

На правах рукописи

САЛИМОВА
ДИЛАРА РИНАТОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* С ЭНТОМОТОКСИЧЕСКИМИ
СВОЙСТВАМИ**

Шифр и наименование научной специальности:

1.5.18. «Микология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР).

Научный руководитель:

Берестецкий Александр Олегович

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией фитотоксикологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Официальные оппоненты:

Кирицели Ирина Юрьевна - доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории систематики и географии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук» (БИН РАН)

Кононенко Галина Пантелеевна - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории Микотоксикологии и санитарии кормов Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Новосибирский государственный аграрный университет (ФГБОУ ВО НГАУ)

Защита состоится 06 июня 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.008.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР) по адресу: 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, тел./факс (812) 470-51-10, e-mail: dissovvet@vizr.spb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте института: vizr.spb.ru

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

Актуальность темы исследования. В настоящее время разработаны и зарегистрированы природные инсектициды, включающие не только соединения, обладающие токсичностью, но также регулирующие рост, развитие, поведение насекомых и проявляющие антифидантное действие (Bills, Gloer, 2016; Берестецкий и др., 2021). Основная часть коммерческих энтомопатогенных препаратов создана на основе живой культуры энтомопатогенов родов *Beauveria* и *Metarhizium* (Jaronski, Mascarin, 2017; Lacey, 2017) и почвенных микромицетов родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Trichoderma*. Многочисленными исследователями доказано, что метаболиты эндофитных грибов злаковых (*Neotyphodium* и *Epichloë*) и хвойных (*Picea*, *Abies*, *Larix*) растений также продуцируют различные метаболиты, обладающие инсектицидной активностью. Трофические и конкурентные связи насекомых с микромицетами, в частности фитопатогенными, подразумевают наличие у них метаболитов с энтомотоксическими свойствами (Берестецкий и др., 2021). К настоящему времени работы, выполняемые в области изучения прямого (за счет энтомотоксического или репеллентного действия) или косвенного (снижая качество растительного субстрата, подавляя иммунитет и симбиотическую микрофлору насекомых) действия этих метаболитов на жизнеспособность, развитие и плодovitость членистоногих, единичны (Берестецкий и др., 2021).

Степень разработанности проблемы. Результаты немногочисленных опытов показывают, что некоторые представители фитопатогенных грибов способны образовывать вторичные метаболиты с энтомотоксическими свойствами. Так, алкалоид, выделенный из культуральной жидкости *Perenophora teres*, при добавлении в искусственный корм ингибировал рост личинок малой совки *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), табачного червя *Helicoverpa virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (L.) (Diptera: Drosophilidae) и совок *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Patent № EP 0 645 963 B1 ..., 2005). В скрининге метаболитов фитопатогенных грибов против гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* Harr. (Homoptera: Aphididae) было показано антифидантное действие глиотоксина, циклопальдиевой кислоты, сеиридина и цитохалазина А (Antifeedent activity ..., 2018). Антифидантные свойства в отношении кровососущих насекомых продемонстрировали некоторые фитотоксины (сеиридин, сферопсидин А, папирацилловая кислота), выделенные из культур фитопатогенов (Cyclopalidic acid ..., 2013).

Грибы рода *Alternaria* обладают высоким потенциалом к образованию вторичных метаболитов с энтомотоксическими свойствами. Важно отметить, что некоторые мелкоспоровые *Alternaria* spp. обнаруживаются на насекомых и способны вызывать их микозы (*Alternaria alternata*, a new ..., 2001). Было показано, что фитофаги избегают листья капусты, инфицированные грибом *A. brassicicola* (Tack, Dicke, 2013). Установлено, что экстракты из различных культур *Alternaria* проявляют токсичность в отношении виковой тли *Megoura vicia* (Buckt.) (Homoptera, Aphididae), из которых наиболее перспективными продуцентами энтомотоксических веществ были *A. saponariae*, *A. japonica*, *A. penicillata*, *A. rapavericola* и *A. tenuissima* (Инсектицидная, акарицидная ..., 2019; Берестецкий и др., 2021). Из *A. sonchi* были выделены метил-3,8-дигидрокси-6-метил-4-хлоро-9-оксо-9Н-ксантен-1-карбоксилат и хлормонилиниковая кислота В токсичные для обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) (Homoptera: Aphididae) (Isolation and bioactivity ..., 2020). Эти данные определяют интерес к

энтмотоксическим свойствам вторичных метаболитов *Alternaria* spp., не только с точки зрения изучения их роли в антагонистических взаимодействиях фитопатогенов и членистоногих, но и поиска экологически безопасных методов борьбы с вредными насекомыми (Берестецкий и др., 2021).

Цель работы — выделить и охарактеризовать вторичные метаболиты различных штаммов трех видов грибов рода *Alternaria* (*A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*), обладающих энтмотоксическими свойствами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- 1) уточнить видовую идентификацию изучаемых штаммов;
- 2) исследовать влияние состава питательного субстрата на образование эндо- и экзогенных метаболитов исследуемых штаммов;
- 3) оценить спектр биологической активности полученных экстрактов;
- 4) определить химический состав экстрактов, обладающих энтмотоксической активностью;
- 5) уточнить энтмотоксические свойства тенуазоновой кислоты как типичного метаболита грибов рода *Alternaria*;
- 6) оценить влияние тенуазоновой кислоты на иммунитет гусениц большой вощиной огневки *Galleria mellonella* (L.).

Научная новизна. Впервые изучен набор вторичных метаболитов в экстрактах из культур *A. japonica* и обнаружены биологически активные соединения – брассициколин А, гидро- и дигидробрассициколин А и фоменин А. Установлено, что *A. japonica* не образует токсины мелкоспоровых видов *Alternaria* spp. Показана возможная связь компонента экстрактов *A. japonica* (дигидробрассициколин А) с их энтмотоксической активностью в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae) и гусениц большой вощиной огневки *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Впервые охарактеризованы энтмотоксические свойства тенуазоновой кислоты в отношении следующих членистоногих – обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), гусениц большой вощиной огневки *G. mellonella*, домового сверчка *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae), личинок жука-чернотелки *Zophobas morio* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae). Впервые установлен синергетический эффект на смертность гусениц *G. mellonella* при совместной обработке энтомопатогеном *Beauveria bassiana* и тенуазоновой кислотой. Впервые показано влияние тенуазоновой кислоты на параметры гуморального иммунитета и активности ферментов детоксицирующей системы в гемолимфе гусениц *G. mellonella*.

Теоретическая и практическая значимость. Гриб *A. japonica* охарактеризован как продуцент брассициколина А, гидро- и дигидробрассициколина А и фоменина А. На примере типичного микотоксина мелкоспоровых видов *Alternaria* spp. – тенуазоновой кислоты, показано прямое (снижение жизнеспособности и гибель) и косвенное (замедление развития, снижение плодовитости) действие в отношении различных членистоногих. Показана способность микотоксина фитопатогена *A. tenuissima* вызывать иммуносупрессию у гусениц большой вощиной огневки *Galleria mellonella* (L.). Разработаны методические рекомендации по выделению тенуазоновой кислоты, которые включают условия и сроки культивирования биоматериала, фракционирование экстракта методами колоночной хроматографии с указанием

условий хроматографирования (сорбент, подвижная фаза, время удерживания, условия детектирования).

Методология и методы исследований. Для достижения цели диссертационного исследования были применены общепринятые микологические, молекулярно-генетические методы, различные методики биотестирования и методы физико-химического анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, УФ- и ЯМР- спектроскопия). Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью современных программ (STATISTICA 12.0, SigmaPlot 14.0).

Положения, выносимые на защиту:

1. Виды *Alternaria japonica* и *A. tenuissima* дифференцируются по морфолого-культуральным, молекулярно-генетическим признакам, и по хемотаксономическим маркерам (комплекс вторичных метаболитов).
2. Экстракты из культур *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima* проявляют разный уровень энтомотоксичности в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.), гусениц вощиной огневки *Galleria mellonella* (L.) и клеточной линии насекомых Sf9 (кукурузная листовая совка *Spodoptera frugiperda* (Smith)).
3. Тенуазоновая кислота повышает восприимчивость гусениц *Galleria mellonella* (L.) к грибной инфекции (*Beauveria bassiana*).

Степень достоверности и апробация полученных научных результатов.

Опыты проведены с необходимым числом повторений, проанализированы методами параметрической и непараметрической статистики.

Результаты исследований были представлены на следующих российских и международных конференциях: IV (XII) Международная ботаническая конференция молодых ученых (г. Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.), Международная научная конференция PLAMIC 2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Уфа, 13–17 июня 2018 г.), Международная научно-практическая конференция «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (г. Ялта, 9–13 сентября 2019 г.), Международная научная конференция PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», (г. Саратов, 5–9 октября 2020 г.).

Публикации. Основные материалы диссертационной работы изложены в 8 печатных публикациях, в том числе 4 из них в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 – в других научных изданиях и сборниках, материалах съездов и конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, заключения, списка публикаций по теме диссертации, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 33 рисунками в основном тексте и 5 – в приложении; 4 таблицы в основном тексте и 12 – в приложении. Библиография включает 246 источников, из них 222 на иностранном языке.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом четырёхлетних исследований (2017–2021 гг.), выполненных лично автором. Диссертанту принадлежит подготовка и проведение лабораторных исследований, учетов и наблюдений, а также анализ и интерпретация полученных результатов.

Благодарности. Выражаю благодарность к.б.н. Берестецкому А. О. за руководство научной работой; сотрудникам ВИЗР А. С. Ориной, С. В. Сокорновой, Е. А. Степаньичевой, И. В. Сендерскому, А. А. Далиновой, Г. М. Фроловой, коллективу лаборатории экологической паразитологии «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук» под руководством д.б.н. В. Ю. Крюкова за помощь в проведении экспериментов.

Исследования были выполнены при поддержке РФФИ (гранты №№ 19-34-90181 «Аспиранты» и 20-516-53009 ГФЕН_а).

ГЛАВА 1. ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* И ИХ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ С НАСЕКОМЫМИ (обзор литературы)

Приведены примеры структурного разнообразия, биологической активности вторичных метаболитов *Alternaria* spp. и перспективы поиска среди них соединений с энтомотоксическими свойствами. Представлены типы возможных антагонистических взаимодействий грибов рода *Alternaria* и насекомых. Рассмотрены энтомотоксические свойства типичного микотоксина мелкоспоровых *Alternaria* spp. – тенуазоновой кислоты.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 9 штаммов трех видов *Alternaria* spp.: *A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*. Грибы *A. japonica* и *A. tenuissima* были идентифицированы по морфологическим признакам и предоставлены Ф. Б. Ганнибалом из рабочей коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии. Штаммы *A. sonchi* были идентифицированы ранее по локусу гена *Alt a1* и хранятся в рабочей коллекции чистых культур лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ФГБНУ ВИЗР (Характеристика евразийских ..., 2013).

Для уточнения видовой идентификации и описания морфолого-культуральных свойств штаммы *A. japonica* и *A. tenuissima* культивировали на двух стандартных агаризованных средах: картофельно-морковный агар (КМА) и среда YES. Оценку макро- и микроморфологических признаков проводили на 7 сутки роста колоний грибов по методическому пособию Ф. Б. Ганнибала (Методическое пособие ..., 2011): диаметр и морфология недельных колоний, длина и ширина конидий, габитус споруляции, наличие хламидоспор.

Молекулярная идентификация штаммов *A. japonica* и *A. tenuissima* была проведена по анализу таксономически информативных локусов ДНК: фактора элонгации трансляции *1α* (EF-1α) и области внутреннего транскрибируемого слейсера (ITS) с соответствующими парами праймеров: EF1-728f/EF1-986r и ITS1/ITS4.

Для оценки влияния способа культивирования и состава питательной среды на метаболитные комплексы экстрактов, культуры грибов получали методами жидкофазного и твердофазного культивирования. В качестве жидких питательных сред использовали синтетические — среда Чапека с витаминами (биотин – 5 мкг/л, тиамин – 1 мкг/л) (ЧАВ) и среда М1Д; полусинтетические — дрожжевая мальтозно-глюкозная среда (ДМГ) и среда Сабуро. В качестве субстрата для твердофазного культивирования использовали перловую крупу. В автоклавированные среды

вносили посевной материал и культивировали в течение 3 недель в стационарных условиях при переменном освещении и температуре 24 °С днем и 20 °С ночью. По окончании жидкофазного культивирования культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия фильтрованием и методом жидкость-жидкостной экстракции последовательно выделяли экзогенные экстрактивные вещества. Неполярные вещества экстрагировали хлористым метилом из КЖ, доведенной до значения pH 7. Вещества средней полярности экстрагировали этилацетатом из КЖ, доведенной до значения pH 3 (соотношение экстрагента к КЖ 1:1, об. /об.). Экстрактивные вещества из сухого измельченного мицелия выделяли последовательно гексаном и этилацетатом (при соотношении экстрагента к мицелию 10:1 об. /г). Экстрактивные вещества из высушенного измельченного колонизированного субстрата получали 50 %-ным водным раствором ацетона (соотношение экстрагента к субстрату 3:1, об. /г). После упаривания ацетона метаболитные комплексы гриба из водной вытяжки переэкстрагировали сначала гексаном, а затем этилацетатом (соотношение экстрагента к водной фазе 1:1, об. /об.). Все экстракты обезвоживали, упаривали до суха и хранили при 4 °С.

Анализ комплекса экстрактивных веществ был проведен с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодно-матричным детектором и тройным квадрупольным масс-спектрометром, открытой программы MZmine 2.4 и литературных данных.

Для подробного изучения энтомотоксического действия тенуазоновой кислоты (ТК) культуру *A. tenuissima* 253-011 получали методом жидкофазного культивирования в биореакторе фирмы Applikon Biotechnology (Голландия) с рабочим объемом 7.0 л на жидкой среде ДМГ объемом 4.75 л в течение 7 дней. Параметры культивирования: скорость подачи воздуха 0.5 л/мин, температура 24°С, скорость перемешивания 200 об/мин в течение 2 суток, затем 400 об/мин до завершения процесса культивирования; уровень pH не поддерживался. Пенегаситель (растительное масло, 0.1 % об.) вводили в среду до посева гриба. Экстракт с содержанием ТК получали из КЖ этилацетатом (как описано выше). Фракционирование экстракта проводили следующими этапами: гель-фильтрация на сорбенте Bio-beads SX-8 (Bio-Rad, США) в изократическом режиме в системе хлористый метилен: этилацетат: муравьиная кислота (49.9:49.9:0.2, об. /об.), обращенно-фазовая хроматография на колонке Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, Германия) в ступенчатом градиенте метанол, 0.1 % муравьиная кислота (10:25:50:75:100, об. /об.), метод препаративной ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Waters (США) на колонке XBridge Prep (C18, Waters, США) в изократическом режиме в системе ацетонитрил: 0.1 % муравьиная кислота (30:70, об. /об.), детектирование при λ_{\max} 272 нм, время удерживания ТК t_R 11.2 мин.

Для идентификации ТК ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР-спектры, двумерные ЯМР-спектры ближнего (^1H - ^{13}C НМQC) и дальнего (^1H - ^{13}C НМBC) взаимодействий регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 400 Ultrashield Plus (Германия) на частотах 400.1 и 100.6 МГц, соответственно.

Образец альтернариола был ранее выделен из культуры гриба *A. simmonsii* S-142 и предоставлен сотрудником лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР Фроловой Г. М. Образцы диверсолонного эфира и хлормонилиниковой кислоты В были ранее выделены из твердофазной культуры *A. sonchi* S-102 и предоставлены для исследований сотрудником лаборатории фитотоксикологии и

биотехнологии ВИЗР Далиновой А. А. Идентификация и чистота предоставленных образцов подтверждена методами ВЭЖХ-МС и ЯМР.

Для сравнения энтомотоксичности ТК с различными грибными токсинами в ряде экспериментов в качестве положительного контроля использовали боверицин (Sigma-Aldrich).

Контактно-кишечное действие исследуемых экстрактов и ТК оценивали на обыкновенной злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae) методом подсадки на обработанный субстрат (Insecticidal effects of ..., 2012). Эффективность экстрактов и индивидуального соединения с учетом контроля вычисляли по формуле Эббота (Abbott, 1925).

Пероральное действие оценивали путем внесения ТК в корм тест-насекомых: личинки *G. mellonella* и *Z. morio*, имаго домового сверчка *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae) (Davis, Schiefer, 1982). Весовой контроль и смертность насекомых регистрировали ежедневно в течение 10 дней.

Остро-контактное действие исследуемых экстрактов и ТК определяли путем инъекции раствора в гемоцель гусениц большой восковой моли *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) и личинок жука-чернотелки *Zophobas morio* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae), используя микрошприц (Hamilton, Швейцария, объем 10 мкл) (Tsai et al., 2016; *Galleria mellonella* larvae ..., 2018). Смертность насекомых регистрировали ежедневно в течение 10 дней.

Акарицидное и овицидное действие исследуемой ТК оценивали на обыкновенном паутином клеще *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) методом подсадки на обработанный субстрат (листовые диски фасоли) (Rincón et al., 2019). Через 1, 3, 7 сутки учитывали смертность самок. На 7-е сутки подсчитывали количество родившихся личинок относительно контрольного варианта.

Фитотоксическое действие исследуемых экстрактов оценивали методом листовых дисков осота полевого *Sonchus arvensis*, редиса *Raphanus sativus* и отрезков пшеницы *Triticum aestivum* (Выделение, идентификация ..., 2010). Учет симптомов (диаметр и длина некроза) проводили через 48 ч инкубации при температуре 24 °С и переменном искусственном освещении (12 ч день).

Антимикробное действие исследуемых экстрактов в отношении грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* и дрожжеподобного гриба *Candida albicans* оценивали диско-диффузионным методом (Методические указания ..., 2004). Радиус зоны лизиса измеряли через 24 часа инкубации при 35 °С.

Цитотоксическое действие исследуемых экстрактов и ТК оценивали на клеточной линии насекомых Sf9 (кукурузная листовая совка *Spodoptera frugiperda* (Smith)). Гибель клеток определяли путем окрашивания 0.25 %-ным раствором трипанового синего (Cytotoxicity against ..., 2003). Долю погибших (окрашенных) клеток определяли в отношении общего количества клеток в трёх полях зрения.

Токсическое действие исследуемых экстрактов и ТК оценивали в отношении инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* согласно ГОСТ (Р 52337-2005). Учёт результатов проводили через 3, 30 и 180 минут инкубации. Критерием для определения токсичности служило время от начала воздействия вещества до полной гибели простейших, которую констатировали на основании прекращения их движения.

Оценку совместного действия ТК и грибной инфекции на гусениц *G. mellonella* проводили пероральным (как описано выше) и перкутанным методами (Крюков и др., 2008). Гусениц погружали в течение 30 секунд в водно-твинную конидиальную суспензию спор гриба *Beauveria bassiana* Sar-31 из коллекции ИСиЭЖ СО РАН. Инкубация была 48 ч в темноте при 26 °С и относительной влажности 90–99 %. Учет весового контроля и смертности гусениц регистрировали ежедневно в течение 10 дней. Синергетический эффект на смертность *G. mellonella* был проанализирован на основе сравнения ожидаемого и наблюдаемого уровня смертности с использованием критерия χ^2 (Robertson, Preisler, 1992)

Приготовление образцов суспензии гемоцитов из гемолимфы гусениц *G. mellonella* для оценки уровня их общего количества проводили по стандартной методике (Leonard et al., 1985). Подсчет концентрации гемоцитов проводили с помощью гемоцитометра Нойбауэра. Процентное содержание мертвых и распластанных гемоцитов определяли микроскопированием после окрашивания раствором 0.25 %-ного трипанового синего. Уровень фенолоксидазной активности (ФО) в гемолимфе гусениц определяли спектрофотометрически по образованию меланина при длине волны 490 нм через 24 и 48 ч после обработки (Ashida, Söderhäll, 1984). Активность неспецифических эстераз (ЭСТ) в гемолимфе гусениц оценивали спектрофотометрически по образованию нитрофенила на длине волны 410 нм, по модифицированному методу (Prabhakaran, Kamble, 1995). Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) в гемолимфе гусениц определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, при длине волны 340 нм, по методу В. Хабига (Habig et al, 1974). Активность ферментов выражали в единицах измерения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах насекомых определяли по методу М. Бредфорд (1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Анализ культивируемой микрофлоры среднего кишечника гусениц *G. mellonella* проводили путем высева аликвоты (100 мкл) на селективные питательные среды: - желчный эскулин-азидный агар для энтерококков (HiMedia, India); - эндо-агар для энтеробактерий (HiMedia, India) в 90-мм чашки Петри. Культуры инкубировали в течение 48 ч при температуре 35 °С и подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ). Количество КОЕ рассчитывали для каждой средней части кишечника.

Статистическую обработку полученного материала проводили с использованием параметрических и непараметрических методов анализа современных программ STATISTICA 12.0 и SigmaPlot 14.0. Значения на графиках представлены как среднее арифметическое и его ошибка (SE).

ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЕТАБОЛИТОВ *ALTERNARIA JAPONICA*, *A. TENUISSIMA* И *A. SONCHI*

3.1 Идентификация и физиолого-биохимические свойства штаммов грибов

Уточнение филогенетического положения грибов и соотношение его с метаболитным профилем необходимо для успешного целенаправленного поиска в дальнейшем продуцентов биологически активных веществ (БАВ). Из пяти штаммов, идентифицированных по морфологическим признакам как *A. japonica*,

штамм 253-011 заметно отличался по скорости роста колоний и комплексу вторичных метаболитов. В связи с этим было необходимо уточнить видовую принадлежность предоставленных культур.

Диаметр (60–78 мм) и морфология недельных колоний изученных штаммов *Alternaria* spp. на среде КМА, а также длина корпуса конидий (32–50 мкм) перекрывались с показателями *A. japonica* и видами мелкоспоровых альтернариоидных грибов, в частности, *A. tenuissima*. Ширина корпуса конидий культур 181-011, 239-011, 244-011 и 259-011 варьировала в диапазоне 17–20 мкм, что в 2 раза больше ширины корпуса конидий штамма 253-011. В воздушном и субстратном мицелии четырех штаммов были обнаружены хламидоспоры, в культуре штамма 253-011 хламидоспоры не выявлены (Идентификация и токсикологическая..., 2021). Идентификация, выполненная по морфолого-культуральным признакам, соответствовала кластеризации, наблюдаемой на филогенетическом древе. Сиквенсы участка EF1 α четырех штаммов были высокоомологичны (>99.7 %) референсным последовательностям *A. japonica*, включая типовой штамм CBS 118390 (Woudenberg et al., 2013) (рисунок 1А). Вторая клада включала референсные штаммы *A. alternata* (CBS 104.26, CBS 686.68), *A. arborescens* (CBS 105.49), *A. tenuissima* (CBS 918.96) и штамм 253-011, идентифицированный по размерам конидий и габитусу споруляции (длинные, неразветвленные цепочки конидий) как *A. tenuissima* (Дифференциация грибов *Alternaria* ..., 2019).

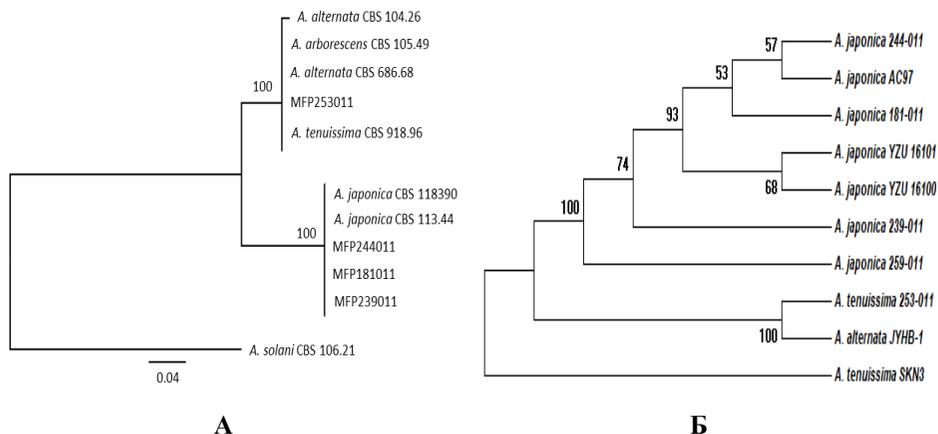


Рисунок 1 – Филогенетические деревья, построенные с применением метода максимального правдоподобия по локусам фактора элонгации трансляции (А) и внутренним транскрибируемым спейсерам (Б). Консенсусное древо построено на основе 500 реплик бутстрепа.

3.2 Влияние состава питательной среды и способа культивирования на образование метаболитов исследуемых штаммов

Для поиска биологически активных соединений были применены различные подходы культивирования потенциальных продуцентов.

Результаты дисперсионного анализа по фактору «штамм микромицета/среда» показали существенные различия в накоплении биомассы у штаммов *A. japonica* (df 3, F=70.66, P<0.01), *A. sonchi* (df 3, F=44.94, P=0.000) и *A. tenuissima* (df 2, F=6.1,

$P < 0.01$) (Идентификация и токсикологическая ..., 2021). Максимальный выход экстрактивных веществ (ВЭВ) неполярной (80–100 мг/л) и полярной (200–600 мг/л) природы отмечен у штаммов *A. japonica* 181-011 и 244-011 при жидкофазном культивировании на полусинтетических средах ДМГ и Сабуро (Идентификация и токсикологическая ..., 2021). Таким невысоким выходом экстрактивных веществ при культивировании на жидких средах характеризуется и *A. brassicicola* (Pedras, Yu, 2009; Pedras, Park, 2015; Fusicoccane-derived diterpenoids ..., 2018). При твердофазном культивировании *A. japonica* 244-011 выход неполярных метаболитов был на уровне 681 ± 85 мг/кг, полярных – 670 ± 71 мг/кг.

Для штаммов *A. sonchi* наблюдалась схожая зависимость ВЭВ от исходных компонентов жидких сред, как и для *A. japonica* (Салимова и др., 2018). Штаммы *A. sonchi* Гер.8.2 и S-102 отличались высоким уровнем накопления неполярных (до 60 мг/л) и полярных (до 325 мг/л) экзогенных метаболитов при культивировании на среде Сабуро (Salimova, Verestetskiy, 2020). ВЭВ из культур *A. sonchi*, полученных на жидких средах ЧАВ и ДМГ, согласуются с данными литературы (Далинова, 2017). При твердофазном культивировании штаммов *A. sonchi* максимальный уровень ВЭВ неполярной (677 ± 92 мг/кг) и полярной (1146 ± 96 мг/кг) природы зафиксирован у штамма *A. sonchi* И 5.4.

Состав жидких питательных сред не оказал влияния на уровень накопления экзогенных метаболитов *A. tenuissima* 253-011. Выход неполярных метаболитов варьировал в пределах 35–50 мг/л, полярных в пределах 500–640 мг/л (Entomotoxic activity ..., 2021). Достоверное различие ($p < 0.01$) выхода неполярных (в среднем, 408 ± 40 мг/кг) и полярных (1740 ± 49 мг/кг) метаболитов из *A. tenuissima* было отмечено при культивировании на твердом субстрате. Максимальный выход эндогенных метаболитов (129 ± 37 мг/л) был получен этилацетатом из мицелия *A. tenuissima* 253-011, полученного на среде М1Д.

3. 3 Спектр биологической активности экстрактов

Для поиска БАВ были протестированы 162 экстракта из четырех штаммов *A. japonica*, четырех штаммов *A. sonchi* и одного штамма *A. tenuissima* в отношении двух видов насекомых (*Schizaphis graminum* (Rond.) и *Galleria mellonella* (L.)) с учетом побочного действия экстрактов на нецелевые тест-объекты (листья растений – *Sonchus arvensis*, *Raphanus sativus*, *Triticum aestivum*; микроорганизмы – *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*; клеточная линия Sf9 и простейшие *Paramecium caudatum*).

3. 3. 1 Энтотоксическая активность

***A. japonica*.** Существенное токсическое действие в отношении *S. graminum* (Rond.) (смертность 85 % относительно контроля) отмечено у 0.5 %-ых неполярных экстрактов из фильтрата штамма *A. japonica* 239-011, полученного на среде ЧАВ. Неполярный экстракт из твердофазной культуры *A. japonica* 244-011 обладал схожей высокой токсичностью. Таким же высоким уровнем (смертность 83 %) афидоцидного действия обладал неполярный экстракт из *A. japonica* 259-011, полученный на среде ДМГ.

***A. sonchi*.** Действие неполярных экстрактов из фильтрата жидкофазных культур *A. sonchi* И 5.4 и *A. tenuissima* 253-011, полученных на среде М1Д, было неселективным к тест-насекомым. Эти экстракты были токсичны в отношении *S. graminum* (при 0.5 %-ной концентрации) и *G. mellonella* (L.) (при 0.1 %-ной концентрации), смертность насекомых достигала 90 %, относительно контроля.

Высокий уровень токсичности в отношении *S. graminum* (смертность тли на уровне 88 %) (Salimova, Berestetskiy, 2020) и *G. mellonella* (100 % смертность гусениц) был отмечен у полярного экстракта из фильтрата культуры *A. sonchi* Гер.8.2, полученной жидкофазным культивированием на среде ДМГ.

***A. tenuissima*.** Гусеницы большой вошинной огневки были наиболее чувствительны (100 %-ная смертность гусениц) к действию 0.1 %-ных полярных экстрактов из культур *A. tenuissima* 253-011, полученных на перловой крупе и жидких средах М1Д, ДМГ и Сабуро (Entomotoxic activity of ..., 2021).

3. 3. 2 Фитотоксическая активность

***A. japonica*.** Уровень фитотоксической активности экстракта из *A. japonica* 239-011 не превышал 50 %, диаметр некротических пятен на листовых дисках редиса составил 4.8 ± 1.0 мм, при 0.5 %-ной концентрации (Идентификация и токсикологическая ..., 2021).

***A. sonchi*.** Среди экстрактов *A. sonchi* максимальную фитотоксичность (диаметр некроза 4.3–5 мм) проявили полярные экстракты из фильтрата культур штаммов *A. sonchi* И 5.4, S-145 и S-102, выращенных на синтетической среде М1Д. Диаметр некроза на листовых дисках осота 4.8 мм был зафиксирован под действием 0.5 %-ого полярного экстракта из твердофазной культуры *A. sonchi* S-102 (Salimova, Berestetskiy, 2020).

***A. tenuissima*.** Токсическое действие на листовые отрезки пшеницы (длина некротических пятен 9.8 ± 3.2 мм) были зафиксированы у экстрактов из штамма *A. tenuissima* 253-011 (Entomotoxic activity ..., 2021).

3. 3. 3 Антибиотическая активность

***A. japonica*.** Антимикробную активность проявляли 0.01 %-ные этилацетатные экстракты из фильтрата культуры *A. japonica*, полученных на всех жидких питательных средах, кроме среды ЧАВ. Зона ингибирования роста *B. subtilis* варьировала от 3 мм до 5 мм. Антибиотическую активность (радиус зоны лизиса 5 мм) в отношении дрожжевого гриба *C. albicans* проявили только неполярные экстракты из фильтрата культуры *A. japonica* 244-011, полученной на средах ДМГ и М1Д.

***A. sonchi*.** Экстракт из штамма *A. sonchi* И 5.4 при 0.01 %-ной концентрации обладал антимикробной (радиус зоны ингибирования роста *B. subtilis* 8.3 ± 1.5 мм) и антифунгальной (радиус зоны ингибирования роста *C. albicans* 6.5 ± 1.5 мм) активностями (Salimova, Berestetskiy, 2020).

***A. tenuissima*.** Антибиотическая активность 0.01 %-ных экстрактов из штамма *A. tenuissima* 253-011 была зафиксирована при ингибировании роста *B. subtilis* (радиус зоны лизиса 7.0 ± 0.5) (Entomotoxic activity ..., 2021) и дрожжевого гриба *C. albicans* (радиус зоны лизиса 12.0 ± 0.5).

3. 3. 4 Цитотоксическая активность

***A. japonica*.** Цитотоксичность неполярных 0.01 %-ных экстрактов из фильтрата культур *A. japonica* в отношении клеточной культуры Sf9 варьировала от 15 % до 35 %, за исключением неполярных экстрактов из культур *A. japonica* 244-011 и 259-011, полученных на среде Сабуро (доля погибших клеток Sf9 была на уровне 56 % и 47 %, соответственно) и *A. japonica* 239-011, полученного на М1Д. Последний был высоко токсичен, доля погибших клеток Sf9 была на уровне 96 %, относительно контроля. Экстракт из твердофазной культуры *A. japonica* 244-011 был высоко токсичен для клеток линии Sf9 и при 0.01 %-ной концентрации вызывал 100 %-ную

гибель клеток. Токсичное действие этих экстрактов в отношении *P. caudatum* не выявлено.

***A. sonchi*.** Полярный экстракт из фильтрата культуры *A. sonchi* Гер.8.2 в 0.01 %-ной концентрации, был слаботоксичным для клеточной линии Sf9 (гибель клеток на уровне 15.4 ± 2.4 %) и *P. caudatum* (гибель инфузорий через 180 мин инкубации). Следует отметить, что 0.01 %-ный экстракт из штамма *A. sonchi* И 5.4 обладал цитотоксической активностью (смертность клеток Sf9 была на уровне 59.1 ± 5.4 %, 100 %-ная гибель инфузорий *P. caudatum* через 180 мин инкубации).

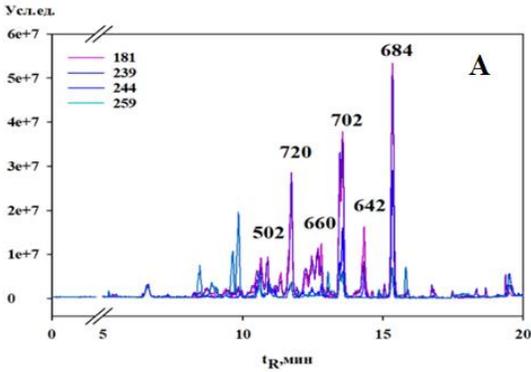
***A. tenuissima*.** Токсические действия в отношении клеточной линии Sf9 (100 %-ная гибель клеток) наблюдались у 0.01 %-ных экстрактов из штамма *A. tenuissima* 253-011. Экстракты при 0.01 %-ной концентрации были слабо токсичными для *P. caudatum* (гибель инфузорий через 180 мин инкубации).

3. 4 Анализ метаболитных профилей экстрактов

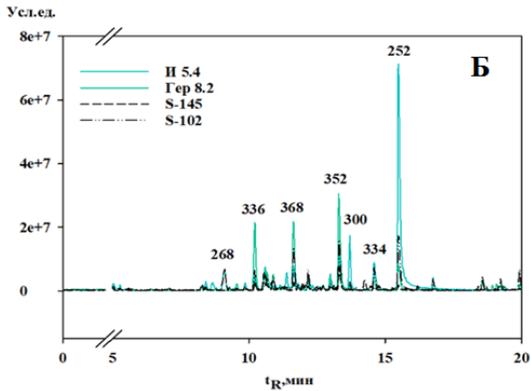
Анализ качественного состава биологически активных экстрактов и сопоставление физико-химических характеристик мажорных компонентов с данными литературы позволили идентифицировать метаболиты *A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*. Установлено, что *A. japonica* не образует характерные микотоксины мелкоспоровых *Alternaria* spp., в частности: альтернариол, его монометилловый эфир, тенуазоновую кислоту, тентоксин и альтенуен, что противоречит данным литературы (Identification and characterization ..., 2017). При этом в экстрактах были идентифицированы мажорные метаболиты, характерные для *A. brassicicola* и *A. infectoria*: брассициколин А, дигидробрассициколин А и фоменин А (рисунок 2А) (Идентификация и токсикологическая..., 2021; Pedras, Yu, 2009). Микотоксины *Alternaria* (альтернариол, тентоксин и тенуазоновая кислота) были идентифицированы в экстрактах из культуры *A. tenuissima* 253-011 (рисунок 2В). Также, следует отметить присутствие мажорных экзометаболитов, предположительно относящихся к группе меротерпеноидов (АСТГ-токсины и трициклоальтенарены) (Ostry, 2008; Amino acid-oriented ..., 2019). В экстрактах из культур *A. sonchi* были идентифицированы следующие соединения – пинзелин, 4-хлорпинзелин, монилифенон, альтернариол и хлоромонилилиновые кислоты В и С (рисунок 2Б). Известно, что эти метаболиты содержат общий структурный фрагмент – альтехромон А, который впервые был выделен из эндофитного штамма *A. brassicicola* (Structural Revision ..., 2010). При этом, в экстрактах *A. japonica* и *A. sonchi* остались не идентифицированные минорные соединения, которые, обладая биологической активностью, также могут играть определенную роль в развитии их продуцента.

3. 5 Оценка взаимосвязи типов активности и состава экстрактов

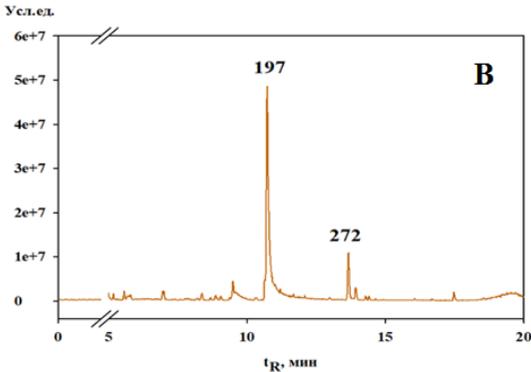
Расчитанный по методу главных компонент (МКГ) массив полученных данных биотестов экстрактов и содержащихся в них метаболитов был распределен на плоскости координат 1-й (32.28 %) и 2-й (12. 1 %) главных компонент (ГК₁ и ГК₂ соответственно). Можно предположить, что чувствительность гусениц *G. mellonella* (L.) и листовых отрезков тест-растений к экстрактам *A. japonica* связана с содержанием в них брассициколина А и продуктов его распада (дигидробрассициколин А). Известно, что брассициколин А обладает фитотоксическими свойствами в отношении горчицы *Brassica juncea* (Pedras et al.,



(А) метаболиты
A. japonica:
Браassicоколин А
(Mw 684 Да)
Гидробраassicоколин А
(Mw 702 Да)
Дигидробраassicоколин А
(Mw 720 Да)



(Б) метаболиты *A. sonchi*:
Хлормонилиниковая кислота С
(Mw 368 Да)
Хлормонилиниковая кислота В
(Mw 352 Да)
Пинзелин (Mw 300 Да)
4-хлорпинзелин (Mw 334 Да)



(В) метаболиты *A. tenuissima*:
Тенуазоновая кислота
(Mw 197 Да)
Метилвый эфир альтернариола
(Mw 272 Да)

Рисунок 2 – Типичные ВЭЖХ-МС хроматограммы экстрактов из культур *Alternaria* spp. А – хлористометиленовый экстракт из фильтрата культур *A. japonica*, полученных на среде М1Д; Б – этилацетатные экстракты из твердофазных культур *A. sonchi*; В – этилацетатный экстракт из фильтрата *A. tenuissima*, полученной на среде ДМГ.

2009). Чувствительность *S. graminum* (Rond.) и клеточной линии Sf9 к экстрактам из культуры *A. japonica* может быть связана с присутствием в них фоменина А. Согласно литературным данным, фоменины А и Б токсичны для рачков вида *Artemia salina* (Phomenins A and B ..., 1993; Pedras, Park, 2015) и слабо токсичны в отношении линии клеток человека MRC-5 (Ivanova et al., 2010).

Расположение результатов экспериментов по биологической активности экстрактов *A. sonchi* и их метаболитного профиля на плоскости координата ГК₁ (18.10 %) и ГК₂ (14.48 %) выявило возможную связь их токсичности в отношении особей *S. graminum* и тест-растений с наличием в составе хлормонилининовой кислоты В. Данное предположение согласуется с исследованиями (Isolation and bioactivity ..., 2020), в которых зарегистрировано действие метаболитов *A. sonchi* на злаковую тлю *S. graminum*. Чувствительность гусениц *G. mellonella* не связана ни с одним из идентифицированных метаболитов, но может быть связана с присутствием соединения с молекулярной массой 234 Да.

МГК позволил отобразить результаты экспериментов по биологической активности и метаболитного профиля экстрактов из *A. tenuissima* в плоскости координат ГК₁ (35.68 %) и ГК₂ (23.98 %). Чувствительность *S. graminum* и клеток линии Sf9 к некоторым экстрактам *A. tenuissima* может быть связана с содержанием в них тентоксина и дигидротентоксина, а также метаболитов из группы меротерпеноидов (молекулярна масса соединений 338, 348 и 362 Да). Высокая чувствительность *G. mellonella* к экстрактам *A. tenuissima* была связана содержанием в них тенуазоновой кислоты. Было показано, что тенуазоновая кислота токсична для личинок первого возраста зеленой мясной мухи *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) (Entomotoxic activity ..., 2021; La Croix et al., 1975). Данных по действию микотоксинов мелкоспоровых видов *Alternaria* на насекомых недостаточно. Тенуазоновая кислота в этом случае представляет особый интерес в виду высокой связи (коэффициент корреляции 0.86) ее содержания в экстрактах из штамма *A. tenuissima* 253-011 и гибели *G. mellonella*.

ГЛАВА 4. ЭНТОМОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ

4.1 Выделение и идентификация тенуазоновой кислоты из фильтрата культуры *A. tenuissima* 253-011

Очистка тенуазоновой кислоты (ТК) из полярного экстракта из культуральной жидкости *A. tenuissima* 253-011 была проведена хроматографическими методами. Уровень выхода ТК (Mw 197 Да; t_R11.2 мин; УФ λ_{max} 272 нм) составил свыше 150 мг/л среды. Структура выделенного токсина была установлена с использованием данных, полученных методами масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

4.2. Энтомотоксические, акарицидные и цитотоксические свойства тенуазоновой кислоты

4.2.1 Пероральный эффект

При оценке кишечного действия ТК, дисперсионный анализ полученных данных показал существенное снижение прироста биомассы личинок *Galleria mellonella* (L.) в диапазоне концентраций токсина 0.025–25 мг/г корма (df 4, F=70.1, P < 0.001). Существенная разница массы личинок относительно контроля по фактору

«концентрация токсина» была отмечена при ТК 2.5 мг/г корма, начиная с 4 суток после обработки. Следует отметить, что визуально гусеницы большой вошиной огневки отказывались от корма, содержащего ТК. Вероятно, поэтому их смертность не превышала уровня 20 % на 10-е сутки наблюдений и только при концентрации ТК на уровне 25 мг/г корма (Entomotoxic activity ..., 2021). При сравнении кишечного действия ТК с действием токсинов *Alternaria* spp.: диверсолоновым эфиром, хлормонилининовой кислотой В из культуры *A. sonchi* S-102 (Isolation and bioactivity ..., 2020), альтернариолом из *A. simmonsii* S-142 и фракцией из фильтрата *A. japonica* с высоким содержанием (79 %) брассициколина А было установлено, что за исключением ТК, ни один из исследуемых грибных токсинов в концентрации 2 мг/г корма не снижал прирост биомассы, не вызывал гибель и не обладал антифидантным эффектом на *G. mellonella* (рисунок 3).

Имаго *Acheta domesticus* (L.) были чувствительны к добавлению ТК в корм, уровень смертности сверчка был достоверно (при $P=0.05$) выше контроля при всех использованных концентрациях токсина (рисунок 4). Медианная выживаемость *A. domesticus* составила 3 ± 0.2 , 5 ± 1.5 и 7 ± 0.9 суток при концентрации ТК 2.5, 1 и 0.25 мг/г корма соответственно (Entomotoxic activity ..., 2021). При этом наблюдалось полное потребление обработанного корма и отсутствие снижения динамики роста и биомассы домашнего сверчка.

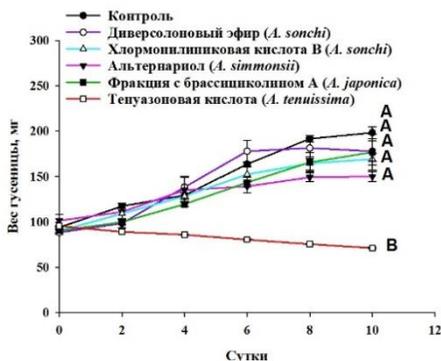


Рисунок 3 – Динамика набора массы личинок *Galleria mellonella* под воздействием токсинов *Alternaria* spp. в концентрации 2 мг/г корма.

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. Одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий на уровне $P = 0.05$ по тесту Тьюки HSD. * - достоверное отличие от контроля при $P = 0.05$ по критерию Данна.

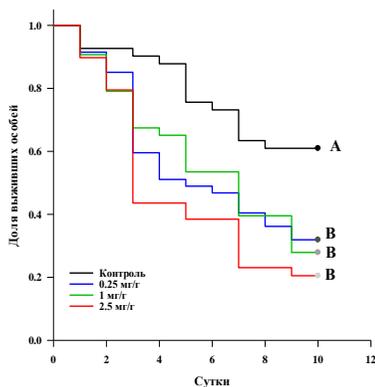


Рисунок 4 – Выживаемость имаго *Acheta domesticus* при добавлении различных концентраций тенуазоновой кислоты в корм.

Одинаковыми буквами обозначены несущественные различия при $P = 0.05$ (логарифмический критерий Холма-Сидака)

В результате оценки кишечного действия ТК в концентрациях 2.5, 1 и 0.25 мг/г искусственного корма в отношении личинок *Zophobas morio* (F.) антифидантный эффект отсутствовал, влияние на динамику набора масс и

смертность личинок не наблюдалось и соответствовало данным контрольного варианта.

4.2.2 Остро-контактная активность

При инъекции ТК в исследуемых концентрациях личинки *Galleria mellonella* (L.) были чувствительны к действию токсина. Уровень смертности гусениц был достоверно (при $P=0.05$) выше контроля, и их медианная выживаемость составила 5 ± 0.7 суток при концентрации ТК 50 мкг/личинку (рисунок 5А).

Личинки *Zophobas morio* (F.) были также чувствительными к инъекции различных концентраций ТК. Существенно (при $P=0.05$) отличающуюся от контроля выживаемость зофобаса отметили при концентрации ТК 20 и 50 мкг/личинку, медианна выживаемости при которых составила 4 ± 4.5 , 2 ± 0.7 суток, соответственно (рисунок 5Б).

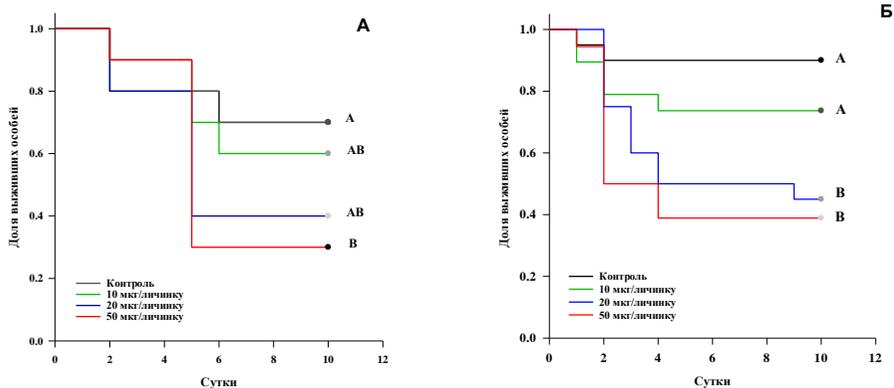


Рисунок 5 – Кривые выживаемости личинок *Galleria mellonella* (А) и *Zophobas morio* (Б) после инъекции тенеброновой кислоты в различных концентрациях.

Одинаковыми буквами обозначены несущественные различия при $P=0.05$ (логарифмический критерий Холма-Сидака)

Полученные нами данные демонстрировали умеренный уровень ларвицидной активности ТК, сравнимый с энтомотоксичностью боверицина и кордицепина (Safavi, 2013; Cordycepin, a metabolite ..., 2020).

4.2.3 Контактно-кишечная активность

При оценке контактно-кишечного действия ТК было установлено существенное ($p < 0.001$, $df 3$) влияние на смертность обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) ($F=28.4$) и самок паутинового клеща *Tetranychus urticae* Koch ($F=31.4$) через 24 ч после обработки в зависимости от концентрации токсина (Entomotoxic activity ..., 2021). Существенную (при $P=0.05$) афидоцидную активность ТК отметили при концентрации токсина 1 мг/мл (смертность *S. graminum* 27 %), акарицидную – при его концентрации 0.5 мг/мл (смертность *T. urticae* 12 %). При этом боверицин в концентрации 0.5 мг/мл вызывал 100 %-ную смертность тестируемых членистоногих. Важно отметить, что ТК вызывала существенное ($p < 0.001$) снижение плодовитости 0.3 ± 0.1 яиц/самку *T. urticae* относительно контроля (3.9 ± 0.5 яиц/самку) не зависимо от концентрации токсина.

4.2.4 Цитотоксическая активность

Результаты экспериментов по цитотоксической активности в отношении клеточной линии кукурузной листовой совки Sf9 *Spodoptera frugiperda* (Smith) показали, что ТК была примерно в 5 раз менее токсична с ИК₅₀ ~25 мкг/мл, чем боверицин с ИК₅₀ 4 мкг/мл. При этом, инфузории *Paramecium caudatum* были не чувствительны к действию ТК в пределах концентраций 1–100 мкг/мл (Entomotoxic activity of ..., 2021). Полученные нами данные по цитотоксичности ТК в отношении клеточной линии Sf9 согласуются с данными других авторов (In vitro screening ..., 2021). Действие микотоксинов грибов *Alternaria* на инфузории малоизучено. Известно, что *P. caudatum* чувствительна к экстрактам из *A. alternata* (Domsch et al., 2007; Pankova et al., 2018).

Таким образом, различные методы испытания ТК (контактная обработка, скармливание с пищей, метод инъекций) показали влияние токсина на некоторые показатели (смертность, набор веса, плодовитость) различных видов членистоногих, а также количественную оценку его токсичности. Известно, что одним из последствий такого воздействия является повышение восприимчивости насекомых к энтомопатогенам на уровне аддитивного или синергетического эффектов (James, Xu, 2012; Крюков, и др., 2020).

ГЛАВА 5. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НАСЕКОМЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ

5.1 Реакция клеточного и гуморального иммунитета гусениц *Galleria mellonella* (L.) при действии tenuазоновой кислоты

Для установления уровня взаимодействия (аддитивного или синергетического) при комбинированном действии токсина *A. tenuissima* – tenuазоновой кислоты (ТК) и живой культуры энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Sar-31) проводили сравнительное исследование скорости гибели гусениц *Galleria mellonella* (L.) и общефизиологических нарушений (нарушение питания и отставание в развитии).

При комбинированном действии на *G. mellonella* ТК и конидиальной суспензией *B. bassiana* наблюдался синергетический эффект на смертность насекомых (100 % гибель гусениц) на 6 сутки эксперимента, тогда как в остальных вариантах монообработки смертность не превышала 60 %. При этом были зарегистрированы изменения реакций иммунной системы в гемолимфе личинок вошинной огневки: повышение уровня активности фенолоксидазы (ФО), ферментов детоксицирующей системы (ЭСТ и ГСТ) и смещение равновесия бактерий в микробиоте среднего кишечника гусениц под действием ТК. При микозе было установлено достоверное снижение (двухфакторный тест Шейрера: $H_{1,119}=3.83$, $P=0.05$) активности ФО на 2 сутки после заражения, тогда как, при добавлении ТК наблюдалось существенное ($H_{1,119}=11.8$, $P=0.0006$) увеличение активности ФО в гемолимфе *G. mellonella* как в случае монотоксикоза, так и комбинированной обработки с энтомопатогеном (рисунок 6).

В начальный период комбинированной обработки гусениц была зарегистрирована активация неспецифических эстераз (ЭСТ) и глутатион-S-трансфераз (ГСТ) в гемолимфе *G. mellonella*. Грибная инфекция приводила к активации ЭСТ, но на более низком уровне, относительно действия токсина ($H_{1,119}=2.3$, $P=0.13$). Тогда как при скармливании ТК гусеницам *G. mellonella* происходило достоверное увеличение уровня фермента ($H_{1,119}=5.38$, $P=0.02$)

(рисунок 7А). Наибольший существенный подъем активности эстераз был зарегистрирован при комбинированном воздействии (Тест Данна, $P=0.007$), по сравнению с монообработками и контролем. Подобные изменения наблюдались в уровне активности ГСТ (рисунок 7Б). На 2-е сутки эксперимента уровень активности ЭСТ и ГСТ во всех вариантах снижался до контрольных значений.

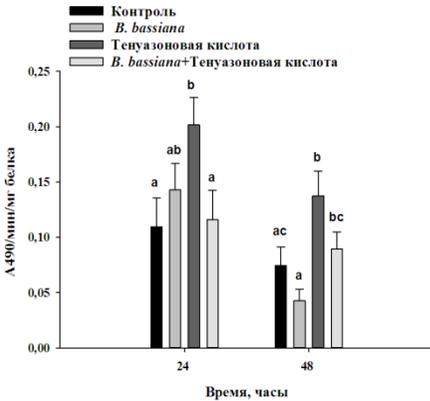


Рисунок 6 – Активность фенолоксидазы в гемолимфе гусениц *Galleria mellonella* после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1мг/мл) и их совместном действии. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической. Одинаковые буквы указывают на несущественные различия (тест Данна: $P > 0.18$).

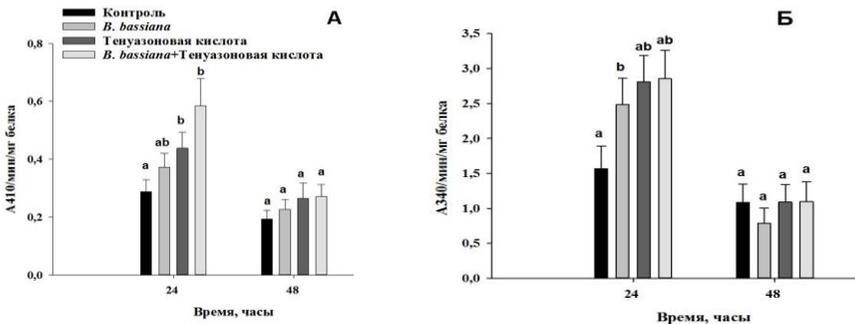


Рисунок 7 – Активность неспецифических эстераз (А) и глутатион-S-трансфераз (Б) в гемолимфе гусениц *Galleria mellonella* после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1мг/мл) и их совместном действии.

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической. Одинаковые буквы указывают на несущественные различия (тест Данна: $P > 0.18$).

Посев содержимого среднего кишечника *G. mellonella* на селективные питательные среды показал подъем колониеобразующих единиц (КОЕ) основных доминантных бактерий (*Enterococcus* и *Enterobacter*) через 48 ч после обработки. В частности, ТК вызывала существенное повышение (эффект тенуазоновой кислоты: $H_{1,23}=7.2$, $P=0.007$ для *Enterococcus* и $F_{1,14} = 5.4$, $p=0.036$ для *Enterobacter*) группы *Enterococcus* как после монообработки, так и после комбинированной обработки с энтомопатогеном.

Эффект снижения общего числа гемоцитов (ОЧГ) от обработки ТК был слабым, концентрация гемоцитов в гемолимфе *G. mellonella* составляла 3.2×10^7 ($\pm 0.2 \times 10^7$) на мл, относительно контроля 3.5×10^7 ($\pm 0.2 \times 10^7$) на мл и грибной

инфекции 2.0×10^7 ($\pm 0.3 \times 10^7$) на мл. Совместная обработка ТК и *B. bassiana* не привела к значительному снижению ОЧГ ни на 1-е 3.1×10^7 ($\pm 0.2 \times 10^7$) на мл, ни на 2-е 3.2×10^7 ($\pm 0.3 \times 10^7$) на мл сутки эксперимента ($F_{3, 35}=1.9$, $p=0.13$).

Стабильное повышение уровня активности ФО вероятно указывает на интоксикацию насекомых, как в случаях воздействия инсектицидов (Крюков и др., 2020; Zibae, Bandani, 2012) и повреждение тканей насекомых (Activation of insect ..., 2009; Factors functioning ..., 2014; Encapsulation ..., 2016). Предположение подтверждается данными по активизации ферментов детоксицирующей системы (ЭСТ и ГСТ) для инактивации токсичных продуктов, образующихся при токсикозах, вызванных инсектицидами (Resistance ..., 1997; Influence ..., 2006; The pyrethroid resistance ..., 2013) и вторичными метаболитами грибов (Loutelier et al., 1994). А также сдвигом в структуре сообществ бактерий в кишечнике *G. mellonella*, как при других токсикозах, например, развитии инфекции *Bacillus thuringiensis* (Encapsulation and nodulation ..., 2016), при заражении паразитоидами *Habrobracon hebetor* (Parasitoid evenomation ..., 2019).

Таким образом, ТК повышает восприимчивость *G. mellonella* к энтомопатогену *B. bassiana*, что подтверждает предположение о влиянии вторичных метаболитов фитопатогенных грибов на насекомых. В данном случае, ТК способствовала активизации ферментов в гемолимфе, связанных с детоксицирующей системой, и росту грамположительных энтерококков в кишечнике гусениц.

ВЫВОДЫ

1. По результатам молекулярного анализа, морфологическим признакам и хемотаксономическим маркерам (комплекс вторичных метаболитов) показано четкое отличие четырех российских штаммов *A. japonica* от *A. tenuissima*.
2. В экстрактах *A. japonica* идентифицированы брассициколин А, гидробрассициколин А, дигидробрассициколин А, фоменин А. Штаммы *A. japonica* не образовывали микотоксины мелкоспоровых *Alternaria* spp. (альтернариол, его монометилловый эфир, тенуазоновая кислота, тентоксин), которые, были идентифицированы в культурах *A. tenuissima*.
3. Контактнo-кишечную токсичность в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) с эффективностью более 50 % продемонстрировали 8 % экстрактов. Более 30 % из изученных экстрактов проявили остро-контактную токсичность в отношении гусениц большой вошинной огнёвки *Galleria mellonella* (L.) с кумулятивной смертностью более 50 %.
4. Выявлена возможная связь энтомотоксической активности в отношении гусениц *G. mellonella* с содержанием в экстрактах *A. japonica* дигидробрассицикололина А, *A. tenuissima* – тенуазоновой кислоты. Чувствительность злаковой тли *S. graminum* к экстрактам из *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima* может быть связана с содержанием в них фоменина А, хлормонилининовой кислоты В и тентоксина, соответственно.
5. Тенуазоновая кислота в концентрации 250 мкг/г корма проявила антифидантный эффект в отношении *G. mellonella* (медианная выживаемость составила 4 суток) и токсичность в отношении домового сверчка *Acheta domesticus* (L.) (медианная выживаемость составила 7 суток).

6. Тенуазоновая кислота в концентрации 20 мкг/личинку обладает острой контактной токсичностью в отношении личинок *G. mellonella* и *Zophobas morio* (F.), с медианной выживаемостью соответственно 7 и 4 суток.
7. Тенуазоновая кислота в 0.1 %-ной концентрации обладает слабой контактно-кишечной токсичностью в отношении *Schizaphis graminum* и *Tetranychus urticae* Koch, однако полностью ингибирует репродуктивную функцию самок паутинного клеща.
8. Тенуазоновая кислота с ИК₅₀ 25 мкг/мл в 5 раз менее токсична, чем боверицин. В пределах концентраций 1–100 мкг/мл она не токсична в отношении инфузорий *Paramecium caudatum*.
9. Тенуазоновая кислота повышает восприимчивость гусениц *G. mellonella* к грибной инфекции (*Beauveria bassiana*).
10. Диета гусениц *G. mellonella* с тенуазоновой кислотой не подавляет клеточный иммунитет, однако усиливает гуморальный (активизирует уровень фенолоксидазы и ферментов детоксицирующей системы) в гемолимфе и увеличивает численность грамположительных бактерий рода *Enterococcus* в кишечнике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грибы рода *Alternaria* характеризуются высоким потенциалом к образованию биологически активных вторичных метаболитов. Некоторые из этих соединений могут оказывать существенное влияние на жизнеспособность, плодовитость и поведение насекомых, а также быть причиной повышения их чувствительности к инфекциям.

На основании наших исследований, мы подтвердили способность *Alternaria* spp. образовывать вторичные метаболиты с энтомотоксическими свойствами. На примере тенуазоновой кислоты с использованием различных методов биооценки показан спектр чувствительных членистоногих (обыкновенный паутинный клещ *Tetranychus urticae* Koch, обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* (Rond.), гусеницы большой восковой моли *Galleria mellonella* (L.), личинки жука-чернотелки *Zophobas morio* (F.) и имаго домового сверчка *Acheta domesticus* (L.)). В результате изучения тенуазоновой кислоты как модельного вещества зафиксировано изменение защитных реакций (активизация уровня фенолоксидазы и ферментов детоксицирующей системы) в гемолимфе большой вошинной огневки *G. mellonella* и повышение их восприимчивости к энтомопатогенному грибу (*Beauveria bassiana*). Эти данные о тенуазоновой кислоте, ее возможном механизме действия важны для понимания экологической роли вторичных метаболитов фитопатогенных микромицетов и имеют значение для развития новых подходов к биологическому контролю вредных насекомых.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Далинова, А.А. Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов (обзор) / А.А. Далинова, Д.Р. Салимова, А.О. Берестецкий // Прикладная биохимия и микробиология. –2020. – Т. 56, вып. 3. – С. 1–19.

2. Идентификация и токсикологическая характеристика штаммов *Alternaria japonica* / **Д.Р. Салимова**, С.В. Сокорнова, А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал, Д.М. Кочура, А.О. Берестецкий // Микология и фитопатология. – 2021. – Т. 55, вып 3. – С. 203–218.
3. Спектр биологической активности грибов рода *Alternaria*, выявленных в филлосфере травянистых растений / А.О. Берестецкий, Ф.Б. Ганнибал, Е.В. Минкович, И.А. Остерман, **Д.Р. Салимова**, П.В. Сергиев, С.В. Сокорнова // Микробиология. – 2018. – Т. 87, вып. 6. – С. 706–717.
4. Entomotoxic activity of the extracts from the fungus, *Alternaria tenuissima* and its major metabolite, tenuazonic acid / **D.R. Salimova**, A.A. Dalinova, V.R. Dubovik [et al.] // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7, iss. 9. – P. 774.

Публикации в сборниках и материалах конференций

1. Дифференциация грибов *Alternaria japonica* и *Alternaria tenuissima*, выделенных из крестоцветных культур, по морфологическим, молекулярным и биохимическим маркерам / **Д.Р. Салимова**, А.С. Орина, Ф.Б. Ганнибал, А.О. Берестецкий // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. Материалы IV Международной научно-практической конф. (г. Ялта, 9–13 сентября 2019 г.). – Ялта, 2019. – С. 238.
2. **Салимова, Д.Р.** Инсектицидные свойства вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* / Д.Р. Салимова, А.А. Далинова, А.О. Берестецкий // Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых ученых (г. Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 181–182.
3. **Салимова, Д.Р.** Влияние состава питательной среды на метаболитный профиль экстрактов из культур различных штаммов *Alternaria japonica* / **Д.Р. Салимова**, А.С. Золотухина, А.О. Берестецкий // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего: сборник тезисов Международной научной конференции PLAMIC 2018 (г. Уфа, 13–17 июня 2018 г.). – Уфа, 2018. – С. 223.
4. **Salimova, D.R.**, Berestetskiy A.O. Secondary metabolite profiles and biological activity of extracts from various isolates fungi *Alternaria sonchi* depending on the composition of the liquid nutrient medium // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего: сборник тезисов Второй Международной научной конференции PLAMIC 2020 (г. Саратов, 5–9 октября 2020 г.). – Саратов, 2020. – С. 214.