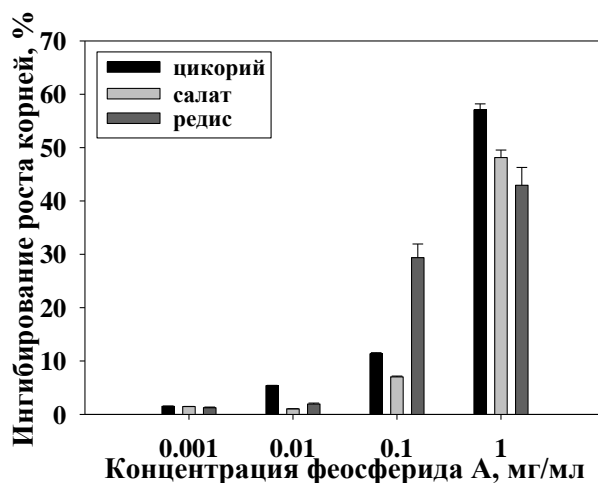


Рисунок 16 – Ингибирующий эффект феосферид А на рост корней проростков салата, цикория и редиса

Примечание: приведены значения со стандартным отклонением

Курвулин, испытанный в максимальной концентрации 1 мг/мл ( $4.2 \times 10^{-4}$  М) не влиял на рост корней проростков салата, цикория и редиса.

Известно, что некоторые фитотоксины, например, гербарумин I (*Ph. herbarum*) и стагонолид (*Stagonospora cirsii*), проявляют сильную ингибирующую активность на рост корней растений. Так, гербарумин I активен с  $LD_{50}=0.5 \times 10^{-4}$  М в отношении семян *Amaranthus hypochondriacus* L., а стагонолид ингибирует рост семян *C. arvensis* с  $LD_{50}=0.05 \times 10^{-4}$  М,

соответственно (Yuzikhin et al., 2007; Rivero-Cruz et al., 2000). В сравнении с этими соединениями, ингибирующая активность феосферида А в концентрации 1 мг/мл является слабой.

## 5.2 Оценка токсичности в отношении инфузорий

Для оценки токсичности выделенных веществ, изучали токсическое действие растворов феосферида А и курвулина в концентрациях 0.1, 0.01 и 0.001 мг/мл на культуру инфузории – туфельки *Paramecium caudatum*.

Через 3 и 30 минут после контакта раствора феосферида А с инфузориями, изменений в подвижности парамеций отмечено не было. Спустя 3 часа в растворе феосферида А с концентрацией 0.1 мг/мл активность инфузорий уменьшилась на 40%, а после 24 часов инкубирования 100% инфузорий перестало двигаться. При меньших концентрациях феосферида, а также во всех испытанных концентрациях курвулина токсического действия не наблюдалось (таблица 5).

Таким образом, было определено, что феосферид А проявляет слабую токсичность в отношении культуры *P. caudatum* в концентрации 0.1 мг/мл, а курвулин не токсичен для инфузорий.

Известно, что культура *P. caudatum* является высокочувствительным тест-организмом для выявления токсичных соединений. Так, действие карбофурана, действующего вещества гербицида Furadan, токсично для инфузорий в концентрации 1.56 мкг/мл (Moreira et al., 2015). Действие известного гербицидного соединения 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты и её производного 2,4 – дихлорфенола вызывает гибель парамеций при концентрации от  $2 \times 10^{-4}$  мг/мл через 5 минут (Takiguchi et al., 2002).

Таблица 5 – Активность феосферид А и курвулина в отношении культуры *P. caudatum*

Концентрация, мг/мл	Феосферид А				Курвулин			
	3 мин	30 мин	3 часа	24 часа	3 мин	30 мин	3 часа	24 часа
0.1	0	0	40%	100%	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0

### 5.3 Антимикробная активность

Феосферид А и курвулин не проявили антимикробной активности в отношении испытанных 2-х видов грамположительных, 5-ти видов грамотрицательных бактерий и 3-х видов грибов при максимально испытанной концентрации 100 мкг/диск. Известно, что алкалоиды, сходные по структуре с феосферидом А – курвапаллиды не обладают антимикробными свойствами в отношении бактерий *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Mycobacterium smegmatis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, а также спор грибов *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Mucor rouxii* в концентрации до 100 мкг (Abraham et al., 1995). Данные литературы подтверждают отсутствие антимикробной активности у курвулина в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* и *B. subtilis* (Varma et al, 2006).



Таким образом, из экстрактов *Paraphoma* sp. 1.46 впервые были выделены фитотоксичные метаболиты, идентифицированные как известные соединения курвулин и феосферид А.

Невысокая фитотоксическая активность курвулина известна по данным литературы. В работе Kamal и соавторов фитотоксическое действие этого соединения было оценено на нескольких видах растений в концентрациях 3.5 мг/мл ( $14.7 \times 10^{-4}$  М) и 7 мг/мл ( $29.4 \times 10^{-4}$  М) и было выявлено, что в низкой концентрации к курвулину чувствительны только растения щирицы запрокинутой (*Amaranthus spinosus*) и портулака (*Portulaca oleraceae*). При более высокой концентрации соединения был отмечен фитотоксический эффект на листьях сои (*Glycine max*) и мятлика (*Poa annua*) (Kamal et al, 1963). Известно также о слабом антимиотическом действии курвулина и родственных ему соединений из группы ацилрезорцинолов, обусловленном ингибирующим эффектом на сборку микротрубочек в процессе деления клетки (Bracher, Crauss, 1998). В связи с относительно невысоким уровнем фитотоксической активности и известными свойствами, дальнейшая работа по изучению курвулина не представляла интерес.

Неселективная фитотоксическая активность феосферид А выявлена нами впервые. Ранее другими авторами было обнаружено, что это соединение обладает противоопухолевой активностью. Феосферид А ингибирует активацию белка STAT 3 (сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции), регулирующего транскрипцию многих генов с  $LD_{50}=6,1 \times 10^{-4}$  М. При этом, в исследовании селективности действия феосферид А было выявлено, что соединение не активно в отношении других STAT-белков: STAT1 и STAT5 (Maloney et al, 2006). По данным литературы, данный белок в растениях не обнаружен. Возможно, фитотоксическая активность феосферид А обусловлена действием на аналог этого белка в клетках растений. Важно отметить, что при высоком уровне фитотоксической активности, соединение было нетоксично для испытанных микроорганизмов

и слаботоксично в отношении культуры инфузории-туфельки в концентрации 0.1 мг/мл. В связи с этим, феосферид А может быть перспективен для дальнейших исследований и оценки возможности практического использования. Структура феосферид А представляет интерес для дальнейшего изучения в качестве прототипа гербицидного вещества, нетоксичного для нецелевых объектов окружающей среды.

Среди продуцентов феосферид А были известны эндофитный гриб FA 39, имеющий 97% гомологии с видом *Phaeosphaeria avenaria* (Maloney et al., 2006) и *Paraphaeosphaeria neglecta* FT462 (Li et al., 2015). Интересно отметить, что представители *Phaeosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*, *Paraphoma* и некоторых других родов объединены в семейство *Phaeosphaeriaceae* (Phookamsak et al., 2014). Можно предположить, что феосферид А является хемотаксономическим маркером для видов, принадлежащих к семейству *Phaeosphaeriaceae*.

Известны две группы метаболитов - структурных аналогов феосферид А, относящихся к классу спироциклических лактамов. Это курвапаллиды (рисунок 15.8) продуцент - *Curvularia pallescens*) и спиростафилотрицины/тритиконы (рисунок 15.1 - 15.7), описанные для видов *Staphylotrichum coccosporum*, *Drechslera tritici-repentis*, *C.clavata* (Sugavara, 2000). Эти семейства соединений отличаются наличием необычной функциональной группы - о-метил гидроксиаминовой кислоты. Следует отметить, что у феосферид А имеется не характерная для этих соединений метильная группа при атоме С-15 (Maloney et al., 2006).

По данным литературы известно о неспецифических фитотоксических свойствах спиростафилотрицинов С и D (рисунок 15.2 - 15.3). Так, смесь этих метаболитов проявляет неселективные фитотоксические свойства в отношении некоторых двудольных и однодольных растений различных семейств. В концентрации  $10 \times 10^{-4}$  М фитотоксины вызывали на сегментах листьев пшеницы (*T. aestivum*) и костра кровельного (*Bromus tectorum* L.) некрозы в диаметре 2 и 1.6 мм, в отношении томата (*S. lycopersicum*) и осота

полевого (*S. arvense*) – 2.3 мм, соответственно (Masi et al., 2014). Известно также о фитотоксичности спиростафилотрицина С (рисунок 15.2), вызывающего некрозы на листьях однодольных (*T. aestivum*) и двудольных растений (*Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexes*, *Taraxacum officinale*) (Sugavara, 2000).

Важно отметить, что минимальная концентрация феосфериды А, в которой соединение проявляет фитотоксическую активность, составляет  $0.84 \times 10^{-4}$  М на бодяке полевом и  $0.42 \times 10^{-4}$  М на отрезках листьев пырея, при этом действие токсина вызывало некрозы в размере 1.7 мм на сегментах листьев чувствительных растений (рисунок 13). Из приведённых данных можно сделать вывод, что активность феосфериды А превосходит фитотоксичные структурные аналоги.

Полученные данные о биологической активности феосфериды А и его структурных аналогов могут быть использованы в изучении взаимосвязи структура-активность. В работе Masi и соавторов рассматривается предположение о том, что природа заместителей при атоме С-3 у фитотоксичных спироциклических лактамов оказывает значительное влияние на фитотоксическую активность. Так, наиболее активными являются спиростафилотрицины А, С и D, имеющие внециклическую  $\text{CH}_2$ -группу при атоме С-3, (рисунок 15.1-15.3), менее высокий уровень активности отмечен для спиростафилотрицинов W и V (рисунок 15.4-15.5), в то время как спиростафилотрицин R и тритикон E нефитотоксичны (Masi et al., 2014). Интересно отметить, что в структурной формуле феосфериды А имеется  $\text{CH}_2$ -группа в этом положении (рисунок 15.9).

Точная роль спиростафилотрицинов в процессе патогенеза гриба-продуцента не изучена. Интересно, что спиростафилотрицин А проявляет фитотоксическую активность ингибирования элонгации колеоптиля, в то время как смесь спиростафилотрицинов С и D проявляет фитотоксическую активность на листовых дисках. Поскольку продуцент

спиростафилотрицинов *P. tritici-repentis* является патогеном пшеницы, вызывающим пятнистость листьев, некоторые авторы предполагают, что смесь спиростафилотрицинов С и D играет важную роль в процессе патогенеза на листьях (Masi et al., 2014). Возможно, высокая фитотоксическая активность феосфериды А имеет важное значение в процессе патогенеза гриба *Paraphoma* sp. 1.46.

Для дальнейшего изучения феосфериды А необходимо было оптимизировать способ его получения из экстрактов твердофазной культуры *Paraphoma* sp. 1.46.

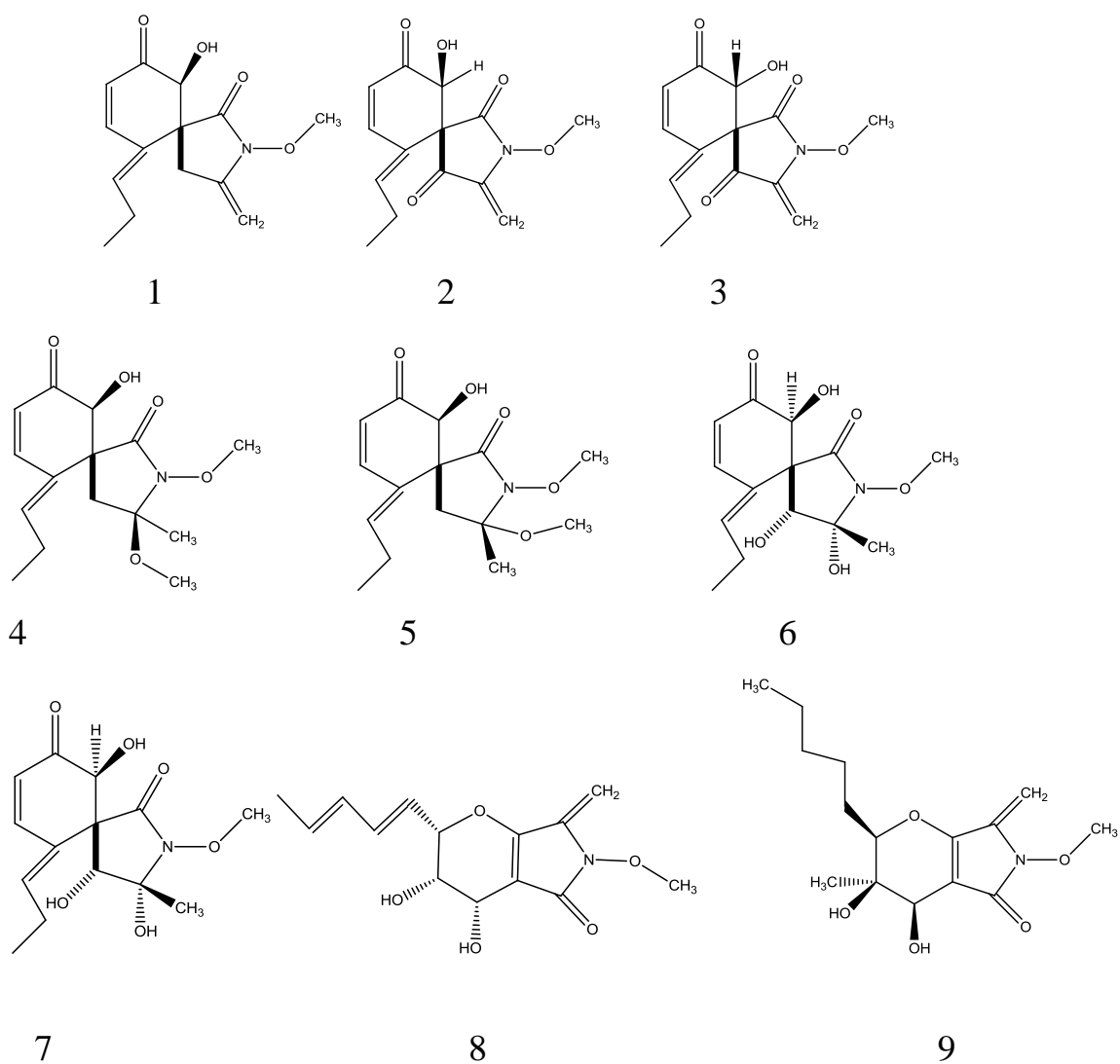


Рисунок 15 – Феосферид А и некоторые структурные аналоги

- 1 – спиростафилотрицин А; 2 – спиростафилотрицин С (тритикон А);  
 3 – спиростафилотрицин D (тритикон В); 4 – спиростафилотрицин W;  
 5 – спиростафилотрицин V; 6 – спиростафилотрицин R; 7 – тритикон E;  
 8 – курвупаллид А; 9 – феосферид А

## 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ВЫХОД ФЕОСФЕРИДА А

### 6.1 Анализ феосферид А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

На первом этапе исследований по оптимизации культивирования продуцентов БАВ необходима разработка метода анализа исследуемого соединения.

Поскольку феосферид А образуется только при твердофазном культивировании гриба, была разработана методика его количественного анализа в твёрдых стандартных зерновых субстратах: перловой, пшённой и рисовой крупах.

Методика полуколичественного анализа феосферид А была разработана с помощью ТСХ. Нами выявлено, что феосферид А в неочищенных экстрактах детектируется в минимальной концентрации 50 мг/кг.

Количественный анализ феосферид А проводили на приборе UPLC Acquity H-Class (Waters) с диодно-матричным детектором на аналитической колонке Acquity UPLC BEH C18 50×2.1 мм с зернением 1.7 мкм (Waters). В качестве подвижной фазы использовали систему ацетонитрил – 5 мМ ортофосфорная кислота в соотношении 40:60 (по объёму), скорость потока составляла 250 мкл/мин, температура колонки 30°C. Объём вводимого образца составил 10 мкл. Детектирование вещества проводили на длине волны 260 нм. Время удерживания феосферид А составляло 1.9 минуты.

Пробоподготовка образцов включала экстракцию ацетонитрилом с последующей очисткой на концентрирующих патронах Диапак С 16 (БиоХиммак СТ, Россия). Подобранный способ очистки позволил анализировать феосферид А без наложения коэкстрактивных веществ (рисунок 17-19).

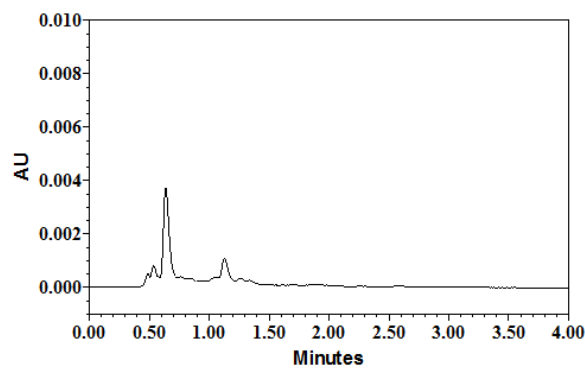
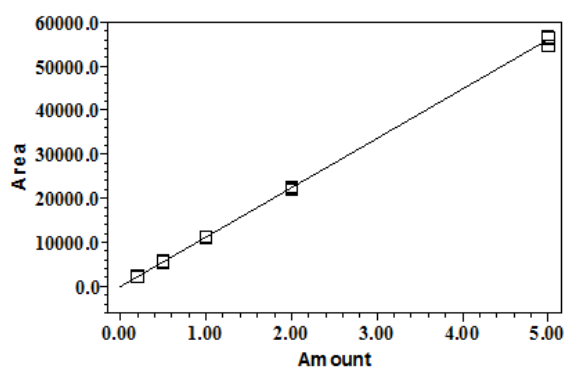
В субстрат вносили феосферид А в количестве от 1 до 10 мг/кг. В зависимости от вида субстрата, степень извлечения вещества составила 84–97% (таблица 6). Предел обнаружения феосферид А в субстратах составил 1 мг/кг.

Таблица 6 – Степень извлечения феосферид А из различных матриц

Внесённая концентрация мг/кг	Степень извлечения феосферид А в анализируемой матрице, % $\pm$ доверительный интервал ( $P = 0.95$ ), $n = 4$		
	Перловая крупа	Рисовая крупа	Пшённая крупа
1	86 $\pm$ 3,64	87,4 $\pm$ 1,73	96,5 $\pm$ 7,1
2	84,3 $\pm$ 4,98	91,7 $\pm$ 6,67	93,6 $\pm$ 3,45
5	88,1 $\pm$ 2	89,02 $\pm$ 3,65	97,7 $\pm$ 3,35
10	90,02 $\pm$ 3,98	91,3 $\pm$ 1,98	95,1 $\pm$ 4,93
Среднее значение	87,1 $\pm$ 3,61	89,8 $\pm$ 3,48	95,7 $\pm$ 4,7

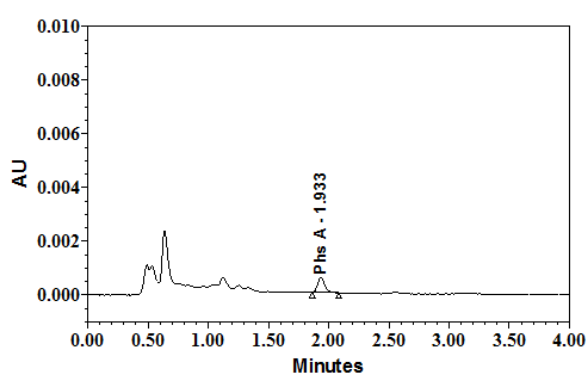
Влияние концентрации внесенного вещества на степень его извлечения из различных матриц было несущественным. При этом, уровень извлечения фитотоксина был выше на пшённой крупе, а на перловой – ниже (таблица 6).

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площадей пиков (отн. единицы) от концентрации феосферид А в растворе (мкг/мл), установили методом абсолютной калибровки по 5-ти концентрациям вещества. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 0.2–5.0 нг в пробе для каждой из матриц (рисунок 17,18,19).

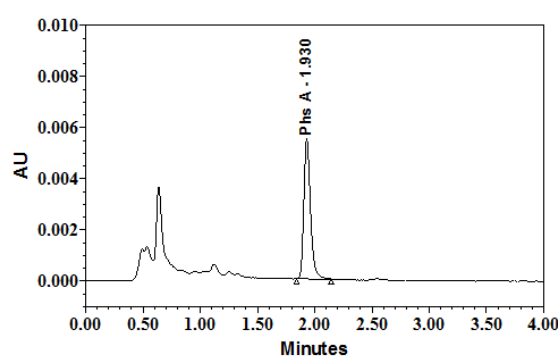


$$R^2=0.9997 \quad y=1.12e+004 x - 4.75 e+001$$

Контроль (автоклавированный субстрат без внесения)



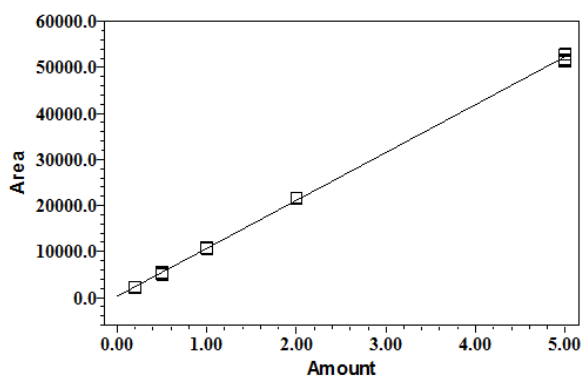
0.2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферид А 0.2 мкг/г субстрата)



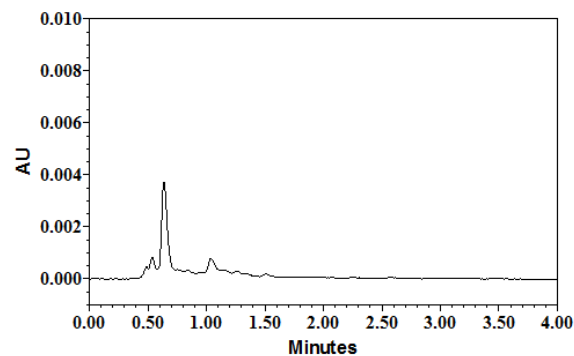
2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферид А 2.0 мкг/г)

Рисунок 17 – Калибровочная кривая и хроматограммы на определение феосферид А в субстрате на основе перловой крупы

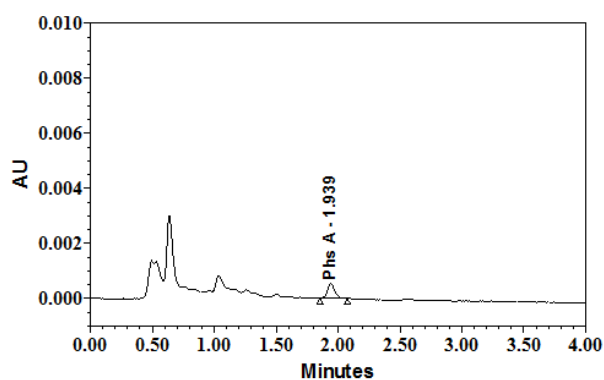




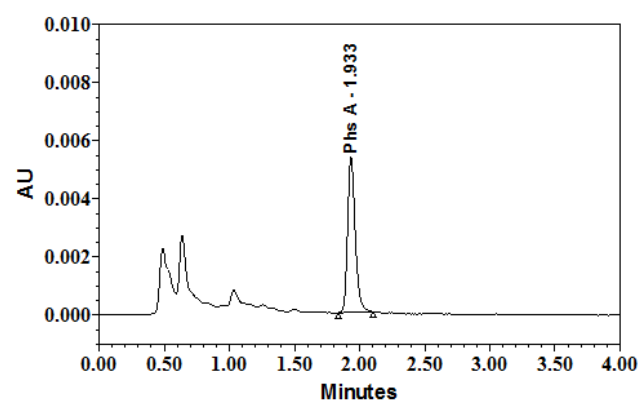
$$R^2=0.9995 \quad y=1.04e+004 \quad x + 2.87 \quad e+002$$



Контроль (автоклавированный субстрат без внесения)

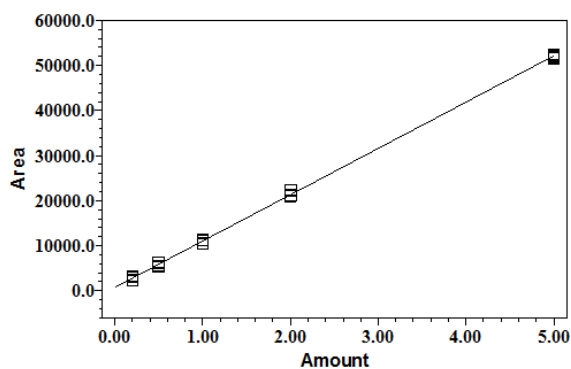


0.2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферида А 0.2 мкг/г субстрата)

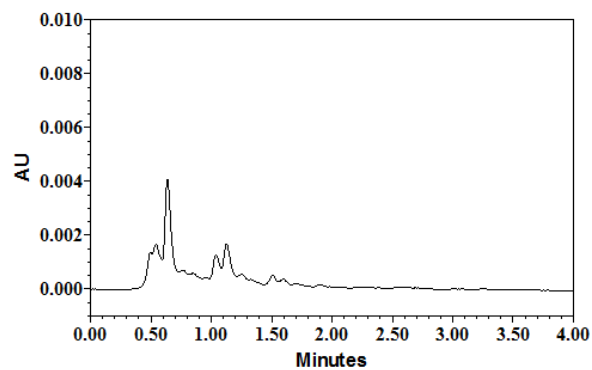


2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферида А 2.0 мкг/г)

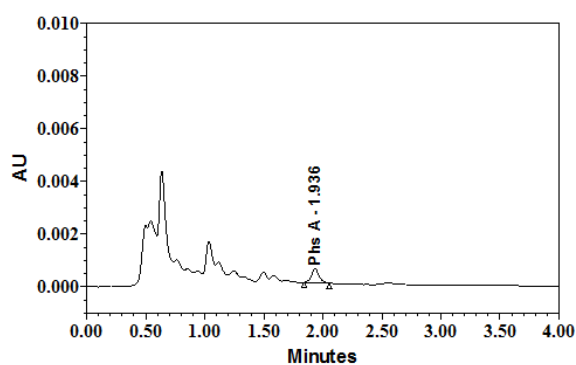
Рисунок 18 – Калибровочная кривая и хроматограммы на определение феосферида А в субстрате на основе рисовой крупы



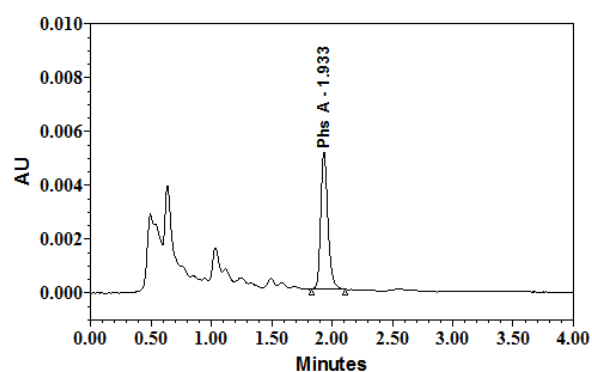
$$R^2=0.9992 \quad y=1.12e+004 \quad x + 7.58 \quad e+002$$



Контроль (автоклавированный субстрат без внесения)



0.2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферида А 0.2 мкг/г субстрата)



2 нг в пробе (соответствует содержанию феосферида А 2.0 мкг/г)

Рисунок 19 – Калибровочная кривая и хроматограммы на определение феосферида А в субстрате на основе пшениной крупы

Методику количественного анализа использовали для изучения влияния различных факторов культивирования гриба на образование феосферида А.

## 6.2 Влияние условий освещения на образование феосфериды А

Развитие воздушного мицелия *Paraphoma* sp. 1.46 отличалось при разных условиях освещения. Так, наиболее быстрый рост мицелия был отмечен в условиях темноты, в то время как воздействие ультрафиолетового света в диапазоне 280-315 нм ингибировало его развитие. Условия освещенности также влияли и на выход экстрактивных веществ из колонизированного грибом субстрата. Ультрафиолетовый свет в диапазоне 300-400 нм стимулировал рост субстратного мицелия гриба и накопление его метаболитов. Действие ультрафиолетового света в диапазоне 280-315 нм обладало этим эффектом только на первом этапе роста гриба (таблица 8). Под влиянием переменного освещения выход экстрактивных веществ увеличивался несущественно по сравнению с вариантом, в котором гриб культивировали в темноте (таблица 8).

Продолжительность культивирования гриба оказала существенное влияние на выход феосфериды А (рисунок 22, 23). На 17-е сутки выход феосфериды А был более чем на порядок выше, чем на 10-е вне зависимости от варианта освещенности. Максимальный выход вещества в данном эксперименте выявили на 17 сутки культивирования *Paraphoma* sp. 1.46 в условиях постоянного облучения ближним ультрафиолетовым светом. Он был примерно на 30% ниже при культивировании гриба в темноте и при переменном освещении лампами дневного света. Ультрафиолетовый свет с длиной волны 280-315 нм ингибировал образование феосфериды А (рисунок 22).

Анализ экстрактов при помощи ТСХ показал, что феосферид А хорошо визуализируется при проявлении хроматограмм в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм в концентрации от 50 мг/кг субстрата (рисунок 22, 23).

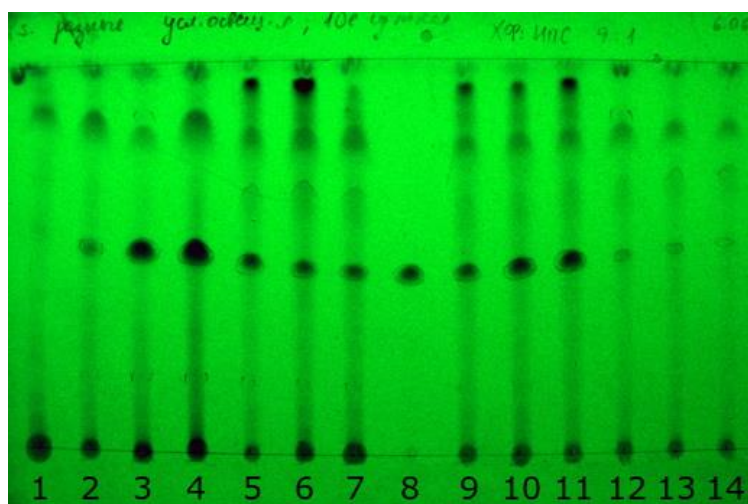


Рисунок 22 – Хроматограмма экстрактов мицелия, полученных при культивировании гриба *Paraphoma* sp. 1.46 на перловой крупе при различных условиях освещения на 10-е сутки (проявление в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм)

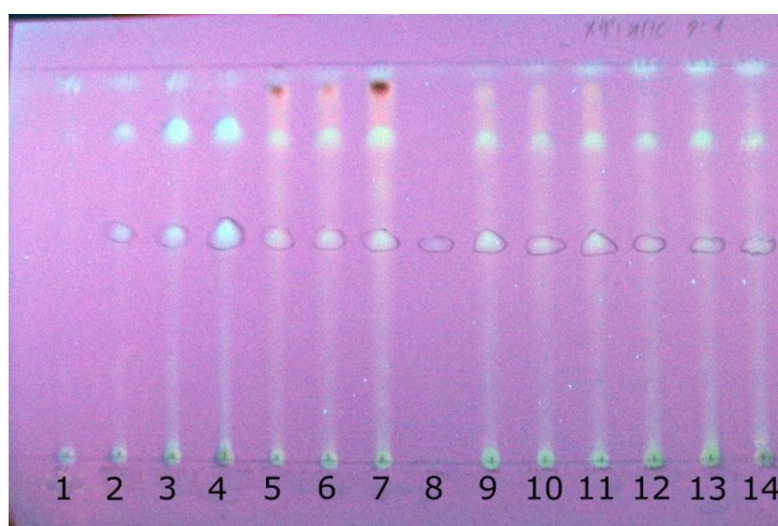


Рисунок 23 – Хроматограмма экстрактов мицелия, полученных при культивировании гриба *Paraphoma* sp. 1.46 на перловой крупе при различных условиях освещения на 17-е сутки (проявление в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм)

Примечание к рисункам 22, 23: 1 – контрольный вариант; 2-4 – темнота; 5-7 - переменное освещение; 8-стандарт феосферина А; 9-11 – УФ 300-400 нм; 12-14 – УФ 280-315 нм

Элюирование в системе хлороформ–изопропанол в соотношении 90:10 (по объёму)

Таблица 8 – Влияние условий освещения на образование феосферида А

Условия освещения	Сроки культивирования, сутки	Средний выход экстракта $\pm$ субстрата, г/кг доверительный интервал (P=0.95), n = 4	Средний выход феосферида А $\pm$ субстрата, мг/кг доверительный интервал (P=0.95) *, n = 4
Темнота	10	0.28 $\pm$ 0.029	6.16 $\pm$ 1.58
	17	0.9 $\pm$ 0.29	112.27 $\pm$ 7.14
Переменное освещение лампами дневного света 12 ч в день	10	0.27 $\pm$ 0.053	2.42 $\pm$ 0.012
	17	1.21 $\pm$ 0.46	108.23 $\pm$ 24.18
Ультрафиолетовый свет 300-400 нм	10	0.48 $\pm$ 0.082	6.13 $\pm$ 0.34
	17	1.57 $\pm$ 0.43	157.22 $\pm$ 9.034
Ультрафиолетовый свет 280-315 нм	10	0.57 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.05
	17	0.78 $\pm$ 0.09	15.88 $\pm$ 1.44

\*Для количественного анализа использовали метод ВЭЖХ

Следует отметить, что при культивировании в условиях освещения и облучения ультрафиолетовым светом гриб образовывал красный пигмент в качестве одного из основных метаболитов. В связи с этим, экстракты твердофазной культуры гриба, полученные в этих условиях, были более комплексными (рисунок 23).

По данным литературы известны примеры стимуляции токсинообразования за счёт воздействия ультрафиолетового света. Многие авторы связывают этот эффект с реакцией продуцента на создаваемые стрессовые условия. Так, в работе Atalla и соавторов рассматривается эффект

ближнего и дальнего ультрафиолетового излучения на образование микотоксинов *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides*, *Scopulariopsis fusca* и *Verticillium lecanii* при росте продуцентов на зерне пшеницы. В работе сообщается, что под влиянием ультрафиолетового света с длиной волны 254 нм, содержание токсинов значительно уменьшается, в то время как при облучении культур ультрафиолетовым светом с длиной волны 365 нм наблюдается повышенный уровень их содержания (Atalla et al., 2004).

Есть сведения об ингибирующем влиянии белого света на образование микотоксинов в культурах *A. flavus* и *A. parasiticus* (Bennett, 1971). В работе Haggblom и Unestan за 1979 год рассматривается влияние действия синего и красного света на образование микотоксинов грибом *A. alternata*. Авторы говорят о том, что воздействие синего света ингибировало образование альтернариола и монометилового эфира альтернариола на 69 и 77%, соответственно. При этом общий уровень содержания липидов повысился на 25% по сравнению с их содержанием в культуре гриба, полученной при культивировании в условиях освещения красным и белым светом. Интересно отметить, что при освещённости синим и белым светом, гриб образовывал красный пигмент, а при действии красного света и в темноте пигмент не был обнаружен (Haggblom, Unestan, 1979).

Полученные нами данные показывают, что выбор условий освещения при твердофазном культивировании *Paraphoma* sp. 1.46 оказывает существенное влияние на образование феосфериды А. Максимальный выход метаболита был достигнут при культивировании гриба в условиях облучения ультрафиолетовым светом с длиной волны 300-400 нм и составил 160 мг/кг. Однако экстракты из твердофазной культуры гриба, полученные в этих условиях, оказались более комплексными и содержали в качестве одного из основных соединений красный пигмент (рисунок 23), что усложняло выделение феосфериды А из них. В связи с этим, облучение культур гриба ультрафиолетовым светом с длиной волны 300-400 нм для повышения

выхода вещества не является технологичным.

В дальнейшем для увеличения выхода феосферида А было изучено влияние соотношения массы субстрата к объёму культурального сосуда. Для этого исследовали влияние 5-ти различных вариантов соотношения массы субстрата к объёму культурального сосуда на выход феосферида А.

### 6.3 Влияние соотношения массы субстрата к объёму культурального сосуда

Первоначальный уровень влажности субстрата во всех вариантах составил 35-38%, в то время как на 20-е сутки культивирования гриба её значение варьировалась в диапазоне 11-54%. Максимальный уровень влажности был отмечен при культивировании гриба в 250 и 1000-мл культуральных сосудах и составил 53-54% (таблица 7). Наименьший процент влажности субстрата был отмечен при росте гриба в 100 мл колбах, при этом его значение составляло 11.8% для 10 г зерна и 33.4% для 20 г зерна.

Максимальный выход феосферида А (396.5 мг/кг) в этом эксперименте был отмечен при культивировании гриба в культуральных сосудах объёмом 250 мл с массой субстрата 40 г, при этом влажность субстрата составила 49.2% (таблица 7).

По данным литературы известно, что влажность субстрата является важным фактором, от которого зависит рост и развитие гриба-продуцента при твердофазном культивировании. Кроме того, уровень влажности может оказывать влияние на образование вторичных метаболитов, их выход и структурное разнообразие. При недостаточном уровне влажности замедляется диффузия растворённых  $O_2$  и  $CO_2$ , что приводит к замедлению процессов метаболизма гриба. Так, выход ферментов при твердофазном культивировании грибов часто положительно коррелирует с активностью воды в субстрате (Осмоловский и др., 2014).

Таблица 7 – Влажность субстрата и выход феосфериды А в зависимости от соотношения массы зерна, объёма воды и объёма колбы

Объем колбы, мл	Масса крупы, г	Объем воды, мл	Соотношение массы субстрата к объёму колбы	Влажность субстрата 0 сут, %	Влажность субстрата на 20 сутки, %	Разница начальной и конечной влажности, %	Выход феосфериды А, мг/кг
100	10	7	5.9	35.7 а	11.8 б	-23.9 г	1.35 а
100	20	13.5	3.0	38.5 а	33.4 в	-5.1 в	52.1 а
250	20	13.5	7.5	37.5 а	40.4 г	2.8 б	78.9 аб
250	40	27	3.7	35.7 а	49.2 а	13.5 а	396.5 в
250	60	40	2.5	36.4 а	54.3 а	17.9 а	182.9 б
1000	150	100	4.0	36.2 а	53.0 а	16.8 а	63,0 аб

Примечание: а, б, в, г – показывают принадлежность значений к одной гомогенной группе

Существенное влияние на состав метаболитного комплекса при твердофазном культивировании гриба может оказывать состав субстрата. Для изучения влияния этого фактора на выход феосфериды А использовали три стандартных вида зернового субстрата на основе перловой, пшённой и рисовой крупы. Для этого опыта гриб *Paraphoma* sp. 1.46 культивировали в колбах объёмом 250 мл, используя 40 г субстрата и 27 мл воды.



#### 6.4 Влияние состава субстрата на образование феосфериды А

При использовании трёх зерновых субстратов, начальный уровень их влажности значительно отличался. При этом, на 20-30-е сутки культивирования гриба *Paraphoma* sp. 1.46 влажность субстрата возрастала. Её максимальное значение составило 50% и было отмечено для перловой крупы на 30-е сутки культивирования. Уровень влажности субстрата на основе рисовой и пшённой круп к окончанию культивирования был значительно ниже и визуально на этих субстратах гриб рос медленнее. Важно отметить, что при использовании пшённой и рисовой круп часто образовывались комки субстрата, что могло ограничить доступ кислорода для гриба.

При культивировании гриба на перловой крупе содержание феосфериды А значительно увеличилось в период с 10 по 30-е сутки культивирования (рисунок 24). Так на 10-е сутки культивирования гриба, выход фитотоксина составил 0.22 мг/кг, уже на 15-е сутки его значение возросло на порядок и составило 21.4 мг/кг (рисунок 20). В период с 15-ти до 30-ти суток культивирования, выход феосфериды А линейно возрастал. Так, на 20-е и 25-е сутки его значение составило 458.9 мг/кг и 1189.2 мг/кг субстрата, соответственно. При этом максимальный уровень содержания фитотоксина 1901.4 мг/кг был отмечен на 30-е сутки при наивысшем уровне влажности субстрата 50% (рисунок 20,21).

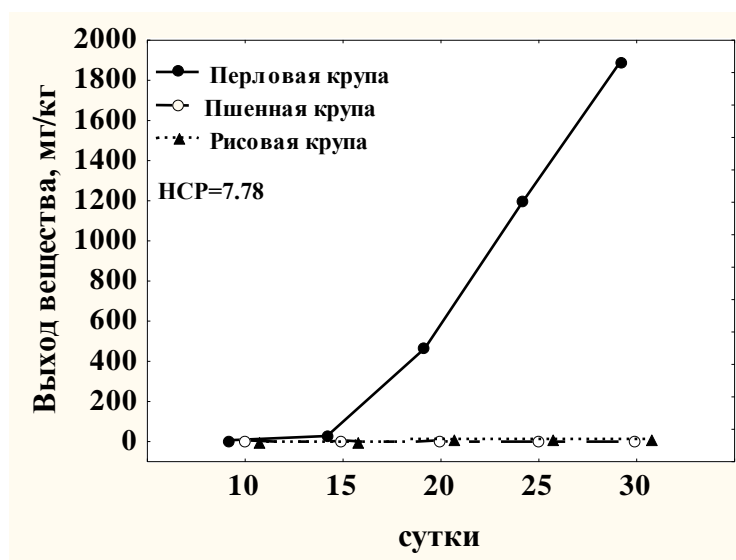


Рисунок 24 – Содержание феосфериды А в различных зерновых субстратах

Накопление феосфериды А при росте гриба на рисовой и пшённой крупах происходило медленно и в период с 10 по 30-е сутки культивирования изменилось несущественно. Так, при культивировании гриба на пшённой крупе накопление феосфериды А было отмечено только на 20-е сутки и составило 0.32 мг/кг субстрата; на рисовой крупе на 10-е сутки содержание феосфериды А составило 0.293 мг/кг. При этом, на 30-е сутки культивирования гриба содержание феосфериды А составило всего 0.768 мг/кг для пшённой крупы и 8.01 мг/кг для рисовой крупы, соответственно (рисунок 20).

Низкий уровень содержания феосфериды А при культивировании *Paraphoma* sp. 1.46 на рисовой и пшённой крупах может быть связан с тем, что уровень влажности этих субстратов был ниже оптимального значения (рисунок 20).

Таким образом, максимальный выход феосфериды А был выявлен при культивировании гриба *Paraphoma* sp. 1.46 на перловой крупе в течение 30-ти суток. На рисовой и пшённой крупах продуктивность гриба была существенно ниже.

В результате проведённого исследования были подобраны условия твердофазного культивирования гриба *Paraphoma* sp. 1.46 с выходом феосфериды А 1.9 г/кг субстрата. Это позволяет получить вещество в достаточном количестве для его изучения в качестве прототипа гербицидного соединения, либо для получения его синтетических производных и изучения механизма действия. Способ получения феосфериды А является технологичным и простым по исполнению.

Интересно отметить, что по данным литературы структурные аналоги феосфериды А – спиросафилотрицины, были обнаружены при культивировании гриба *Curvularia pallescens* DSM 62482 только в условиях недостатка азота, на среде, содержащей в качестве источника азота хлорид аммония в количестве 0.1 г/л. Предполагается, что в таких условиях *in vivo* гриб колонизирует растение-хозяин для получения доступа к азоту. При этом выход фитотоксина составил 1.4 мг/л среды (Abraham et al., 1995).

Известно, что по данным литературы феосферид А образуется при культивировании эндофитного гриба FA 39 только на среде, содержащей кукурузную, рисовую крупу, хлопья Fiber One и 0.1% дрожжевой экстракт, при этом выход метаболита составил 1.01 г/кг (Maloney et al., 2006). Следует отметить, что подобранные условия культивирования гриба *Paraphoma* sp. 1.46 позволяют получить феосферид А с выходом на 58.1% выше, чем FA 39 и более чем на порядок превышают .

Для изучения физиологического эффекта феосфериды А на растительную клетку исследовали действие фитотоксина на проницаемость мембран, концентрацию фотосинтетических пигментов и митотическую активность растительной клетки.

## 7 ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕОСФЕРИДА А В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

### 7.1 Действие на проницаемость мембран растительной клетки

Одной из первых и неспецифических реакций растений на действие различных стрессов является повреждение клеточных мембран, которое ведёт к изменению их проницаемости. Определить влияние различных веществ на проницаемость клеточных мембран можно, измеряя выход электролитов из клетки (Власова и др., 1994).

Кондуктометрический метод определения выхода электролитов из растительной клетки является достаточно простым способом определения веществ, дестабилизирующих мембраны (Duke, Kenyon, 1993).

Известно, что некоторые вещества, вызывающие разрушение мембран растительной клетки на свету, действуют как ингибиторы фотосинтеза (например, соли бипиридила, триазины, карбаматы и другие) либо вызывают накопление некоторых фотодинамических пигментов (например, соединения - ингибиторы фермента протопорфириноген оксидазы) (Федтке, 1985).

Некоторые природные соединения способны вызывать разрушение мембран в темноте, что приводит к нарушениям в дыхании растительной клетки или окислительному стрессу (Dayan et al., 2000).

Действие феосферида А на выход электролитов исследовали на сегментах листьев бодяка полевого и пырея ползучего. Согласно полученным данным, феосферид А не вызывал разрушения мембран растительной клетки в условиях переменного освещения и темноты (таблица 11, 12).

Таблица 11 – Влияние феосферид А на проницаемость мембран в тканях растений (инкубация при переменном освещении)

Растение	Удельная электропроводность растворов, См/см ± доверительный интервал (P=0.95), n = 4					
	Феосферид А, 2 мг/мл		Отрицательный контроль		Положительный контроль	
	Период инкубации, ч					
	24	48	24	48	24	48
<i>Cirsium arvense</i>	210.3±14.2	218.2±19.2	251.3±18.9	214±12.7	577.3±9.1	567.7±14.4
<i>Elytriga repens</i>	57.2 ±2.9	63.6±5.9	58.9±5.4	56.9±3.3	313.7±17.7	313.3±16.2

Таблица 12 – Влияние феосферид А на проницаемость мембран в тканях растений (инкубация в условиях темноты)

Растение	Удельная электропроводность растворов, См/см ± доверительный интервал (P=0.95), n = 4					
	Феосферид А, 2 мг/мл		Отрицательный контроль		Положительный контроль	
	Период инкубации, ч					
	24	48	24	48	24	48
<i>Cirsium arvense</i>	203.5±7.4	198.8±6.8	198.1±11.8	224.2±22	570.3±16.4	601.7±11.1
<i>Elytriga repens</i>	53.2 ± 3.6	58.7±4.2	44.7±4.4	59±5.3	300.7±15.1	313.3±16.2

По данным литературы известно о фитотоксических метаболитах, действие которых вызывает изменения в проницаемости плазмолеммы. Как правило их токсичное действие, вызывающее выход электролитов из клеток, проявляется за сравнительно короткий период времени. К примеру, фитотоксин церкоспорин в концентрации  $5 \times 10^{-6}$  М вызывает разрушение

мембран в тканях растений через 1-2 минуты действия на свету, а его максимальный эффект наблюдается через 3-4 часа (Daub, 1982). В работе Kwon и соавторов рассматривается действие фитотоксинов гриба *Pyrenophora tritici-repentis*, которые в концентрации 1-20 мкг/мл вызывают значительный выход электролитов из тканей растений через 4-12 часов после обработки (Kwon et al., 1996).

Из проведённого эксперимента можно сделать заключение, что фитотоксическое действие феосферида А не зависит от наличия света и не вызывает повреждения мембран.

## 7.2 Действие на концентрацию фотосинтетических пигментов

Уровень хлорофиллов и каротиноидов существенно не различался во всех вариантах обработки феосферидом А сегментов листьев бодяка полевого и пырея ползучего. Следует отметить, что даже при существенных некрозах, вызванных действием фитотоксина в концентрации 1 и 2 мг/мл существенного изменения в концентрации пигментов отмечено не было (таблица 13, 14).

Под действием феосферида А было отмечено несущественное снижение содержания пигментов через 24 часа инкубации (таблица 13, 14). При этом в некоторых вариантах обработки фитотоксином через 48 часов наблюдали повышенное содержание фотосинтетических пигментов по сравнению с контрольным вариантом.

Так, на бодяке полевом было отмечено несущественное уменьшение содержания хлорофиллов А и В в сравнении с контрольным вариантом. При этом, через 48 часов действия фитотоксина в концентрации 0.5 и 2 мг/мл наблюдалось увеличение концентрации хлорофиллов А, В и каротиноидов (таблица 13).

Таблица 13 – Действие феосфериды А на содержание хлорофиллов А и В и каротиноидов в сегментах листьев *S.arvensis*

Вариант	Концентрация феосфериды А (мг/мл)	Диаметр некроза, мм	Хлорофилл А (мг/г)	Хлорофилл В (мг/г)	Соотношение хлорофиллов (А/В)	Содержание каротиноидов (мг/г)
Бодяк 24 ч	0	0.25	7.15 ± 0.58	0.736 ± 0.059	9.71 ± 0.138	1.935 ± 0.167
	0.5	1.33	6.99 ± 0.25	0.681 ± 0.02	10.27 ± 0.40	1.931 ± 0.104
	1	2.64	6.78 ± 0.07	0.645 ± 0.04	10.51 ± 0.86	1.907 ± 0.105
	2	3.57	6.97 ± 0.59	0.687 ± 0.07	10.16 ± 0.197	1.91 ± 0.13
Бодяк 48 ч	0	0.28	6.305 ± 0.04	0.659 ± 0.008	9.56 ± 0.086	1.63 ± 0.034
	0.5	1.43	6.669 ± 0.46	0.698 ± 0.051	9.55 ± 0.118	1.725 ± 0.11
	1	3.28	6.306 ± 0.21	0.662 ± 0.024	9.52 ± 0.03	1.587 ± 0.04
	2	4.62	6.995 ± 0.56	0.725 ± 0.056	9.63 ± 0.08	1.773 ± 0.138

Примечание: приведённые значения указаны с доверительным интервалом при  $P = 0.95$  и  $n = 4$

Через 24 часа после обработки сегментов листьев пырея ползучего, наблюдали уменьшение содержания хлорофиллов А и В, при этом концентрация каротиноидов изменилась незначительно (таблица 14). Через 48 часов действия феосфериды А в концентрации 0.5 мг/мл, было отмечено увеличение содержания хлорофиллов А и В, а также каротиноидов. При этом в больших концентрациях фитотоксина, изменений содержания фотосинтетических пигментов в сравнении с контрольным вариантом отмечено не было (таблица 14).

Таблица 14 - Действие феосфериды А на содержание хлорофиллов А и В и каротиноидов в сегментах листьев *E. repens*

Вариант	Концентрация феосфериды А (мг/мл)	Длина некроза, мм	Хлорофилл А (мг/г)	Хлорофилл В (мг/г)	Соотношение хлорофиллов (А/В)	Содержание каротиноидов (мг/г)
Пырей 24 ч	0	0.4	13.75 ± 0.55	1.84 ± 0.134	7.44 ± 0.31	2.61 ± 0.15
	0.5	1.36	13.27 ± 0.86	1.71 ± 0.07	7.74 ± 0.19	2.809 ± 0.26
	1	2.17	11.67 ± 0.35	1.54 ± 0.05	7.58 ± 0.02	2.37 ± 0.06
	2	3.34	12.20 ± 1.98	1.63 ± 0.25	7.47 ± 0.09	2.38 ± 0.42
Пырей 48 ч	0	0.45	11.44 ± 0.25	1.53 ± 0.018	7.49 ± 0.23	2.27 ± 0.206
	0.5	2.45	13.01 ± 1.14	1.73 ± 0.158	7.53 ± 0.099	2.58 ± 0.23
	1	3.83	11.33 ± 1.21	1.49 ± 0.178	7.59 ± 0.08	2.32 ± 0.17
	2	5.06	11.49 ± 0.87	1.56 ± 0.14	7.35 ± 0.105	2.26 ± 0.13

Примечание: приведённые значения указаны с доверительным интервалом при  $P = 0.95$  и  $n = 4$

Интересно отметить, что структурные аналоги феосфериды А - тритиконы А и В (рисунок 11.1-11.2) действуют на фотосинтез в растительных клетках, влияя на различные физиологические функции, включая реакцию Хилла и фиксацию  $CO_2$  (Kenfield et al., 1989). Реакция Хилла представляет собой комплекс начальных стадий фотосинтеза и является одним из показателей фотохимической активности хлоропластов (Власова и др., 1994). В исследовании с изолированными протопластами пшеницы, овса и шпината тритиконы А и В проявили неселективную активность, что подтвердило ингибирующее действие фитотоксинов на транспорт электронов в процессе фотосинтеза. Однако в исследовании с изолированным ферментом ферредоксин – оксидоредуктазой, конечным



ферментом фотосинтеза, было выявлено стимулирующее действие этих соединений (Kenfield et al., 1989).

Другой интересной особенностью тритикона А является угнетающее действие на протеазную активность гриба-продуцента. При этом, соединение не действует на такие ферменты как бета-глюкозидаза и эстераза. В дополнение к перечисленным свойствам тритикон А ингибирует действие ферментов, имеющих SH-группировку в активном сайте действия. Так, было показано, что тритикон А вступает в реакцию с цистеином *in vitro* за 1 минуту (Kenfield et al., 1988). Эта особенность связывания с SH-группой ферментов объясняет возможность ингибирующего действия тритикона А на протеазы, например, фицин. Поэтому, в исследованиях на тканях и органеллах растений, фитотоксин проявляет неселективную активность. Эти особенности тритикона А объясняют потенциал и перспективность его использования для изучения сайтов действия ферментов и сайт-специфичной чувствительности в мультикомпонентных системах, таких как электронный транспорт цепи фотосинтеза (Kenfield et al., 1988).

В дальнейшем для определения физиологического действия феосфериды А на фотосинтетический аппарат растений возможно изучить его влияние на эффективность фотосинтеза методом флуоресценции хлорофилла. Этот метод позволяет определить соединения, влияющие на транспорт электронов (Dayan et al., 2000). Кроме того, возможно исследовать действие вещества на интенсивность дыхания растений. Этим методом, как правило, можно определить вещества-ингибиторы транспорта электронов в процессе фотосинтеза (например, атразин, бентазон, диурон) или транспорт электронов в митохондриях (например, 2,4-динитрофенол) (Dayan et al., 2000; Власова и др., 1994).

### 7.3 Действие на митотическую активность меристематических тканей

В данном эксперименте в качестве стандартного вещества, нарушающего процесс полимеризации микротрубочек, использовали колхицин. Под влиянием этого соединения происходило накопление клеток в стадии метафазы, которое образуется из-за невозможности образования веретена деления и перехода в последующие фазы деления клетки (таблица 15, 16).

Действие феосфериды А не вызывало существенных изменений значения митотического индекса в сравнении с контрольным вариантом (таблица 17,18). Это говорит о том, что фитотоксин не оказывает существенного влияния на митотическую активность растительных тканей. Многоядерных клеток в образцах, обработанных фитотоксином, обнаружено не было.

Таблица 15 - Влияние ФА в различных концентрациях на митотический индекс клетки и содержание клеток в различных фазах

Вариант обработки	Профаза, %	Метафаза, %	Анафаза, %	Телофаза, %	МИ, % ± доверительный интервал (P=0.95), n= 4
Контроль	4.08	1.47	2.73	1.71	17.1± 1.7
ФА 0.5 мг/мл	3.85	1.53	2.48	1.67	16.2± 1.3
ФА 1 мг/мл	4.14	1.63	2.55	1.81	19.6± 3.3
ФА 2 мг/мл	3.94	1.57	2.441	1.62	18.6± 3.1
Колхицин 1 мг/мл	1.12	6.36	1.236	1.27	11.2± 1.75

Известны некоторые фитотоксины, ингибирующие митоз в растительных клетках. Одним из таких соединений является диацетоксицирпенол, представитель семейства трихотеценовых токсинов, образуемых грибами рода *Fusarium*. В концентрации 0.01 мг/мл вызывает увеличение процента клеток в состоянии метафазы и анафазы через 24 часа после обработки, в то время как общее количество клеток в стадии профазы и телофазы существенно сокращается. Считается, что пролонгированное действие токсина приводит к программируемой смерти клетки. Дезоксиниваленол в той же концентрации обладает более сильными антимитотическими свойствами, вызывая полное остановление деления клеток на стадии профазы. При этом увеличивалось число хромосомных аббераций (Danuta, Sliwinska, 2005).

На основании полученных данных можно заключить, что феосферид А не обладает антимитотическими свойствами.

Для определения физиологического действия феосферид А на растительную клетку необходимы дополнительные исследования. Важно отметить, что поскольку феосферид А является селективным ингибитором белка STAT 3, его фитотоксическое действие может быть связано с аналогами этого белка в растениях. Для подтверждения этого предположения необходимо проведение в дальнейшем геномных исследований. Возможно, феосферид А обладает новым механизмом действия на растительную клетку.

Следует отметить, что внешнее проявление фитотоксического действия феосферид А связано с появлением некрозов на листьях чувствительных к нему растений. Подобные симптомы могут быть связаны с действием на синтез ароматических, amino- и жирных кислот в растении (Федтке, 1985).

Симптомы фитотоксичности феосферид А могут также говорить о том, что он не действует на ферменты, отвечающие за биосинтез изопреноидов в растении (каротиноидов, пластохинонов, токоферолов). Подтверждением

данного предположения может быть тот факт, что концентрация каротиноидов под действием феосферид А в сравнении с контрольным вариантом значительно не изменялась (таблица 13,14).

Известно, что феосферид А не способен самостоятельно проникать в интактные ткани растения. Для оценки возможности повышения фитотоксической активности соединения на интактные сегменты листьев растений, нами было изучено влияние добавления адъювантов различного состава к раствору фитотоксина.

## 8 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕОСФЕРИДА А

### 8.1 Влияние поверхностно-активных соединений на фитотоксическую активность феосфериды А

Как правило, природные фитотоксины не способны самостоятельно проникать через кутикулу растений, поэтому для многих исследований фитотоксичности поверхность листа надкалывают перед нанесением тест-образца (Берестецкий и др., 2010).

Известно, что применение адъювантов позволяет повысить смачиваемость листа, площадь нанесённой капли и проникновение активного вещества в ткань листа (Sharma et al., 2004). Совместно с гербицидами наиболее часто используемыми адъювантами являются неионные и анионные поверхностно-активные вещества и различные масла (Radivojevic et al., 2011; Yilmaz, Dane 2012). Многие авторы рассматривают возможности использования адъювантов для повышения эффективности гербицидов и снижения нормы расхода активных компонентов (Gitsopoulos et al., 2008, Radivojevic et al., 2011). Некоторые растворители, например диметилсульфоксид (ДМСО), также способны повышать проницаемость липофильных молекул через мембраны (Gurtovenko et al., 2007). На данный момент в литературе нет примеров использования адъювантов с природными фитотоксинами для повышения их активности. Цель эксперимента состояла в оценке влияния 5-ти видов ПАВ (таблица 3), а также 2 растворителей (этанола и ДМСО) на фитотоксическую активность феосфериды А. В контроле растворители и ПАВ в использованных концентрациях были нефитотоксичны.

Было установлено, что существенное влияние на фитотоксическую активность 0.1%-ных растворов феосферида А оказывали все исследуемые факторы: повреждение листа, растворитель и добавление адъювантов.

Повреждённые листовые диски бодяка и отрезки листьев пырея были более чувствительны к фитотоксическому действию феосферида А, чем неповреждённые. В среднем для бодяка полевой диаметр некроза на надколотых листовых дисках был на 53% выше, чем на интактных, для пырея ползучего – на 31%, соответственно (рисунок 24).

Для бодяка полевого статистически значимым оказалось взаимодействие факторов «растворитель-повреждение» (таблица 17). Наиболее сильным оказалось действие токсина, растворённого в 5%-ном ДМСО.

Для пырея ползучего статистически значимыми факторами являлись повреждение листа, выбор растворителя и добавление адъювантов, при этом их взаимодействие существенно не влияло на фитотоксическую активность феосферида А (таблица 18). Наиболее сильным оказалось действие соединения, растворённого в 5%-ном этаноле. Оно было в среднем на 30% выше, чем в 5%-ном ДМСО (рисунок 25).

Различие во влиянии растворителей на фитотоксическую активность феосферида А в отношении бодяка полевого и пырея ползучего может быть связано с различной проницаемостью, обусловленной разным химическим составом и строением кутикулы листьев этих растений.

Было отмечено, что добавление некоторых адъювантов существенно повышает способность проникновения феосферида А в ткань листа. Так, наиболее сильное фитотоксическое действие вещества в отношении бодяка полевого наблюдали при добавлении к его раствору адъювантов БиоПауэр и Хастен (рисунок 24).

В опыте на пырее ползучем, наиболее сильное действие феосферида А наблюдали при добавлении к 0.1%-ному раствору феосферида А адъюванта

БиоПауэр. Оно было в 5 раз выше по сравнению с действием фитотоксина без добавления адъювантов (рисунок 25). Добавление адъювантов Твин 20 и Тренд 90 также повышало фитотоксическую активность феосферид А (рисунок 25).

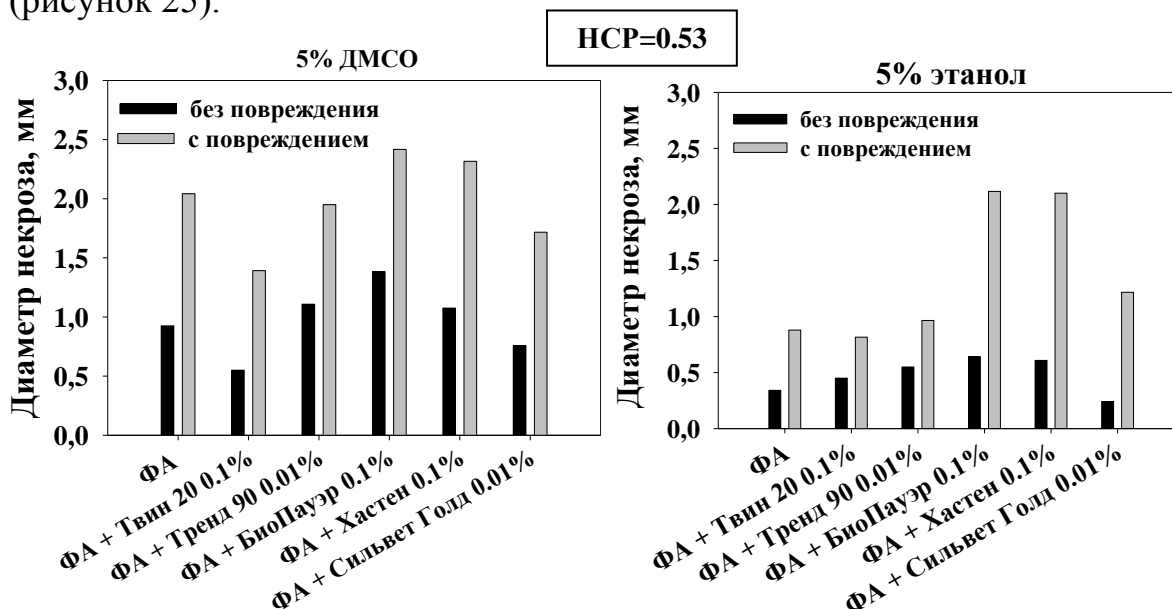


Рисунок 24 - Влияние растворителя и добавления адъювантов на фитотоксическую активность феосферид А в отношении бодяка полевого

Таблица 17 - Результаты многофакторного дисперсионного анализа эффекта добавления адъювантов, выбора растворителя и повреждённости листа на фитотоксическую активность феосферид А в отношении бодяка полевого

Факторы	SS	Степени свободы	MS	F	p
Адъюванты	17,07	5	3,41	7,51	<0,001
Растворитель	1,45	1	1,45	3,21	0,074
Повреждение листа	132,70	1	132,71	291,83	<0,001
Адъюванты*растворитель	8,68	5	1,73	3,820	0,0023
адъюванты*повреждение	3,53	5	0,70	1,55	0,173
растворитель*повреждение	8,92	1	8,92	19,63	<0,001
адъюванты*растворитель* повреждение	4,75	5	0,95	2,09	0,067
Ошибка	120,05	264	0,45		

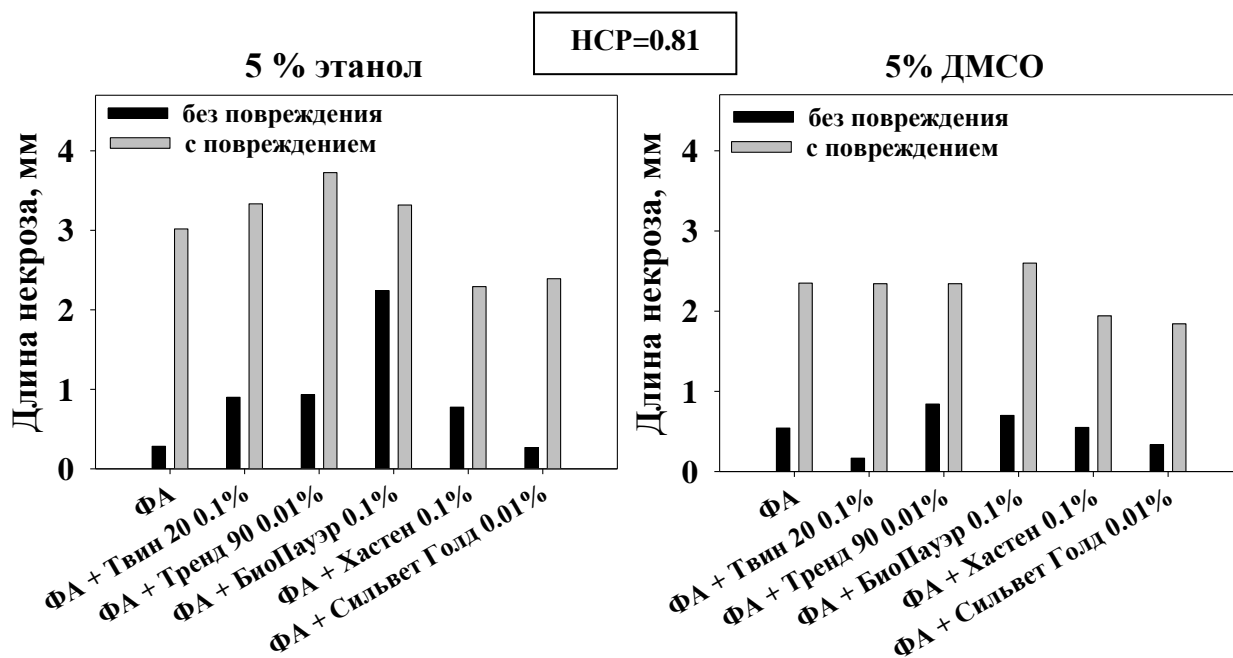


Рисунок 25 - Влияние растворителя и добавления адьювантов на фитотоксическую активность феосферида А в отношении пырея ползучего

Таблица 18 - Результаты многофакторного дисперсионного анализа эффекта добавления адьювантов, выбора растворителя и повреждённости листа на фитотоксическую активность феосферида А в отношении пырея ползучего

Факторы	SS	Степени свободы	MS	F	p
Адьюванты	37,08	5	7,41	7,30	<0,001
Растворитель	27,64	1	27,64	27,23	<0,001
Повреждение листа	275,38	1	275,38	271,27	<0,001
Адьюванты*растворитель	7,86	5	1,57	1,55	0,175
адьюванты*повреждение	6,67	5	1,33	1,31	0,258
растворитель*повреждение	1,78	1	1,78	1,75	0,187
адьюванты*растворитель* повреждение	9,61	5	1,92	1,89	0,095
Ошибка	267,99	264	1,01		



Проанализировав результаты проведённого эксперимента, для опыта на целых растениях бодяка полевого и пырея ползучего в качестве адъювантов были выбраны Тренд 90, Хастен и БиоПауэр.

В связи с тем, что экстракт из твердофазной культуры *Paraphoma* sp. 1.46 содержал 60% феосферид А (рисунок 26), и проявил фитотоксическую активность, его использование для обработки целых растений было более технологично, чем использование чистого феосферид А.

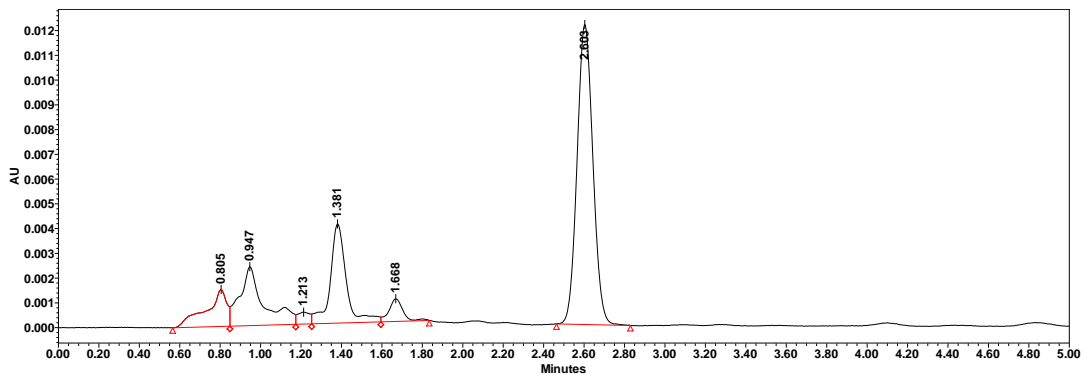


Рисунок 26 – Хроматограмма экстракта из мицелия *Paraphoma* sp. 1.46, содержащего 60% феосферид А

Для обработки растений бодяка полевого использовали экстракт из твердофазной культуры гриба, растворённый в 5%-ном ДМСО с добавлением адъювантов Хастен и БиоПауэр в концентрации 0.1% по объёму, обеспечивающих наиболее эффективное проникновение фитотоксина в ткань листа.

Для обработки растений пырея ползучего экстракт растворяли в 5%-ном этаноле, а в качестве адъювантов использовали Тренд 90 и БиоПауэр. Предварительные эксперименты показали отсутствие гербицидной активности экстракта из мицелия *Paraphoma* sp. 1.46 на растениях пырея ползучего.

## 8.2 Оценка гербицидной активности экстракта твердофазной культуры гриба на растениях бодяка полевого

Для оценки гербицидной активности экстракта из твердофазной культуры гриба проводили обработку растений бодяка полевого в фазе розетки. Растения опрыскивали суспензией, содержащей экстракт, растворённый в ДМСО и доведённый водой до концентрации 5 мг/мл с добавлением адъюванта Хастен (0.1%) или БиоПауэр (0.1%). Для сравнения растения обрабатывали раствором экстракта без добавления адъювантов. Растения в контрольном варианте опрыскивали 5%-ным водным раствором ДМСО с добавлением Хастен (0.1%) или БиоПауэр (0.1%) без добавления экстракта.

Установлено, что экстракт из твердофазной культуры *Paraphoma* sp. 1.46 обладал гербицидными свойствами на растениях бодяка полевого. В контрольном варианте некротические повреждения растений составили 0.7-7% от общей площади листьев (рисунок 27, 28).

Экстракт из твердофазной культуры *Paraphoma* sp. 1.46 без добавления адъювантов, вызывал некротические повреждения, которые составили 20-40% от общей площади листьев. Это вызывало уменьшение массы надземной части растений лишь на 25% (рисунок 28, 29).

При обработке растений бодяка полевого раствором, содержащим экстракт из твердофазной культуры гриба с добавлением адъюванта Хастен (0.1%), площадь некрозов листьев достигала 70-80%, что в 2.5 раза превосходило гербицидный эффект экстракта без добавления ПАВ. Это приводило к трёхкратному уменьшению массы наземной части растений (рисунок 28, 29).

Площадь некрозов листьев бодяка после опрыскивания растений 0.5%-ным раствором экстракта из твердофазной культуры гриба с добавлением адьюванта БиоПауэр составила около 20%, при этом достоверного снижения массы надземной части растений отмечено не было (рисунок 28, 29).

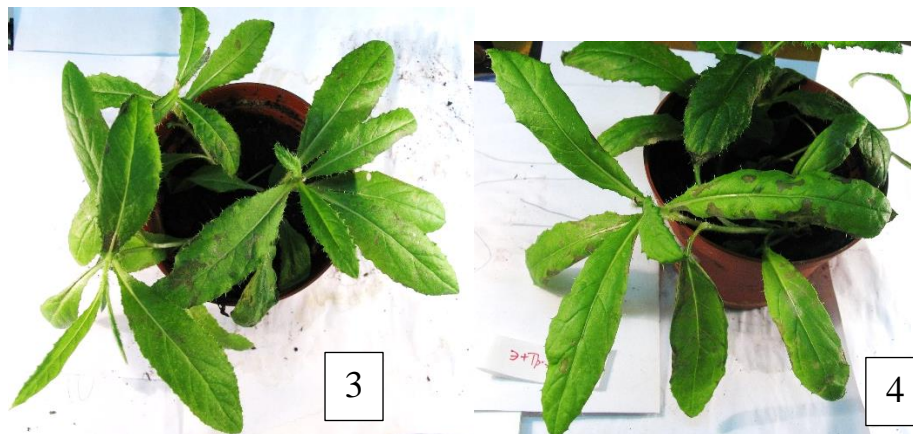
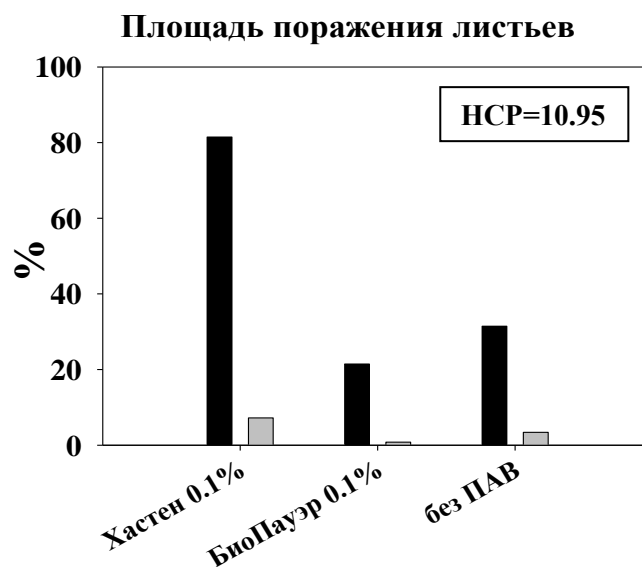


Рисунок 27 - Растения бодяка полевого, обработанные раствором экстракта *Paraphoma* sp. 1.46 через 48 часов после обработки

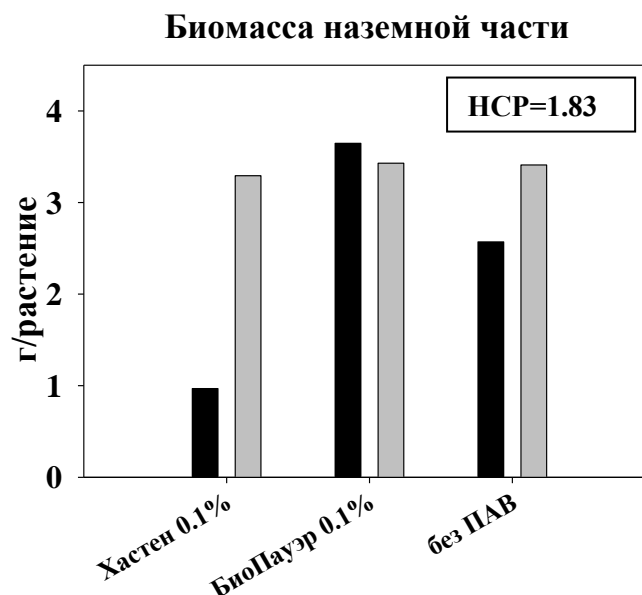
1 – контрольный вариант; 2 – обработка 0.5%-ным раствором экстракта из твердофазной культуры гриба с добавлением адьюванта Хастен (0.1%); 3 – обработка 0.5%-ным раствором экстракта из твердофазной культуры гриба без добавления адьювантов; 4 – обработка 0.5%-ным раствором экстракта

из твердофазной культуры гриба с добавлением адьюванта БиоПауэр (0.1%)



■ с добавлением экстракта    □ без добавления экстракта

Рисунок 28 – Зависимость развития некрозов от варианта обработки экстрактом из твердофазной культуры гриба *Paraphoma* sp. 1.46



■ с добавлением экстракта    □ без добавления экстракта

Рисунок 29 – Масса надземной части растений бодяка полевого через 48 часов после обработки экстрактами из твердофазной культуры гриба *Paraphoma* sp. 1.46

Таким образом, 0.5%-ный раствор экстракта из твердофазной культуры гриба *Paraphoma* sp. 1.46 в комбинации с адьювантом Хастен в концентрации 0.1% был в 2.5 раза более эффективен по сравнению с действием экстракта без ПАВ. Его действие вызывало некрозы до 80% от общей листовой поверхности, что сопровождалось трёхкратным снижением надземной биомассы растений спустя 48 часов. Следовательно, адьювант Хастен может быть рекомендован для применения совместно с экстрактом из твердофазной культуры гриба *Paraphoma* sp.1.46 в вегетационных и полевых опытах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием микологических, фитопатологических и молекулярно-генетических методов штамм ВИЗР 1.46 был охарактеризован как патоген бодяка полевого и отнесён к роду *Paraphoma*. Из жидкой и твердой культур гриба выделены два фитотоксических метаболита – курвулин и феосферид А, соответственно. Относительно высокая фитотоксичность и отсутствие побочной активности позволяют рассматривать феосферид А в качестве прообраза гербицидного соединения.

С использованием разработанной нами методики количественного анализа феосфериды А подобраны условия твердофазного культивирования *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46, которые позволяют получить соединение с выходом до 1.9 г/кг субстрата. Это открывает возможности для оценки его гербицидных свойств, более детального изучения структуры, получения более активных синтетических производных. Так, с использованием полученного нами феосфериды А определена кристаллическая структура этого вещества, синтезированы несколько его производных (Abzianidze et al., 2015 а,б).

Несмотря на то, что проникновение феосфериды А в листья растений затруднено, его применение в составе 0.5%-ного раствора грубого экстракта из твердой культуры *Paraphoma* sp. ВИЗР 1.46 совместно с адьювантом Хастен (0.1% по объему) приводило к практически полной гибели растений бодяка и снижению их надземной биомассы в 3 раза по сравнению с контролем уже через 2 суток после обработки. Для повышения гербицидного потенциала феосфериды в дальнейшем возможно проведение исследований по следующим направлениям: повышение активности путём встречного синтеза активных аналогов и оптимизация состава многокомпонентных препаративных форм.

## ВЫВОДЫ

1. Изучаемый штамм ВИЗР 1.46 отнесён к роду *Paraphoma* на основании анализа его нуклеотидных последовательностей по локусам внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), большой субъединицы рРНК (LSU) и фактора элонгации трансляции (TEF).
2. Из культурального фильтрата и твердофазной культуры гриба выделены два фитотоксических метаболита, идентифицированные как курвулин и феосферид А, соответственно.
3. Курвулин обладал слабыми фитотоксическими свойствами в концентрации 2 мг/мл при тестировании на 10-ти видах растений, не проявил антибиотической активности в отношении испытанных 2-х видов грамположительных, 5-ти видов грамотрицательных бактерий, 3-х видов грибов и культуры инфузорий *Paramecium caudatum*.
4. Феосферид А обладал высокой фитотоксической активностью в концентрации 1 мг/мл в отношении испытанных растений, соединение не обладало антибиотической активностью и проявляло слабую токсичность в отношении инфузорий (*P. caudatum*).
5. Разработана методика количественного анализа феосферид А в трёх зерновых субстратах (рисовой, перловой и пшённой крупах) методом ВЭЖХ. Средний уровень извлечения токсина составил 87-95%, минимальный уровень определения – 1 мг/кг.
6. На основании изучения влияния состава субстрата, длительности культивирования и условий освещённости на выход феосферид А оптимизирован способ его получения. Максимальный выход вещества (1.9 г/кг субстрата) был достигнут при культивировании гриба в течение 25-30-ти суток на перловой крупе в темноте.

7. Фитотоксический эффект феосферида А проявлялся в виде некрозов на сегментах листьев чувствительных растений, но не вызывал повреждения мембран и снижения концентрации фотосинтетических пигментов в тканях растений, а также не ингибировал митоз в меристематических тканях корней репчатого лука.

8. Совместное применение адъювантов (Хастен, БиоПауэр) с 0.1%-ным раствором феосферида А повышало его фитотоксическую активность в отношении интактных сегментов листьев бодяка полевого и пырея ползучего на 50-70% по сравнению с действием токсина без ПАВ.

9. При обработке растений бодяка полевого составом на основе 0.5%-ного экстракта из твердофазной культуры *Paraphoma* sp. 1.46, содержащего 60% феосферида А, в комбинации с адъювантом Хастен площадь некрозов листьев достигала 70-80%. Это в 2.5 раза превосходило гербицидный эффект экстракта без добавления ПАВ и приводило к трёхкратному уменьшению массы наземной части растений.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелин В. Г., Лаврухин Д. К., Третьяков А. В. Дисперсионная жидкостно–жидкостная микроэкстракция при определении гербицидов – производных мочевины в природных водах методом ВЭЖХ // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68. – №9. – С. 908–916.
2. Амелин В. Г., Большаков Д. С., Третьяков А. В. Идентификация и определение синтетических пиретроидов, хлорпирифоса и неоникотиноидов в воде методами газовой и жидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. – №4. – С. 398–403.
3. Баздырев Г.И. Защита сельскохозяйственных культур от сорных растений. – М.: Колос, 2004. – 328 с.
4. Белякова Г. А., Левкина Л. М. Токсические метаболиты грибов рода *Alternaria*. II Неспецифические микотоксины // Микология и фитопатология. – 1992. – С. 183–188.
5. Берестецкий А. О. Фитоксины грибов: от фундаментальных исследований – к практическому использованию. (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – №5. – С. 501–514.
6. Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С. Выделение, идентификация и характеристика фитотоксина, образуемого грибом *Alternaria cirsiinoxia* // Прикладная биохимия и микробиология – 2010. – Т. 46. – №1. – С. 84–87.
7. Берестецкий А.О., Курленя А.С. Антимикробные свойства фитопатогенных микромицетов. Микология и Фитопатология. 2014. – Т. 48. – №. – С. 123 – 134.
8. Берестецкий О.А. Изучение фитотоксических свойств микроскопических грибов / Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – С. 321–333.
9. Бидлингмейер Б., Фрайд Б., Хегнауер Г. и др.; Ред. Бидлингмейер

- Б.; Пер. с англ. О. Г. Ларионова. Препаративная жидкостная хроматография. – М.: Мир, 1990. – 358 с.
10. Билай В. И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1997. – 442 с.
11. Власова Т.А., Гавриленко В.Ф., Ермаков И.П., Жигалова Т.В., Маркарова Е.Н., Матвеева Н.П., Тукеева М.И., Харитонашвили Е.В. Малый практикум по физиологии растений. – М.: Издательство Московского университета, 1994. – 183 с.
12. Бондаренко А. П., Еремин С. А. Определение микотоксинов зеараленона и охратоксина в зерне методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. – №9. – С. 878–883.
13. Гайдашева И.И. Культивирование штамма *Streptomyces lateritius* 19/97 М: перспективы создания биопрепарата для стимуляции роста и защиты растений от болезней. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2011. – 175 С.
14. Грапов А.Ф., Козлов В.А. Современные подходы к созданию новых пестицидов // Агрехимия. – 2003. – №11. – С. 4–13.
15. ГОСТ Р 53162–2008 Продукты пищевые. Определение афлатоксина В(1) и общего содержания афлатоксинов В(1), В(2), G(1) и G(2) в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.
16. ГОСТ Р 51435–99 Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.
17. ГОСТ Р 52337–2005 Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения общей токсичности.
18. Ижевский С.С. Новые вредители тепличных растений // Защита растений. – 1992. – №12. – С. 26–27.

19. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М: Издательство МГУ, 2004. – 528 с.
20. Карцова Л. А., Обьедкова Е. В. Хроматографические и электрофоретические профили биологически активных соединений для диагностики различных заболеваний // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68. – №4. – С. 316–324.
21. Клишаре А.А. Пестициды и микрофлора растений. – Рига: Зинанте, 1983. – 168 с.
22. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. Учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 152 с.
23. Левитин М.М. Фитопатогенные грибы против сорняков // Защита и карантин растений. – 2000. – №7. – С. 16–17.
24. Мельников Н.Н. Пестициды: Химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. 712 с.
25. Микеш О. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. Микеш О. (ред.). М.: Мир, 1982. – Ч. 2. – 381 с.
26. Обьедкова Е. В., Карцова Л. А., Кирсанов Д. О., Великанова Л. И., Легин А. В. Получение характерных профилей стероидных гормонов методом обращенно–фазовой ВЭЖХ // Журнал аналитической химии. – 2014. Т. 69. – №2. – С. 214–218.
27. Осмоловский А. А., Баранова Н. А., Крейер В. Г., Кураков А. В., Егоров Н. С. Твердофазное и поверхностно–мембранное жидкостное культивирование микромицетов, особенности их развития и образования ферментов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – №3. – С. 245–255.
28. Пивкин М. В., Кузнецова Т. Ф., Сова В. В. Морские грибы и их метаболиты. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – 248 с.
29. Пивкин М. В., Белогорцева Н. И., Лукьянов П. А. Штамм гриба

- Phoma glomerata* – продуцент полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью // Патент РФ. 2006. N2312148.
30. Поповская Т. Н. Таргетная терапия – новое направление лекарственного лечения злокачественных опухолей// Междунар. Мед. Жур. – 2005. – N 2. – С. 105–108.
31. Поликсенова В.Д., Шуканов А.С., Стефанович А.И., Храмцов А.К. Микология: основные понятия и термины. Учебно–методическое пособие. – Минск: БГУ, 2004. – 122 с.
32. Сокорнова С.В. Биологическое обоснование создания микогербицида на основе фитопатогенного гриба *Stagonospora cirsi*. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – СПб: ГНУ Всероссийский НИИ защиты растений РАСХН, 2011. – 132 с.
33. Хлопцева Р.И. Микогербициды // Защита и карантин растений. – 1996. – N1. – С. 40–41.
34. Ульянова Т.Н. Причины природной устойчивости сеgetальных сорных растений в посевах сельскохозяйственных культур // Фитосанитарное оздоровление экосистем. Материалы съезда. – СПб. – 2005 – Т.1. – С. 368–370.
35. Федтке К. Биохимия и физиология действия гербицидов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 220 с.
36. Хохряков М.К. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов. – Ленинград: ВИЗР, 1974. – 69 с.
37. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса. – 2007. – С. 109.
38. Щекочихина Р.И. Географическая изменчивость популяций *Helminthosporium sativum* Pamm., Kinget Bakke // Микология и фитопатология. – 1977. – Т.11. – N5. – С. 433–438.
39. Чиркин В. А., Карпов С. И., Селеменев В. Ф., Шумский Н. И. Определение жирорастворимых витаминов в пищевых продуктах,

витамино–минеральных комплексах, комбикормах, премиксах и сыворотке крови методом обращенно–фазовой ВЭЖХ // Журнал аналитической химии. – 2013. – Т. 68. – N8. – С. 820–825.

40. Яковлев В. И. Биотехнология микробного синтеза: Учебное пособие. – СПб.: СПбГТИ (ТУ), 2005. – С. 86–115.

41. Abraham W.R., Hanssen H.P., Arfmann H. A. Spirostaphylotrichins U and V from *Curvularia Pallescens* // *Phytochemistry*. – 1995. – Vol. 38. – N. 4. – P. 843–845.

42. Abzianidze V. V., Poluektova E.V., Bolshakova K.P., Panikorovskii T. L., Bogachenkov A. S. and Berestetskiy A. O. Crystal structure of natural phaeosphaeride A. *Acta Cryst.* – 2015. – Vol. E71. – P. 625–626.

43. Abzianidze V. V., Prokofieva D. S., Chisty L. A., Bolshakova K. P., Berestetskiy A.O., Panikorovskii T. L., Bogachenkov A. S., Holder A. A. Synthesis of natural phaeosphaeride A derivatives and an *in vitro* evaluation of their anti-cancer potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – In Press, Accepted Manuscript Available online 19 October 2015.

44. Alani F., Grove J. A., Andersonb W. A., Moo–Young M. Mycophenolic acid production in solid–state fermentation using a packed–bed bioreactor // *Biochemical Engineering Journal*. – 2009. – Vol. 44. – P. 106–110.

45. Alberts J. F., Gelderblom W.C., Thiel P.G., Marasas W.F., Van Schalkwyk D.J., Behrend Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme* // *Appl Environ Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – N6. – P. 1729–1733.

46. Albinati A., Arnone A., Assante G., Meilleb S. V., Nassini G. Chrysanthone, a bioactive alkaloid from *Ascochyta chrysanthemi* // *Phytochemistry*. – 1989. – Vol. 28. – N. 3. – P. 923–927.

47. Alvi K.A., Nair B., Pu H., Ursino R., Gallo C., Mocek U. Phomacins: Three novel antitumor cytochalasan constituents produced by a *Phoma* sp. // *J.*

Org. Chem. – 1997. – Vol. 62. – P. 2148–2151.

48. Amber C. P., Akram A, Qureshi R., Akram Z. HPLC analysis for secondary metabolites detection in *Sclerotium rolfsii* isolated from Chickpea. Issues in Life Sciences – Botany and Plant Biology Research: 2013 Edition. – 2012. – P. 417–422.

49. Amusa N.A. Microbially produced phytotoxins and plant disease management // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5 – N. 5. – P. 405–414.

50. Auld B.A., McRae C. Emerging technologies in plant protection – bioherbicides // New Zealand Plant Protection Society (Inc.). – 1997. – P. 191–194.

51. Asam S., Lichtenegger M., Liu Y., Rychlik M. Content of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in a food commodities determined by a stable isotope dilution assay // Mycotoxin research. – 2012. – Vol. 28. – N. 1. – P. 9–15.

52. Assante, G., Locci, R., Camarda, L., Merlini, L., and Nasini, G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites // Phytochemistry. – 1977. – Vol. 16. – P. 243–247.

53. Atalla M.M., Hassanein N.M., El-Beih A.A., Youssef Y.A. Effect of Fluorescent and UV Light on Mycotoxin Production Under Different Relative Humidities in Wheat Grains // International Journal of Agriculture and Biology. – 2004. – Vol. 6. – N. 6. – P. 1006–1012.

54. Aveskamp M. M., Gruyter J. and Crous P. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance // Fungal Diversity. – 2008. – Vol. 31. – P. 1–18.

55. Aveskamp M. M., Gruyter J., Woudenberg J. H. C., Verkley G. J. M., Crous P. W. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera // Stud. Mycol. – 2010. – Vol. 65. – P. 1–60.

56. Awad G., Florence M., Yannick C., Lebrihi A. Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18. – 2005. – Vol. 51. – P. 59–67.
57. Ayer W. A., Jimenez L. D. Phomalone, an antifungal metabolite of *Phoma etheridgei* Can. J. Chem. – 1994. – Vol. 72. – P. 2326–2332.
58. Bailey K. L., Derby J., 2010. Fungal isolates and biological control compositions for the control of weeds. US Patent 7772155.
59. Bennett J. W., Fernholz F. A., Lee L. S. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* // Mycologia. – 1978. – Vol. 70. – P. 104–116.
60. Bhargav S., Panda B. P., Alia M., Bhargav S. J. Solid–state Fermentation: An Overview // Chem. Biochem. Eng. – 2008. – Vol. 22. – N. 1. – P. 49–70.
61. Bhattacharyya P. N., Jha D. K. optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain TSF 146 // International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. – 2011. Vol. 2. – N. 4. – P. 133–143.
62. Bobylev M.M., Bobyleva L.I., Strobel G.A. Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*) // J. Agric. Food Chem. – 1996. – Vol. 44. – P. 3960–3964.
63. Boerema G. H., Gruyter J., Noordeloos M. E., Hamers M. A. *Phoma* Identification Manual. Differentiation of specific and infraspecific taxa in culture // Cambridge: CABI Publishing, Wallingford. – 2004. – 470. P.
64. Bonder E. M., Mooseker M. S. Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament // J. Gell Biol. – 1986. – Vol. 102. – P. 282–288.
65. Borges W., Pupo M. T. Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant

*Tithonia diversifolia* (Asteraceae) // J. Braz Chem. Soc. – 2006. – Vol. 17. – N. 5. – P. 929–934.

66. Bracher F., Krauss J. Total synthesis of secocurvularin, curvulin, and the corresponding carboxylic acids. A convenient application of the enzymic hydrolysis of acid and base sensitive esters, Nat. Prod. Lett. – 1998. – Vol. 12. – P. 31–34.

67. Brown S.S., Spudich J.A. Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends // J. Cell Biol. – 1982. – Vol. 88. – P. 487–491.

68. Burges, H. D. Formulation of microbial biopesticides: beneficial organisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – 1998. – 412 P.

69. Calvo A.M., Wilson R. A., Bok J. W., Keller N. P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development // Microbiology and molecular biology reviews. – 2002. – Vol. 66. – N. 3. – P. 447–459.

70. Cannell R. J. P. Follow-up of natural product isolation. // Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation, 2nd ed. – 1998. – Vol. 20. – P. 463–506.

71. Cantrell C. L., Dayan F. E., Duke S. O. Natural products as sources for new pesticides // J. Nat. Prod. – 2012. – Vol. 75. – N. 6. – P. 1231–1242.

72. Capasso R., Corrado E., Randazzo G., Bottalico A. Detection of Phomenone by High-Performance Liquid Chromatography in Tomato Plants Infected by *Phoma destructiva* Plowr // Journal of Liquid Chromatography. – 1984 – Vol. 7. – N. 5. – P. 935–942.

73. Cascales C., Lingham R. B., Pelaez F., Polishook J. D., Silverman K. C., Singh S. B., Zink D. L., 1997. Inhibitors of farnesyl-protein transferase. US Patent 5663193.

74. Chai C. L., Waring P. Redox sensitive epidithiodioxopiperazinesin biological mechanisms of toxicity // Red Rep. – 2000. – Vol. 5. – P. 257–264.



75. Chatzimpaloglou A., Yavropoulou M.P., Rooij K. E., Biedermann R., Mueller U., Kaskel S., Sarli V. Total synthesis and biological activity of the proposed structure of phaeosphaeride a // *J. Org. Chem.* – 2012. – Vol. 77. – P. 9659–9667.
76. Che Y., Gloer J. B., Wicklow D. T. Phomadecalins A–D and phomapentenone A: new bioactive metabolites from *Phoma* sp. NRRL 25697, a fungal colonist of hypoxylon stromata // *J. Nat. Prod.* – 2002. – Vol. 65. P. 399–402.
77. Chen Y. M., Strange R. N. Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiebi* grown in expressed chickpea sap // *Plant Pathology.* – 1994. – Vol. 43. – N. 2. – P. 321–327.
78. Chu M., Patel M., Horan A. C., Gullo V. P., 1994. Bicyclic diterpene PAF antagonist compounds. US Patent 5338758.
79. Cigic I. K., Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2009. – Vol. 10. – P. 65–102.
80. Cimmino A., Andolfi A., Berestetskiy A., Evidente A. Phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a Potential Mycoherbicide against Perennial Thistles // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – Vol. 56. – P. 6304–6309.
81. Coombe R.G., Jacobs J.J., Watson T.R. Constituents of some *Curvularia* species // *Australian Journal of Chemistry.* – 1968. – Vol. 21. –N. 3. – P. 783 – 788.
82. Coulombe R. A. *Alternaria* toxins // *Mycotoxins and phytoalexins* / Ed. R. P. Sharma, D. K. Salunkhe. Boca Ration: CRC Press. – 1991. – P. 425 – 433.
83. Cox R. J., Glod F., Hurley D., Lazarus C. M., Nicholson T. P., Rudd B. A. M., Simpson T. J., Wilkinson B., Zhang Y. Rapid cloning and expression of a fungal polyketide synthase gene involved in squalestatin biosynthesis // *Chem. Commun.* – 2004. – P. 2260–2261.

84. Curticapean A., Toma F., Tarcea M., Curticapean M., Samarghitan V., Pop I. A., Gulea A. HPLC Method Validation for Simultaneous Determination of Mycotoxins from Corn Seeds // *Croat. Chem. Acta.* – 2011. – Vol. 84. – N. 3. – P. 413–417.
85. Danuta P., Sliwinska E., Trichothecene fusarial toxins perturb the cell cycle in meristem–atic cells of *Secale cereale* L., *Triticum aestivum* L. and *Vicia faba* L. // *Caryologia: International Journal of Cytology.* – 2005. – Vol. 58. N. 1. – P. 86–93.
86. Dayan F.E., Duke S.O. Natural Compounds as Next Generation Herbicides // *Plant Physiology Preview.* – 2014. doi:10.1104/pp.114.239061.
87. Dayan F.E., Romagni J.G., Duke S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins // *J. Chem. Ecol.* – 2000. – Vol. 26. – P. 2079–2094.
88. Dayan F.E., Ferreira D., Wang Y.H., Khan I.A., McInroy J.A., Pan Z.Q. A pathogenic fungi diphenyl ether phytotoxin targets plant enoyl (acyl carrier protein) reductase. // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 147. – P. 1062–1071.
89. Dayan F.E., Owens D.K., Duke S.O. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery // *Pest Manag Sci.* – 2012. – Vol. 68. – N. 4. – P. 519–528.
90. Daub M. E., Chung Kuang–Ren Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis // *Plant relationships.* – 2009. – Vol. 2. – P. 201–219.
91. Daub M. E. Peroxidation of Tobacco Membrane Lipids by the Photosensitizing Toxin, Cercosporin // *Plant Physiol.* – 1982. – Vol. 69. – P. 1361–1364.
92. DeSimone J.M. Practical Approaches to Green Solvents // *Science.* – 2002. – Vol. 297. – P. 799–803.
93. de Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Aveskamp M.M., Verkley G.J.M., Groenewald J.Z., Crous P.W. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma* // *Mycology.* 2010. V.

102 (5). P. 1066–1081.

94. de Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Aveskamp M.M., Verkley G.J.M., Groenewald J.Z., Crous P.W. Redisposition of phoma-like anamorphs in *Pleosporales* // *Studies in Mycology*. 2012. V. 75. P. 1–36.

95. Devys M., Ferbezou J., Topgi R. S., Barbier M. Structure and Biosynthesis of phomenoic acid, an antifungal compound isolated from *Phoma lingam* Tode // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* – 1984. – Vol. 1. – P. 2133–2137.

96. Dombrowski A. W., Hastings J. C. Hazuda D. J` David J. Singh S. B., 1998. *In vitro* HIV integrase inhibitors. US Patent. 5759842.

97. Duke S.O., Lydon J. Herbicides from Natural Compound. // *Weed Technology*. – 1987. – Vol. 1. – P. 122–128.

98. Duke S.O., Romagni J.G., Dayan F.E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action // *Crop Protection*. – 2000. – Vol. 19. – P. 583–589.

99. Duke S.O., Dayan F.E., Romagni J.G., Rimando A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Res* 40. – 2000. – P. 99–111.

100. Duke, S.O., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Schrader, K.K., Aliotta, G., Oliva, A., Romagni, J.G. Chemicals from nature for weed management // *Weed Science*. – 2002. – Vol. 50. – P. 138–151.

101. Duke S.O., Dayan F.E. Modes of action of microbially-produced phytotoxins // *Toxins*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1038–1064.

102. Duke S.O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? // *Pest management science*. *Pest Manag Sci*. – 2012. Vol. 68. – P. 505–512.

103. Duke S.O., Kenyon W.H. Peroxidizing activity determined by cellular leakage. In Böger P and Sandmann G (Eds.). *Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds*. CRC Press, Boca Raton, FL. – 1993. – P. 61–66.

104. El-Elimat T., Raja H. A., Figueroa M., Falkinham J. O., Oberlies N. H. Isochromenones, isobenzofuranone, and tetrahydronaphthalenes produced by *Paraphoma radicina*, a fungus isolated from a freshwater habitat // *Phytochemistry*. – 2014. doi:10.1016/j.phytochem.2014.04.006.
105. Friesen T. L., Faris J.D., Solomon P.S., Oliver R.P. Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity // *Cellular Microbiology*. – 2008. – V. 10. N. 7. – P. 1421–1428.
106. Frisvad J. C., Filtenborg O., Thrane U. Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1989. V. 18, N3. P. 331–335.
107. García-Pajón C. M., Collado I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum species* // *Nat. Prod. Rep.* – 2003. – Vol. 20. – P. 426–431.
108. Ghisalberti E. L. Bioactive tetramic acid metabolites // Atii-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 28. Bioactive natural products (part I). Elsevier Science B.V. – 2003. – P.109–163.
109. Gibbons S. An introduction to planar chromatography. *Methods in Biotechnology Natural Products Isolation*, 2nd ed. – 2005. – Vol. 20. – P.77–116.
110. Gitsopoulos, T.K.; Damalas, C.A.; Georgoulas, I. Improving diquat efficacy on grasses by adding adjuvants to the spray solution before use. *Planta Daninha*. – 2014. – V. 32. – N. 2. – P.355–360.
111. Glinsukon T., Lekutai S. Comparative toxicity in the rat of cytochalasins B and E. // *Toxicon*. – 1979. – Vol. 17. – P. 137–144.
112. Graupner P. R., Carr A., Clancy E., Gilbert J., Bailey K. L., Derby J., Gerwick B. C. The Macrocidins: novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma* // *J. Nat. Prod.* – 2003. – Vol. 66. – P. 1558–1561.
113. Grayson B. T., Williams K. S., Freehauf P. A., Pease R. R., Ziesel W.

- T., Reinsfelder R. L. S., Reinsfelder R. E. The Physical and Chemical Properties of the Herbicide Cinmethylin (SD 95481) // *Pestic. Sci.* – 1987. – Vol. 21. – P. 143–153.
114. Gurtovenko A.A., Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111. – P. 10453–10460.
115. Guske S., Schulz B., Boyle C. Biocontrol options for *Cirsium arvense* with indigenous fungal pathogens // *European Weed Research Society Weed Research.* – 2004. – Vol. 44. – P. 107–116.
116. Haggblom P., Unestam T. Blue Light Inhibits Mycotoxin Production and Increases Total Lipids and Pigmentation in *Alternaria alternata* // *Applied and environmental microbiology.* – 1979. – Vol. 38. – N. 6. – P. 1074–1077.
117. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp.* – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
118. Herath K., Harris G., Jayasuriya H., Zink D., Smith S., Vicente F., Bills G., Collado J., Gonzalez A., Jiang B., Kahn J. N., Galuska S., Giacobbe R., Abruzzo G., Hickey E., Liberator P., Xu D., Roemer T., Singh S. B. Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a widespread tropical *Phoma* sp. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* – 2009. – Vol. 17. – P. 1361–1369.
119. Hiscox J. D., Israelstam G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration // *Can. J. Bot.* – 1979. – Vol. 57. – P. 1332–1334.
120. Hoffman A. M., Mayer S. G., Strobel G. A., Hess W. M., Sovocool W., Grange A. H., Harper J. K., Arife A. M., Grant D. M., Kelley-Swift E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species // *Phytochemistry.* – 2008. – Vol. 69. – P. 1049–1056.

121. Howlett B. J., Alexander Idnurm A., Pedras M. S. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of brassicas // Fungal Genetics and Biology. – 2001. – Vol. 33. – P. 1–14.
122. Hussain H., Krohn K., Florke U., Schulz B., Draeger S., Pescitelli G., Salvadori P., Antus S., Kurtan T. Absolute configuration of hypothemycin and 50-O-methylhypothemycin from *Phoma* sp.–a test case for solid state CD/TDDFT approach // Tetrahedron: Asymmetry. – 2007. – Vol. 18. – P. 925–930.
123. Irinyi L.M., Kövics G., Rai M.K., Karaffa E.M. Studies of evolutionary relationships of *Phoma* species based on phylogenetic markers. – 2006. – P. 99–113.
124. Ishibashi K. Studies on antibiotics from *Helminthosporium* sp. fungi. Part II. Pyrenophorin, a new antibiotic produced by *Pyrenophora avenae* (= *Helminthosporium avenae*) // J. Agric. Chem. Soc. Japan. – 1961. – Vol. 35. – P. 257–262.
125. Ishibashi K. Studies on antibiotics from *Helminthosporium* sp. fungi. Part VIII. Effects of ophiobolin, zizanin, pyrenophorin and siccanin on spore germination and growing mycelium of *Trichophyton mentagrophytes* // J. Agric. Chem. Soc. Japan. – 1962. – Vol. 36. – P. 645–648.
126. Jain P., Pundir R. K. Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production // Journal of Agricultural Technology. – 2011. – Vol. 7. – N2. – P. 247–269.
127. Jimenez J. C., Chavarrı B., Lopez-Macia A., Royo M., Giralt E., Albericio F. Tentoxin as a scaffold for drug discovery. Total solid-phase synthesis of tentoxin and a library of analogues. // Org. Lett. – 2003. – Vol. 5. – N. 12. – P. 2115–2118.
128. Juan-Garcia A., Manyes L., Ruiz M. J., Font G. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: a review // Food Chem Toxicol. – 2013. – Vol. 56. – P. 40–59.

129. Kachlicki P. Metabolites of *Helminthosporia* // In: *Helminthosporia* metabolites, biology, plant diseases (Ed. Chelkowski J.) Poznań: Institute of Plant Genetics. – 1995. – P. 1–26.
130. Kamal A., Ahmad N., Ali Khan M., Qureshi H. Studies in the biochemistry of microorganisms – I. Curvulin and curvulinic acid, metabolic products of *Curvularia siddiqui* // *Tetrahedron*. – 1962. – Vol. 18. – P.433–436.
131. Kamal. A., Khan. M. A., Qureshi. A. Studies in the biochemistry of microorganisms–II Constitution of curvulin, curvulinic acid and curvulol, metabolic products of *Curvularia siddiqui* // *Tetrahedron*. – 1963. – Vol. 19. – P. 111–115.
132. Kenfield D., Hallok Y., Clard J., Strobel G. Curvulin and o-methylcurvulinic acid: phytotoxic metabolites of *Dreshlera indica* which cause necroses on purslane and spiny amaranth // *Plant science*. – 1989. – Vol.60. – P. 123–127.
133. Kenfield D., Strobel S., Sugawara F. Triticone A: a novel bioactive lactam with potential as a molecular probe. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1988. – V. 157. – N. 1. – P.174–182.
134. Kluth S., Kruess A., Tschardtke T. Effects of two pathogens on the performance of *Cirsium arvense* in a successional fallow // *Weed Research*. – 2005. – V. 45. – P. 261–269.
135. Kobayashi K., Okamoto I., Morita N., Kiyotani T., Tamura O. Synthesis of the proposed structure of phaeosphaeride A // *Org. Biomol. Chem*. – 2011. – Vol. 9. – P. 5825–5832.
136. Kok C. J., Papert A. Effect of temperature on *in vitro* interactions between *Verticillium chlamydosporium* and other meloidogyne-associated microorganisms // *BioControl*. – 2002. – V. 47. – N5. – P. 603–606.
137. Kong W., Wei R., Logrieco A. F., Wei J., Wen J., Xiao X., Yang M. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC–

FLD in functional foods and spices in China markets // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 146. – P. 320–326.

138. Kumar M. D. J., Immaculate N. R. A., Srimathi S., Muthumary J., Kalaichelvan P. T. Isolation of *Phoma* Species From Aloe Vera: An Endophyte And Screening The Fungus For Taxol Production // World Journal of Science and Technology. – 2011. – Vol. 1. N. 11. – P. 23–31.

139. Linvilleg P., Sheparadt H. Neural tube closure defects caused by cytochalasin B // Nature New Biology. – 1972. – Vol. 236. – P. 246–247.

140. Liras P., Martin J. F. Assay Methods for Detection and Quantification of Antimicrobial Metabolites Produced by *Streptomyces clavuligerus* // Methods in Biotechnology. Microbial Processes and Products. – 1989. – Vol. 18. – P.149–163.

141. Loesgen S., Bruhn T., Meindl K., Dix I., Schulz B., Zeeck A., Bringmann G. (+)-Flavipucine, the missing member of the pyridione epoxide family of fungal antibiotics // Eur. J. Org. Chem. – 2011. – P. 5156–5162.

142. Macias F.A., Oliveros–Bastidas A., Marin D., Carrera C., Chinchilla N., Molinillo J.M.G. Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. // Phytochem Rev. 7. – 2008. – P. 179–194.

143. Maclean–Fletcher S., Pollard T.D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin // Cell. – 1980. – Vol. 20. – P. 329–341.

144. Malferrari G., Monferini E., De Blasio P., Diaferia G., Saltini G., Del Vecchio E., Rossi-Bernardi L., Biunno I. High-quality genomic DNA from human whole blood and mononuclear cells / BioTechniques. 2002. Vol. 33, N 6. P. 1228—1230.

145. Maloney K. N. , Hao W., Xu J., Gibbons J., Hucul J., Roll D., Brady S. F., Schroeder F. C., Clardy J. Phaeosphaeride A, an inhibitor of STAT3-dependent signaling isolated from an endophytic fungus // Org Lett. – 2006. – P. 4067–4070.



146. Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S. and Banerjee U.C. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation // *Malalaysian Journal of Microbiology*. – 2005. – Vol. 1. – N. 2. – P. 1–9.
147. Mas Diego S. M., Gonzalez Morla A., Campos Sofia M., Cabeza Pullez D. Growing of *Trichoderma reesei* on static and dynamic solid substrate fermentation under electromagnetic fields // *New Horizons in Biotechnology*. Springer Science+Business Media Dordrecht. – 2003. – P. 57–62.
148. Masi M., Meyer S., Clement S., Andolfi A., Cimmino A., Evidente A. Spirostaphylotrichin W, a spirocyclic  $\beta$ -lactam isolated from liquid culture of *Pyrenophora semeniperda*, a potential mycoherbicide for cheatgrass (*Bromus tectorum*) biocontrol // *Tetrahedron*. – 2014. – Vol. 70. – P. 1497–1501.
149. Masi M., Evidente A., Meyer S., Nicholson J., Munoz A. Effect of strain and cultural conditions on the production of cytochalasin B by the potential mycoherbicide *Pyrenophora semeniperda* (Pleosporaceae, Pleosporales) // *Biocontrol Science and Technology*. – 2014. – Vol. 24. – N. 1. – P. 53–64.
150. Matsuno K. et al. Identification of a new series of STAT3 inhibitors by virtual screening // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 1. – P. 371–375.
151. Mitchell G., Bartlett D.W., Fraser T.E.M., Hawkes T.R., Holt D.C., Towson J.K., Wichert R.A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* – 2001. – Vol. 57. – P. 120–128.
152. Mobius N., Hertweck C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2009. – Vol. 12. – P. 390–398.
153. Mohamed I. E., Gross H., Pontius A., Kehraus S., Krick A., Kelter G., Maier A., Fiebig H., Konig G. M. Epoxyphomalins A and B, prenylated polyketides with potent cytotoxicity from the marine-derived fungus *Phoma* sp. // *Organic Letters*. – 2009. – Vol.11. – N. 21. – P. 5014–5017.
154. Montel E., Bridge P. D., Sutton B. C. An integrated approach to

- Phoma* systematics // Mycopathologia. – 1991. – Vol. 115. – N 2. – P. 89–103.
155. Mottier N., Tabacchi R. Isolation and identification of secondary metabolites from the fungus *Phomopsis* spp., a pathogen responsible for vine excoriosis. Ph.D. thesis. – 2005. – P. 139.
156. Moreira R.A., Mansano A. S., Rocha O. The toxicity of carbofuran to the freshwater rotifer, *Philodina roseola* // Ecotoxicology. – 2015. doi:10.1007/s10646-014-1408-2.
157. Nielsen K. F., Thrane U. Fast methods for screening of trichothecenes in fungal cultures using gas chromatography–tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. 929. – P.75–87.
158. Nielsen K.F. Mycotoxin production by indoor molds // Fungal Genetics and Biology. – 2003. – V. 39. – P. 103–117.
159. Oikawa H., Toshima H., Ohashi S., Wilfried A. König W.A., Kenmoku H., Sassa T. Diversity of diterpene hydrocarbons in fungus *Phoma betae* // Tetrahedron Letters. – 2001. – Vol. 42. – P. 2329–2332.
160. Olbe M., Sommarin M., Gustafsson M., Lundborg T. Effect of the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* toxin pre-helminthosporol on barley root plasma membrane vesicles // Plant Pathol. – 1995. –Vol. 44. – P. 625–635.
161. Oliver R.P., Solomon P.S. Recent Fungal Diseases of Crop Plants: Is Lateral Gene Transfer a Common Theme? // Molecular plant–microbe interactions. – 2008. – Vol. 21. – N. 3. – P. 287–293.
162. Omura S., Murata M., Hanaki H., Hinotozawa T., Ōiwa R., Tanaka H. Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin. Fermentation, isolation, biological activity and mechanism of action. J. Antibiot. – 1984. – Vol. 37. – P. 829–835.
163. Ondeyka J.G., Zink D.L., Young K., Painter R., Kodali S., Galgoci A., Collado J., Jose Tormo R., Basilio A., Vicente F., Wang J., and Singh S.B. Discovery of bacterial fatty acid synthase inhibitors from a *Phoma* species as antimicrobialagents using a new antisense–based strategy // J. Nat. Prod. –

2006. – Vol. 69. – P. 377–380.

164. Osterhage C., Schwibbe M., König G. M., Wright A. D. Differences between marine and terrestrial *Phoma* species as determined by HPLC–DAD and HPLC–MS // *Phytochemical Analysis*. – 2000. – Vol. 11. – N5. – P. 288–294.

165. Osterhage C., König G. M., Jones P. G., Wright A. D. 5–Hydroxyramulosin, a new natural product produced by *Phoma tropica*, a marine–derived fungus isolated from the Alga *Fucus spiralis* // *Planta Med.* – 2002. – Vol. 68. – P. 1052–1054.

166. Oswald S., Karsunke X. Y. Z., Dietrich R., Martlbauer E., Niessner R., Knopp D. Automated regenerable microarray–based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals // *Anal Bioanal Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 6405–6410.

167. Pedras M. S., Ward D., 2000. Use of *Alternaria brassicae* and *Phoma lingam* phytotoxins in determining specific disease resistance traits in plants. Canadian Patent 2312537.

168. Pedras M. S., Chumala P. B., Quail J. W. Chemical Mediators: The remarkable structure and host–selectivity of depsilairdin, a sesquiterpenic depsipeptide containing a new amino acid. // *Org. Lett.* – 2004. – Vol. 6. – N. 24. – P. 4615–4617.

169. Pedras M.S., Chumala P.B., Yu Y. The phytopathogenic fungi *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria Biglobosa*: chemotaxonomical characterization of isolates and metabolite production in different culture media // *Can. J. Microbiol.* – 2007. – Vol. 53. – P. 364–371.

170. Petroski R.J., Stanley W.S. Natural Compounds for Pest and Weed Control // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – Vol. 57. – P. 8171–8179.

171. Pillmoor J.B. Carbocyclic Coformycin: a Case Study of the Opportunities and Pitfalls in the Industrial Search for New Agrochemicals from Nature // *Pestic. Sci.* – 1998. – Vol. 52. – P. 75–80.

172. Phookamsak R., Liu J., McKenzie E. H. C., Manangoda D. S., Ariyawansa H., Thambugala K. M., Dai D., Camporesi E., Chukeatirote E., Wijayawardene N. N., Bahkali A. H., Mortimer P. E., Xu J., Hyde K. D. Revision of *Phaeosphaeriaceae* // Fungal Diversity. – 2014. – Vol. 68. – P. 159–238.
173. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging // Mol Biol Evol. – 2008. – Vol. 25. – N. 7. – P. 1253–1256.
174. Qin S., Hussain H., Schulz B., Draeger S., Krohn K. Two new metabolites, epoxydine A and B, from *Phoma* sp. // Helvetica Chimica Acta. – 2010. – Vol. 93. – P. 169–174.
175. Radivojević L., Gašić S., Umiljendić J. G., Šantrić L., Brkić D. Impact of Different Adjuvants and Modes of Application on Efficacy of Rimsulfuron in Maize. // Pestic. Phytomed. (Belgrade). – 2011. – V. 26. – N. 3. – P. 255–263.
176. Rai M., Deshmukh P., Gade A., Ingle A., Kövics G. J., Irinyi L. *Phoma* Saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications // Critical Reviews in Microbiology. – 2009. – Vol. 35. N. 3. – P. 182–196.
177. Rank J. The method of *Allium* anaphase–telophase chromosome aberration assay // Ekologija. – 2003. – Vol. 1. – P. 38–42.
178. Reddy C. S., Reddy R.V., Hayes A.W. High–performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin secalonic acid D and its application to biological fluids. // J. Chromatogr. – 1981. – Vol. 208. – N. 1. – P. 17–26.
179. Ritchie F., Bain R. A., McQuilken M. P. Effects of nutrient status, temperature and pH on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato // Journal of Plant Pathology. – 2009. – Vol. 91. – N3. – P. 589–596.
180. Rivero–Cruz J. F., Macías M., Cerda–García–Rojas C.M., Mata R. A New Phytotoxic Nonenolide from *Phoma herbarum* // J. Nat. Prod. – 2003. –

Vol. 66. – P. 511–514.

181. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. – 2003. – Vol. 19. N. 12. – P. 1572–1574.

182. Saad S.M., Halloin J.M., Hagedorn D.J. Production, Purification and Bioassay of Tentoxin // *Phytopathology*. – 1970. – Vol. 60. – P. 415–418.

183. Sambrook E.A., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. – 1989.

184. Schulz B., Draeger S., dela Cruz T. E., Rheinheimer J., Siems K., Loesgen S., Bitzer J., Schloerke O., Zeeck A., Kock I., Hussain H., Dai J., Krohn K. Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats // *Botanica Marina*. – 2008. – Vol.51. – P. 219–234.

185. Siegel D., Rasenko T., Koch M., Nehls I. Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high–performance liquid chromatography–electrospray ionization ion–trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4–dinitrophenylhydrazine. // *J. Chromatogr.* – 2009. – Vol. 1216. – N. 21. – P. 4582–4588.

186. Siegel D., Merkel S., Koch M., Nehls I. Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 120. – P. 902–906.

187. Shaner D.L., Beckie H.J. The future for weed control and technology. // *Pest Manag Sci.* – 2014. doi:10.1002/ps.3706.

188. Sharma S.D., Chandrasena N., Singh M. Glyphosate–Adjuvant Interactions: A Review Of Recent Experiences // *Proc. 20th Asia–Pacific Weed Science Soc. Conf., Ho–Chi–Minh City, Vietnam.* – 2004. – P. 434–442.

189. Shepardt H. Anencephaly and potatoes. // *Lancet*. 1973i, 97.

190. Smedsgaard J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. // *J Chromatogr A.* –

1997. – Vol.760. – N. 2. – P. 264–70.

191. Sorensen J., Aveskamp M., Thrane U., Andersen B. Chemical characterization of *Phoma pomorum* isolated from Danish maize // Intern. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 136. – N. 3. – P. 310–317.

192. Strange R.N. Phytotoxins associated with Ascochyta species // Toxins in plant disease development and evolving biotechnology / Ed. R. K. Upadhyay, K.G. Mukerji.: Oxford and IBN Publishing Co. Pvt. Ltd. – 1997. – P. 167–181.

193. Subramaniam R., Vimala R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study // International Journal of Science and Nature. – 2012. – Vol. 3. – N. 3. – P. 480–486.

194. Sugawara F. Phytotoxins as potential herbicides.in S.S. Narwal et al. (eds.), Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry, Kluwer, Dordrecht. – 2000. – P. 113–128.

195. Takiguchi N., Tajima T., Asayama K., Ikeda T., Kuroda A., Kato J., Ohtake H. Behavioral Responses of the Ciliated Protozoan *Paramecium caudatum* to 2,4–Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Analogues // Journal of bioscience and bioengineering. – 2002. – Vol. 93. – P. 416–420.

196. Tulp M., Bohlin L. Rediscovery of known natural compounds: Nuisance or goldmine? // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 13. – P. 5274–5282.

197. Tsantrizos Y. S. Bioactive metabolites of the genus *Phomopsis* // Attaur–Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier Science B.V. –1995. – Vol. 15. – P. 341–360.

198. Varma G. B., Fatope M. O., Marwah R.G., Deadman M. E., Al–Rawahi F. K. Production of phenylacetic acid derivatives and 4–epiradicinol in culture by *Curvularia lunata* // Phytochemistry. – 2006. Vol. 67. – P. 1925–1930.

199. Vanot G. E., Sergent M. Experimental design in microbiology //

Methods in Biotechnology. Microbial Processes and Products. – 2005. – Vol. 18. – P. 25–39.

200. Vurro M. Benefits and risks of using fungal toxins in biological control / Proceedings of the NATO Advanced study Institute on Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management held in Gualdo Tadino, Italy 8–19 September 2006/edited by Vurro M. and Gressel J. 2007, 53 – 75.

201. Vurro M., Zonno M. C., Evidente A., Andolfi A., Montemurro P. Enhancement of Efficacy of *Ascochyta caulina* to Control *Chenopodium album* by Use of Phytotoxins and Reduced Rates of Herbicides // Biological Control. 2001. V. 21. P. 182–190.

202. Walravens J., Mikula H., Rychlik M., Asam S. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs // Journal of Chromatography A. 2014. V. 1372. P. 91–101.

203. 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. Ed: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. New York, USA: Academic Press. – 1990. – P. 315–322.

204. Wu N. Herbicide Sulcotrione, Herbicides, Theory and Applications, Prof. Marcelo Larramendy (Ed.), ISBN: 978-953-307-975-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theoryand-applications/herbicide-sulcotrione> Herbicide Sulcotrione) P. 527–544.

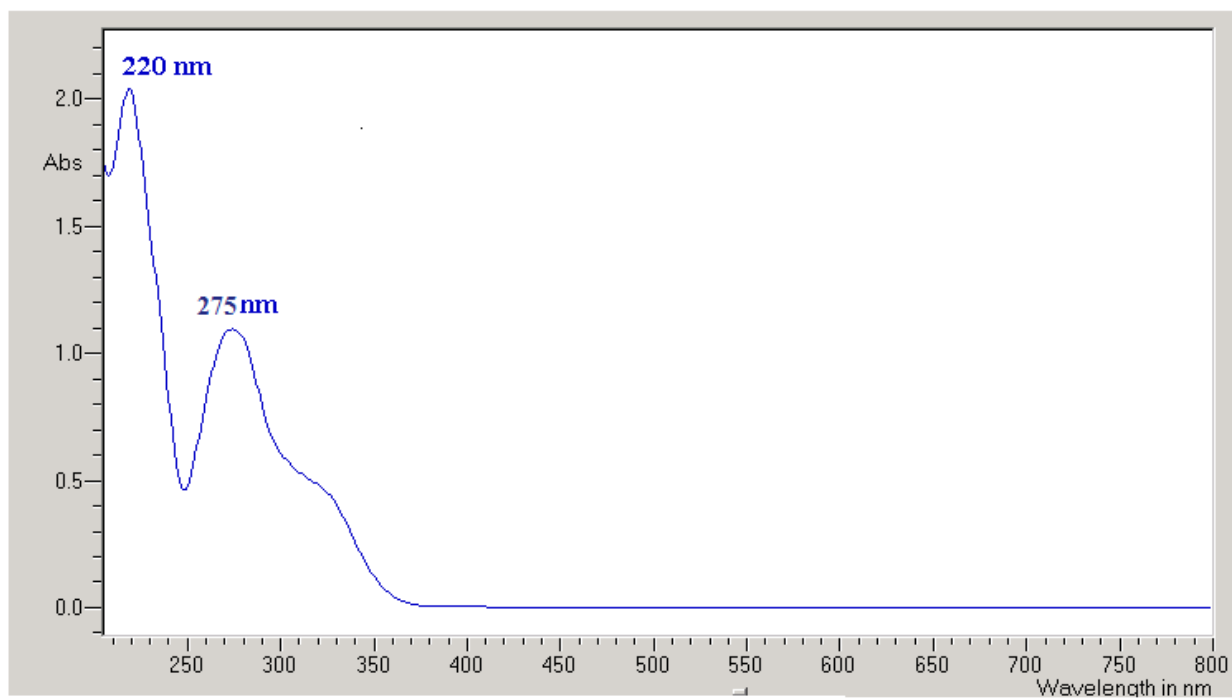
205. Yuzikhin O., Mitina G., BErestetkiy A. Herbicidal Potential of Stagonolide, a New Phytotoxic Nonenolide from *Stagonospora cirsii* // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 7707–7711.

206. Zhang H.W., Song Y.C., Tan R.X. Biology and chemistry of endophytes. Nat. Product Rep. 2006.V. 23 (5). P. 753–771.

207. Zhang G. F., Han W. B., Cui J. T., Ng S. W., Guo Z. K., Ren Xiang Tan R. X., Ge H. M. Neuraminidase inhibitory polyketides from the marine-derived fungus *Phoma herbarum* // *Planta Med.* – 2012. – Vol. 78. – P. 76–78.
208. Zhang Y. , Crous P. W. , Schoch C. L. , Hyde K. D. Pleosporales // *Fungal Diversity.* – 2012. – Vol. 53. – P. 1–221.
209. Zhou B., Qiang S. Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. // *African Journal of Biotechnology.* – 2008. – Vol. 7. – N. 8. – P. 1151–1156.



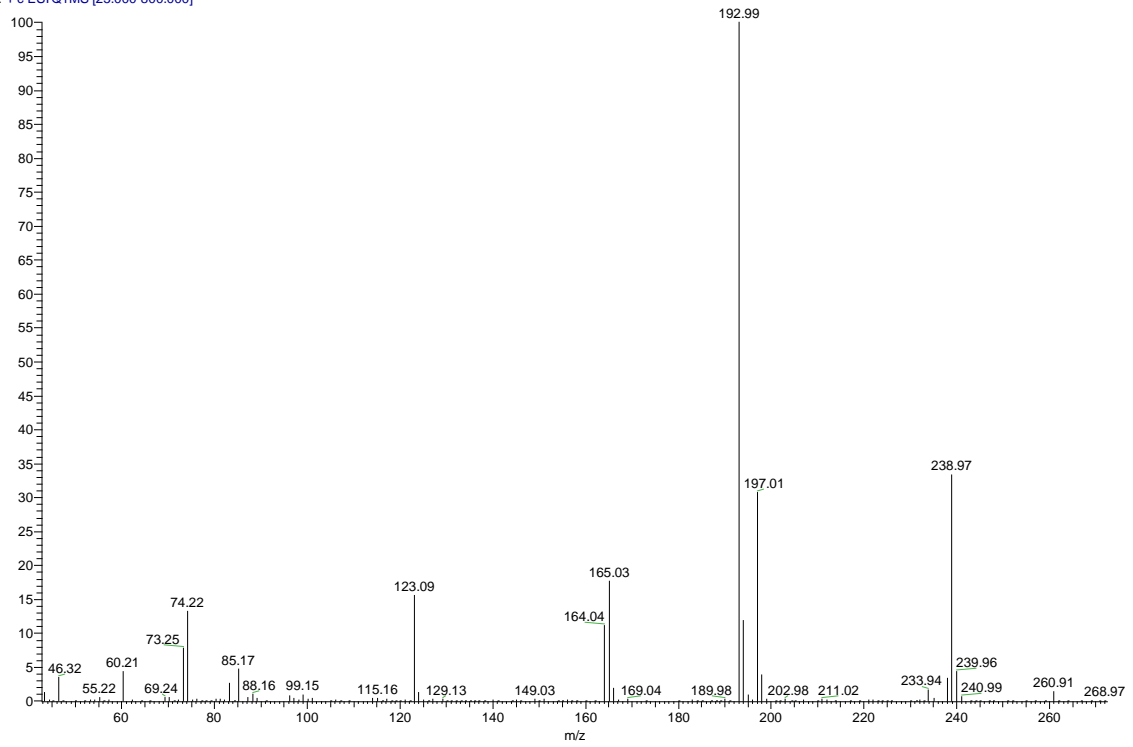
## ПРИЛОЖЕНИЕ А



УФ-спектр курвулина (вещество растворено в ацетонитриле)

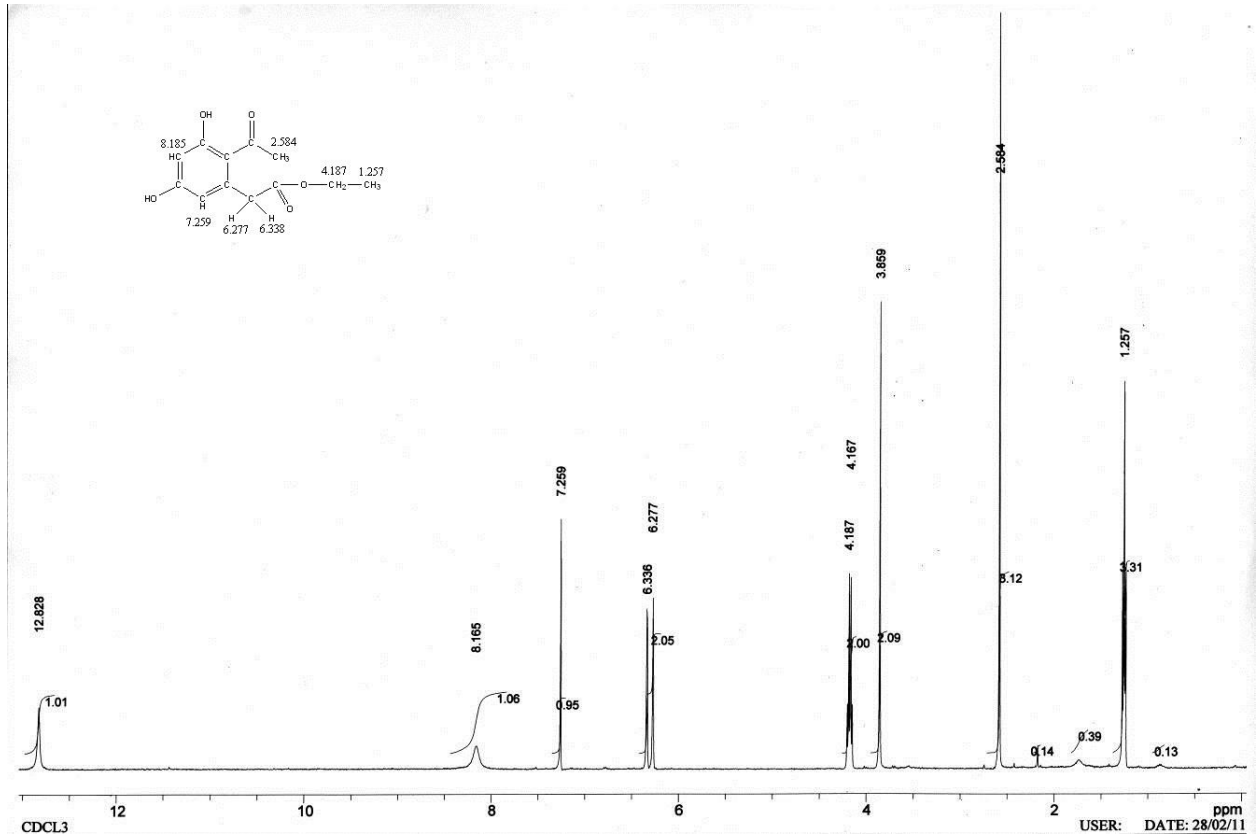
## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

L#0141\_141209112637 #1189-1211 RT: 10.54-10.74 AV: 23 SB: 39 10.36-10.55, 10.73-10.87 NL: 1.04E6  
T: + c ESI Q1 MS [25.000-800.000]

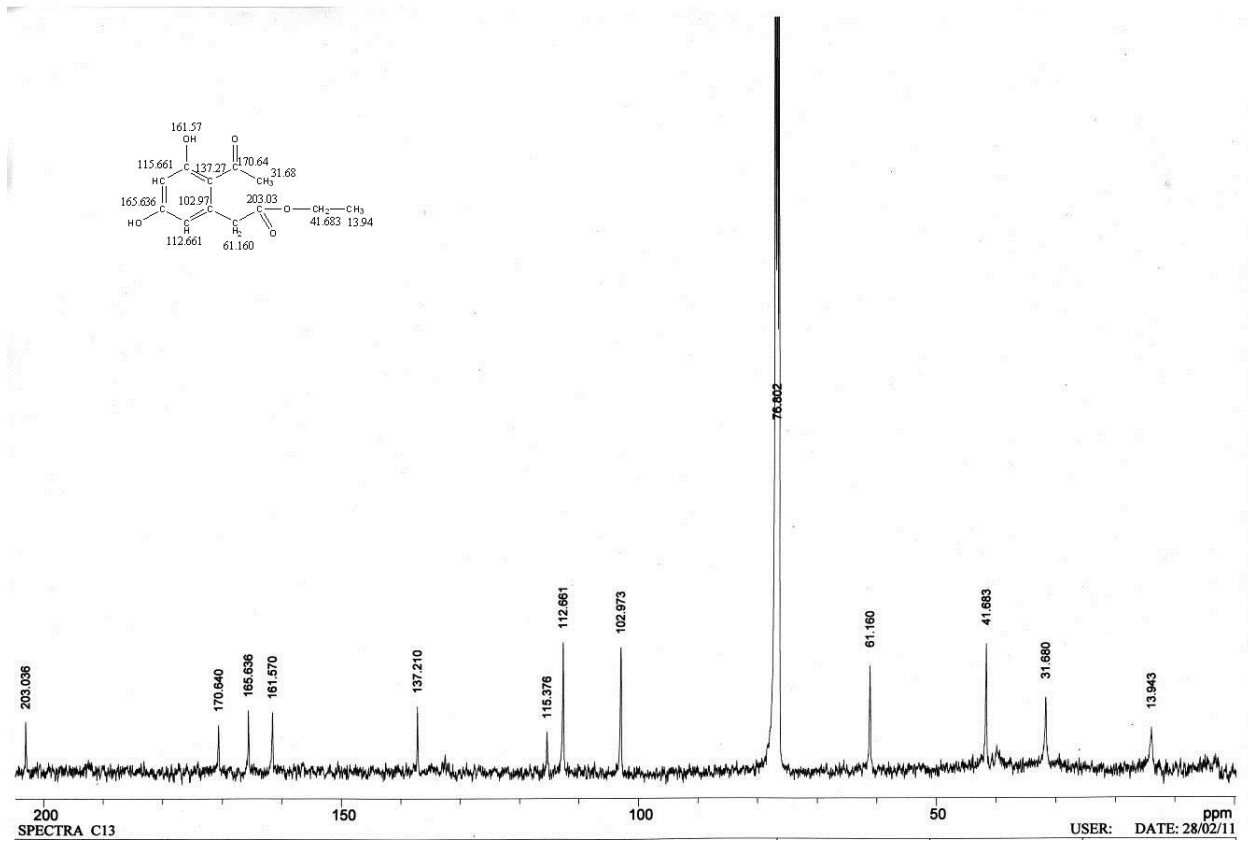


Масс-спектр курвулина, полученный в режиме положительной электроспрей-ионизации

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400,6 МГц), курвулин

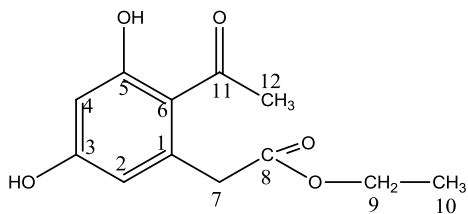
## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 100,6 МГц), курвулин

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

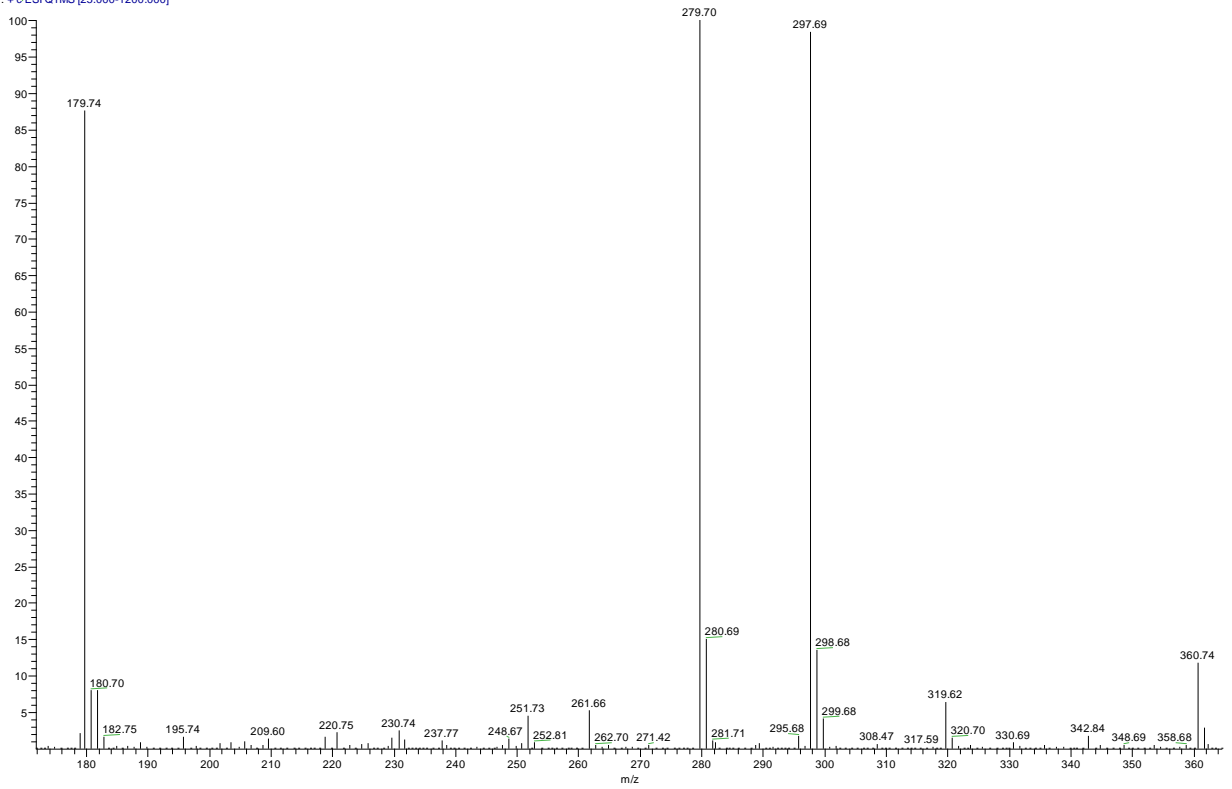
 $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектры феосферид А ( $\text{CDCl}_3$ )

№ атома С	$\delta_{\text{C}}$ , ppm	$\delta_{\text{H}}$ , ppm	Мультиплетность $m_{\text{H}}$	J, Гц	$n_{\text{H}}$	Группа
1	102,97	-	-	-	-	C
2	137,27	-	-	-	-	C
3	161,57	-	-	-	-	C
4	115,66	8,165	c	-	1	CH
5	165,64	-	-	-	-	C
6	112,66	7,259	c	-	1	CH
7	61,16	6,277	д	-	2	CH <sub>2</sub>
		6,338	д	-	2	
8	203,03	-	-	-	-	C
9	41,68	4,187	м	-	2	CH <sub>2</sub>
10	13,94	1,257	м	-	4	CH <sub>3</sub>
11	170,64	-	-	-	-	C
12	31,68	2,584	c	-	3	CH <sub>3</sub>



## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

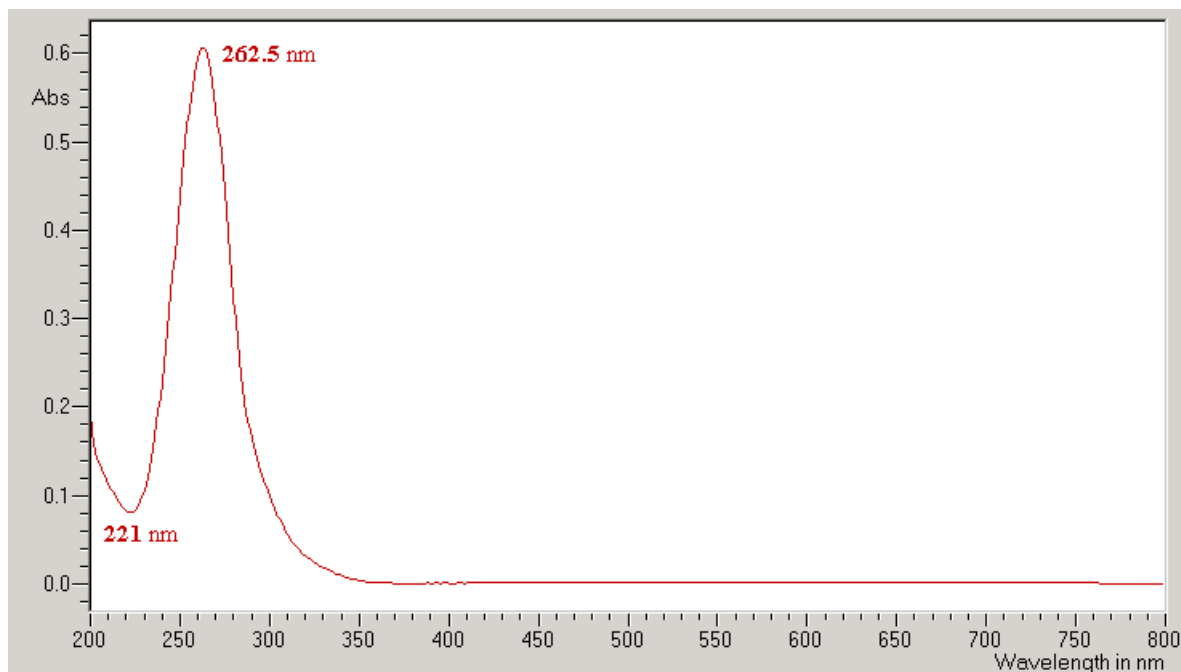
L#0082 #3234-3310 RT: 20.44-20.92 AV: 77 NL: 1.11E5  
T: + c ESI Q1MS [25.000-1200.000]



Масс-спектр феосферина А, полученный в режиме положительной электроспрей-ионизации

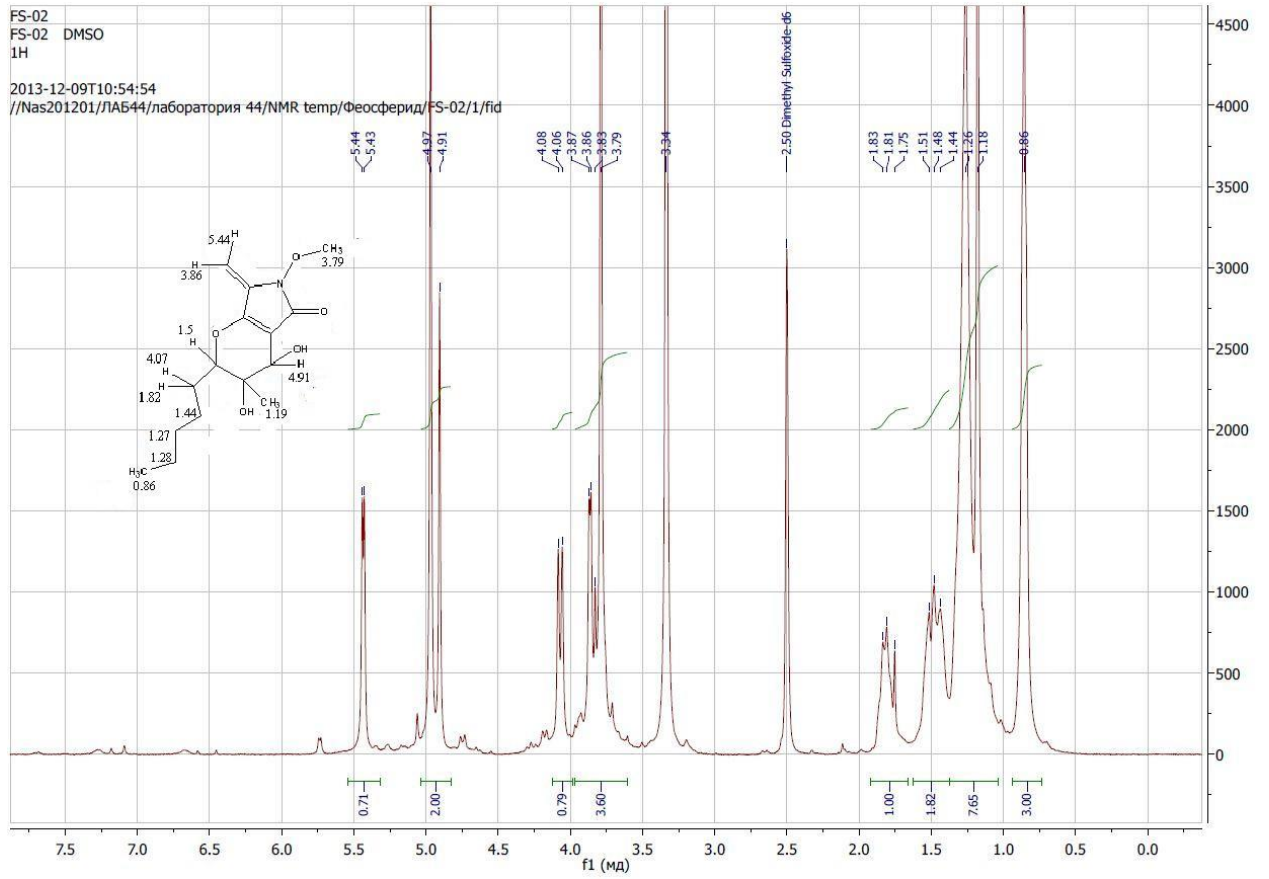
## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

## УФ-спектр феофериды А (ацетонитрил)



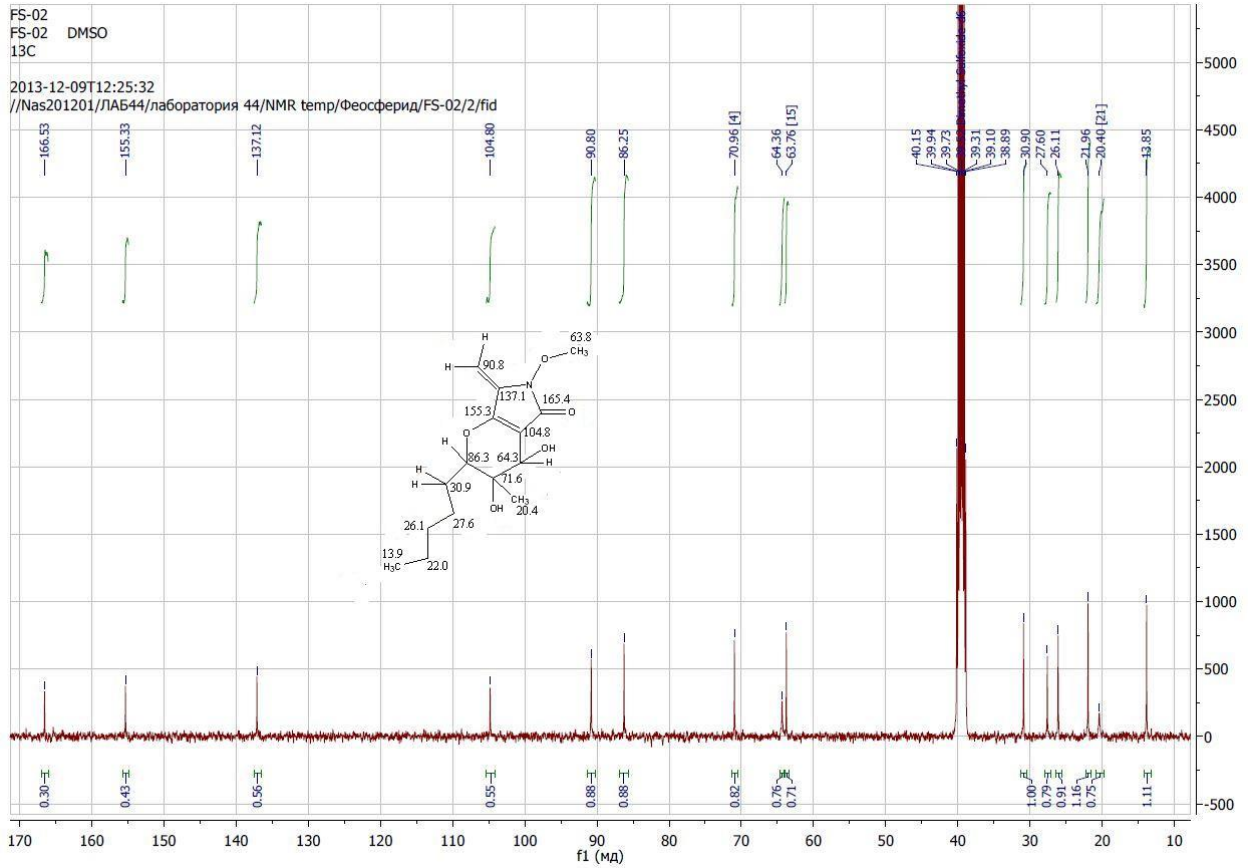
## УФ-спектр феофериды А (вещество растворено в ацетонитриле)

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

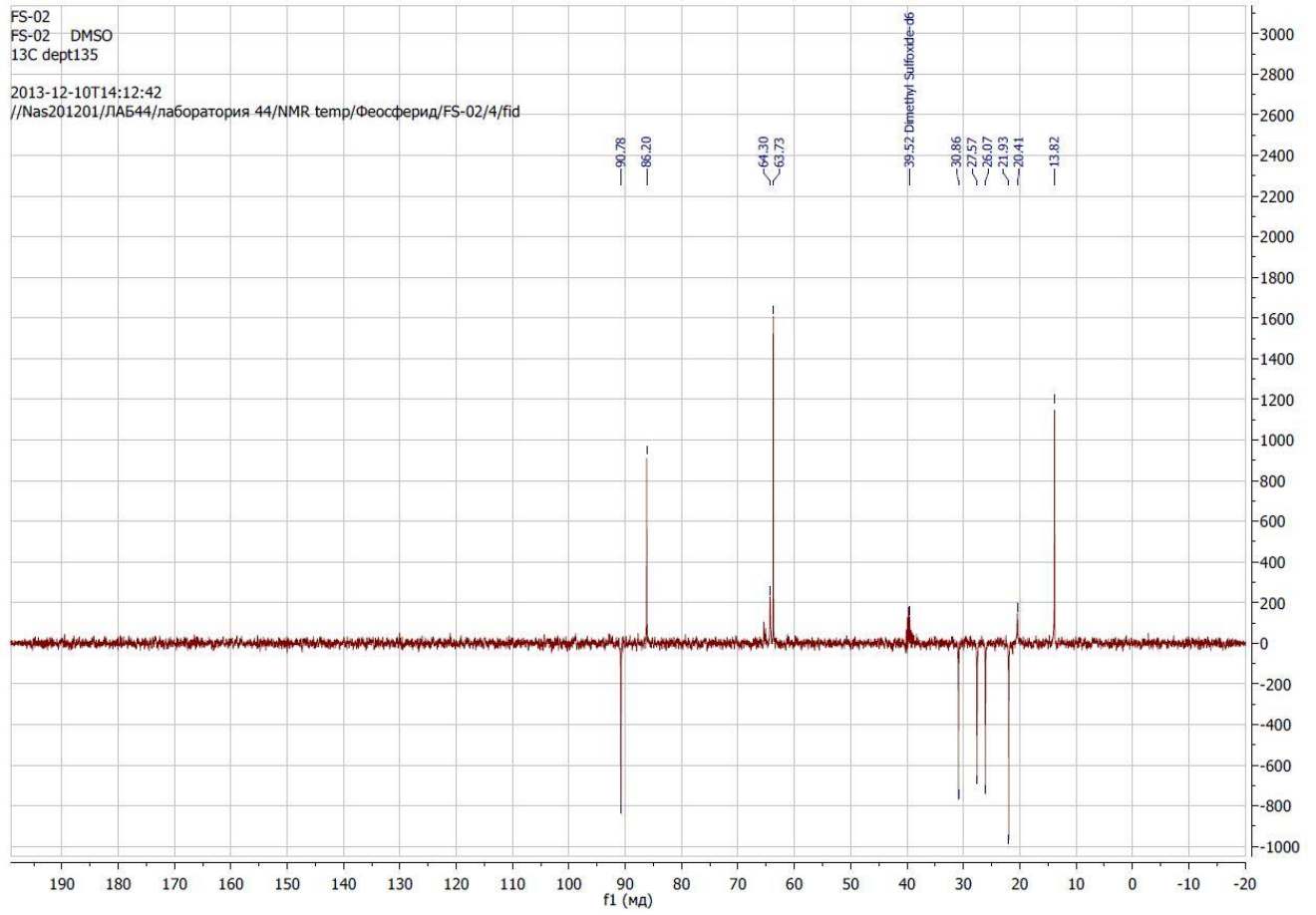
Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР феосферида А



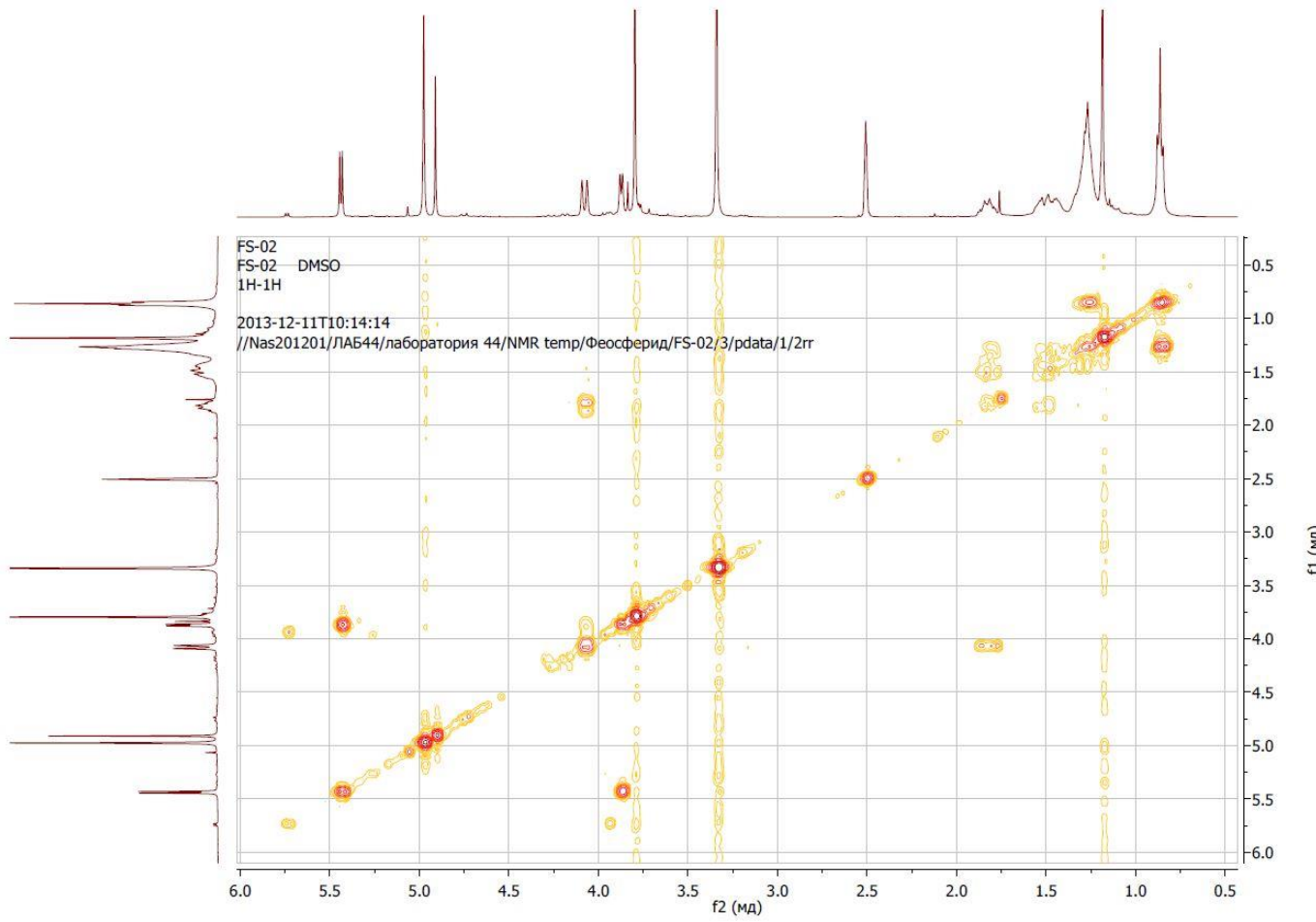
## ПРИЛОЖЕНИЕ И

Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР феосферид А

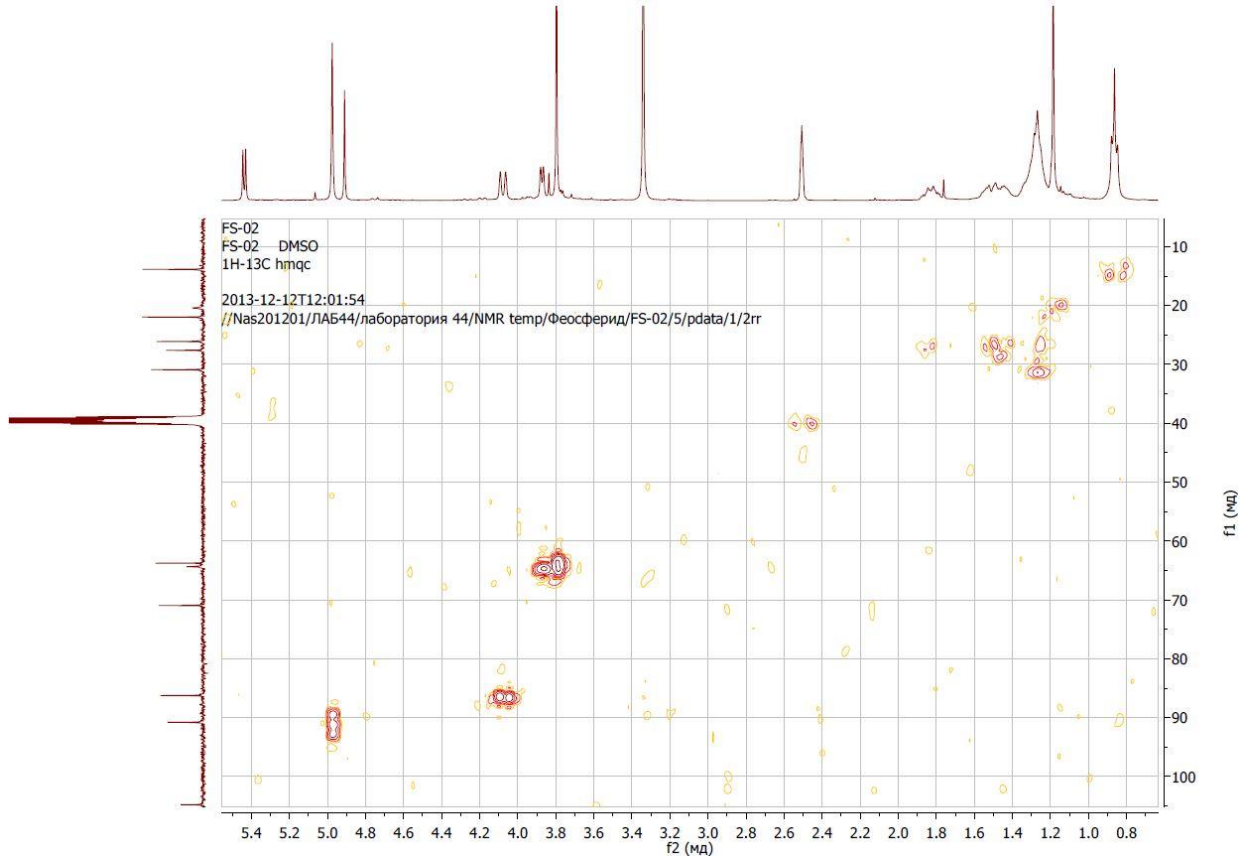
## ПРИЛОЖЕНИЕ К

Спектр  $^{13}\text{C}$  ДЕРТ феосферида А

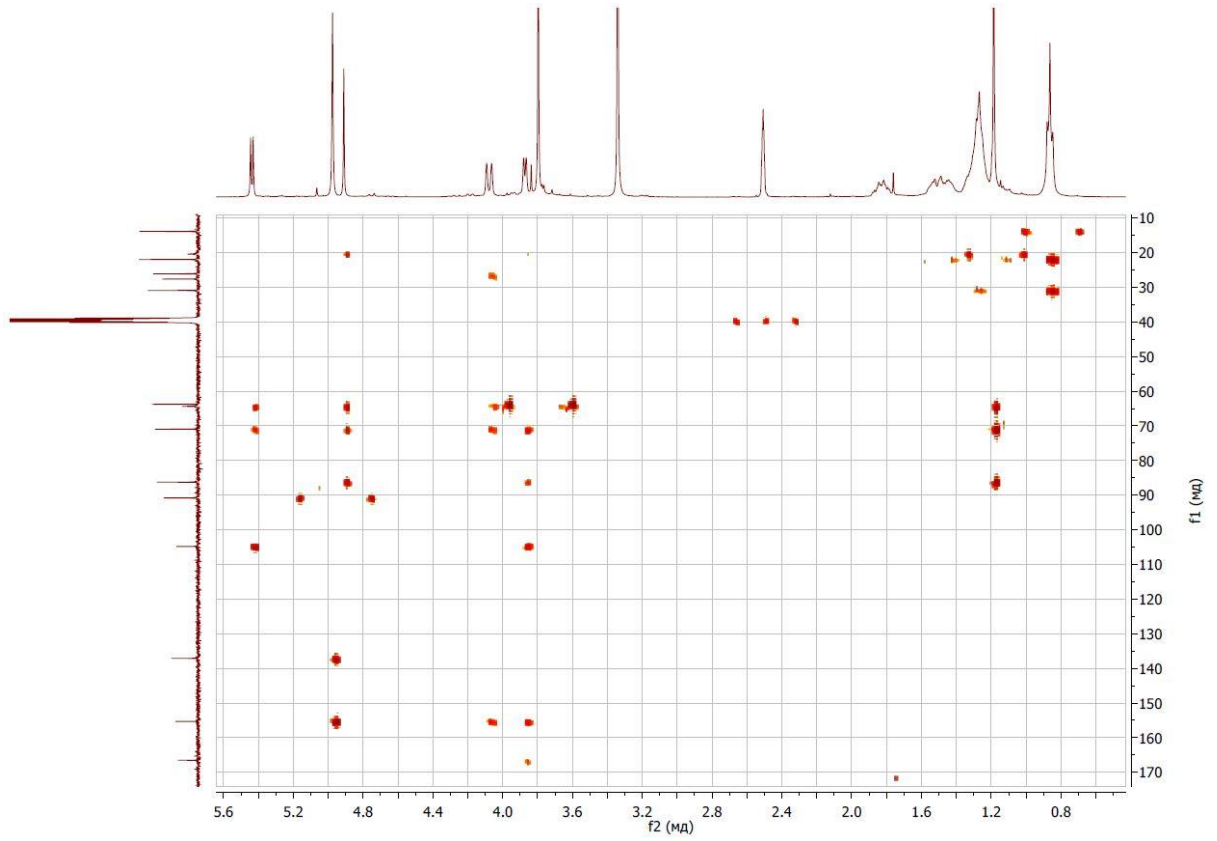
## ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY феоcферида А

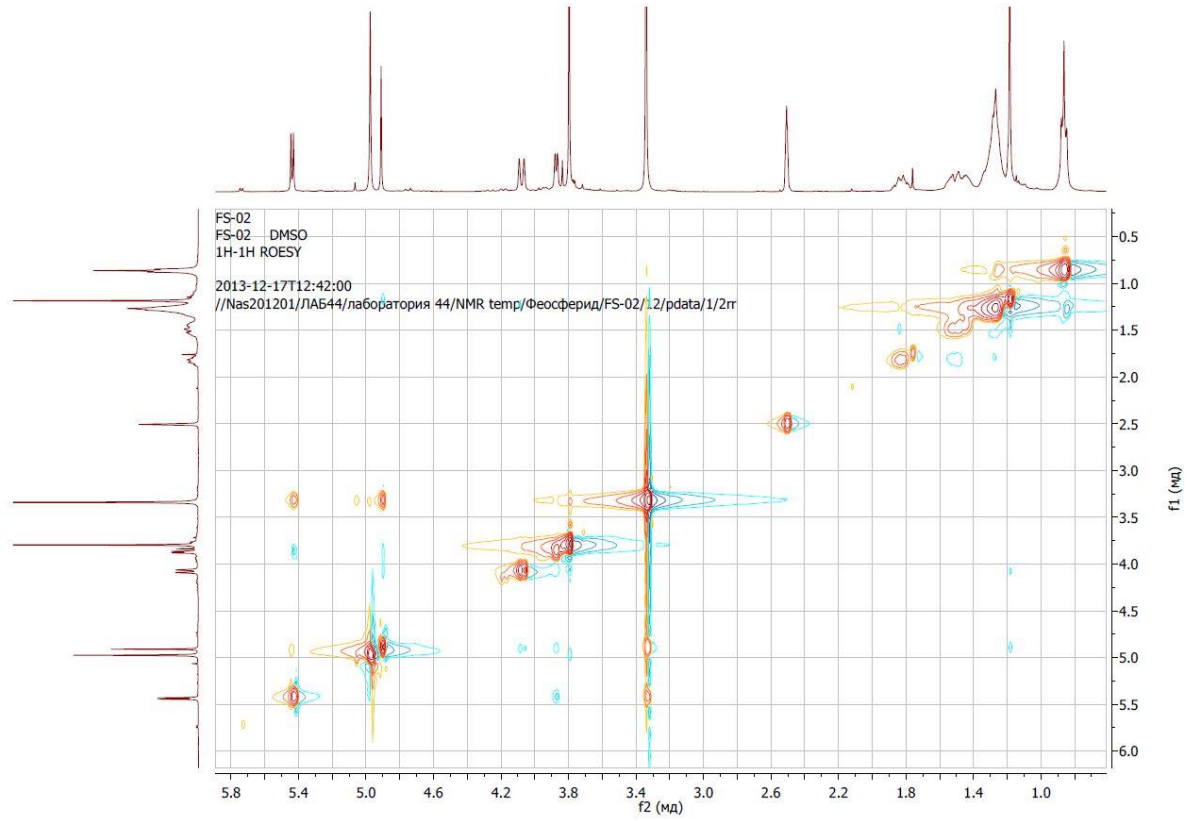
## ПРИЛОЖЕНИЕ М

Спектр  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМҚС феосферид А

## ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Спектр  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС феоферина А

## ПРИЛОЖЕНИЕ О

Спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY феоcферида А

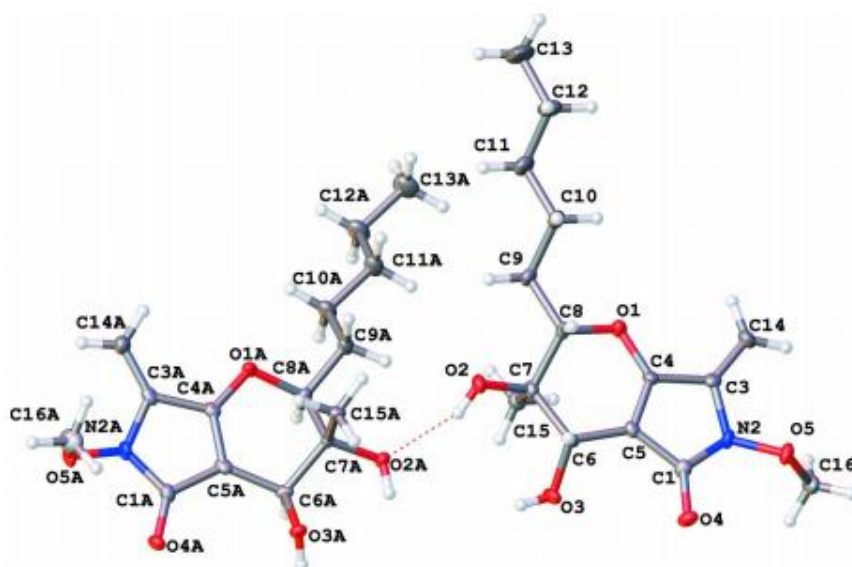
## ПРИЛОЖЕНИЕ П

<sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР спектры феосферид А (ДМСО d-6)

№ атома С	δ <sub>С</sub> , ppm	δ <sub>Н</sub> , ppm	Мультиплетность m <sub>Н</sub>	J, Гц	n <sub>Н</sub>	Группа
1	166,53	-	-	-	-	С
3	137,12	-	-	-	-	С
4	155,3	-	-	-	-	С
5	104,8	-	-	-	-	С
6	64,36	4,92	-	-	1	СН
7	70,96	-	-	-	-	С
8	86,25	1,51	д	11.3	1	СН
9	30,90	4,07	с	-	1	СН <sub>2</sub>
		1,82	с	-	1	
10	27,6	1,44	м	-	2	СН <sub>2</sub>
		1,51	м	-	1	
11	26,11	1,27	м	-	2	СН <sub>2</sub>
12	21,96	1,28	м	-	2	СН <sub>2</sub>
13	13,85	0,86	т	6.4	3	СН <sub>3</sub>
14	90,80	5,44	д	5.8	1	СН <sub>2</sub>
		3,86	д	5.8	1	
15	20,40	3,79	с	-	3	СН <sub>3</sub>
16	63,76	1,19	с	-	3	СН <sub>3</sub>

Данные получены на основании одномерных и двумерных спектров ЯМР (COSY, ROESY, HMQC, HMBC)

## ПРИЛОЖЕНИЕ Р



Геометрия молекулы I (левая) и II (правая) феосфериды А в кристалле