

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

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»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Берестецкий Александр Олегович

Санкт-Петербург
2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ РОДА <i>ALTERNARIA</i> И ИХ ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ С НАСЕКОМЫМИ.....	9
1.1 Грибы рода <i>Alternaria</i> как продуценты биологически активных вторичных метаболитов..	9
1.2 Типы возможных антагонистических взаимоотношений грибов рода <i>Alternaria</i> и насекомых.....	21
1.3 Тенуазоновая кислота как модельный токсин для изучения энтомотоксических свойств грибных метаболитов.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
2.1 Объекты исследования.....	27
2.1.1 Штаммы гриба.....	27
2.1.2 Тест-организмы	27
2.2 Видовая идентификация	29
2.2.1 Изучение морфологических признаков	29
2.2.2 Молекулярно-генетические методы.....	29
2.3 Анализ экстрактов из культур <i>Alternaria japonica</i> , <i>A. sonchi</i> , <i>A. tenuissima</i> , полученных на различных жидких и твердых питательных средах	30
2.4 Выделение и очистка вторичных метаболитов из культур <i>Alternaria japonica</i> , <i>A. sonchi</i> , <i>A. tenuissima</i> , полученных на различных жидких и твердых питательных средах	31
2.5 Приборы и оборудование для выделения индивидуальных соединений	33
2.6 Определение биологической активности исследуемых метаболитов.....	33
2.6.1. Энтомотоксическая активность.....	33
2.6.2. Фитотоксическая активность.....	35
2.6.3. Антибиотическая активность	35
2.6.4. Цитотоксическая активность	35
2.7 Изучение возможности токсинов вызывать иммуносупрессию гусениц <i>Galleria mellonella</i> (L.)	36
2.7.1 Влияние tenuazonовой кислоты на восприимчивость вошинной огневки к грибной инфекции пероральным методом	36
2.7.2 Уровень общего количества гемоцитов в гемолимфе гусениц <i>Galleria mellonella</i>	37
2.7.3 Активность фенолоксидаз (ФО).....	37
2.7.4 Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) и неспецифических эстераз (ЭСТ).....	38
2.7.5 Анализ культивируемой микрофлоры среднего кишечника гусениц <i>Galleria mellonella</i>	38
2.8 Статистическая обработка	39
ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЕТАБОЛИТОВ <i>ALTERNARIA JAPONICA</i>, <i>A. TENUISSIMA</i> И <i>A. SONCHI</i>	41
3.1 Идентификация и физиолого-биохимические свойства штаммов	41

3.2 Влияние состава питательной среды и способа культивирования на образование метаболитов исследуемых штаммов.....	45
3. 3 Спектр биологической активности экстрактов	54
3. 3. 1 Энтомотоксическая активность.....	54
3. 3. 2 Фитотоксическая активность.....	58
3. 3. 3 Антибиотическая активность	61
3. 3. 4 Цитотоксическая активность	63
3. 4 Анализ метаболитных профилей экстрактов.....	68
3. 5 Оценка взаимосвязи типов активности и состава экстрактов.....	79
ГЛАВА 4. ЭНТОМОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ...	84
4.1 Выделение и идентификация tenuazonовой кислоты из фильтрата культуры <i>A. tenuissima</i> 253-011.....	84
4.2. Энтомотоксические, акарицидные и цитотоксические свойства tenuazonовой кислоты..	87
4.2.1 Пероральный эффект	87
4.2.2 Остро-контактная активность.....	89
4.2.3 Контактно-кишечная активность	90
4.2.4 Цитотоксическая активность	91
ГЛАВА 5. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НАСЕКОМЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ	95
5.1 Реакция клеточного и гуморального иммунитета гусениц <i>Galleria mellonella</i> (L.) при действии tenuazonовой кислоты	95
ВЫВОДЫ.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
ПРИЛОЖЕНИЯ	122
Приложение А.....	122
Приложение Б	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время для защиты сельскохозяйственных растений от действия насекомых-вредителей используют современные и экологические чистые подходы, которые позволяют снизить интенсивность применения химических инсектицидов и снизить загрязнение окружающей среды. Эти подходы включают создание устойчивых трансгенных сортов, использование естественных врагов насекомых (паразитов, хищников и др.) (Alternatives to chemical ..., 2012) и применение препаратов на основе природных соединений - биорациональных инсектицидов (Biorational insecticides ..., 2008; Horowitz et al., 2009; Берестецкий, 2017; Rethinking biorational ..., 2020; Берестецкий и др., 2021).

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 инсектицидными свойствами (Берестецкий и др., 2021). Известно, что эти соединения играют важную экологическую роль в формировании разнообразных ассоциаций гриба-продуцента с насекомыми, проявляя как негативный (снижение жизнеспособности и плодовитости, ухудшение условий развития потомства) (Roberts, St Leger, 2004; Entomopathogenic fungi ..., 2004; Pedrini et al., 2007) так и положительный эффекты (увеличение плотности популяции и повышение жизнеспособности) (Биология взаимоотношений ..., 2014). А также, фитопатогены могут быть симбионтами насекомых с мутуалистической ассоциацией, ведущей, например, к повышению эффективности пищеварения (обработка и усвоение компонентов растения) (Hartley, Gange, 2009).

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 вторичных метаболитов фитопатогенных грибов на жизнеспособность, развитие и плодовитость членистоногих, единичны (Берестецкий и др., 2021).

Известно, что вторичные метаболиты фитопатогенных грибов *Alternaria* spp., обладают широким спектром действия на различные объекты, включая растения, бактерии, грибы, членистоногие и другие организмы (Lou et al., 2013). Это определяет интерес к токсинам *Alternaria* spp., и их энтомотоксическим свойствам с точки зрения не только изучения их антагонистического влияния в рамках трофических связей, но и поиска экологически безопасных методов борьбы с вредными насекомыми (Берестецкий и др., 2021).

Степень разработанности проблемы. Результаты немногочисленных опытов показывают, что некоторые представители фитопатогенных грибов способны образовывать вторичные метаболиты с энтомотоксическими свойствами. Возможно, эти соединения необходимы им для конкурентной борьбы с насекомыми-фитофагами за питательный субстрат. 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* (Hemiptera: Aphididae) было показано антифидантное действие глиотоксина, циклопальдиевой кислоты, сеиридина и цитохалазина А, при этом, два последних соединения были нефитотоксичны для листьев бобов (Antifeedent activity ..., 2018). Антифидантные свойства в отношении кровососущих насекомых продемонстрировали некоторые фитотоксины (сеиридин, сферопсидин А, папирацилловая кислота), выделенные из культур фитопатогенов (Cyclopaldic acid ..., 2013).

Грибы рода *Alternaria* обладают высоким потенциалом к образованию вторичных метаболитов с энтомотоксическими свойствами. Так, фитофаги избегают листья капусты, инфицированные грибом *A. brassicicola* (Tack, Dicke, 2013). Важно отметить, что некоторые мелкоспоровые *Alternaria* spp. обнаруживаются на насекомых и способны вызывать их микозы (*Alternaria alternata*, a new ..., 2001). В лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ФГБНУ ВИЗР проводятся систематические исследования по поиску биологически активных вторичных метаболитов, в том числе биорациональных инсектицидов, среди различных родов фитопатогенных грибов, в том числе и грибов рода *Alternaria*. Было показано, что *A. papavericola*, *A. saponariae*, *A. penicillata* и *A. japonica*, способны образовывать вторичные метаболиты с инсектицидными свойствами в отношении различных видов насекомых-вредителей. Этанольный экстракт из мицелия *A. papavericola* вызывал гибель виковой тли *Megoura viciae* (Buckt.) (Homoptera, Aphididae) на уровне биоинсектоакарицида нимацаль (Инсектицидная, акарицидная ..., 2019; Берестецкий и др., 2021).

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

Задачи исследования:

- 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 энтомотоксической активностью;
- 5) уточнить энтомотоксические 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 рода *Alternaria*. Показана возможная связь компонента экстрактов *A. japonica* (дигидробрассициколин А) с их энтомотоксической активностью в отношении обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) и гусениц большой вощиной огневки *Galleria mellonella* (L.). Впервые охарактеризованы энтомотоксические свойства тенуазоновой кислоты в отношении следующих членистоногих – паутиного клеща *Tetranychus urticae* Koch, большой вощиной огневки *G. mellonella*, домового сверчка *Acheta domesticus* (L.), личинок жука-чернотелки *Zophobas morio* (F.). 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 работы. Гриб *A. japonica* охарактеризован как продуцент брассициколина А, гидро- и дигидробрассициколина А и фоменина А. На примере типичного микотоксина мелкоспоровых *Alternaria* spp. – тенуазоновой кислоты, показано прямое (повышенная восприимчивость и гибель) и косвенное (замедление развития, снижение плодовитости) действие в отношении различных членистоногих. Показана способность микотоксина фитопатогена *A. tenuissima* вызывать иммуносупрессию у гусениц большой

восковой моли *Galleria mellonella* (L.). Разработаны методические рекомендации по выделению теназоновой 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 исследования. 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. Теназоновая 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.

Объём 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 рисунком 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. Степанычевой, 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)

1.1 Грибы рода *Alternaria* как продуценты биологически активных вторичных метаболитов

Анаморфный род грибов *Alternaria*, в соответствии с принятой в настоящее время систематикой, относится к семейству Pleosporaceae (Pleosporales, Dothideomycetes и Ascomycota) (Lawrence et al., 2016). Ключевой таксономической особенностью рода *Alternaria* является образование крупных, многоклеточных, темных меланизированных конидий (оливковых, коричневых, желтоватых) с продольными и поперечными перегородками. Меланины определяют относительную устойчивость грибов к ультрафиолетовому облучению и неблагоприятным условиям среды, действию литических ферментов и других повреждающих агентов (Lawrence et al., 2016). Некоторые виды грибов рода *Alternaria* могут формировать хламидоспоры, которые образуются чаще путём округления вегетативных клеток, реже из клеток конидий после действия на них низких температур во время постепенного высушивания. Некоторые виды, такие как *Alternaria brassicae*, *A. dauci*, *A. radicina* и *A. alternate*, способны формировать из конидий микросклеротии (Shabana et al., 1995). Известно, что род *Alternaria* насчитывает около 250 видов, но с учетом альтернариодных гифомицетов (10 родов) это цифра составляет более 350 видов. Условно род делится на две группы — мелкоспоровые и крупноспоровые виды, которые, в свою очередь, с использованием морфологических, молекулярных и биохимических признаков разделены на несколько секций (Pinto, Patriarca, 2017).

Род *Alternaria* представляет собой одну из самых распространенных и разнообразных по биологическим характеристикам группу микромицетов. Для представителей этого рода характерен гетеротрофный образ жизни с разным уровнем специализации и взаимоотношениями в системе растение-хозяин; они принимают участие в разложении и минерализации растительных остатков. В основном грибы рода *Alternaria* (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. japonica*, *A. dauci*, *A. radicina* и др.) являются фитопатогенами и вызывают болезни многих сельскохозяйственных культур (Lee et al., 2015). Они, как правило, поражают листья, семена и плоды растений разных семейств (Thomma, 2003). Некоторые виды данного рода способны специфически поражать сорные растения и предложены в качестве продуцентов биогербицидов (Green, Bailey, 2000; Kaur et al., 2015; Shabana et al., 1995).

Вредоносность фитопатогенов рода *Alternaria* обусловлена токсическим действием их вторичных метаболитов. Вторичные метаболиты представляют собой низкомолекулярные органические соединения природного происхождения, уникальные для одного или небольшого числа близкородственных видов. Вторичные метаболиты играют химико-экологическую роль в адаптации и выживании живых организмов (O'Brien, Wright, 2011), но не выполняют основные клеточные функции, как первичные метаболиты. Среди различных вторичных метаболитов было продемонстрировано, что токсичные метаболиты, вырабатываемые фитопатогенными грибами, могут не только способствовать развитию болезней растений, но и быть токсичными для других организмов (Pusztahelyi et al., 2015). В настоящее время описано свыше 300 вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria*, которые являются фитотоксинами, микотоксинами, антибиотиками и могут служить основой для разработки новых пестицидов и лекарственных препаратов (Lou et al., 2013; Korres et al., 2018), а также являться поллютантами пищевых продуктов (Multi-mycotoxin screening ..., 2013). Токсичные вторичные метаболиты *Alternaria* можно сгруппировать не только по спектру биологической активности, по характеру взаимоотношения растения-хозяина и фитопатогена, но и по типу химической структуры соединения. По классу химической структуры группы включают в себя: алкалоиды, циклопептиды, стероиды, терпеноиды, пираноны, хиноны, ароматические и другие (Lou et al., 2013).

В данной главе представлена малая часть вторичных метаболитов альтернариодных грибов, их структурная характеристика и биологическая активность. Некоторые вторичные метаболиты уникальны для одного вида *Alternaria*, но большинство метаболитов продуцируются более чем одним видом.

Фитотоксические свойства метаболитов. Представители рода *Alternaria* известны своей способностью продуцировать специфичные и неспецифичные фитотоксины — низкомолекулярные соединения, принадлежащие к различным классам органических соединений. Симптомы действия фитотоксинов на растения выражаются обычно в хлорозах, некрозах, пятнистостях их надземных частей, увядании и общем угнетении роста, а также в ингибировании прорастания семян (Berestetskiy, 2008; Ismaiel, Papenbrock, 2015).

Хозяин-специфические фитотоксины (ХСТ) действуют только на определенные генотипы культурных и сорных растений; растения, восприимчивые к патогену, чувствительны и к образуемому им токсину. Только при выполнении всех этих условий, можно отнести фитотоксины к ХСТ (Möbius, Hertweck, 2009).

Большинство ХСТ относятся к азотсодержащим метаболитам - аминам, циклическим пептидам и депсипептидам (рис.1) (Möbius, Hertweck, 2009; Host-selective toxins ..., 2013; Lou et al., 2013; Complex regulation ..., 2014) (рис.1).

AAL-токсины (рисунок 1.1) были впервые выделены Боттини и Гилкристом (Bottini, Gilchrist, 1981) из *A. alternata* f.sp. *lycopercici*. Они являются аналогами сфинганина, этерифицированного пропан-1,2,3-трикарбоновой кислотой. Существует десять аналогов, обозначенных как токсины AAL 1–10, которые отличаются, как количеством и положением ОН-групп, так и положением радикала трикарбоновой кислоты (Structural characterization ..., 1994; *Alternaria* toxins: potential ..., 2017). AAL-токсины фитотоксичны для растений, вызывают некроз листьев и сухую гниль стеблей (Prasad, Upadhyay, 2010). AAL-токсины останавливают синтез церамидов путем ингибирования ключевого фермента сфингазин N-ацилтрансферазы (Inhibition of sphingolipid ..., 1991).

AF-токсины (рисунок 1.2) представлены тремя токсинами различной структуры: AF-I и III являются производными валина с 2,3-дигидроксиизовалериановой и 2-гидроксиизовалериановой кислотами, соответственно, в то время как AF-II является производным изолейцина с 2-гидроксизовалериановой кислотой. AF-токсины воздействуют на цитоплазматическую мембрану клетки, не влияя на другие внутриклеточные органеллы (A conditionally dispensable ..., 2002; Meena, Samal, 2019). Производные AF-II (например, ацетил, пропионил или изовалерил) проявляют фитотоксичность как на листьях клубники, так и груши, тогда как сам токсин AF- II был токсичен только для клубники (Host-selective toxins ..., 2013).

AM-токсины (рисунок 1.3) относятся к классу депсипептидов. Они состоят из четырех структурных фрагментов, таких как α -аминоакриловая кислота, L-аланин, L- α -гидроксиизовалериановая кислота и L- α -амино- δ -фенилвалериановая кислота. Существует три вида AM-токсинов, отличающиеся структурой заместителя в *p*-положении фенильного радикала ($R=OCH_3$ в AM-I; $R=H$ в AM-II и $R=OH$ в AM-III). Действие AM-токсинов в тканях растений заключается в снижении уровня хлорофилла и разрушении клеточной мембраны. Токсин вызывает фрагментацию и везикуляцию цитоплазматической мембраны клеток растений, что приводит к лизису клетки. В хлоропластах AM-токсины вызывают нарушение ламелл в гранах, что приводит к снижению содержания хлорофилла и к ослаблению фиксации углекислого газа (Meena, Samal, 2019);

Макулозин (рисунок 1.4) относится к циклическим пептидам - цикло-(L-Pro-L-Tyr). Оценка фитотоксического действия макулозина в отношении различных растений показала чувствительность к нему растений василька (Stierle et al., 1988). Селективность действия, безопасность и простая структура макулозина дает перспективу для разработки и синтеза его производных с целью применения в качестве гербицида против василька (Bobylev et al., 1996).

Деструксины (рисунок 1. 5 и 1.6) еще одна группа ХСТ, продуцируемых *A. brassicae* как *in vitro*, так и *in planta*. Деструксины относятся к классу гексадепсипептидов, в частности, деструксин В, состоящий из α -гидроксикислоты и пяти аминокислотных остатков, был выделен

из энтомопатогенных грибов *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum* (Mass spectrometry as ..., 2009; Ibrahim, Asker, 2012) и вызывал сильный хлороз листьев рапса и канолы (*Alternaria brassicae produces* ..., 2008). Деструксин В, выделенный из фитопатогенного гриба *A. brassicae*, вызывал хлоротичные и некротические поражения листьев *Brassica campestris*. Некротические поражения показали плазмолиз с полным разрушением клеточных органелл. Хлоротичные поражения имели нормальную цитоплазматическую мембрану, но показали деформацию митохондрии с уменьшенным количеством крист и везикуляцией оболочки (Meena, Samal, 2019). Помимо фитотоксичности, эти гексадепсипептиды проявляют широкий спектр биологической активности: противоопухолевая, противовирусная, инсектицидная, цитотоксическая и иммуносупрессивная.

Неспецифические фитотоксины (НСТ) *Alternaria* способны поражать широкий спектр растений независимо от того, являются ли они хозяином фитопатогена или нет и считаются дополнительным фактором заболевания. Они действуют как факторы вирулентности и усиливают симптомы заболевания (*Alternaria toxins: potential* ..., 2017). НСТ, образуемые грибами рода *Alternaria*, относятся к различным классам химических соединений: производным бензопирона, антрахиноновым пигментам, простым фенолам и др. (рисунок 2).

К пионовым фитотоксинам относится *альтернариевая кислота* (рисунок 2.1) – первый НСТ, описанный в 1949 году. Этот токсин был обнаружен в культуральных фильтратах *A. alternata*, *A. solani*, *A. porri*. Фитотоксическое действие альтернариевой кислоты проявлялось на широком круге растений, но наиболее чувствительными к действию токсина были картофель и томат. Альтернариевая кислота также ингибировала прорастание семян капусты и редиса (Templeton, 2016).

Неспецифические хиноновые фитотоксины включали *альтерсоланол А* (рисунок 2.2) – тетрагидроантрахиноновый пигмент впервые был выделен из фильтрата *A. solani* в 1969 году. Позже метаболиты этого класса соединений были найдены у других грибов, в частности *A. porri*, *Dactylaria lutea* и *Phomopsis juniperovora*. Альтерсоланол А ингибировал рост проростков салата и лука-батуна (*Allium fistulosum*). Его механизм действия заключается в ингибировании клеточного дыхания, вследствие чего растение недополучает необходимых веществ для осуществления фотосинтеза (*Bioactive hydroanthraquinones* ..., 2012). Бипроизводные антрахинонов (альтерпорриолы А, В, С, D и F), выделенные из *A. porri*, показали сильную фитотоксичность (Lou et al., 2013).

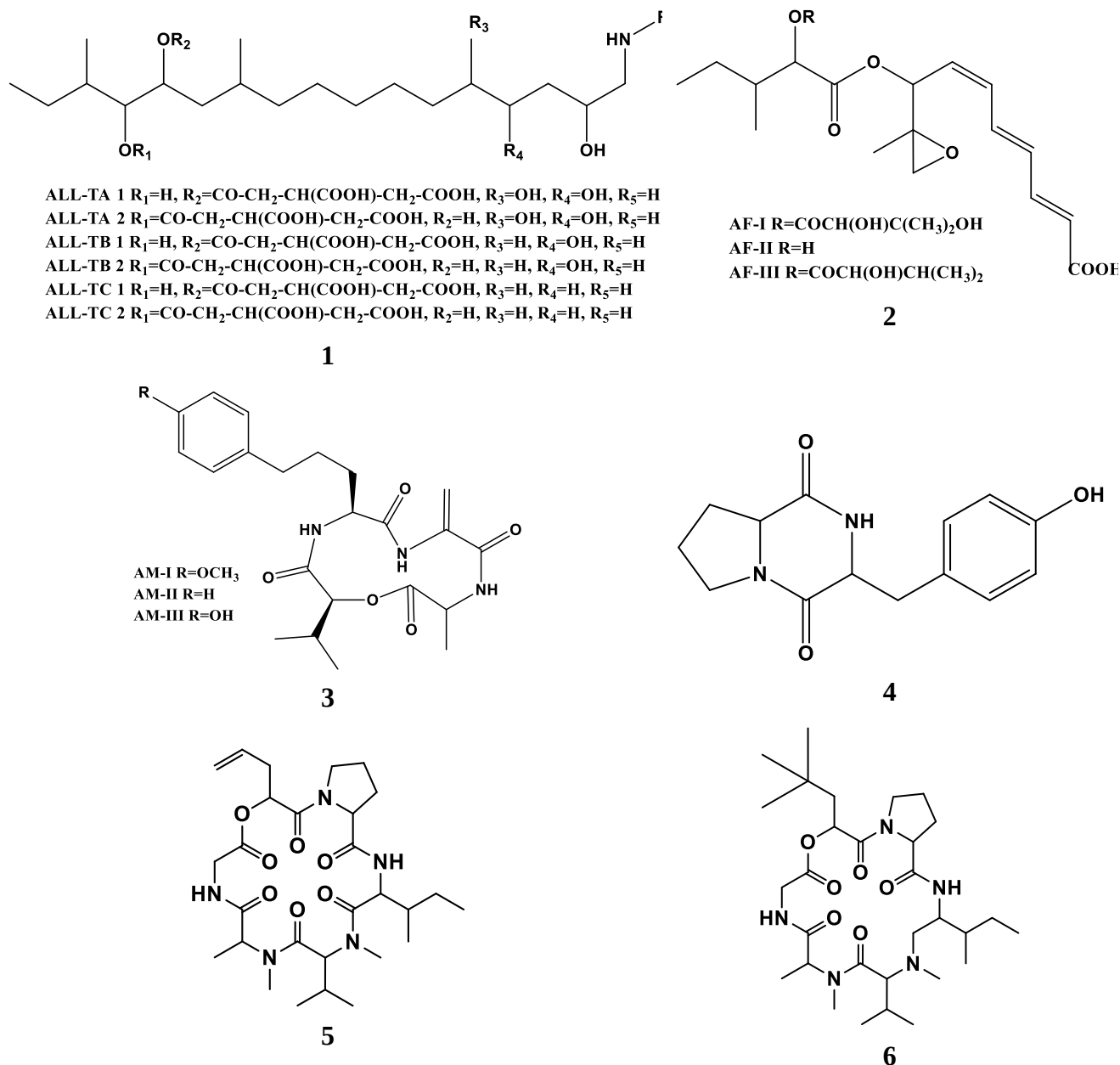


Рисунок 1 — Хозяин-специфические фитотоксины грибов рода *Alternaria*

1 — ALL-токсин, 2 — AF-токсин, 3 — AM-токсин, 4 — макулозин, 5 — деструксин А, 6 — деструксин В

Представителями фенольных НСТ являются *цинниол* (рисунок 2.3) и его аналоги. Пятизамещенный бензол, продуцируемый несколькими видами *Alternaria*, индуцировал некрозы тканей листьев растений разных родов (Cotty, Misaghi, 1984). Он впервые был выделен из культуры гриба *A. zinniae* (Starrat, 1968), однако позже цинниол и его производные были обнаружены также у *A. targetica*, *A. cirsinioxia*, *A. solani*, *A. dauci* (Natural zinniol derivatives ..., 2002; Выделение, идентификация ..., 2010). Механизм его действия заключается в повышении проницаемости клеточных мембран, что проявляется в виде некрозов (Cotty, Misaghi, 1984; Thomma et al., 2003). В исследованиях по взаимосвязи химической структуры и фитотоксичности

с использованием природных и синтетических производных цинниола в отношении календулы *Tagetes erecta* был зафиксирован сильный некроз, вызванный цинниолом и производными его карбоксилированного метилового эфира (Natural zinniol derivatives ..., 2002).

Неспецифические терпеновые фитотоксины - *брассицицены* (рисунок 2.4 и 2.5) представляют собой группу дитерпенов, выделенных из фитопатогенного гриба *Alternaria brassicicola*. На сегодняшний день из вида *A. brassicicola* выделено более 10 брассициценов, из которых брассицицены А-I проявляют гормоноподобную активность в отношении широкого круга растений (Cho, 2015; Total biosynthesis of ..., 2018).

Изоцианидный фитотоксин *брассициколин А* (рисунок 2.6) был выделен в виде смеси эпимеров из *A. brassicicola*, патогена растений рода *Brassica* (Pedras, Yu, 2009). Химическая структура содержит маннит, этерифицированный ацетилом по C1 и C1', 2-изоцианоизопентаноилом по C2 и C2', и 2-гидроксиизопентаноилом по C3 и C3' атомам. Фитотоксин был выделен в разное время разными исследователями и была установлена его антибактериальная активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* (Structure of brassicicolin A: ..., 1988; Cho, 2015).

Неспецифические азотсодержащие фитотоксины включают *тенуазоновую кислоту* (рисунок 2.7), *порритоксин* и *тентоксин*. Тенуазоновая кислота – производное тетрамовой кислоты, была выделена как основной фитотоксин гриба *A. alternata*, который является возбудителем листовой гнили дурмана безвредного и вызывает пятнистость листьев агератины железистой (*Eupatorium adenophora*). Тенуазоновая кислота индуцирует хлороз листьев нескольких видов дурмана, ржи, кукурузы, пшеницы, капусты и других растений (*Alternaria alternata* crofton-weed..., 2007; Altenusin, a biphenyl ..., 2008). Механизм фитотоксического действия тенуазоновой кислоты заключается в ингибировании транспорта электронов в фотосистеме II, что приводит к накоплению активных форм кислорода и вызывает программируемую клеточную гибель (Blocking the QB-binding ..., 2015).

Тентоксин (рисунок 2.8) - циклический тетрапептид, который образуют многие грибы рода *Alternaria* – *A. alternata*, *A. linicola*, *A. porri*, *A. japonica* (Pinto, Patriarca, 2017). Его токсичное действие на растения проявляется в виде хлорозов. Тентоксин оказывает комплексное воздействие на растительные клетки, вызывая деформацию хлоропластов, деполимеризацию мембран и нарушение регулирования открытия устьиц (Klotz, 1988). Известно, что *Е*-изомер тентоксина – *изотентоксин*, вызывал более сильное увядающее действие листьев сорного растения *Galium aparine*, чем тентоксин (Liebermann et al., 1996).

Вторичные метаболиты грибов рода *Alternaria* проявляют биологическую активность, что вызывает интерес их дальнейшего изучения и применения в различных областях, в частности в химии, медицине, сельском хозяйстве (Lou et al., 2013).

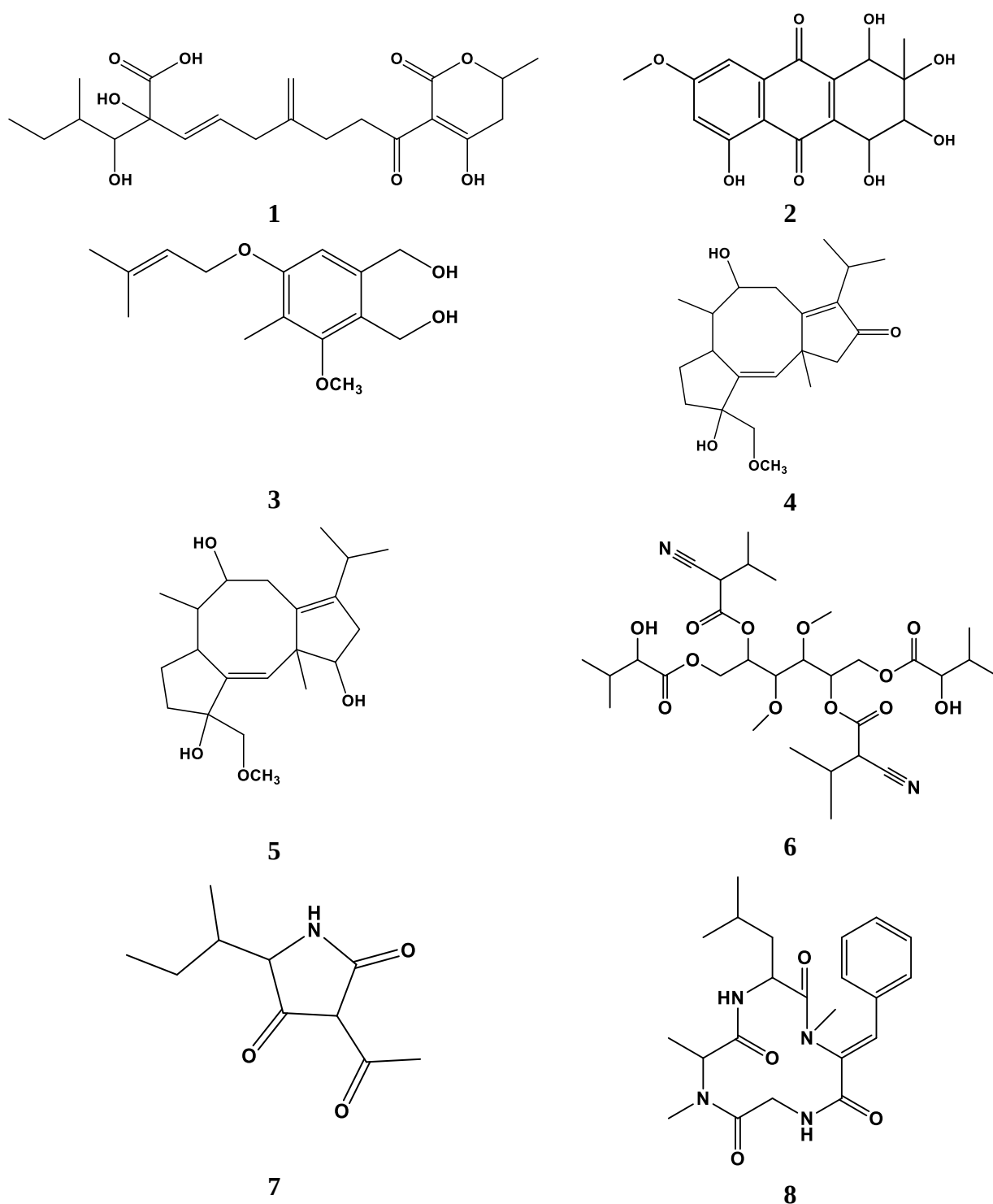


Рисунок 2 — Неспецифические фитотоксины грибов рода *Alternaria*

1 — альтернариевая кислота, 2 — альтерсоланол А, 3 — цинниол, 4 — брассициден А, 5 — брассициден В, 6 — брассициколин А, 7 — тенуазоновая кислота, 8 — тентоксин

Цитотоксические свойства. Был проведен ряд скрининговых работ по действию некоторых вторичных метаболитов *Alternaria* в отношении различных клеточных культур.

Из дибензопираноновых метаболитов, *альтернариол* (рисунок. 3. 1) проявляет цитотоксическую активность на клетках лимфомы мыши (Cytotoxic metabolites ..., 2008) и ингибирует активность протеинкиназ и ксантинооксидаз (Gu, 2009). Было обнаружено, что

производное альтернариола, такое как дегидроальтенузин, выделенный из *A. tenuis*, является специфическим ингибитором эукариотической ДНК-полимеразы α , и проявляет сильную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток (Lou et al., 2013).

Производные антрахинонов *Alternaria* также проявили цитотоксическую активность. Деметилмакроспорин (рисунок 3.4) был цитотоксичен в отношении клеток шейки матки HeLa и молочной железы KB в концентрации полумаксимального ингибирования ИК₅₀ 7.3 мкг/мл и 8.6 мкг/мл, соответственно (Phuwapraisirirana, 2009). Схожим действием в отношении этих клеточных линий обладают биантрахиноновые метаболиты, в частности, *альтерпорриол F* и *альтерпорриол L* (рисунок 3.5 и 3.6) (Phuwapraisirirana, 2009; The cytotoxicity and ..., 2012). Альтерсоланол А (рисунок 2.2) проявляет антиопухолевую активность против линии клеток миелоидного лейкоза и рака легких, при этом соединение индуцирует апоптоз раковых клеток, но не изменяет жизнеспособность живых клеток (Anticancer effect of ..., 2013).

Фенольный метаболит - *альтерлактон* (рисунок 3.7) обладал токсичным действием на клетки лимфомы мыши (Cytotoxic metabolites ..., 2008). Монилифенон и пинзелин, выделенные из *A. sonchi*, показывают цитотоксическую активность в отношении клеток рака пищевода (Evaluation of the ..., 2011; Isolation and bioactivity ..., 2020).

Способностью индуцировать дифференцировку опухолевых клеток обладает одиннадцатуглеродный линейный поликетид из *A. brassicicola* - *денудецин* (рисунок 4.1) (Monneret, 2005).

Антибиотические свойства. Среди азотсодержащих вторичных метаболитов, высокая активность против грамположительных бактерий (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) показана для *альтенузина* (рисунок 4.), *дизметилальтенузина* (рисунок 3.10) (Altenusin, a biphenyl ..., 2008) и брассициколина А (рисунок 2.6) (Structure of brassicicolin A: ..., 1988). *Альтенуизол* (рисунок 3.11), *альтернариол* (рисунок 3.1) и его метиловый эфир (рисунок 3.2) активны, как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Salmonella typhimurium* и *Xanthomonas vesicatoria*) (Examination of *Alternaria* ..., 2001, Ostry, 2008). *Альтенузин* показал антигрибную активность против *Paracoccidioides brasiliensis* (Antifungal activity ..., 2012). Тенуазоновая кислота (рисунок 2.7) обладает слабыми антибиотическими свойствами, показано, что минимальная ингибирующая концентрация против *Mycobacterium tuberculosis* составила 250 мкг/мл (Tenuazonic acid: a ..., 2011).

Антрахиноновые метаболиты, выделенные из *A. solani* и *Alternaria* sp., например, *макроспорин* (рисунок 3.3), *гидроксибострицин* (рисунок 4.5), *альтерсоланолы* (А, В, С и G) (рисунок 2.2 и рисунок 4.6-8) и *альтерпорриол С* (рисунок 4.9) показали антибиотическую

активность против ряда бактерий: *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Vibrio parahemolyticus* (Lou et al., 2013).

Среди вторичных метаболитов, относящихся к классу пирановых, антибиотическая активность была отмечена у *гербарина А* (рисунок 4. 10) и *альтехромона А* (рисунок 4.11), выделенных из *A. brassicicola*. К противомикробному действию этих токсинов были чувствительны *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* и дрожжеподобный гриб *Candida albicans* (Gu, 2009). Последний был чувствителен к противогрибковому действию руброфусарина В, выделенного из *A. alternata* (Shaaban et al., 2012).

Вторичные метаболиты *Alternaria* могут найти потенциальное применение в качестве противоопухолевых и противомикробных препаратов. Для нескольких биологически активных из них был подобран процесс химического синтеза: макулозина (Bobilev et al., 1996), АМ-токсина I (Syntheses of cyclotetradepsipeptides ..., 1976), альтернариола (Koch et al., 2005), монометилового эфира альтернариола (Koch et al., 2005), цинниола (Martin, Vogel, 1980), альтенусина и альтерлактона (Cudaj, Podlech, 2012).

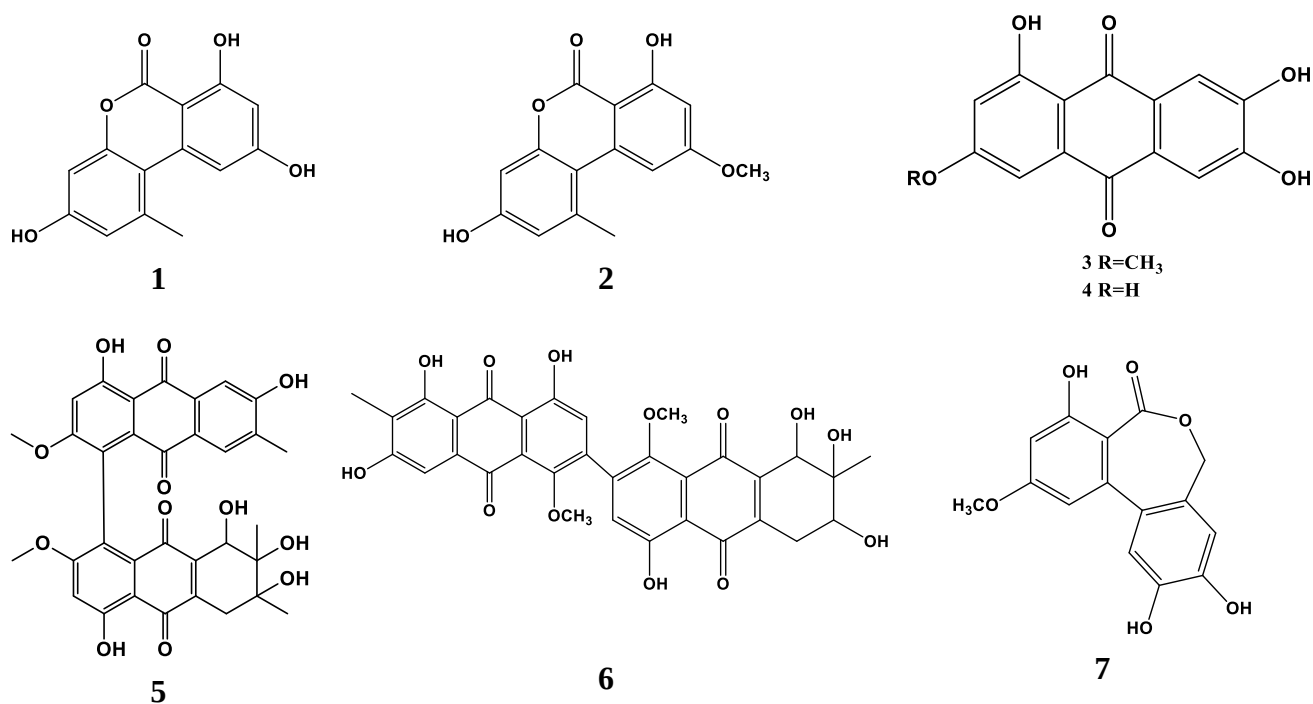


Рисунок 3 — Вторичные метаболиты грибов рода *Alternaria* с цитотоксическими и антибиотическими свойствами

1 — альтернариол, 2 — монометилый эфир альтернариола, 3 — макроспорин, 4 — деметилмакроспорин, 5 — альтерпорриол F, 6 — альтерпорриол L, 7 — альтерлактон

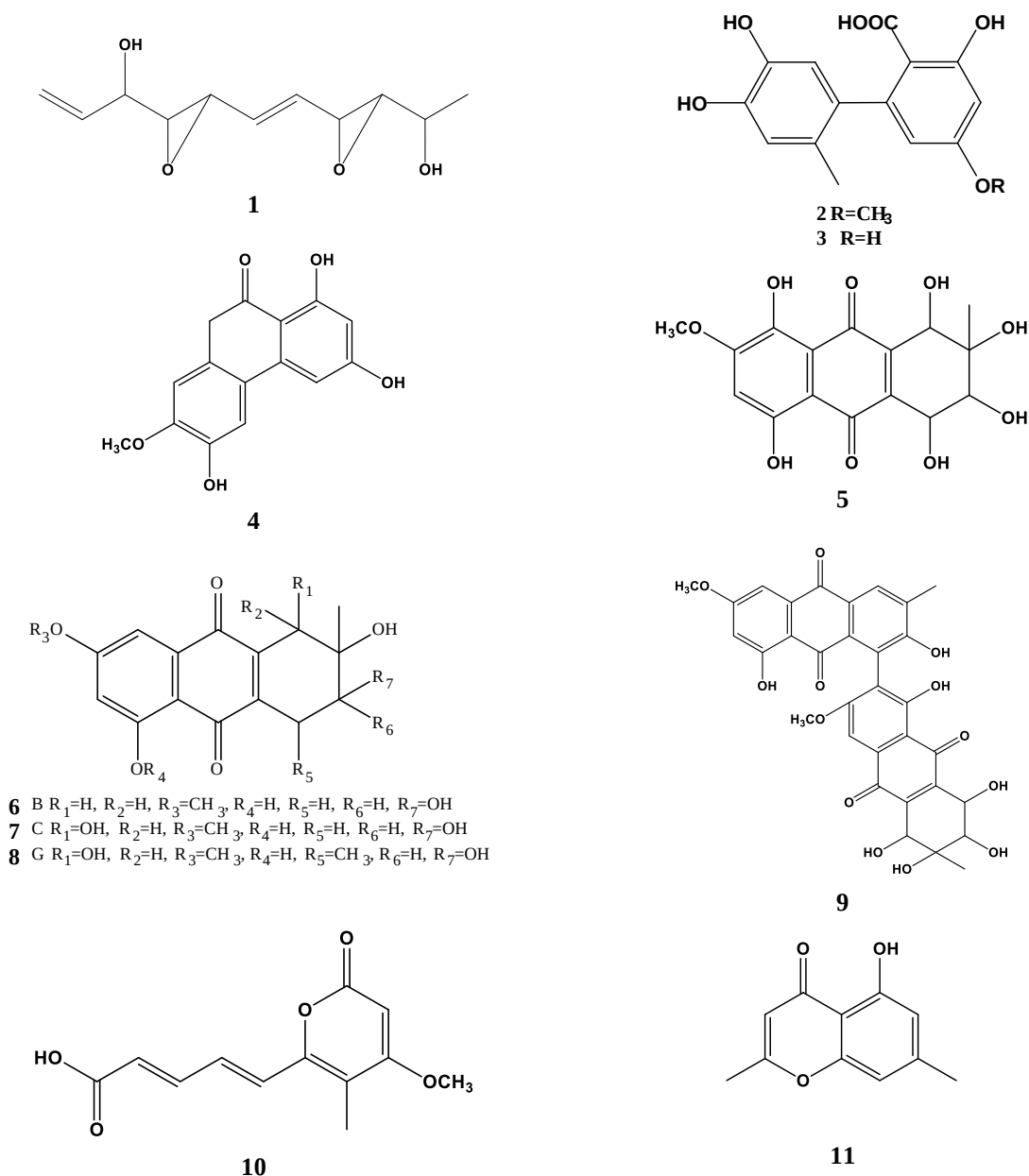


Рисунок 4 — Вторичные метаболиты грибов рода *Alternaria* с цитотоксическими и антибиотическими свойствами

1 — депудецин, 2 — альтенузин, 3 — дизметилальтенузин, 4 — альтенуизол, 5 — гидроксибострицин, 6 — альтерсоланол В, 7 - альтерсоланол С, 8 — альтерсоланол G, 9 — альтерпорриол С, 10 — гербарин А, 11 — альтехромон А

Микотоксины. Рядом исследователей было показано, что грибы рода *Alternaria* продуцируют микотоксины — метаболиты, связанные с различными неблагоприятными эффектами (генотоксическими, мутагенными, канцерогенными) на здоровье человека и животных, в том числе и серьезными заболеваниями (MÁ et al., 2012; Mycotoxins: occurrence ..., 2013). Так же, микотоксины *Alternaria*, могут быть обнаружены в качестве контаминантов пищевых продуктов. Среди наиболее распространенных в продуктах питания являются альтернариол (рисунок 3.1), монометилловый эфир альтернариола (рисунок 3.2), альтенуен, тенуазоновая кислота (рисунок 2.7), реже альтертоксин I (The studies of ..., 1986, Immunoassay of

selected ..., 1999). В литературе показано, что в основном токсикологические исследования были сосредоточены на микотоксинах со структурой дибензопирона, т.е. на альтерналиоле и его монометиловом эфире. Главная причина связана с высокой частотой встречаемости в продуктах питания и кормах, и их биологическая активность учитывалась при анализе пищевых рисков (Dall'Asta et al., 2014). На культуре клеток человека и животных было показано, что альтерналиол является ингибитором топоизомеразы I и II α , и тем самым может вызывать разрывы ДНК и мутации генов (Benassi et al., 2012; Alternariol acts as ..., 2009). Монометиловый эфир альтерналиола, как и сам альтерналиол, может активировать онкогены и способствовать развитию плоскоклеточной карциномы пищевода (Etiological role of ..., 1992). Альтерналиол обладает цитотоксическим эффектом на культуре клеток человека HeLa (Toxicity of metabolites ..., 1973). По причине структурного сходства альтерналиола с некоторыми веществами, имитирующими эстроген, он был исследован как возможный эндокринный деструктор. На примере, клеточной линии аденокарциномы эндометрия было показано, что микотоксин функционировал как антагонист рецепторов эстрогена α и β (Lehmann et al., 2006). Эстрогенная активность альтерналиола была охарактеризована *in vitro* и описана по способу действия. В частности, нарушение передачи сигналов ядерных рецепторов, изменение выработки гормонов и вмешательство в экспрессию генов, кодирующих стероидогенные ферменты (An *in vitro* investigation ..., 2013).

Существует мало данных о токсикологическом действии альтенуена, указывающих на то, что он обладает острой токсичностью (Degradation of the ..., 2010; Bioactive metabolites ..., 2014).

Мутагенный потенциал нескольких микотоксинов *Alternaria* был оценен в генетическом тесте Эймса с использованием бактерий *Salmonella typhimurium*. Альтертоксины I и II проявили значительную мутагенную активность, в то время как монометиловый эфир альтерналиола был слабо активен. Альтерналиол и тенуазоновая кислота не проявили никаких признаков мутагенности (*Alternaria* toxins: ..., 2012; Fleck et al., 2014).

Токсическое действие тенуазоновой кислоты подробно изучено на мышах, курах и собаках. Показано, что низкие суточные дозы (10 мг/кг корма) вызвали у собак кровоизлияние в некоторых органах. Содержание тенуазоновой кислоты в курином корме приводило к снижению веса кур и повышению внутренних кровоизлияний (Griffin, Chu, 1983). Существуют результаты, свидетельствующие, что тенуазоновая кислота ингибирует биосинтез белка в клетках. Например, микотоксин ингибировал пролиферацию стандартной фибробластоподобной клеточной линии мышей 3T3, фибробласты легкого китайского хомячка CHL и гепатоцитов человека L-O2 (Zhou, Qiang, 2008).

Данные литературы, свидетельствуют о том, что основные вторичные метаболиты *Alternaria* (альтерналиол, его монометиловый эфир, альтенуен и тенуазоновая кислота)

представляют собой одну из групп природных токсикантов, требующих дополнительной информации о токсикологических эффектах на животных и человека.

Энтомотоксические свойства метаболитов грибов рода *Alternaria* исследованы фрагментарно. Так, экстракт из культурального фильтрата *A. alternata* проявлял токсичное действие в отношении розовой тли *Macrosiphum rosivorum* (Zhang) (Hemiptera: Aphididae) (*Alternaria toxin-induced ...*, 2015). Результаты исследования показали, что действующим началом экстракта является тенуазоновая кислота. При обработке листьев розы *Rosa chinensis* нефитотоксичными дозами (0.06 мкг/мл) тенуазоновой кислоты гибель *M. rosivorum* была на уровне 80% по сравнению с контролем. Предполагается, что тенуазоновая кислота может вызывать косвенные реакции в растениях и стимулировать выработку их защитных метаболитов с целью усиления резистентности растений к насекомым. Показано ларвицидное действие тенуазоновой кислоты в отношении зеленой мясной мухи *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) (Cole, Rolinson, 1972). В концентрации 120 мкг/мл тенуазоновая кислота показала 100%-ую смертность личинок через 48 часов после обработки. Однако особи *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) были не чувствительны к энтомотоксическому действию тенуазоновой кислоты (*Insecticidal activity of ...*, 1975).

Установлен инсектицидный потенциал альтенуена и деструксина В, продуцируемых *A. alternata* который оценивали путем добавления токсинов в корм насекомым. В концентрации 50 мг/мл альтенуен вызывал гибель более чем 70 % гусениц *Spodoptora litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) (*Cholinesterase inhibitor ...*, 2016; Салимова Д. Р. и др., 2018).

Показана высокая токсичность двух метаболитов, выделенных из мицелия *A. sonchi* - метил-3,8-дигидрокси-6-метил-4-хлор-9-оксо-9-Н-ксантен-1-карбоксилата и хлормонилининовой кислоты В, для особей злаковой тли (*Isolation and bioactivity ...*, 2020).

Сделаны попытки установления механизмов энтомотоксического действия токсинов *Alternaria*. Показано, что их действие может быть обусловлено способностью ингибировать различные ацилхолинэстеразы (*Acetylcholinesterase inhibitory ...*, 2012) и угнетать клеточный и гуморальный иммунитет, что выражалось в снижении количества гемоцитов, подавлении лизоцимной и фенолоксидазной активности у гусениц *S. litura* (Kaur, Kumar Aggarwal, 2015).

Таким образом, грибы рода *Alternaria*, помимо образования фитотоксинов, антибиотиков, микотоксинов, способны образовывать вторичные метаболиты с энтомотоксическими свойствами, которые могут быть перспективными для создания препаратов инсектицидного действия. Возможно, данные соединения необходимы им для борьбы за питательный субстрат, а также для выживания на растительных остатках и в почве (Спектр биологической ..., 2018). Изучение токсинообразующих фитопатогенных видов *Alternaria*, выделение их вторичных

метаболитов с энтомотоксическими свойствами является перспективным направлением для дальнейшего изучения.

1.2 Типы возможных антагонистических взаимоотношений грибов рода *Alternaria* и насекомых

Среди возбудителей болезней растений, подавляющее количество видов относится к фитопатогенным грибам (более 80 %). Высокие потери урожая возделываемых культур привели к более подробному изучению жизненного цикла развития, путей и способов распространения фитопатогенных грибов и динамики инфекционного процесса. Изучение фитопатогенных грибов сформировало не только знания об эпидемиологии и факторах, способствующих возникновению инфекционных заболеваний, но и привело к разработке эффективных мер контроля и профилактики многих болезней растений. Однако, в последнее время возник интерес в изучении формирования разнообразных форм взаимоотношений фитопатогенных грибов и биологических объектов, выходящих за рамки традиционной модели «растение - фитопатоген». Исследования в данном направлении позволят сформировать представления об эволюции фитопатогенных грибов и действии их вторичных метаболитов в условиях сложных экологических взаимодействий и биологической безопасности (Plant–insect–pathogen ..., 2017).

Взаимодействие насекомых-фитофагов с фитопатогенными грибами на общем растительном субстрате приводит к формированию симбиотических и антагонистических ассоциаций между ними. В свою очередь антагонистические взаимоотношения могут привести как к летальным, так и к нелетальным последствиям для насекомых. В таких формах взаимоотношений между насекомыми и грибами могут принимать участие вторичные метаболиты фитопатогена (Биология взаимоотношений ..., 2014).

Среди грибов рода *Alternaria* известны виды, способные поражать насекомых. Известно, что *Alternaria infectoria* E.G. Simmons токсична для инжировой восковой ложнощитовки *Ceroplastes rusci* (L.) (Homoptera: Coccidae) на всех стадиях развития насекомого. Гриб не только вызывал смертность, но и снижал плодовитость насекомых. Через три дня после обработки патогеном у 30 % обработанных яиц наблюдалось обесцвечивание, а у 17 % усыхание, но без смертности. Через две недели после обработки 91 % яиц были поражены грибом, смертность составила 74 %. *A. infectoria* была впервые обнаружена на восковой ложнощитовке и представлена как энтомопатоген (Shabana, Ragab, 1997).

Известно, что мелкоспоровые виды *Alternaria* способны инфицировать в разной степени различные виды тлей и вызывать их микозы, но при этом не поражать насекомых из отряда двукрылых (*Drosophila melanogaster* (Meigen) и *Ceratitis capitata* (Wied.)). Различия в

чувствительности к инфекции среди отобранных видов тлей были заметны на первые сутки после обработки, на третьи сутки эксперимента результаты заражения нивелировались и достигли 100 % смертности пяти видов тли (*Anuraphis nerii*, *Aphis pisum*, *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion fragariae*, *Uroleucon* sp.) (*Alternaria alternata*, a new ..., 2001).

Показано инсектицидное действие метаболитов фитопатогена *A. alternata* в отношении личинок *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuoidea). Этилацетатный экстракт из культуры гриба вызывал смертность гусениц хлопковой совки; снижение концентрации сопровождалось угнетением их развития - увеличением периода стадии формирования куколки, снижением плодовитости насекомых и выживаемости мужских и женских особей, а также морфологической деформацией крыльев насекомых. С увеличением концентрации экстракта смертность насекомых увеличивалась, ЛД₅₀ составила 18.6 мкл/мл корма (*Antifeedent and toxic ...*, 2013).

Инсектицидное действие фитопатогена *A. alternata* наблюдалось и в отношении божьей коровки *Henosepilachna vigintioctopunctata* (F.) (Coleoptera: Coccinellidae), питающейся инфицированными листьями растения *W. somnifera* из семейства пасленовых. Питание пораженными листьями вызывало не только гибель и задержку развития насекомых, но и морфологическую деформацию личинок (*Effect of Alternaria ...*, 2012). Показано инсектицидное действие фитопатогена *A. brassicicola* на капустного листоеда *Phaedon cochleariae* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae): жуки избегали питания пораженными листьями, однако смертность насекомых достигала 100 % при их употреблении (Tack, Dicke, 2013).

Таким образом, антагонистические взаимоотношения оказывают однонаправленное действие с летальным и нелетальным эффектом для насекомых. В обоих случаях эта форма взаимодействия осуществляется с помощью вторичных метаболитов грибов. Анализ литературных данных показал, что исследования антагонистических взаимоотношений фитопатогенных грибов рода *Alternaria* и насекомых, а также выявление вторичных метаболитов с инсектицидными свойствами, единичны.

1.3 Тенуазоновая кислота как модельный токсин для изучения энтомотоксических свойств грибных метаболитов

Химическая структура тетрамовой кислоты (2,4-пирролидиндион) известна с начала двадцатого века (Royles, 1995). Данное соединение вызывает большой исследовательский интерес, так как содержит ряд структурных элементов для введения разнообразных функциональных групп и синтеза новых гетероциклических систем (Функциональные производные ..., 2007). Очевидная причина изучения тетрамовой кислоты и ее аналогов заключалась в их биологической активности широкого спектра действия (антибиотическая,

противовирусная, цитотоксическая, фунгицидная, а также токсичность в отношении теплокровных) (Mo et al., 2014). Благодаря своей сложной структуре и высокой биологической активности тетрамовая кислота природного происхождения является перспективным объектом для биосинтеза новых соединений в биологических, химических и фармацевтических областях.

Основными источниками тетрамовой кислоты являются различные виды микроорганизмов. Эти соединения являются вторичными метаболитами фитопатогенных (*Alternaria*, *Pyricularia*, *Phoma* и др.), почвенных (*Aspergillus*, *Penicillium* и др.), морских (*Fusarium*, *Trichobotrys*, *Alternaria*, *Didymella*, *Phoma* и др.) грибов, бактерий (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* и др.), цианобактерий (*Myxococcus*, *Oscillatoria*, *Symploca*, *Caldwellia*, *Schizothrix* и др.), и актиномицетов (*Streptomyces*, *Actinobolus*, *Actinomyces*, *Micromonospora*) (The biological and ..., 2020). Однако основными продуцентами тетрамовой кислоты и ее аналогов являются именно грибы.

Одним из самых распространенных производных тетрамовой кислоты, образуемых грибами рода *Alternaria*, является тетуазоновая кислота. Впервые выделенная из фильтрата культуры *A. tenui* в 1957 году (Tenuazonic acid ..., 2021), позже была обнаружена в экстракте из культурального фильтрата *Ulocladium* sp. как новый индуктор морфогенеза и образования красных пигментов, таких как фузарубин *Fusarium culmorum* ((-)-Terpestacin and ..., 2001) в экстрактах *A. brassicicola* и *A. raphani*. Она проявляла ингибирующую антимикробную активность в отношении бактерии *Paenibacillus larvae*, вызывающей смертельное заболевание личинок медоносных пчёл. Концентрация тетуазоновой кислоты при ингибировании бактерий составила 32 мкг/мл, что сопоставимо с активностью антибиотика окситетрациклина (L-Tenuazonic acid ..., 2004). Данное соединение является основным микотоксином и обладает выраженной токсичностью для теплокровных и доминирующим контаминантом сельскохозяйственной продукции (Определение содержания ..., 2017). Тетуазоновая кислота проявляет фитотоксические свойства и была запатентована в качестве природного неселективного гербицида (Patent № 2008/0280761 USA ..., 2008). По классификации токсичности пестицидов она относится к среднетоксичным, что позволяет использовать ее в качестве послевсходового гербицида (Patent № 2004290516 ..., 2005; Chen, Qiang, 2017). Встречаются работы, посвященные синтезу производных тетрамовых кислот с целью увеличения их антибиотической и фунгицидной активности (Synthesis and bioactivity ..., 2014; Synthesis and investigation ..., 2017; Amino acid-oriented ..., 2019).

Тетуазоновая кислота и ее синтетические производные рассматриваются как потенциальные инсектицидные соединения. Производные тетуазоновой кислоты с двумя фенольными группами и хлором при 4-ом атоме углерода были более токсичны относительно исходного соединения в отношении *L. sericata* и *S. granarius* ЛД₅₀, которых составила 50 мкг/мл

и 23 мкг/мл, соответственно (Insecticidal activity ..., 1975). Ионы металла в составе хелатного комплекса тенуазоновой кислоты позволяют увеличить стабильность соединения. Например, ЛД₅₀ натриевой соли тенуазоновой кислоты в тесте на ларвицид составила 120 мкг/мл. Синтетический аналог, полученный из DL-изолейцина, показал такой же уровень активности. (Cole, Rolinson, 1972). Известно, что тенуазоновая кислота была выделена в виде смеси комплексов кальция и магния, Ca (II) и Mg (II), из *Phoma sorghina* (Schobert, Schlenk, 2008).

Производные тетрамовой кислоты составляют важный класс азотсодержащих гетероциклов с 2,4-пирролидиндионным структурным фрагментом с координационными возможностями для синтеза как простых, так и сложных по структуре производных. В первую очередь это синтез металл-хелатных комплексов через атом кислорода экзоциклической карбонильной группы и кетонной части положения 4 или 2 в соответствии с *E/Z*-изомера (Athanasellis et al., 2010). Реакционным центром тетрамовой кислоты является кетонная группа в положении 4 и 2 активных метиленовых звена в положении 3 и 5. Другой особенностью химической структуры этих соединений является возможность циклических кетонов конденсироваться по первичной аминогруппе для построения гетероциклических систем (Функциональные производные ..., 2007). Модификации химической структуры тетрамовой кислоты и получение ее производных способны увеличить и усилить широкий спектр биологической активности, включая антибактериальную, противовирусную, фунгицидную, цитотоксическую, микотоксическую, а также ингибирование клеточного цикла (Singh et al., 2006). Различными примерами производных тетрамовой кислоты, природного происхождения, являются стрептолидигин, ингибирующий РНК-полимеразу (Inhibition of bacterial ..., 2005), мелофлиновые соединения, проявившие антимикробную активность (Aoki et al., 2000), эквисетин и его гомолог трихосетин, обладающие ингибирующей активностью в отношении грамположительных бактерий (Characterization of the *Fusarium* ..., 1989; Trichosetin, a novel ..., 2002). Кроме того, компанией Bayer CropScience был запатентован ряд производных в качестве ингредиентов для фунгицидного и гербицидного применения (Patent №2008/0280761 USA..., 2008).

Первые синтетические производные тетрамовой кислоты с сильными инсектицидными и акарицидными действиями были получены компанией Bayer CropScience в 1990-х годах. Одним из таких активных производных является *спиродиклофен* (рисунок 5.1), акарицид с высокой активностью против растительных клещей (*Panonychus*, *Tetranychus*, *Phyllocoptruta*, *Brevipalpus* и *Aculus*) при нормах расхода 50 — 200 г/га. Он может использоваться для борьбы с популяциями клещей на citrusовых и косточковых культурах, яблонях, виноградной лозе и арахисе (Bretschneider et al., 2012). Контактную инсектицидную активность спиродиклофена в отношении насекомых-энтомофагов оценивали путем опрыскивания. Данный акарицид был не

токсичен для личинок двух видов тест-насекомого *Coccinella septempunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) (L2 и L4). Смертность личинок через 7 дней после обработки составила 9 % и 5 %, соответственно (Olszak, Sekrecka, 2008).

Другое производное тетрамовой кислоты *спиромезифен* (рисунок 5.2) был разработан для борьбы с клещами и белокрылкой и применялся для защиты овощных культур, хлопка, фруктовых и декоративных растений (Bretschneider et al., 2012). Он проявлял высокую эффективность по сравнению с инсектицидами и, важно отметить, был не токсичен для шмелей. Определение его токсичности по 10 показателям (смертности личинок, куколок, взрослых особей, частота лета, опылительная активность и др.) не выявило различий между обработанными и необработанными вариантами насекомых (Effects of Oberon® ..., 2005).

Производное тетрамовой кислоты *спиротетрамат* (рисунок 5.3) – инсектицид, который является ингибитором биосинтеза липидов. Спиротетрамат применяют против вредителя цитрусовых культур из семейства щитовок *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae) и других сосущих насекомых, таких как тля, мучнистые червецы, белокрылка и некоторых трипсов (Grafton-Cardwell, Reagan, 2007; Grafton-Cardwell, Scott, 2008). Действие инсектицида изучали в отношении взрослых особей и личинок *Cryptolaemus montrouzieri* (Muls.) (Coleoptera: Coccinellidae) двумя методами: путем обработки взрослых насекомых и личинок опрыскиванием и внесения действующего вещества в корм насекомых. В результате опытов спиротетрамат был нетоксичен ни для личинок, ни для взрослых особей *C. montrouzieri* в двух вариантах биотеста. Побочный эффект на жизненный цикл, плодовитость и выживаемость потомства также отсутствовал. В отличие от хлорпирифоса, который влиял на плодовитость и выживаемость потомства, и пирипроксифена, который обладал острой токсичностью для куколок *C. montrouzieri* (Lethal and sublethal ..., 2013). Большинство производных тетрамовой кислоты были признаны нетоксичными для насекомых-энтомофагов (Singh et al., 2006).

Эти соединения обладают широким спектром и механизмом действия, а именно ингибируют ацетил-КоА-карбоксилазу, которая играет фундаментальную роль в метаболизме жирных кислот насекомых (Bretschneider et al., 2012).

Недавние исследования выявили популяцию табачной белокрылки *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) с высоким уровнем резистентности к спиромезифену и спиротетрамату (Spiromesifen and spirotetramat ..., 2019). Резистентность насекомых к коммерческим кетоенольным инсектицидам была обусловлена мутацией A2083V в ацетил-КоА карбоксилазе (Identification and functional ..., 2020).

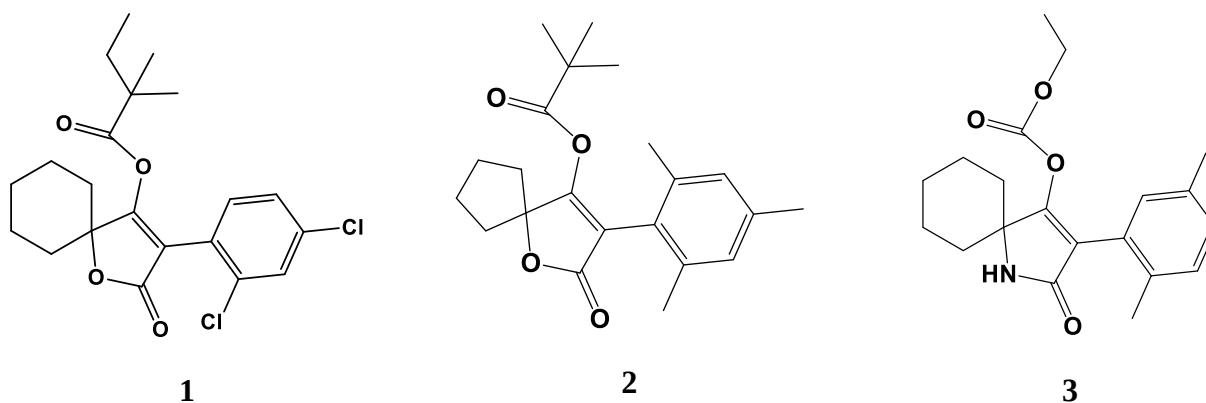


Рисунок 5 – Синтетические производные тетрамовой кислоты с инсектицидным и акарицидным действиями

1 – спиродиклофен, 2 – спиромезифен, 3 – спиротетрамат

В заключение можно отметить, что повсеместное использование синтетических инсектицидов в течение многих лет приводит к повышению устойчивости насекомых к действующим веществам, в связи с этим необходим постоянный поиск стабильных соединений с высокой биологической активностью. Одним из способов решения этой проблемы является поиск инсектицидных молекул природного происхождения, источником которых могут являться грибы различной экологической группы, в частности фитопатогены. С помощью увеличения объёмов скрининга грибов как продуцентов биологически активных соединений можно расширить число веществ с инсектицидными свойствами. Дальнейшее получение синтетических производных на основе молекулы природного происхождения позволит повысить эффективность действия вещества и расширить спектр восприимчивых насекомых (Берестецкий и др., 2021).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Штаммы гриба

Для проведения исследования были выбраны 9 штаммов трех видов грибов рода *Alternaria*: *A. japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima* (перечень штаммов представлен в таблице 1). Грибы *A. japonica* и *A. tenuissima* были предоставлены Ф.Б. Ганибаллом из рабочей коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии; штаммы *A. sonchi* были выбраны из коллекции чистых культур лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ФГБНУ ВИЗР. Все культуры хранили на скошенном картофельно-глюкозном агаре при температуре 4°C.

Таблица 1 – Грибы рода *Alternaria*, изученные в ходе исследования

Штамм	Видовое название	Субстрат (страна, регион)
181-011	<i>Alternaria japonica</i> Yoshiib	плод редьки (–)
239-011		семена редиса (Россия, Московская обл.)
244-011		семена редиса (Дагестан, р-н Вавилово)
259-011		семена капусты (–)
И 5.4	<i>Alternaria sonchi</i> J.J. Davis	листья осота (Россия, Иркутская обл.)
Гер. 8.2		листья осота (Германия)
S- 102		листья осота (Россия, Краснодарский край)
S- 145		листья осота (Россия, Вологодская обл.)
253-011	<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	плод редьки (Дагестан, р-н Вавилово)

«–» — географическое происхождение штамма неизвестно

2.1.2 Тест-организмы

Насекомые и наукообразные. В экспериментах использовали следующие виды лабораторной популяции членистоногих:

1 – обыкновенной злаковой тли *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae). Насекомых содержали на проростках пшеницы при температуре 23±2°C и продолжительностью светового дня 16 часов.

2 – гусеницы большой вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (IV–V возраста, весом 120 ± 4.8 мг/гусеницу). Насекомых содержали в пластиковых контейнерах (1.5 л) при температуре 30°C на искусственной питательной среде следующего состава: кукурузная крупа (90 г), пшеничная мука (40 г), дрожжи (10 г), сухое молоко (50 г), воск (50г), глицерин (50 г), вода (50 мл) (Тамарина, 1987).

3 – личинок жука-чернотелки *Zophobas morio* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae) (IV–V возраста, весом 140 ± 8 мг/личинку) содержали в пластиковых контейнерах (1.5 л) при температуре 30°C на влажном корме (морковь, кабачок, яблоко).

4 – имаго домового сверчка *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera: Gryllidae) содержали в пластиковых контейнерах (1.5 л) с картонными ячейками при температуре 30°C, влажностью воздуха 60–70 % и продолжительностью светового дня 16 часов на влажном корме (морковь, кабачок, яблоко).

5 – обыкновенного паутинного клеща *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) разводили на растениях фасоли в фазе 1–2 настоящих листьев; содержали в термостатированном помещении при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и продолжительностью светового дня 16–18 часов.

Растения. В экспериментах использовали хорошо развитые листья осота полевого *Sonchus arvensis* из семейства *Asteraceae*, пшеницы *Triticum aestivum* из семейства *Gramineae*, редиса *Raphanus sativus* из семейства *Brassicaceae*. Растения выращивали в условиях искусственного освещения (14 дней) и переменной температуры (24°C днем и 20°C ночью).

Микроорганизмы. Антимикробную активность определяли с использованием грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* NCTC 104000 и дрожжеподобного гриба *Candida albicans* NCTC 104000. Культуры микроорганизмов инкубировали в течение 24 часов при температуре 35°C и хранили на агаризованной картофельно-глюкозной среде при температуре 4°C.

Культура клеток. Для оценки цитотоксической активности использовали:

1 – культуру клеток Sf9 - клональный изолят клеток кукурузной лиственной совки *Spodoptera frugiperda* (Smith). Культуру клеток культивировали в матрацах на питательной среде sf-900 III при температуре 28°C, и хранили в жидком азоте.

2 – культуру инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* (7-дневного возраста) поддерживали в комнатных условиях на дистиллированной воде с добавлением 10 %-ой минеральной среды Лозина-Лозинского, в качестве корма использовали хлебопекарные дрожжи (1 г, «Саф-момент»).

Энтомопатогенный гриб. В экспериментах использовали культуру гриба *Beauveria bassiana* (изолят Sar-31) из коллекции микроорганизмов Института систематики и экологии

животных СО РАН. Для получения конидиальной массы гриба культуру инкубировали на автоклавированной пшённой крупе в чашках Петри (диаметр 150 мм) в термостате при 24°C в течение 3–3.5 недель. Полученную биомассу гриба сушили 2 недели при комнатной температуре и перемалывали с помощью блендера. Титр конидий определяли методом серийных разведений и последующим высевом на агаризованной питательной среде Чапека (Влияние различных..., 2010).

2.2 Видовая идентификация

2.2.1 Изучение морфологических признаков

Для изучения морфологических признаков, штаммы выращивали на двух стандартных агаризованных средах: *KMA* (картофельно-морковная) и *YES*. Инокулированные чашки Петри инкубировали при температуре 24°C при постоянном освещении лампами дневного света (4 повторности) и при постоянной темноте (4 повторности) в течение 7 суток. Оценку макроморфологических (диаметр и морфология колоний) и микроморфологических признаков (длина и ширина конидий, наличие хламидоспор) проводили на 7 сутки роста колоний по методическому пособию Ф.Б. Ганнибала (Методическое пособие ..., 2011). Таксономически значимые признаки конидий анализировали с помощью метода световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM2500 (Германия).

2.2.2 Молекулярно-генетические методы

Экстракция ДНК. Выделение ДНК из воздушного мицелия чистых культур осуществляли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific», Литва) как описано ранее (Characterization and identification ..., 2018).

Амплификация ДНК. Для секвенирования таксономически информативных локусов и идентификации альтернариоидных грибов были амплифицированы: область внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-локус) и участки гена фактора элонгации *Alt 1α* (EF1α) с соответствующими парами праймеров ITS1/ITS4 и EF1-728f/EF1-986r. В состав смеси для ПЦР входили DreamTaq™ Green Master Mix (2X) («Thermo Scientific», США), по 5 пмоль каждого праймера и 1 мкл препарата ДНК. Очистку продуктов ПЦР из агарозного геля осуществляли с помощью набора diaGene («Диаэм», Россия). Нуклеотидные последовательности определяли на секвенаторе ABIPrism 3500 («Applied Biosystems-Hitachi», США) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («ABI», США).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Выравнивание и редактирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Advance 10 («Thermo Fisher Scientific», США) и в свободной программе BioEdit. Полученные сиквенсы были депонированы в базу данных NCBI и сопоставлены с имеющимися в ней последовательностями нуклеотидов грибов.

2. 3 Анализ экстрактов из культур *Alternaria japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*, полученных на различных жидких и твердых питательных средах

Посевной материал инкубировали на чашках Петри с агаризованной картофельно-глюкозной питательной средой при температуре 24°C в течение 14 дней. Питательную среду инокулировали агаровыми блоками (диаметр 5 мм), вырезанными из периферии посевной культуры.

Глубинное культивирование на различных питательных средах. В качестве питательных сред были использованы:

— две жидкие синтетические среды с использованием неорганического азота и глюкозы/сахарозы состава (г/л): *ЧАВ* (среда Чапека с витаминами) (20 г глюкозы, 2 г NaNO_3 , 1 г KH_2PO_4 , 0.5 г MgSO_4 , 0.5 г KCl , 100 мкг тиамина, 5 мкг биотина) и *МИД* состава 0.45 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.15 г KNO_3 , 0.15 г KCl , 0.03 г NaH_2PO_4 , 45 г сахарозы, 7.5 г виннокислого аммония, 0.003 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.0375 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.003 г H_3BO_3 , 0.015 г KJ , 0.75 г MnSO_4 , 5.25 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$);

— две полусинтетические жидкие среды с природными источниками азота и углерода состава (г/л): *ДМГ* (дрожжевая мальтозно-глюкозная среда) (20 г глюкозы; 10 г мальтозного экстракта; 4 г дрожжевого экстракта) и среда *Сабуро* (10 г пептона; 40 г глюкозы).

В автоклавированные среды (объемом 300 мл в колбе на 1 л) вносили посевной материал и культивировали в течение 3х недель при переменном освещении и температуре 24°C днем и 20°C ночью.

Культивирование на твердом субстрате. В качестве твердого субстрата была использована перловая крупа. Для приготовления субстрата в конические колбы вместимостью 1000 мл помещали 150 г крупы, добавляли 70 мл дистиллированной воды и автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. Гриб культивировали в течение 3х недель при переменном освещении и температуре 24°C днем и 20°C ночью. Колбы встряхивали каждые 3 дня для предотвращения комкования субстрата.

Глубинное культивирование *A. tenuissima* 253-011 в биореакторе проводили на жидкой питательной среде ДМГ объемом 4.75 л. Посевной материал, полученный путем культивирования штамма в 100 мл среды (в колбах вместимостью 500 мл) на качалке (180 об/мин при температуре 24°C) в течение 7-ми дней, вносили в стеклянный биореактор фирмы Applikon Biotechnology (Голландия) с рабочим объемом 7.0 л. Биореактор оснащен системой управления процессами ez-Control (сенсоры pH, температуры, концентрации растворенного кислорода и пены) и программным обеспечением BioXpert. Параметры ферментации: скорость подачи воздуха 1.5 л/мин, температура 24°C, скорость перемешивания 200 об/мин в течение 2 суток, затем 400 об/мин до завершения процесса ферментации; уровень pH не поддерживался. Пеногаситель (растительное масло, 1% об.) вводили в среду до посева гриба. Культивировали в течение 7 дней.

2. 4 Выделение и очистка вторичных метаболитов из культур *Alternaria japonica*, *A. sonchi*, *A. tenuissima*, полученных на различных жидких и твердых питательных средах

Выделение различных экзогенных метаболитов (ЭкзоМ) проводили методом жидкостной экстракции из культуральной жидкости (КЖ) растворителями различной полярности. Фракцию неполярных экзометаболитов (**ЭкзоНМ**) получали из КЖ, предварительно доведённой до значения pH 7, путем экстракции двумя порциями хлористого метилена объёмом 300 мл (соотношение экстрагент к КЖ 1:1 об/об). Фракцию экзометаболитов средней полярности (**ЭкзоПМ**) проводили из КЖ, доведённой до значения pH 3, путем экстракции двумя порциями этилацетата (300 мл). Органические фазы обезвоживали, пропуская через воронку с безводным сернокислым натрием, упаривали на роторном испарителе до постоянного веса и хранили при 4°C.

Выделение различных эндогенных метаболитов (ЭндоМ) проводили из сухого измельченного мицелия (блендер Braun 4191-MQ5235WH, Румыния) путем последовательной экстракции гексаном и этилацетатом (при соотношении экстрагента к мицелию 10:1 об/г). Экстракцию проводили в УЗВ-2.8 («Сапфир», Россия) в течение 10 мин при 30°C. Экстракты отделяли от мицелия с помощью фильтрования, упаривали до постоянного веса и хранили при 4°C.

Выделение метаболитов из твердофазной культуры. Высушенный измельченный колонизированный субстрат 2 раза экстрагировали 50 %-ым водным раствором ацетона (300 мл на 100 г субстрата) в течение 10 минут в УЗ-ванне, как описано выше. Экстракты отделяли от субстрата с помощью фильтрования, упаривали ацетон и водный слой использовали для выделения метаболитов методом жидкостной экстракции. Неполярные метаболиты

экстрагировали гексаном (соотношение экстрагента к водной фазе 1:1 об/об) в двух повторностях. Метаболиты средней полярности экстрагировали этилацетатом (соотношение экстрагента к водной фазе 1:1 об/об) в двух повторностях. Экстракты объединяли, обезвоживали, упаривали досуха и хранили при 4°C.

Выделение тенуазоновой кислоты из *A. tenuissima* 253-011 проводили из КЖ, полученной при культивировании штамма в биореакторе. Фракцию метаболитов (1272 мг), полученную путем экстракции этилацетатом (как описано выше), фракционировали с помощью гель-фильтрации на сорбенте Bio-beads SX-8 (колонка 300x50 мм, Bio-Rad, США) в изократическом режиме в системе хлористый метилен: этилацетат: муравьиная кислота (49.9 : 49.9 : 0.2 об/об) при скорости потока 5 мл/мин. Идентификацию тенуазоновой кислоты проводили методом ВЭЖХ по данным УФ спектра (с использованием диодноматричного детектора (Waters, США)). Фракцию, содержащую тенуазоновую кислоту (890 мг), повторно фракционировали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на колонке Chromabond C18ec (Macherey-Nagel, Германия); масса сорбента 10 г, зернение 45 мкм, размер пор 60 Å в ступенчатом градиенте метанол: 0.1% муравьиная кислота (10 : 25 : 50 : 75 : 100 % об/об). Идентификацию тенуазоновой кислоты проводили по данным УФ спектра. В результате получили фракцию (775 мг) с содержанием тенуазоновой кислоты. Финальную очистку тенуазоновой кислоты проводили методом 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). Размеры колонки 19×250 мм, зернение 5 мкм, размер пор 135 Å, скорость потока 24 мл/мин, детектирование при длине волны λ 272 нм. Время удерживания тенуазоновой кислоты t_R 11.2 мин. В результате было получено 475 мг тенуазоновой кислоты в виде желтого масла. Идентификацию тенуазоновой кислоты проводили методами ЯМР и ESIMS (методом ВЭЖХ/МС).

УФ (метанол; 0.1% FA) λ_{max} 275 нм;

Спектры 1H и ^{13}C ЯМР приведены в таблице 4; ESIMS m/z 198.094 $[M+H]^+$.

Токсины, выделенные из *Alternaria*

Образец альтернариола был ранее выделен из культуры гриба *A. simmonsii* S-142 и предоставлен сотрудником лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР Фроловой Г.М. Образцы диверсолонового эфира и хлормонилиниковых кислот А и Б 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.

2.5 Приборы и оборудование для выделения индивидуальных соединений

^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 400 Ultrashield Plus (Германия) на частотах 400.1 и 100.6 МГц, соответственно. В качестве растворителей использовали дейтерированный хлороформ. Получены двумерные ЯМР-спектры ближнего взаимодействия ^1H - ^{13}C HMQC и дальнего взаимодействия ^1H - ^{13}C HMBC. УФ-спектры получены с помощью диодноматричного детектора (Waters, США) в системе ацетонитрил – 0.1 % муравьиная кислота.

Масс-спектры определяли методом ВЭЖХ/МС с использованием хроматографической системы Acella с диодноматричным детектором и тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access TM (Thermo Scientific, США). Использовали колонку Zorbax SB-C18 (размеры колонки 2.1×150 мм, зернение 1.8 мкм, Agilent), скорость потока 250 мкл/мин в градиентном режиме ацетонитрил - 0.1 % муравьиная кислота 1–95 %. Режим ионизации электрораспыление (ESIMS), энергия столкновения – 35 В, энергия ионизации – 70 эВ, растворитель ацетонитрил – 0.1 % муравьиная кислота, диапазон сканирования 50-1000 m/z с частотой 0.8 секунды в режиме положительно заряженных ионов. Хроматограммы анализировали с помощью открытой программы MZmine 2.4.

Препаративную ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы, состоящей из насоса (Quaternary Gradient Module 2545), детектора (UV/Visible Detector 2489) и коллектора фракций (Fraction Collector III) (Waters, США). Очистку проводили на колонке XBridge Prep, фаза C18, зернение 5 мкм, размеры колонки 250×19 мм (Waters, США), скорость потока 24 мл/мин.

2. 6 Определение биологической активности исследуемых метаболитов

2.6.1. Энмотоксическая активность

Контактно-кишечное действие фракций метаболитов и индивидуальных соединений оценивали на злаковой тле *Schizaphis graminum* (Rond.) в концентрациях 5 мг/мл и 1 мг/мл (в 5%-ом водном этаноле), соответственно. Листья пшеницы, обработанные раствором метаболитов методом окунания, и диски фильтровальной бумаги (диаметром 40 мм) помещали на дно чашки Петри. Для создания влажности, на крышки помещали влажные фильтровальные диски с 0.25 мл раствора на диск. В качестве контроля использовали 5%-ый водный раствор этанола. В

приготовленную таким образом чашку Петри сажали 20 особей имаго злаковой тли *S. graminum* и учет живых и погибших особей проводили через 24 часа. Каждый вариант включал 4 повторности (Insecticidal effects of ..., 2012).

Эффективность исследуемых экстрактов и индивидуальных соединений с учетом контроля вычисляли по формуле Эббота (Abbott, 1925):

$$\mathcal{E} = (C_o - C_k) / (100 - C_k) \times 100\%, \quad (1)$$

где C_o – смертность в опыте;

C_k – смертность в контроле.

Пероральное действие оценивали на личинках *Galleria mellonella* (L.) и *Zophobas morio* (F.), помещая их в стерильную чашку Петри (диаметр 90 мм) с 2 г искусственного корма и выдерживая их в термостате при отсутствии освещения и постоянной температуре 30°C (Davis, Schiefer, 1982). Токсины растворяли в ацетоне и вносили в искусственный корм насекомых в пределах концентраций 0.25–25 мг/г. Растворитель испаряли при комнатной температуре в течение 45 минут. Контрольные варианты корма обрабатывали только растворителем. Весовой контроль и смертность личинок регистрировали ежедневно в течение 10 дней. Опыт проводили в четырех повторностях (5 личинок на повторность).

Остро-контактное действие экстрактов и индивидуальных соединений определяли путем инъекции раствора в гемоцель личинок насекомых, используя микрошприц (Hamilton, Швейцария, объем 10 мкл) (Tsai et al., 2016; *Galleria mellonella* larvae ..., 2018). Для проведения эксперимента 10 мкл экстракта в концентрации 1 мг/мл вводили в гемоцель тест-насекомого (10 мкг/личинку). Для оценки действия индивидуального соединения, 10 мкл токсина в концентрациях 1, 2 и 5 мг/мл вводили в гемоцель тест-насекомого (10 мкг/личинку, 20 мкг/личинку и 50 мкг/личинку, соответственно).

Антифидантная активность тенуазоновой кислоты. Эксперимент проводили на имаго домового сверчка *Acheta domesticus* (L.), личинках *G. mellonella* и *Z. morio* по стандартной методике (Davis, Schiefer, 1982). Тенуазоновую кислоту растворяли в ацетоне и вносили в искусственный корм насекомых в пределах концентраций 0.25–25 мг/г. Растворитель испаряли при комнатной температуре в течение 45 минут. Контрольные варианты корма обрабатывали только растворителем. Личинки *G. mellonella* и *Z. morio* помещали в чашки Петри (диаметр 90 мм), сверчков *A. domesticus* в пластиковые контейнеры (1.5 л) с кормом и инкубировали, как описано выше. Опыт с *A. domesticus* проведен в четырех повторностях (10 имаго на повторность), с *G. mellonella* – в трех повторностях (10 гусениц на повторность), с *Z. morio* – в четырех

повторностях (5 личинок на повторность). Весовой контроль и смертность насекомых регистрировали ежедневно в течение 10 дней.

Акарицидная активность. Оценку контактного и овицидного действий тенуазоновой кислоты оценивали на обыкновенном паутинном клеще *Tetranychus urticae* Koch методом подсадки на обработанный субстрат. Эксперимент проводили на листовых дисках фасоли (диаметр 40 мм), которые в течение двух секунд обмакивали в 0.1–0.2 %-ном растворе тенуазоновой кислоты в 5 %-ном этаноле (Rincón et al., 2019). В качестве контроля использовали 5 %-ый водный раствор этанола. После испарения жидкости с поверхности обработанных листьев их помещали в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и заселяли молодыми самками паутинного клеща по 20 особей на каждую (5 повторностей). Через 1, 3, 7 суток после обработки учитывали смертность самок. Кроме того, на 7-е сутки после обработки подсчитывали количество родившихся личинок относительно контрольного варианта. В ряде экспериментов в качестве положительного контроля использовали боверицин (Sigma-Aldrich).

2.6.2. Фитотоксическая активность

Фитотоксичность оценивали методом надколотых листовых дисков (Выделение, идентификация ..., 2010) при заданной концентрации – 5 мг/мл для экстрактов и 2 мг/мл для индивидуальных веществ (в водном растворе 5 %-ого этанола). Учет симптомов (диаметр некроза на листовых дисках осота и редиса, длину некроза на отрезках листьев пшеницы) проводили через 48 ч инкубации при температуре 24°C и переменном искусственном освещении (12 ч в день). В качестве контроля использовали водный раствор 5 %-ого этанола.

2.6.3. Антибиотическая активность

Антимикробную активность оценивали диско-диффузионным методом (Методические указания ..., 2004) в концентрации экстрактов 500 мкг/диск, индивидуального соединения – 100 мкг/диск. Радиус зоны лизиса измеряли через 24 часа инкубации при 35°C.

2.6.4. Цитотоксическая активность

Цитотоксичность оценивали на клеточной линии Sf9 (ECACC89070101) клонального изолята клеток *Spodoptera frugiperda* (Smith). Образцы анализируемых соединений (10 мкл), растворенных в диметилсульфоксиде (ДМСО) в диапазоне концентраций от 10-100 мкг/мл, добавляли к 890 мкл свежей культуральной среды SF900II (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с 100 мкл суспензии активно растущих клеток (1×10^5 клеток/мл, жизнеспособность ≥ 90 %) в лунках 48-луночного планшета. Конечная концентрация растворителя составляла 1 %. В качестве контроля использовали 1 % раствор ДМСО. Клетки инкубировали 24 часа при 28°C. Гибель клеток определяли с помощью окрашивания 0.25 %-ным

раствором трипанового синего (Cytotoxicity against ..., 2003). Долю погибших (окрашенных) клеток определяли в отношении общего количества клеток в трёх полях зрения.

Токсичность в отношении культуры инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* оценивали согласно ГОСТ (Р 52337-2005). В 96-луночный планшет помещали 300 мкл культуры инфузорий в среде Лозина-Лозинского и 3 мкл раствора в тестируемых концентрациях - 10, 1 и 0.1 мг/мл для фракций метаболитов и 100 мкг/мл для индивидуального соединения. В контроле в культуру инфузорий добавляли 3 мкл ацетона. Планшет с растворами инкубировали при постоянном искусственном освещении и температуре 24° С. Учёт результатов эксперимента проводили через 3 минуты, 30 минут и 3 часа. Критерием для определения токсичности служило время от начала воздействия вещества до полной гибели простейших, которую констатировали на основании прекращения их движения.

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

2. 7 Изучение возможности токсинов вызывать иммуносупрессию гусениц *Galleria mellonella* (L.)

2.7.1 Влияние тенуазоновой кислоты на восприимчивость вошинной огневки к грибной инфекции пероральным методом

На каждый вариант тестируемого вещества брали 10 гусениц, опыт проводили в трех повторностях. Индивидуальные вещества (диверсолонный эфир, ДЭ; альтерналиол, АОН; хлормонилининовая кислота В, ХМК В; брассициколин А), выделенные ранее из культур *Alternaria* spp. и тенуазоновую кислоту (ТК), выделенную из *A. tenuissima*, тестировали в концентрации 1 мг/г искусственного корма для насекомых. При обработке корма ДЭ и АОН растворяли в метаноле и вносили по 450 мкл раствора в 2 г корма на вариант. ХМК В, ТК и брассициколин А растворяли в ацетоне и так же вносили по 450 мкл раствора в 2 г корма на вариант. Контроль ставили в двух вариантах растворителя: ацетон и метанол, в соответствующих количествах. Смену корма у гусениц проводили на четвертые сутки после обработки. Весовой контроль и смертность гусениц регистрировали ежедневно в течение 10 дней.

Подробное изучение влияния ТК на весовой контроль и смертность личинок изучали в концентрации вещества 0.025, 0.25, 1, 2.5, 25 мг/г корма.

При исследовании совместного влияния на насекомых тенуазоновой кислоты (пероральный метод) и энтомопатогенного гриба (перкутанный метод) каждую гусеницу

большой вощинной огневки *G. mellonella* погружали на 30 секунд в водно-твинную суспензию конидий *B. bassiana* (Sar-31) с концентрацией $1 \cdot 10^8$ конидий/мл, после чего личинок подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 20 с и помещали в чашки Петри (90 мм). Контрольные личинки *G. mellonella* обрабатывали водным раствором Tween 20 (0.03%), корм контрольных личинок обрабатывали ацетоном. Метод обработки искусственного корма гусениц тенуазоновой кислотой описан выше. Смертность личинок огневки *G. mellonella* от совместной обработки *B. bassiana* и тенуазоновой кислотой регистрировали ежедневно в течение 10 дней.

2.7.2 Уровень общего количества гемоцитов в гемолимфе гусениц *Galleria mellonella*

Уровень общего количества гемоцитов в гемолимфе гусениц оценивали через 24 и 48 ч после эксперимента. Для приготовления суспензии гемоцитов, гемолимфу собирали в пластиковые пробирки с охлаждаемым льдом антикоагулянтным буфером (62 mM NaCl, 100 mM глюкоза, 10 mM ЭДТА, 30 mM цитрат натрия, 3.26 mM лимонная кислота, pH 4.6) (Leonard et al., 1985). Гемолимфу центрифугировали 5 мин при 500 g. Полученный осадок ресуспендировали. Гемоциты промывали трижды холодным антикоагулянтом и один раз буфером HEPES (pH 7.2).

Для получения общего числа гемоцитов, суспензию гемоцитов готовили из 10 мкл гемолимфы и 30 мкл охлажденной (4°C) фенилтиомочевинной, содержащей антикоагулянт (0.4 %). Гемоциты подсчитывали с помощью гемоцитометра Нойбауэра.

Для подсчета смертности и распластывания гемоцитов в гемолимфе гусениц *G. mellonella*, суспензию клеток (10 мкл) наносили на предметное стекло в двух повторностях и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 40 минут. Гемоциты фиксировали в течение 5 мин глутаральдегидформальдегидом (2.5 % глутарового альдегида, 4 % формальдегида в 0.1 М натрий-фосфатном буфере pH 7.2). Процентное содержание мертвых гемоцитов и распластывание в каждом из слоев плотности определяли под микроскопом AxioSkop 40 Carl Zeiss (Германия) после окрашивания 0.25 % трипановым синим. Соотношение мертвых и распластанных гемоцитов определяли подсчетом клеток в 30 полях зрения на образце.

2.7.3 Активность фенолоксидаз (ФО)

Уровень ФО в гемолимфе гусениц *G. mellonella* оценивали через 24 и 48 ч после обработки. В качестве контрольных групп использовали не обработанные личинки насекомых. Гемолимфу (10 мкл) получали путем пункции кутикулы личинок, собирали в пластиковые пробирки с охлажденным 0.1 М натрий-фосфатным буфером (ФБ), pH 7.2 (10 мкл). Гемолимфу с ФБ центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g. Супернатант (30 мкл) добавляли к 200 мкл 10 mM 3.4-дигидроокси-L-фенилаланина (L-ДОФА) и инкубировали в течение 6 ч при 28°C. ФО активность оценивали по образованию меланина при длине волны 490 нм (Ashida,

Söderhäll, 1984). Активность ферментов выражали в единицах измерения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах гемолимфы определяли по методу М. Бредфорд (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Анализ проводили в трех повторностях, используя гемолимфу 3-х личинок в каждом образце.

2.7.4 Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) и неспецифических эстераз (ЭСТ)

Уровень ГСТ и ЭСТ в гемолимфе гусениц *G. mellonella* оценивали через 24 и 48 ч после обработки. К гемолимфе, полученной как описано выше, добавляли 4 мкг/мл фенилтиомочевины, для предотвращения меланизации гемолимфы. Гемолимфу с ФБ центрифугировали в течение 5 мин при 500 g и 4°C, плазму, свободную от клеток, использовали для определения активности ферментов и концентрации белка.

Активность ГСТ определяли по отношению к 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (ДТНБ) методом Хабига (Habig et al, 1974). Инкубацию образца гемолимфы (5 мкл) проводили в 200 мкл ФБ с 1 mM глутатиона и 1 mM ДТНБ при 28 ° C в течение 10 мин. Реакцию инициировали добавлением раствора ДНТБ в ацетоне. Концентрацию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, образующегося в результате реакции, определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Измерение активности ЭСТ проводили модифицированным методом (Prabhakaran, Kamble, 1995). К 5 мкл образца добавляли 200 мкл p-нитрофенилацетата и инкубировали 25 мин при 28°C. Активность ЭСТ определяли по образованию нитрофенила спектрофотометрически при длине волны 410 нм. Удельную активность ЭСТ и ГСТ выражали в единицах измерения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Анализ проводили в трех повторностях, используя гемолимфу 3-х личинок в каждом образце.

2.7.5 Анализ культивируемой микрофлоры среднего кишечника гусениц *Galleria mellonella*

После обработки гусениц тенуазоновой кислотой пероральным методом через 24 и 48 часов после опыта личинок поверхностно стерилизовали водным раствором 70 %-ого этанола и препарировали. Средний кишечник с содержимым извлекали в пробирку (5 средних кишечников на один образец) с 100 мкл холодного раствора 150 mM NaCl и немедленно гомогенизировали в один цикл в течение 3 секунд (условия были предварительно подобраны экспериментально на лабораторных штаммах) с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Берлин, Германия). Образцы разбавляли тем же раствором 150 mM NaCl в 10, 100 и 1000 раз. Аликвоту объемом 100 мкл инокулировали на поверхность

селективных питательных сред: – желчный эскулин-азидный агар для энтерококков (HiMedia, India); – эндо-агар для энтеробактерий (HiMedia, India) в чашки Петри (диаметром 90 мм). Культуры инкубировали в течение 48 ч при температуре 35 °С и подсчитывали колониеобразующие единицы (КОЕ). Количество КОЕ рассчитывали для каждой средней части кишечника.

2. 8 Статистическая обработка

Анализ данных проводили с использованием программ STATISTICA v. 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные по биологической активности анализировали с помощью дисперсионного анализа (Factorial ANOVA), достоверность отличий определяли с помощью критерия Фишера. Значения на графиках представлены как среднее арифметическое и его ошибка (SE). Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Данные экспериментов в отношении паутиного клеща *Tetranychus urticae* Koch были проанализированы с помощью ANOVA (MicroCalOrigin, version 3.01), средние значения сравнивали, используя тест Тьюки (Tukey's HSD). Статистическую значимость различий учитывали при $p < 0.05$. Синергетический эффект в смертности насекомых при совместном заражении тенуазоновой кислотой и грибом *Beauveria bassiana* Sar-31 был проанализирован на основе биномиального теста, который включал сравнение ожидаемого и наблюдаемого уровня смертности с использованием критерия χ^2 (Robertson, Preisler, 1992). Ожидаемая смертность при различных концентрациях ТК и *B. bassiana* была рассчитана по формуле

$$P_E = P_o + (1-P_o)(P_1) + (1-P_o)(1-P_1)(P_2), \quad (2)$$

где P_E – ожидаемая смертность от комбинации двух патогенов;

P_o – естественная (контрольная) смертность;

P_1 – смертность только от ТК;

P_2 – смертность только от *B. bassiana*.

Значения χ^2 рассчитывали по формуле

$$\chi^2 = (L_o - L_E)^2 / L_E + (D_o - D_E)^2 / D_E, \quad (3)$$

где L_o – наблюдаемое количество живых личинок;

L_E – ожидаемое число живых личинок;

D_o – наблюдаемое количество мертвых личинок;

D_E – ожидаемое число мертвых личинок.

Синергизм отмечали, если $\chi^2 > 3,84$ и $P_C > P_E$. P_C и P_E представляют наблюдаемую и ожидаемую смертность, от комбинированной обработки двух патогенов. Достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна — Уитни, также использовали непараметрический аналог двухфакторного дисперсионного анализа - тест Шейрера-Резе-Хейра (Scheirer et al., 1976).

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

3.1 Идентификация и физиолого-биохимические свойства штаммов

Работа проводилась с 9 штаммами рода *Alternaria*. Четыре штамма И 5.4, Гер.8.2, S-145, S-102 (таблица 1 п. 2.2.1) были идентифицированы ранее по локусу гена *Alt a1* и отнесены к виду *A. sonchi* (Характеристика евразийских ..., 2013). Пять штаммов из рабочей коллекции чистых культур лаборатории микологии и фитопатологии были ранее идентифицированы только по морфологическим признакам как *A. japonica*. Было установлено, что штамм 253-011 заметно отличался от других штаммов *A. japonica* по скорости роста колоний и комплексу вторичных метаболитов.

Наблюдали существенную вариабельность роста штаммов *Alternaria* spp. на агаризованных средах (таблица 2, рисунок 5). Штаммы *A. japonica* 181-011 и 244-011 отличались относительно медленным ростом на КМА (диаметр недельных колоний около 60 мм), тогда как штаммы 239-011, 259-011, 253-011 росли быстрее (диаметр недельных колоний около 70–75 мм). На среде YES рост колоний *A. japonica* (181-011, 239-011, 244-011 и 259-011) был более слабым (35–45 мм) по сравнению с *A. tenuissima* 253-011 (60 мм) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

На КМА цвет колоний, изученных *Alternaria* spp. варьировал от беловатого до серовато-оливкового, на YES – также имел желтоватые оттенки в центре колоний. Заметных различий между изученными штаммами не обнаружено. На КМА колонии штаммов 239-011, 259-011, 253-011 характеризовались хорошо развитым воздушным мицелием, тогда как периферия колоний медленно растущих штаммов 181-011 и 244-011 имела паутинистый слабо развитый воздушный мицелий. На среде YES воздушный мицелий изученных микромицетов был хорошо развит без существенных различий между штаммами (рисунок 6) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

В культуре на КМА конидии *A. japonica* (181-011, 239-011, 244-011 и 259-011) образовывали короткие цепочки (2–4 конидии) и были визуальнее крупнее (рисунок 6), чем конидии *A. tenuissima* 253-011, которые образовывали длинные цепочки конидий. Длина корпуса конидий, изученных *Alternaria* spp. варьировала в диапазоне 32–50 мкм, различия между штаммами были несущественными. Ширина корпуса конидий *A. japonica* (181-011, 239-011, 244-011 и 259-011) была примерно в 2 раза больше ширины корпуса конидий *A. tenuissima* 253-011 (таблица 2, рисунок 7). В воздушном и субстратном мицелии *A. japonica* (181-011, 239-011, 244-011 и 259-011) обнаружены хламидоспоры – округлые или вытянутые темноокрашенные клетки в виде

цепочек (рисунок 8), в культуре штамма 253-011 хламидоспоры не выявлены (таблица 2) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

Таблица 2 — Морфолого-культуральные признаки исследованных штаммов *Alternaria* spp.

Штамм	Диаметр 7-ми суточных колоний, мм		Размеры корпуса конидий, мкм		Наличие хламидоспор
	КМА	YES	длина	ширина	
MFP 181011 <i>A. japonica</i>	60±0.4 ⁴	39±0.4	49±12.3	21±5.4	+
MFP 239011 <i>A. japonica</i>	67±1.9	31±0.6	46±6.9	18±3.4	+
MFP 244011 <i>A. japonica</i>	59±2.0	35±1.7	39±8.2	17±3.6	+
MFP 259011 <i>A. japonica</i>	74±0.7	44±0.8	40±7.6	23±4.5	+
MFP 253011 <i>A. tenuissima</i>	78±0.4	59±0.7	32±6.6	9±1.2	-
<i>A. japonica</i> ¹	58-60 ¹		35-70 ²	18-24 ²	+
<i>A. tenuissima</i> ²	62-66 ³		20-45	8-12	-

примечание: ¹ – Nishikawa, Nakashima, 2020; ² – Методическое пособие по ..., 2011; ³ – Rahimloo, Ghosha, 2015

⁴ – здесь и далее в таблицах приведены средние значения со стандартным отклонением (p=0.05)

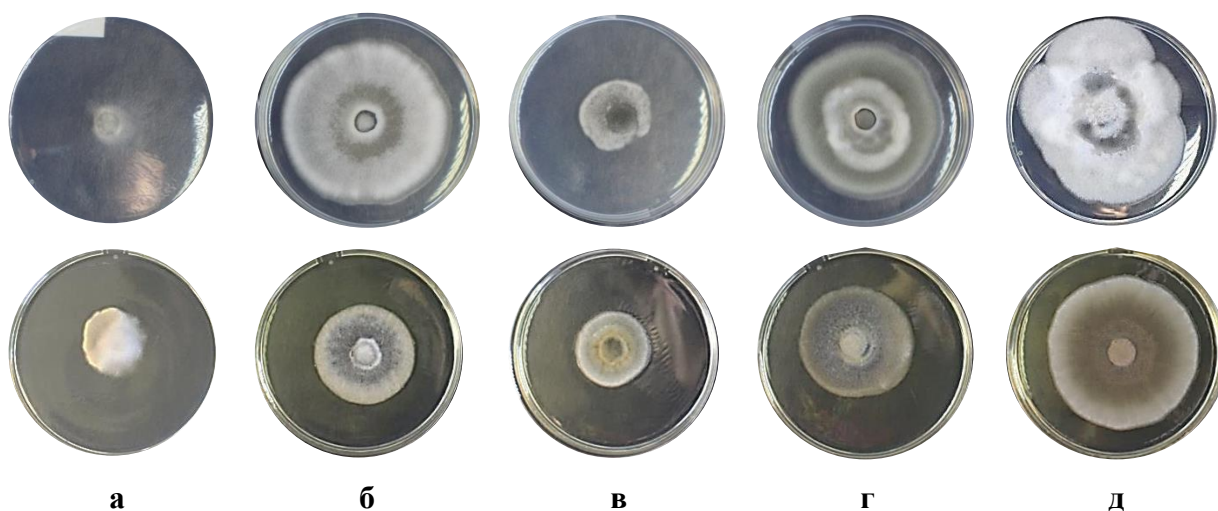


Рисунок 6 — Морфология 7-ми суточных колоний *A. japonica* (а – 181-011, б – 239-011, в – 244-011, г – 259-011) и *A. tenuissima* (д – 253-011) на КМА (верхний ряд) и YES (нижний ряд)

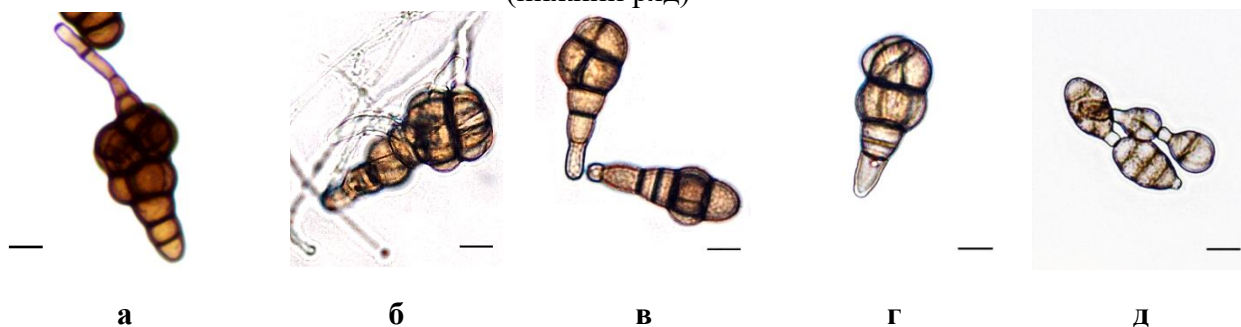


Рисунок 7 — Типичные конидии *A. japonica* (а – 181-011, б – 239-011, в – 244-011, г – 259-011) и *A. tenuissima* (д – 253-011) при культивировании на КМА. Шкала 10 мкм.



Рисунок 8 — Морфология хламидоспор *A. japonica* на КМА
(а – 181-011, б – 239-011, в – 244-011, г – 259-011). Шкала 10 мкм.

Для уточнения видовой принадлежности данных штаммов необходимо было провести идентификацию по морфолого-культуральным и молекулярным признакам. По локусу внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) методом максимального правдоподобия с бутстрэпподдержкой было построено филогенетическое древо, позволившее отнести изученные штаммы к 2 кладам (рисунок 9).

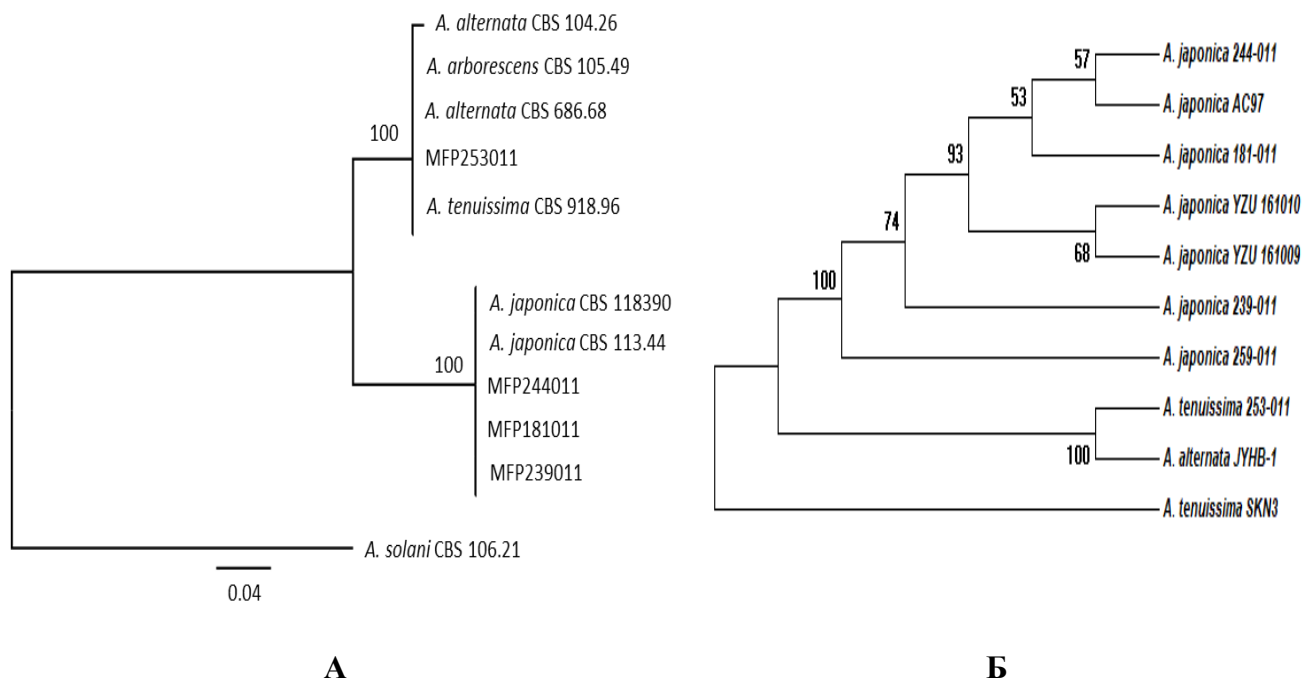


Рисунок 9 – Филогенетические деревья, построенные с применением метода максимального правдоподобия по локусам фактора элонгации трансляции (А) и внутренним транскрибируемым спейсерам (Б). Консенсусное древо построено на основе 500 реплик бутстрепа.

Сиквенсы участка EF1α штаммов 181-011, 239-011, 244-011 и 259-011 (таблица 2) были высокгомологичны (>99.7 %) референсным последовательностям *A. japonica*, включая типовой

штамм CBS 118390 (*Alternaria* redefined, 2013). Вторая клада включала только штамм 253-011, идентифицированный по размерам и форме конидий как *A. tenuissima*. В эту вторую кладу также входили референсные штаммы *A. alternata* (CBS 104.26, CBS 686.68), *A. arborescens* (CBS 105.49), *A. tenuissima* (CBS 918.96) (Дифференциация грибов *Alternaria* ..., 2019).

Таблица 3 — Происхождение штаммов *A. japonica* и *A. tenuissima*, использованных в работе и номера нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных NCBI

Штамм	Вид	Субстрат (регион)	Номер в NCBI (Бутстрэпподдержка)	
			ITS	EF1 α
MFP 181011	<i>A. japonica</i>	плод редьки (Московская область)	MT895504 (53)	MT904295 (100)
MFP 239011	<i>A. japonica</i>	семена редиса (место сбора неизвестно)	MT895505 (74)	MT904296 (100)
MFP 244011	<i>A. japonica</i>	семена редиса (место сбора неизвестно)	MT895503 (57)	MT904294 (100)
MFP 259011	<i>A. japonica</i>	семена капусты (Республика Дагестан)	MT895502 (100)	MT904293 (100)
MFP 253011	<i>A. tenuissima</i>	плод редьки (Республика Дагестан)	MT895501 (100)	MT904292 (100)

Ранее были зарегистрированы три вида *Alternaria* (*A. brassicicola*, *A. brassicae* и *A. japonica*) как возбудители альтернариоза растений семейства крестоцветных (Peruch et al., 2006; Reis, Boiteux, 2010; Occurrence of *Alternaria* ..., 2015). По литературным данным *A. tenuissima* была идентифицирована как основной патогенный вид на капусте в Иране (Rahimloo, Ghosta, 2015). Известно, что таксономия рода *Alternaria* довольно сложна, и точная идентификация видов обычно основана на сочетании морфологических наблюдений и результатов молекулярного анализа (Morphological, physiological ..., 2014; Simmons, 2007). Несмотря на наличие у *A. japonica* таких отличительных признаков как замедленный рост на агаризованных питательных средах, спороношение в виде коротких неразветвленных цепочек конидий и образование хламидоспор, из-за высокого уровня изменчивости микромицетов использование только морфологических параметров может привести к ошибочной видовой идентификации. Так, диаметр и морфология недельных колоний исследуемых штаммов *A. japonica* на среде КМА, а также длина их конидий перекрывалась с этими показателями альтернариоидных грибов секции *Alternaria*, в частности, *A. tenuissima* 253-011. Сопоставление совокупности полученных нами результатов по морфологическим признакам с данными литературы и применение ПЦР-диагностики позволило идентифицировать штаммы 181-011, 239-011, 244-011 и 259-011 как *A. japonica*, а штамм 253-011 как *A. tenuissima*. Более того, идентификация, выполненная по морфолого-культуральным признакам, соответствовала кластеризации, наблюдаемой на филогенетическом древе.

Молекулярно-генетический метод, основанный на анализе таксономически значимых последовательностей ДНК, хорошо дифференцировал *A. japonica* от других *Alternaria* spp. В данной работе анализ участков генов ITS и EF1 α позволил уверенно отнести изучаемые штаммы 181-011, 239-011, 244-011 и 259-011 к *A. japonica* (Дифференциация грибов *Alternaria* ..., 2019).

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

Известно, что условия культивирования оказывают существенное влияние на рост и биосинтез вторичных метаболитов грибов. Это обусловлено присутствием большого числа генных кластеров, участвующих в биосинтетических процессах, активация которых зависит от многих факторов, в том числе состава питательной среды (Big effects from ..., 2002). Использование подхода систематического изменения условий культивирования, известного как «один штамм - много соединений» (one strain - many compounds, OSMAC), успешно применяется в настоящее время для получения разнообразных и новых вторичных метаболитов грибов. Варьирование параметрами культивирования способно полностью изменить метаболический профиль многих микроорганизмов (Expanding the chemical ..., 2019; Koul, Singh, 2017; OSMAC Strategy ..., 2021). Данный подход особенно интересен для поиска соединений, представляющих биотехнологический интерес.

Подход OSMAC был применен нами с целью увеличения выхода биомассы и продукции вторичных метаболитов, обладающих различной биологической активностью. Исследуемые штаммы *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima* были выращены с использованием метода глубинного культивирования на различных питательных средах и метода твердофазного культивирования.

Природа источников углерода и азота оказывает значительное влияние на продукцию вторичных метаболитов, причем природа источника азота служит ключевым фактором в продукции азотсодержащих метаболитов (Effect of amino acids ..., 2006; Influence of medium ..., 2007). Нами были использованы среды с различными источниками азота и углерода: две синтетические среды, содержащие неорганический азот – среда ЧАВ (NaNO₃) и М1Д (Ca (NO₃)₂, KNO₃, виннокислый аммоний) и две полусинтетические среды, содержащие природные источники азота – среда ДМГ (дрожжевой экстракт/мальтоза) и среда Сабуро (пептон).

Выход биомассы. Результаты двухфакторного дисперсионного ($p < 0.01$) анализа показали, что на среде ЧАВ наблюдался самый низкий рост мицелия всех исследованных штаммов, выход сухой биомассы не превышал 2 г/л (рисунок 10). В то время как, на остальных средах выход

биомассы был значительно выше, однако проявлялась различная зависимость выхода биомассы от вида/штамма микромицетов. В целом, поверхностно - глубинный рост различных штаммов *A. japonica* на жидких питательных средах заметно варьировал, при этом уровень накопления биомассы был ниже, чем у *A. tenuissima* (рисунок 10А). Так, у *A. tenuissima* 253-011 наблюдался высокий уровень биомассы (7–8 г/л) на всех трех вариантах сред, в то время как у большинства штаммов *A. sonchi* выход биомассы был самый низкий и не превышал 4 г/л, за исключением штамма S-145, выращенного на среде ДМГ, выход которого составлял 6 г/л (рисунок 10Б). Заметные различия наблюдались среди штаммов *A. japonica*: у штаммов 181-011 и 244-011 максимальный уровень накопления биомассы был на средах М1Д и Сабура (7–8 г/л) и низкий выход на среде ДМГ (5 г/л), в то время как у штамма 239-011 низкий выход биомассы (6 г/л) наблюдался на всех средах (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

Таким образом, состав питательной среды оказывал существенное влияние на накопление биомассы микромицетов. Существенные различия наблюдались у штаммов *A. japonica* (df 3, $F=70.66$, $P<0.01$), и *A. sonchi* (df 3, $F=44.94$, $P=0.000$), в то время, как у *A. tenuissima* выход биомассы не зависел от данного показателя (df 2, $F=6.1$, $P<0.01$) (рисунок 10В).

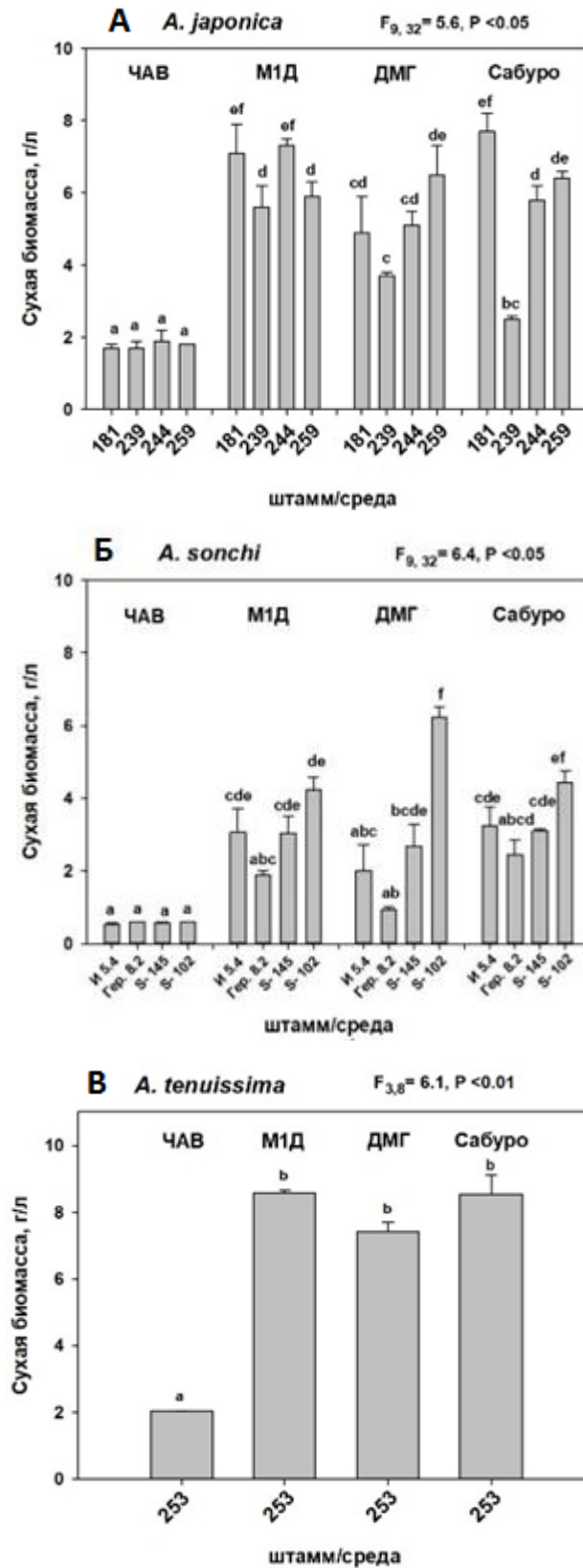


Рисунок 10 — Выход биомассы культур *A. japonica* (А), *A. sonchi* (Б), *A. tenuissima* (В) при поверхностно-глубинном культивировании на различных жидких питательных средах.

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия (тест Тьюки, $P > 0.05$). Вверху указаны значения двухфакторного дисперсионного анализа, по фактору «штамм микромицета/среда».

Выход вторичных метаболитов. Для штаммов *A. japonica* выход метаболитов существенно зависел от природы источника азота. В целом у всех штаммов, выращенных на средах с природным источником азота (среды ДМГ и Сабура) выход неполярных экзогенных метаболитов (ЭкзоНМ) был значительно выше, чем у штаммов, выращенных на средах с неорганическим азотом (среды ЧАВ и М1Д), и колебался в пределах 70–120 и 10–20 мг/л, соответственно (рисунок 11 А1). В то же время, на среде Сабура выход ЭкзоНМ был выше, чем на среде ДМГ и зависел от штамма: так у штамма 181-011 выход вторичных метаболитов колебался от 115.1 ± 9.4 до 45 ± 2.4 мг/л, у штамма 244-011 от 84.9 ± 4.8 до 67.9 ± 6.5 мг/л, выход ЭкзоНМ из штаммов 239-011 и 259-011 был почти одинаковым от 46.5 ± 3.5 до 48.2 ± 5.5 мг/л. Природа источника азота, в основном, не оказывала существенного влияния на выход полярных экзогенных метаболитов (ЭкзоПМ). Их выход значительно превышал выход ЭкзоНМ и колебался в пределах 130–500 мг/л (рисунок 11 А2). Однако, культивирование на среде с дрожжевым экстрактом (среда ДМГ) приводило к значительному увеличению выхода ЭкзоПМ у штаммов 239-011 и 244-011 (480 ± 43.3 и 504.7 ± 101.7 мг/мл, соответственно).

Для штаммов *A. sonchi* наблюдалась подобная зависимость выхода экзо- и эндогенных метаболитов от природы источника азота. Выход ЭкзоНМ на средах с неорганическим азотом (среды ЧАВ и М1Д) был минимальным и составлял до 27 мг/мл (рисунок 11 Б1). На средах с природным источником азотом выход ЭкзоНМ увеличивался, достигая максимального значения на среде с пептоном (среда Сабура, 80–110 мг/мл). Выход ЭкзоПМ (до 325 мг/мл) также превышал выход ЭкзоНМ, но, за исключением среды ЧАВ, не зависел от состава среды. Низкий выход ЭкзоПМ при культивировании на среде ЧАВ (20 мг/л), по-видимому, вызван низким ростом мицелия в данных условиях (рисунок 11 Б2) (Salimova D. R., Berestetskiy A. O., 2020).

Штамм *A. tenuissima* отличался от штаммов *A. japonica* и *A. sonchi*, поскольку состав среды культивирования не оказывал влияние на продукцию экзогенных метаболитов и составлял приблизительно 34.3 ± 5.7 мг/л (рисунок 11 В). Основными экзометаболитами были ЭкзоПМ, высокое содержание которых наблюдалось при культивировании на всех средах (рисунок 11 В). Низкий выход метаболитов на среде ЧАВ, по-видимому, также вызван низким ростом мицелия (Entomotoxic activity of..., 2021). Выход ЭкзоПМ был соизмерим с выходом ЭкзоПМ штамма *A. japonica* 244-011 при культивировании на среде ДМГ (с дрожжевым экстрактом).

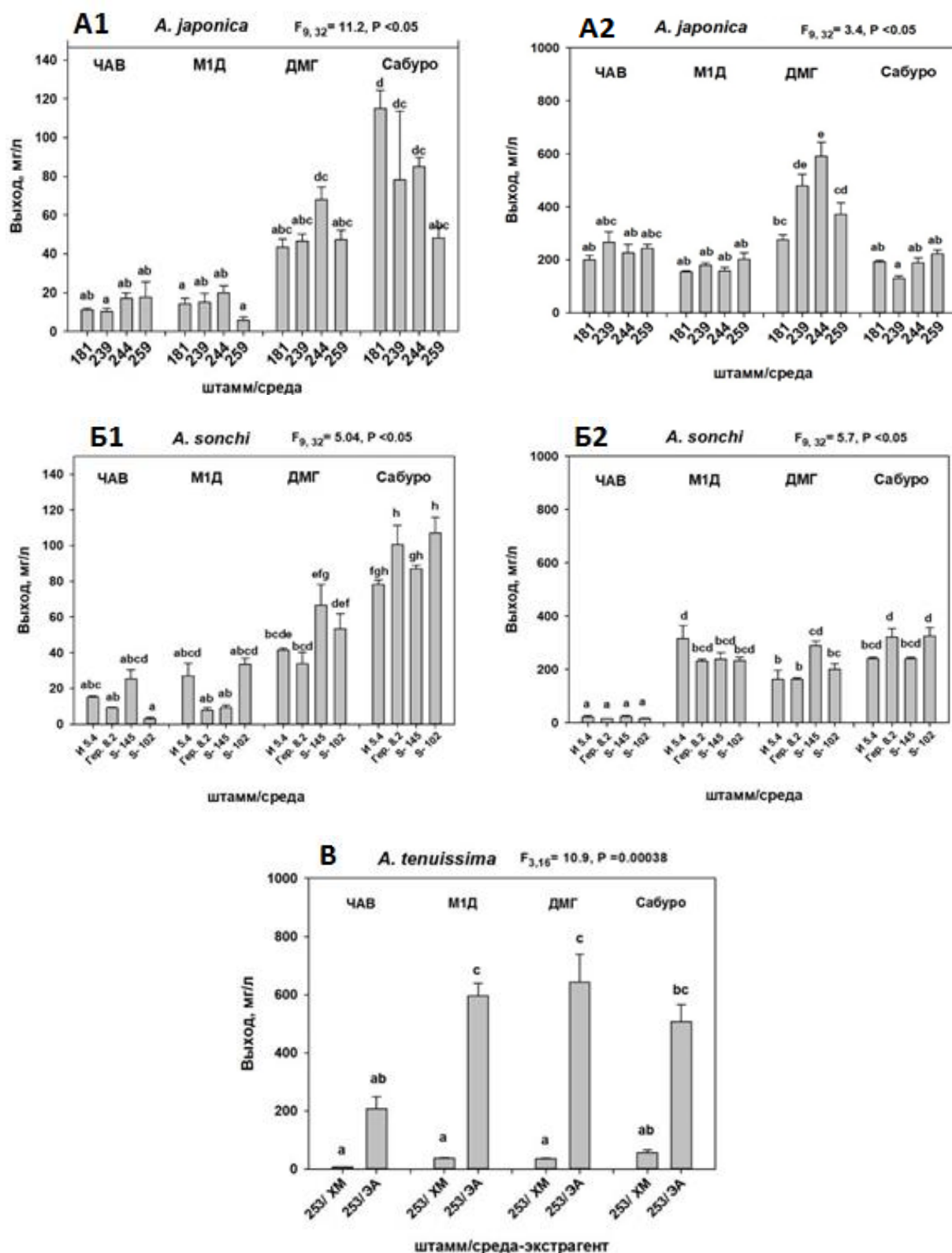


Рисунок 11 — Выход неполярных и полярных экзогенных метаболитов из культур *A. japonica* (А), *A. sonchi* (Б), *A. tenuissima* (В), полученных на различных жидких средах. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия (тест Тьюки, $P > 0.05$). Вверху указаны значения двухфакторного дисперсионного анализа, по фактору «штамм микромицета/среда». ХМ – хлористый метилен, ЭА – этилацетат. 1 – неполярные, 2 – полярные метаболиты.

Для штаммов *A. japonica* выход эндогенных метаболитов также, как и выход экзогенных метаболитов зависел от природы источника азота. В целом, выход эндометаболитов из мицелия был более высоким (примерно в 2 раза) при культивировании микромицетов на средах с природным источником азота (среды ДМГ и Сабуро), чем на средах с неорганическим азотом (среды ЧАВ и М1Д), и варьировал в диапазоне 45–235 мг/л и 5–25 мг/л, соответственно (рисунок 12) (Идентификация и токсикологическая..., 2021). В тоже время, выход неполярных эндогенных метаболитов (ЭндоНМ) на жидких средах зависел от штамма: так наибольший выход был у штаммов 181-011 и 244-011 и составил 149.3 ± 45.9 и 151.6 ± 37.6 мг/л на среде ДМГ, 203.9 ± 20.6 мг/л и 211.9 ± 41.4 мг/л на среде Сабуро, соответственно (рисунок 12 А1). Штамм *A. japonica* 239-011 отличался не только слабым ростом, но и низким уровнем накопления эндометаболитов (до 23 мг/л) на всех видах жидких питательных сред. Выход полярных эндогенных метаболитов (ЭндоПМ) не значительно превышал выход ЭндоНМ и колебался в широком диапазоне 5–270 мг/л (рисунок 12 А2). Культивирование штамма 181-011 на среде с пептоном (среда Сабуро) приводило к высокому выходу ЭндоПМ, 234 ± 21.1 мг/л (рисунок 12 А2) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

При жидкофазном культивировании все штаммы *A. sonchi* отличались низким уровнем накопления эндометаболитов на всех видах питательных сред. Минимальный выход ЭндоНМ был при культивировании грибов на синтетических средах и был в пределах 1.7–3.9 мг/л на среде ЧАВ и 3.7–26.7 мг/л на среде М1Д (рисунок 12 Б1). Выход ЭндоНМ из *A. sonchi* при культивировании на средах ДМГ и Сабуро был на том же уровне, 3.8–21.6 мг/л и 2.7–14.0 мг/л, соответственно. Максимальный выход ЭндоПМ был у штамма *A. sonchi* И 5.4 (66.3 ± 5.2 мг/л), при культивировании на среде М1Д, и штамма *A. sonchi* S-145 (65.6 ± 13.2 мг/л), при культивировании на среде ДМГ (рисунок 12 Б2).

Штамм *A. tenuissima* отличался от штаммов *A. japonica* и *A. sonchi* высоким выходом ЭндоНМ при культивировании на среде ЧАВ, выход составил 174.8 ± 85.1 мг/л, при этом был существенно низкий выход ЭндоПМ (5.9 ± 3.0 мг/л) (рисунок 12 В). На трех других средах выход ЭндоНМ у штамма 253-011 не превышал 45.7 мг/л. Культивирование штамма 253-011 на среде М1Д приводило к максимальному выходу ЭндоПМ, выход составил 129.2 ± 37.0 мг/л (рисунок 12 В).

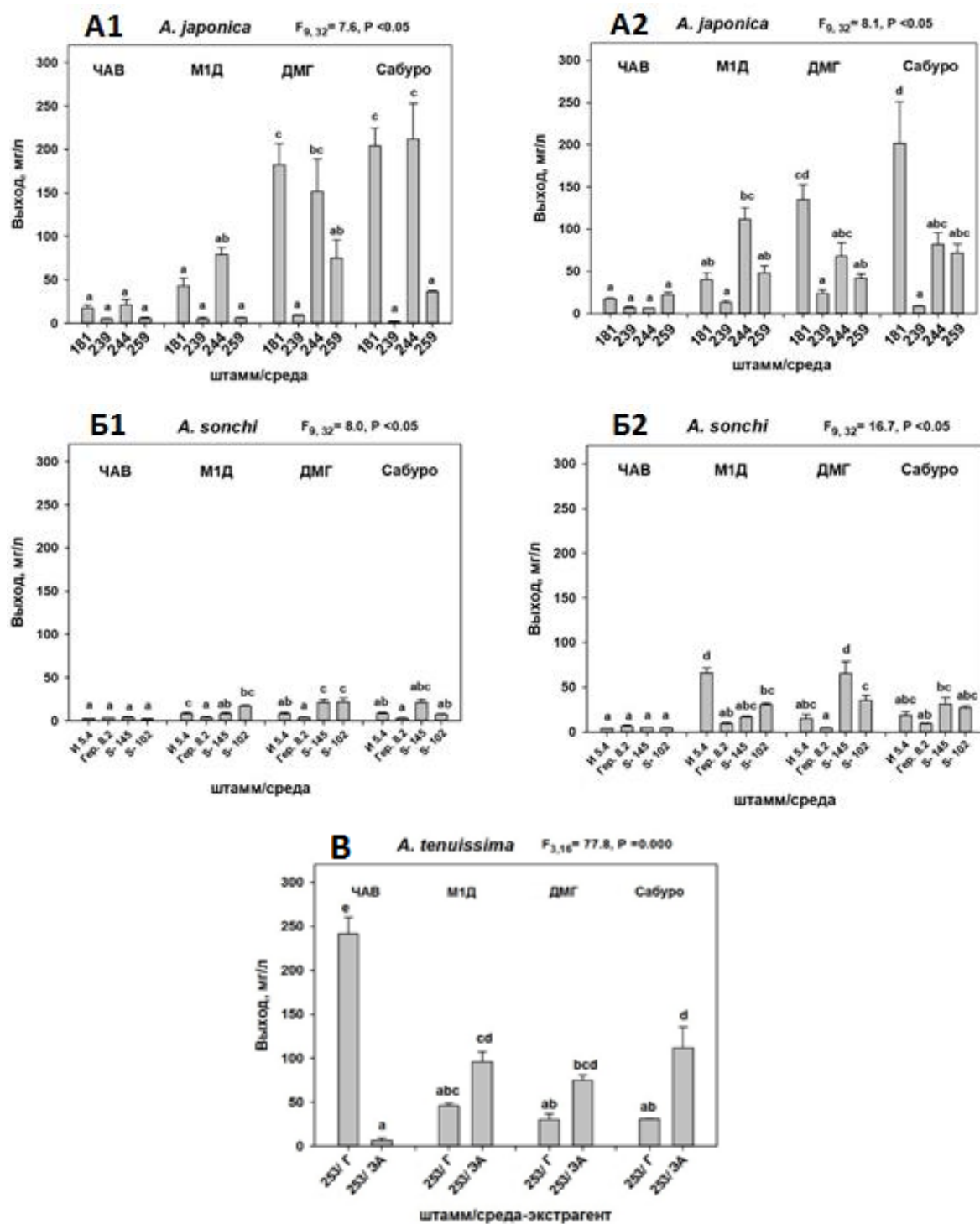


Рисунок 12 — Выход неполярных и полярных эндогенных метаболитов из культур *A. japonica* (А), *A. sonchi* (Б), *A. tenuissima* (В), полученных на различных жидких средах. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия (тест Тьюки, $P > 0.05$). Вверху указаны значения двухфакторного дисперсионного анализа, по фактору «штамм микромицета/среда». Г – гексан, ЭА – этилацетат. 1 – неполярные, 2 – полярные метаболиты.

При твердофазном культивировании исследованных штаммов *Alternaria* spp. проявлялось достоверное различие ($p < 0.01$) выхода неполярных и полярных метаболитов от вида/штамма микромицетов. Культуры, полученные на твердом субстрате, давали более высокие выходы

вторичных метаболитов, чем выходы вторичных метаболитов этих грибов, полученных на жидких средах. Наибольшее заметное различие между способом культивирования и выходом ЭкзоМ и ЭндоМ было у штаммов *A. sonchi*. Так, при культивировании на твердом субстрате, из культуры *A. sonchi* И.5.4 уровень неполярных метаболитов составил около 677.3 ± 92.5 мг/кг, приблизительно такой же уровень был у *A. japonica* 244-011 681 ± 49.1 мг/кг (рисунок 13 Б и 13 А, соответственно). Уровень извлеченных неполярных метаболитов из *A. tenuissima* был ниже, но не значительно и составил 408.3 ± 40 мг/кг, при этом уровень полярных метаболитов был максимальным 1740.3 ± 49.8 мг/кг (рисунок 13 В). Среди остальных исследованных видов высокий выход полярных эндогенных метаболитов был у штаммов *A. sonchi*, диапазон их выхода варьировал в пределах 870–1250 мг/кг.

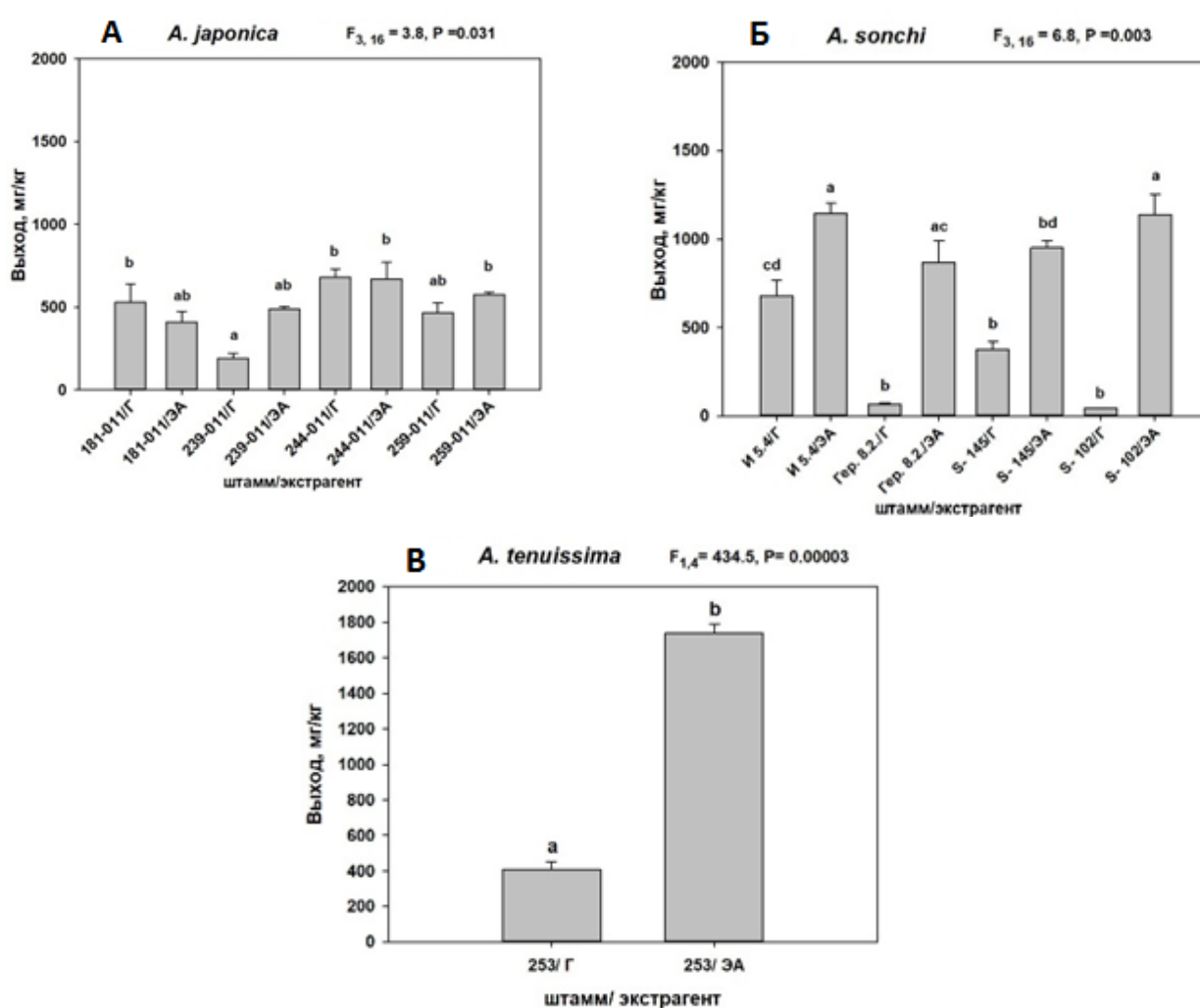


Рисунок 13 — Выход метаболитов из твердофазных культур *A. japonica* (А), *A. sonchi* (Б), *A. tenuissima* (В).

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. Одинаковыми буквами указаны недостоверные различия (тест Тьюки, $P > 0.05$). Вверху указаны значения двухфакторного дисперсионного анализа, по фактору «штамм микромицета/среда». Г – гексан, ЭА – этилацетат.

Изменения условий культивирования, как правило, используются для оптимизации выхода определенного биологически активного соединения (Big effects from ..., 2002) или для оценки полного биоразнообразия вторичных метаболитов потенциального продуцента (Production of trichothecenes ..., 2002). Данная часть работы была направлена на поиск оптимальной среды для конкретного вида/штамма микромицета, продуцирующего один или два ключевых метаболита. Так как, то, что может быть лучшей средой для одного гриба, часто может оказаться непродуктивным для других штаммов.

В данном исследовании показано, что среди различных протестированных сред полусинтетические (ДМГ и среда Сабуро) поддерживали максимальный уровень накопления биомассы и выход вторичных метаболитов из культур *A. japonica*. Полученные результаты согласуются с данными работ по модификации полусинтетической среды на основе картофельно-глюкозного бульона (Meah et al., 2017). Вид *A. japonica* не так широко распространен, как два других патогенных вида для растений из семейства крестоцветных – *A. brassicicola* и *A. brassicae* (Identification and characterization ..., 2017). Информации по исследованиям влияния состава питательного субстрата на рост и выход метаболитов недостаточно, что затрудняет сопоставление полученных результатов с литературными данными. Выход хлористометиленовых экстрактов (неполярных) из фильтрата культур *A. japonica* на синтетических питательных средах ЧАВ и М1Д достаточно низкий (около 20 мг/л); при культивировании штаммов *A. japonica* на полусинтетических питательных средах ДМГ и Сабуро в 2 – 4 раза выше (до 100 мг/л) (Идентификация и токсикологическая..., 2021). Выход этилацетатных экстрактов (полярных) был выше – на уровне около 200 мг/л. Таким невысоким выходом экстрактивных веществ при культивировании на жидких питательных средах характеризуется и *A. brassicicola*. Так, для выделения минорных метаболитов этого гриба объём питательной среды достигал 50 л, мажорных – 20 л (Pedras, Yu, 2009; Pedras, Park, 2015; Fusicoccane-derived diterpenoids ..., 2018).

Качество роста грибов и накопление эндогенных метаболитов *A. sonchi* при твердофазном культивировании значительно выше, чем культивирование на комплексных жидких питательных средах. Ранее в работах Далиновой А. А. было показано влияние состава питательной среды и способа культивирования на продуктивность *A. sonchi* S-102. При сопоставлении результатов эксперимента по выходу сухой биомассы и экзо- и эндогенных метаболитов при поверхностно-глубинном культивировании (среда ЧАВ и ДМГ), данные согласуются с результатами, полученными ранее (Далинова, 2017). При этом результаты по выходу метаболитов из культуры S-102, полученной на перловой крупе не воспроизвелись, но вывод о способе культивирования *A. sonchi* подтвердился.

Среди изученных грибов максимальный уровень накопления биомассы и продуцирования вторичных экзо- и эндометаболитов был у *A. tenuissima* 253-011 на всех вариантах жидких питательных сред. Более комплексный состав сред ЧАВ и М1Д поддерживал рост биомассы и образование вторичных метаболитов *A. tenuissima*.

Было показано, что представители разных видов *Alternaria* по-разному реагируют на способ культивирования и демонстрируют заметные различия в зависимости от состава питательного субстрата.

3. 3 Спектр биологической активности экстрактов

3. 3. 1 Энмотоксическая активность

При оценке энмотоксической активности экстрактов не удалось проанализировать экстракты из культурального фильтрата культур *A. sonchi*, из мицелия *A. japonica* полученных на среде ЧАВ, ввиду низкого выхода экстрактивных веществ. Результаты оценки биологической активности приведены в таблицах приложения Б.

A. japonica

Schizaphis graminum (Rond.). Экстракты из культур *A. japonica* были слабоэффективны в отношении злаковой тли и почти не отличались от контрольного варианта. На уровень токсичного действия экстрактов в отношении злаковой тли влиял состав питательной среды и источник вторичных метаболитов. Эндометаболиты из мицелия при жидкофазном культивировании и при твердофазном культивировании были более токсичны, чем экзометаболиты. Наиболее благоприятной средой для накопления эндометаболитов с афидоцидными свойствами является среда Сабуро и твердый субстрат – перловая крупа. Афидоцидное действие не зависело от полярности полученных метаболитов и было примерно одинаковым, при культивировании грибов на среде Сабуро, и вызывало смертность злаковой тли на уровне примерно 40 %. Приблизительно таким же действием обладали экстракты из твердофазных культур *A. japonica*. Заметной высокой токсичностью для злаковой тли отличались неполярные метаболиты из культуры *A. japonica* 244-011, при культивировании ее на средах ЧАВ и зерновом субстрате (приложение А, таблица А.1). Действие этих экстрактов вызывало смертность насекомых на уровне 85 %. Таким же уровнем (смертность 83 %) афидоцидного действия обладал неполярный экстракт из *A. japonica* 259-011, полученного на среде ДМГ.

Galleria mellonella (L.). Для гусениц большой вощиной огневки токсичными (смертность выше 50 %) были экстракты из культур *A. japonica* 181-011, 239-011, 244-011. Штаммы 181-011 и 239-011 образуют вторичные метаболиты с энтомотоксичными свойствами при их культивировании на питательных средах ДМГ и М1Д. Полусинтетическая среда Сабуро благоприятна для культуры *A. japonica* 244-011 для образования токсичных соединений против *G. mellonella*.

Токсичностью в отношении личинок *G. mellonella* в основном обладали неполярные экстракты из фильтрата культур *A. japonica*, полученных на средах ДМГ и М1Д, в частности хлористометиленовый экстракт из *A. japonica* 239-011 (смертность гусениц на уровне 80 %) (приложение Б, таблица Б.1). Неполярные экстракты из фильтрата штаммов 181-011, 244-011, 259-011, полученных на полусинтетических средах и синтетической среде М1Д вызывали гибель большой вощиной огневки на уровне 40–50 %. В основном, все этилацетатные экстракты из фильтрата культур *A. japonica*, были слаботоксичны, за исключением полярного экстракта из фильтрата *A. japonica* 244-011 со среды Сабуро (смертность гусениц на уровне 80 %) (приложение А, таблица А. 2).

Экстракты из мицелия были слаботоксичны для гусениц *G. mellonella*, относительно экстрактов из фильтрата полученных грибов. Высокая токсичность была отмечена у этилацетатных экстрактов из мицелия 181-011 и 239-011, полученных на синтетических средах (М1Д и среда ЧАВ), уровень смертности гусениц вощиной огневки был 60 % (приложение А, таблица А. 4).

При культивировании штаммов *A. japonica* на твердом субстрате, накопление вторичных метаболитов полярной природы с энтомотоксическими свойствами было у культур *A. japonica* 181-011 и 239-011 (смертность личинок огневки на уровне 40 % и 50 %, соответственно) (приложение А, таблица А. 5).

A. sonchi

Schizaphis graminum (Rond.). На уровень токсичного действия экстрактов из культуры грибов влияли состав жидкой питательной среды и происхождение изолята. Среди жидких питательных сред более благоприятными для биосинтеза вторичных метаболитов *A. sonchi* с афидоцидными свойствами оказались среды М1Д и ДМГ. Комплексы вторичных метаболитов, выделенные из фильтрата культур, полученных на среде Сабуро, были слаботоксичны для тли, смертность не превышала 17 %. Тля была высокочувствительной (относительная смертность более 50 %) к экстрактам из культурального фильтрата штаммов *A. sonchi* И 5.4 и Гер.8.2. Хлористометиленовый экстракт из фильтрата штамма И 5.4, полученного на среде М1Д, был высокотоксичен для *S. graminum* (смертность злаковой тли 81 %) (приложение А, таблица А. 8).

Схожим уровнем токсичности обладал этилацетатный экстракт из фильтрата штамма Гер.8.2, полученного на ДМГ (приложение А, таблица А. 9) (Salimova D. R., Berestetskiy A. O., 2020).

Эндометаболиты из мицелия *A. sonchi*, выращенного на средах М1Д и ДМГ, были более токсичны для злаковой тли, чем экстракты из мицелия культур, полученных на Сабуро. Вторичные метаболиты из мицелия штаммов S-145 и S-102, полученных на среде М1Д, были токсичны для тли на уровне 42–50 %, независимо от полярности метаболитного комплекса. Максимальное афидоцидное действие (смертность тли на уровне 85 %) показал этилацетатный экстракт из мицелия *A. sonchi* S-102, полученного на ДМГ (приложение А, таблица А. 11).

Вторичные метаболиты, полученные из твердофазных культур *A. sonchi*, были в разной степени токсичны для *S. graminum* (гибель злаковой тли 3–62 %). В основном, афидоцидное действие показали неполярные метаболитные комплексы. Максимальную гибель злаковой тли (62 %) показал гексановый экстракт из твердофазной культуры *A. sonchi* S-145 (приложение А, таблица А. 12). Среди этилацетатных экстрактов из грибов, полученных на твердом субстрате, самым токсичным был этилацетатный экстракт из *A. sonchi* S-102.

Galleria mellonella (L.). Оптимальной средой для образования вторичных метаболитов *A. sonchi* с энтомотоксичными свойствами была среда ДМГ. Более токсичными для личинок оказались экстракты из культурального фильтрата грибов. Ввиду низкого накопления биомассы штаммов *A. sonchi* на синтетических средах и низкого выхода экстрактивных веществ из мицелия полученных культур, не удалось оценить действие всех полученных комплексов эндометаболитов на личинках большой вощиной огневки. На токсичность экстрактов из *A. sonchi*, полученных на жидких питательных средах, в основном влияло происхождение штамма и источник извлечения метаболитов. Все экстракты, независимо от полярности, проявили в разной степени энтомотоксическую активность в отношении гусениц. При оценке экстрактов из твердофазных культур *A. sonchi*, полученных на перловой крупе, более токсичным для гусениц были полярные экстракты, смертность насекомых была выше 50 % относительно контроля.

Все экстракты, выделенные из культур, полученных на среде ДМГ, проявили относительно высокое энтомотоксическое действие (смертность гусениц в диапазоне от 70 % до 100 %) против гусениц вощиной огневки, в сравнении с контролем и экстрактами, полученными при культивировании грибов на других жидких средах. Для гусениц высокотоксичными оказались экстракты из фильтрата изолята *A. sonchi* Гер. 8.2, причем как полярные, так и неполярные. Среднюю токсичность (смертность гусениц 40–60 %) проявили этилацетатные экстракты из штаммов *A. sonchi*, полученных на синтетической среде М1Д (приложение А, таблица А. 9). При культивировании грибов на Сабуро, образование токсичных метаболитов было у штамма И 5.4 (100 % смертность личинок) и S-102 (60 % смертность личинок).

Экстракты из мицелия были слаботоксичны для гусениц *G. mellonella*, относительно экстрактов из фильтрата полученных грибов. Высокая токсичность была отмечена у этилацетатных экстрактов из мицелия *A. sonchi* S-102 на среде М1Д (смертность 90 %) и *A. sonchi* И 5.4 на среде ДМГ (смертность 70 %) (данные приведены в таблице А. 11 приложения А).

Полярные метаболиты из экстрактов штаммов *A. sonchi*, полученных при твердофазном культивировании, вызывали гибель более 50 % личинок вошинной огневки. Высокая смертность гусениц (90 %) наблюдалась под действием этилацетатного экстракта из *A. sonchi* S-145 (приложение А, таблица А. 12)

A. tenuissima

Schizaphis graminum (Rond.). На уровень токсичного действия экстрактов из культуры *A. tenuissima* 253-011 влияли состав питательной среды и полярность экстрагента. Среди жидких питательных сред более оптимальными для образования вторичных метаболитов с энтомотоксичными свойствами оказались среды М1Д, ДМГ и Сабуро. Также накопление вторичных метаболитов афидоцидного действия характерно при культивировании штамма 253-011 на перловой крупе. Эффективность действия экстрактов из мицелия культуры *A. tenuissima*, полученной на различных питательных средах, была на уровне контроля и не превышала 17 % (приложение А, таблица А. 7). Экстракты из культурального фильтрата обладали более токсичным эффектом на злаковую тлю, чем экстракты из мицелия культуры *A. tenuissima*. Среди экстрактов, полученных из культурального фильтрата, высокой летальной эффективностью (смертность тли на уровне 84 % и 98 %, соответственно) обладали хлористометиленовые экстракты из фильтрата культуры 253-011, полученной на среде М1Д и ДМГ (приложение А, таблица А. 8). Неполярные экстракты из фильтрата штамма 253-011, полученного на среде Сабуро, были токсичны для злаковой тли, смертность была на уровне 63 %. Эффективность полярных экстрактов была незначительной, токсичное действие на тлю было ниже 30 % (Entomotoxic activity of ..., 2021).

Экстракты, полученные из твердофазной культуры *A. tenuissima* 253-011, обладали афидоцидным действием на уровне 40 %, независимо от полярности экстракта (приложение А, таблица А.6).

Galleria mellonella (L.). Анализ острой токсичности полученных экстрактов из культуры *A. tenuissima* 253-011 в отношении гусениц вошиной огневки показал, что более благоприятной средой для образования вторичных метаболитов энтомотоксического действия является перловая крупа и жидкие питательные среды М1Д и ДМГ. Для получения комплекса метаболитов с энтомотоксическими свойствами, в качестве экстрагента желательно использовать

этилацетат, полярные экстракты из фильтрата обладали 100 %-ым летальным эффектом (приложение А, таблица А. 6) для личинок огневки, за исключением полярного экстракта из *A. tenuissima*, полученной на среде ЧАВ (гибель насекомых на уровне 40 %) (Entomotoxic activity of ..., 2021). Среди экстрактов из мицелия относительно высоким уровнем энтомотоксической активности (смертность гусениц на уровне 70 %) обладал гексановый экстракт из мицелия *A. tenuissima*, полученного на ДМГ (приложение А, таблица А. 7). Энтомотоксичность в отношении личинок *G. mellonella* остальных экстрактов из мицелия не превышала 40 %, как и действие гексанового экстракта из *A. tenuissima* с твердого субстрата. Полярные метаболиты из экстракта из твердофазной культуры *A. tenuissima* вызывали 100 %-ую гибель личинок вошинной огневки (приложение А, таблица А. 6).

3. 3. 2 Фитотоксическая активность

Изученные экстракты из фильтрата жидких культур, использованных в работе *Alternaria* spp., проявили в разной степени фитотоксическую активность при тестировании на сегментах листьев редиса, осота и пшеницы. Экстракты из различных штаммов *A. japonica* были фитотоксичны для листовых дисков редиса и слаботоксичны для листовых дисков осота и отрезков пшеницы. Листья осота и пшеницы были чувствительны к полученным экстрактам из изученных культур *A. sonchi*. Экстракты из *A. tenuissima* вызывали некрозы на всех видах тест-растений.

A. japonica

По данным дисперсионного анализа происхождение штамма *A. japonica* не оказывало существенного влияния на фитотоксичность экстрактов из культуральной жидкости в отношении листовых дисков редиса. Достоверный эффект ($p < 0.01$) на этот параметр оказывали состав среды и экстрагент. В целом, фитотоксическая активность экстрактов из фильтрата культур на синтетических средах была выше (примерно в 1.2 раза), чем фитотоксичность экстрактов, полученных из культуральной жидкости грибов, выращенных на полусинтетических средах. Этилацетатные экстракты из культуральной жидкости *A. japonica* были в среднем на 25 % более токсичными, чем хлористометиленовые. Взаимодействие факторов «среда» и «экстрагент» было несущественным ($p = 0.08$), тогда как остальные взаимодействия экспериментальных факторов были достоверными ($p < 0.01$) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

Среди экстрактов *A. japonica* максимальную фитотоксичность на листовых дисках редиса (диаметр некроза около 4.7–5 мм) показали хлористометиленовые и этилацетатные экстракты из

фильтрата культур штаммов 239-011 и 244-011, выращенных на синтетических средах ЧАВ и М1Д, соответственно (приложение А, таблица А. 1 и А. 2). При культивировании на полусинтетических средах (в частности, на среде Сабуро), на которых обнаружен высокий выход экстрактивных веществ, максимальную токсичность показали этилацетатные экстракты из культуральной жидкости штаммов *A. japonica* 244-011 и 259-011 (приложение А, таблица А. 2) (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

Экстракты из мицелия изученных грибов *A. japonica* были нефитотоксичными для тест-растений.

Аналогичный уровень фитотоксичности (диаметр некроза листового диска редиса 4.3–4.7 мм) вызывали этилацетатные экстракты из твердофазных культур *A. japonica* 181-011, 239-011, 259-011, полученных на перловой крупе (приложение А, таблица А. 5).

В целом, листовые высежки осота и отрезки листьев пшеницы были слабочувствительны к экстрактам из культур *A. japonica*, кроме этилацетатных экстрактов из фильтрата грибов, полученных на синтетических средах, в частности 244-011 и 259-011 на М1Д, 239-011 и 244-011 на среде ЧАВ. Диаметр некроза на листовых отрезках пшеницы составил от 4 мм до 6.2 мм, на листовых дисках осота от 2.8 мм до 4.3 мм (приложение А, таблица А. 2).

Высокий уровень фитотоксичности (диаметр некроза листового диска осота 7.3 мм) показал этилацетатный экстракт из твердофазной культуры *A. japonica* 244-011. Этилацетатные экстракты из штаммов 239-011 и 259-011, полученных на перловой крупе, вызывали некроз длиной 6.3 мм и 4.8 мм на листовых отрезках пшеницы (приложение А, таблица А. 5).

A. sonchi

Изученные экстракты из фильтрата культур *A. sonchi*, проявили фитотоксическую активность при тестировании на листьях осота, тогда как токсичность на отрезках листьев пшеницы проявили не все экстракты.

На фитотоксичность экстрактов из культуральной жидкости влияли такие параметры как состав питательной среды и полярность экстрагента. Полусинтетические среды были наиболее благоприятными для образования фитотоксичных веществ неполярной природы. Этилацетатные экстракты из фильтрата культур, полученных на среде ДМГ и М1Д, были примерно в 2 раза более токсичными для листовых дисков осота и отрезков листьев пшеницы. Среди экстрактов *A. sonchi* максимальную фитотоксичность (диаметр некроза около 4.3–5 мм) показали этилацетатные экстракты из фильтрата культур И 5.4, S-145 и S-102, выращенных на синтетической среде М1Д. Фитотоксичность этих экстрактов на отрезках листьев пшеницы была от 4.5 мм до 7.6 мм (приложение А, таблица А. 9) (Salimova D. R., Berestetskiy A. O., 2020).

Экстракты из мицелия полученных культур на жидких питательных средах не были токсичны для высечек из листьев тест-растений (приложение А, таблица А. 10 и А. 11).

Неполярные экстрактивные вещества из культур *A. sonchi*, полученных на твердом субстрате, были токсичны для листовых дисков осота на уровне фитотоксичности этилацетатных экстрактов из культур с перловой крупы. Максимальной фитотоксической активностью против осота обладал гексановый экстракт из штамма Гер.8.2 (диаметр некроза на листовых дисках осота 4.5 мм). Среди полярных экстрактивных веществ фитотоксичным был этилацетатный экстракт из *A. sonchi* S-102, диаметр некроза на листовых дисках осота 4.8 мм, длина некроза на отрезках пшеницы 3.8 мм (приложение А, таблица А. 12).

A. tenuissima

Независимо от состава среды и экстрагента экстракты из культуральной жидкости *A. tenuissima* 253-011 (при $p=0.05$) были достоверно более фитотоксичными, чем экстракты штаммов *A. japonica* и *A. sonchi*.

При анализе фитотоксичности экстрактов из культурального фильтрата *A. tenuissima*, более токсичными были этилацетатные, чем хлористометиленовые, за исключением неполярного экстракта из фильтрата 253-011, полученного на М1Д. Длина некроза на листовых отрезках пшеницы достигла 10 мм, диаметр некротического пятна на листовых дисках редиса – 5.7 мм (приложение А, таблица А. 6). Значительных различий в фитотоксичности этилацетатных экстрактов из фильтрата *A. tenuissima*, при культивировании на средах ДМГ и М1Д, и при культивировании на средах Сабуро и ЧАВ не наблюдалось. В первом случае размер некротических пятен варьировал в пределах 5.5–6.7 мм, во втором 4.3–4.7 мм (приложение А, таблица А. 6) (Entomotoxic activity of ..., 2021).

Гексановые и этилацетатные экстракты из мицелия *A. tenuissima* 253-011 были нефитотоксичны.

Экстракты из твердофазной культуры *A. tenuissima*, полученной на перловой крупе, были фитотоксичны для трех видов растений, кроме неполярного экстракта (фитотоксичность на листовых высечках редиса отсутствовала). Максимальный размер диаметра некротических пятен на листовых дисках осота достигал 7.5 мм под действием этилацетатного экстракта (приложение А, таблица А.6).

3. 3. 3 Антибиотическая активность

A. japonica

Экстракты из фильтрата культур *A. japonica*, проявили слабую антимикробную активность. Более чувствительным к токсичности экстрактов при тестировании был *B. subtilis*, чем *C. albicans*. В целом, антимикробную активность проявляли этилацетатные экстракты из фильтрата культур *A. japonica*, полученных на всех жидких питательных средах, кроме ЧАВ. Зона ингибирования роста *B. subtilis* варьировала от 3 мм до 5 мм (приложение А, таблица А. 2). Хлористометиленовые экстракты из фильтрата и экстракты из мицелия не проявляли антибиотическую активность в отношении бактерии. Исключением были неполярные экстракты из фильтрата *A. japonica* 259-011 со среды ДМГ (радиус зоны лизиса 4 мм) и 239-011 с М1Д (радиус зоны лизиса 7 мм).

Экстракты из твердофазных культур *A. japonica*, полученных на перловой крупе, были слабо токсичны, радиус зоны лизиса не превышал 3 мм (приложение А, таблица А. 5).

Из всех тестируемых экстрактов, антибиотическую активность (радиус зоны лизиса 5 мм) в отношении дрожжевого гриба *C. albicans* проявили неполярные экстракты из фильтрата культуры *A. japonica* 244-011, полученной на средах ДМГ и М1Д.

A. sonchi

Экстракты из фильтрата культур *A. sonchi*, проявили антимикробную активность при тестировании на *B. subtilis* и *C. albicans*. На антимикробную активность полученных экстрактов из культуральной жидкости грибов *A. sonchi* влияли такие факторы как, состав питательной среды и полярность экстрагента. При анализе влияния эффектов штамм/среда/экстрагент можно заметить, что при культивировании грибов на среде М1Д и ДМГ, антимикробная активность экзометаболитов в отношении *B. subtilis* была приблизительно одинаковой и не зависела от полярности экстрагента. В случае культивирования изученных штаммов на синтетической среде ЧАВ активность неполярных экстрактивных веществ из фильтрата грибов была в 2–3 раза выше, относительно полярных экстрактов, полученных этилацетатом. При культивировании на Сабуро наблюдается обратная ситуация.

Максимальную зону ингибирования роста *B. subtilis* показали этилацетатные экстракты из фильтрата культур *A. sonchi*, полученных на среде М1Д (радиус зоны лизиса 10–15 мм) (Salimova D. R., Berestetskiy A. O., 2020). Примерно такие же результаты были у этилацетатных экстрактов из культурального фильтрата *A. sonchi*, полученного на ДМГ (радиус зоны лизиса 9.3–10.7 мм). Максимальную (радиус зоны лизиса 15 мм) зону ингибирования роста бактерии *B. subtilis* вызывал этилацетатный экстракт из фильтрата *A. sonchi* S-102, полученного на синтетической среде М1Д (приложение А, таблица А. 9).

Экстракты из мицелия *A. sonchi* были менее токсичны для тест-микроорганизмов, чем экстракты из фильтрата. Более благоприятными для накопления эндометаболитов с антибиотическими свойствами были среды М1Д и ДМГ. При культивировании штаммов *A. sonchi* на средах ЧАВ и Сабура, антибиотическая активность полученных экстрактов из мицелия отсутствовала. Ингибирование роста *B. subtilis* в диапазоне радиуса от 2 до 5 мм вызывали экстракты из мицелия грибов *A. sonchi* И 5.4, S-145 и S-102, полученных на М1Д и ДМГ (приложение А, таблицы А. 10 и А. 11).

Экстракты из штаммов *A. sonchi*, полученных при твердофазном культивировании, были более токсичны для *B. subtilis*, по сравнению с экстрактами из фильтрата и мицелия, полученных при жидкофазном культивировании на различных жидких питательных средах. Ингибирование роста *B. subtilis* было в диапазоне приблизительно 5-8 мм, независимо от полярности эндометаболитов *A. sonchi*. Максимальное ингибирование роста (радиус зоны лизиса 8.3 мм) грамположительной бактерии вызывал гексановый экстракт из твердофазной культуры *A. sonchi* Гер. 8.2 (приложение А, таблица А. 12).

Дрожжевой гриб *C. albicans* был менее чувствителен к комплексу вторичных метаболитов, выделенных из штаммов *A. sonchi*, полученных на различных питательных средах. Экстракты из мицелия *A. sonchi* были нетоксичны или слаботоксичны в отношении дрожжевого гриба. Экстракты из культур *A. sonchi*, полученных на перловой крупе, обладали средней токсичностью в отношении *C. albicans*, относительно экстрактов из фильтрата и мицелия фитопатогенов, полученных на жидких средах. Ингибирование роста дрожжевого гриба вызывали хлористометиленовые экстракты из фильтрата *A. sonchi*.

Зона ингибирования роста *C. albicans* варьировала от 4 до 8 мм и была характерна для хлористометиленовых экстрактов из фильтрата штаммов *A. sonchi* И 5.4, S-145 и S-102 (приложение А, таблица А. 12). Максимальной антибиотической активностью (радиус зоны лизиса 8 мм) обладали неполярные экзометаболиты, выделенные из *A. sonchi* S-102, полученного на синтетической среде М1Д (приложение А, таблица А. 12). При культивировании этого штамма на перловой крупе, этилацетатные экстракты подавляли рост *C. albicans* в меньшей степени (радиус зоны лизиса 5 мм), по сравнению с хлористометиленовым экстрактом из фильтрата (приложение А, таблица А. 12).

A. tenuissima

Оценка антибиотических свойств экстрактов из культуры *A. tenuissima*, полученной на различных питательных средах, показала, что *B. subtilis* оказался более чувствительным к полученным экстрактам, чем дрожжевой гриб. На антимикробную активность полученных экстрактов из культуры *A. tenuissima* влияли такие факторы как состав среды и полярность

экстрагента. При культивировании *A. tenuissima* на среде М1Д, ДМГ и Сабура, антимикробная активность экзометаболитов в отношении *B. subtilis* приблизительно одинаковая. Но этилацетатные экстракты были более токсичны для бактерии, чем при экстракции неполярным растворителем. В случае культивирования изученных штаммов на синтетической среде ЧАВ активность неполярных экстрактивных веществ из фильтрата отсутствовала. При культивировании на среде Сабура наблюдается обратная ситуация. Экстракты, полученные из мицелия *A. tenuissima* 253-011 были нетоксичны в отношении тест-микроорганизмов.

Максимальную ингибирующую активность (радиус зоны лизиса 12 мм) в отношении *B. subtilis* показал этилацетатный экстракт из фильтрата 253-011, полученного на среде М1Д (приложение А, таблица А. 6). Подобным ингибирующим действием (радиус зоны лизиса 10-11 мм) обладали полярный экстракт гриба, полученного на полусинтетической среде ДМГ, и полярные эндометаболиты из культуры с перловой крупы (приложение А, таблица А. 6) (Entomotoxic activity of ..., 2021).

Дрожжевой гриб *C. albicans* был чувствителен только к хлористметиленовым экстрактам из фильтрата *A. tenuissima* 253-011, полученного на среде М1Д и ДМГ (радиус зоны лизиса микроорганизма составил 12 мм и 10 мм, соответственно) (приложение А, таблица А. 6).

3. 3. 4 Цитотоксическая активность

С использованием клонального изолята (Sf9) клеточной линии кукурузной лиственной совки *Spodoptera frugiperda* (Smith) и одноклеточного организма инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* оценили цитотоксичность метаболитных комплексов *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima*.

A. japonica

Клеточная линия Sf9. Все изученные экстракты из культур *A. japonica* обладали разной степенью цитотоксической активности в отношении клеточной культуры Sf9. При оценке цитотоксической активности экстрактов из мицелия штаммов *A. japonica*, не удалось проанализировать экстракты из мицелия культур, полученных на среде ЧАВ, ввиду низкого выхода экстрактивных веществ. В целом, экстракты из *A. japonica* не были высокотоксичны для клеток Sf9, в большинстве вариантов доля погибших клеток не превышала уровня 50 %. Независимо от состава питательной среды, активность хлористометиленовых экстрактов из фильтрата культур *A. japonica* в отношении клеточной культуры варьировала от 15 % до 35 %, за исключением неполярных экстрактов из *A. japonica* 244-011 и 259-011, полученных на Сабура

(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 % (приложение А, таблица А. 2). Полярные экстракты из жидких культур *A. japonica* не обладали высоким цитотоксическим действием в отношении клеточной линии Sf9. При культивировании на среде Сабуро, этилацетатные экстракты из фильтрата *A. japonica* 239-011 и 244-011 были в 2 раза менее токсичны (доля погибших клеток на уровне 50 %), относительно всех полярных экстрактов из фильтрата культур *A. japonica*, полученных на всех жидких питательных средах (приложение А, таблица А. 2).

При оценке экстрактов из мицелия, относительно высокой цитотоксической активностью обладали гексановые экстракты из мицелия грибов *A. japonica* 181-011, 239-011, 244-011, полученных на среде ДМГ и 181-011, 239-011, 259-011 на среде М1Д (доля погибших клеток Sf9 варьировала в диапазоне 77–100 %) (приложение А, таблица А. 3).

Все изученные экстракты из твердофазных культур *A. sonchi*, полученных на перловой крупе вызывали 100 %-ую гибель клонального изолята Sf9 клеток *Spodoptera frugiperda* (приложение А, таблица А. 5).

Parametium caudatum. На цитотоксичность экстрактов из различных культур *A. japonica* в отношении инфузории-туфельки влияли такие показатели как происхождение штамма, источник комплекса вторичных метаболитов, состав питательной среды и полярность экстрагента. В целом, экстракты из культурального фильтрата штаммов *A. japonica* были не токсичны для *P. caudatum* и не вызывали морфологических изменений формы тела. Слабая цитотоксическая активность (смертность клеток через 180 минут инкубации) наблюдалась лишь у хлористометиленовых экстрактов из фильтрата *A. japonica* 239-011 и 259-011, полученных на среде М1Д (приложение А, таблица А. 1).

Цитотоксичность экстрактов из мицелия культур *A. japonica* варьировала от слабой до острой токсичности. Этилацетатные экстракты из мицелия *A. japonica* были высокотоксичными в исследуемой концентрации. Экстракты, полученные гексаном из высушенного мицелия изученных грибов *A. japonica*, не проявили цитотоксичности или проявили лишь слабую активность (из мицелия жидкой культуры штаммов *A. japonica* 181-011 и 259-011 на среде ЧАВ, 239-011 – на среде Сабуро). Некоторые из полярных экстрактов из мицелия культур *A. japonica* показали острую токсичность, вызывая немедленную гибель инфузорий (через 3 минуты инкубации), как, например, экстракты из мицелия *A. japonica* 259-011, полученного на синтетических средах ЧАВ и М1Д, *A. japonica* 244-011 на среде М1Д, а также штамм 239-011 – на среде Сабуро (приложение А, таблица А. 3, А. 4).

Экстракты из штаммов *A. japonica*, полученных на перловой крупе, были не токсичны или слаботоксичны и вызывали гибель *P. caudatum* через 180 минут инкубации (приложение А, таблица А. 5).

A. sonchi

Клеточная линия Sf9. Все изученные экстракты из культур *A. sonchi* обладали разной степенью цитотоксической активности в отношении Sf9. На токсичность экстрактов влияли такие показатели как, происхождение изолята, состав питательной среды и экстрагент.

Среди экстрактов из культурального фильтрата более токсичными оказались хлористометиленовые экстракты из штаммов *A. sonchi*, полученных на всех жидких средах, относительно этилацетатных экстрактов из культур, полученных на этих же средах. Высокой цитотоксической активностью отличались хлористометиленовые экстракты из культур *A. sonchi* S-102, полученных на среде ЧАВ, И 5.4 на среде М1Д и S-145 на полусинтетической среде ДМГ (доля погибших клеток Sf9 была примерно одинаковой и достигала 60 %) (приложение А, таблица А. 8).

Слабую смертность клеток на уровне, не превышающем 30 %, вызывали этилацетатные экстракты из фильтрата штаммов *A. sonchi*, полученных на различных жидких средах. Среди полярных экзометаболитов максимальной цитотоксичностью (доля погибших клеток Sf9 составила 29 %) обладал экстракт из *A. sonchi* S-102, полученного на синтетической среде ЧАВ (приложение А, таблица А. 9).

Чувствительность клеточной линии Sf9 к экстрактам из мицелия грибов *A. sonchi* варьировала в широком диапазоне (гибель клеточной линии от 12 до 97 %). При культивировании *A. sonchi* на полусинтетических средах, токсичность полярных экстрактов была выше и вызывала гибель клеток приблизительно на уровне 100 %, чем при культивировании грибов на синтетических средах. Высоким цитотоксическим действием в отношении клеточной линии насекомых обладали этилацетатные экстракты из мицелия *A. sonchi* S-145 и S-102, полученных на среде Сабуро (доля погибших клеток Sf9 на уровне 82 % и 97 %, соответственно). Среди неполярных эндогенных метаболитов токсичными (доля погибших клеток Sf9 на уровне 50 %) были комплексы метаболитов из мицелия культур *A. sonchi* Гер. 8.2 и S-102, полученных на среде ДМГ (приложение А, таблица А. 11). Примерно такой же уровень гибели клеток Sf9 вызывали этилацетатные экстракты из мицелия штаммов S-145 и S-102, полученных на синтетических средах ЧАВ и М1Д, соответственно.

Все изученные экстракты из культур *A. sonchi*, полученных на твердом субстрате, вызывали 100 %-ую гибель клонального изолята Sf9 клеток *Spodoptera frugiperda* (приложение А, таблица А. 12).

Parametium caudatum. Экстракты из фильтрата изученных грибов *A. sonchi* проявили слабую токсичность в отношении инфузорий. В большинстве вариантов после внесения в среду с культурой *P. caudatum*, простейшие сохраняли подвижность через 180 минут инкубации, без изменения формы тела. Некоторые экстракты, полученные из высушенного мицелия *A. sonchi*, были более токсичны, чем экстракты из культурального фильтрата, но в целом, цитотоксичность экстрактов из *A. sonchi* была низкая. Гибель инфузорий через 180 минут от начала опыта вызывали хлористометиленовые экстракты из фильтрата культур *A. sonchi*, полученных на синтетических средах (штаммы И 5.4, Гер. 8.2 и S-145 на среде ЧАВ и И 5.4, S-145 на среде М1Д). Схожее действие наблюдалось у хлористометиленового экстракта из фильтрата *A. sonchi* S-102, полученного на среде ДМГ (приложение А, таблица А. 8). Среди этилацетатных экстрактов 100 %-ную гибель инфузорий через 180 минут инкубации показали экзометаболиты грибов, полученных на синтетической среде ЧАВ, а именно экстракты из штаммов *A. sonchi* S-145 и S-102 (приложение А, таблица А. 9).

100 %-ая гибель клеток через 30 минут инкубации была после внесения гексановых экстрактов из мицелия культур И 5.4 и Гер. 8.2, полученных на синтетической среде ЧАВ и из мицелия штаммов И 5.4 и S-145, полученных на полусинтетической среде Сабура (приложение А, таблица А. 10). Такой же уровень токсичности в отношении *P. caudatum* показали этилацетатные экстракты из мицелия Гер.8.2 и S-145, полученных на среде ЧАВ. При культивировании грибов *A. sonchi* на полусинтетических средах, гибель инфузорий через 30 минут инкубации вызывали лишь полярные эндометаболиты *A. sonchi* S-145 (приложение А, таблица А. 11).

В целом, все экстракты из культур *A. sonchi*, полученных на перловой крупе, были среднетоксичными для *P. caudatum*. В исследуемой концентрации почти все выделенные метаболитные комплексы вызывали гибель инфузорий через 30 минут инкубации, за исключением гексанового экстракта из *A. sonchi* S-145 и этилацетатного экстракта из штамма S-102, которые были слаботоксичны (гибель *P. caudatum* через 180 минут инкубации) (приложение А, таблица А. 12).

A. tenuissima

Клеточная линия Sf9. Все изученные экстракты из культуры *A. tenuissima* обладали разной степенью цитотоксической активности в отношении Sf9, но преимущественно доля погибших клеток была выше 50 %. Цитотоксическое действие полученных экстрактов зависело от полярности экзо-и эндометаболитов. Вторичные метаболиты неполярной природы из культуры *A. tenuissima* 253-011 обладали более высокой токсичностью (доля погибших клеток Sf9

достигала уровня 100 %), по сравнению с полярными метаболитами (доля погибших клеток Sf9 ниже 50 %) (приложение А, таблица А. 6).

100 %-ую гибель клеточной линии насекомых вызывали хлористометиленовые экстракты из фильтрата штамма 253-011, полученного на синтетических средах. Средним уровнем цитотоксической активности (доля погибших клеток Sf9 на уровне 60 %) обладал неполярный экстракт из фильтрата *A. tenuissima*, полученной на среде Сабуро, низким (доля погибших клеток на уровне 12 %) – неполярные экзогенные метаболиты при культивировании гриба на среде ДМГ (приложение А, таблица А. 6).

Для клеточной линии Sf9 токсичными были экстракты из мицелия *A. tenuissima*, в частности неполярные экстракты из мицелия культур, полученных на полусинтетических средах (ДМГ и среда Сабуро). При культивировании *A. tenuissima* на синтетических средах (ЧАВ и М1Д) цитотоксическое действие неполярных экстрактов из мицелия было приблизительно на уровне 55 % и 78 %, соответственно. Доля погибших клеток Sf9 после действия полярных экстрактов из мицелия штамма 253-011 не превышала 20 % (приложение А, таблица А. 7).

Все экстракты из твердофазной культуры *A. tenuissima* 253-011, полученной на перловой крупе, были высокотоксичны и вызывали 100%-ую гибель клонального изолята насекомых *Spodoptera frugiperda* (приложение А, таблица А. 6).

Parametium caudatum. Все изученные экстракты из *A. tenuissima* 253-011 обладали разной степенью цитотоксической активности в отношении культуры *P. caudatum*. На уровень цитотоксического действия экстрактов влияли состав питательной среды, источник получения комплекса вторичных метаболитов и экстрагент. Этилацетатные экстракты из *A. tenuissima* в исследованной концентрации были нетоксичными для инфузории-туфельки, простейшие сохраняли подвижность без изменения формы тела через 180 минут инкубации с внесенным в среду экстрактом. Низкий уровень цитотоксичности проявили хлористометиленовые экстракты из фильтрата *A. tenuissima* 253-011, полученного на синтетической среде М1Д и полусинтетических средах ДМГ и Сабуро (приложение А, таблица А. 6).

Экстракты, полученные гексаном из высушенного мицелия *A. tenuissima* 253-011, не проявили цитотоксичности или проявили низкий уровень активности: средний – при культивировании штамма на среде Сабуро, низкий – на среде ЧАВ, остальные экстракты были нетоксичными. Этилацетатные экстракты из мицелия *A. tenuissima* были высокотоксичными в исследуемой концентрации в отношении культуры инфузорий. Некоторые из этих полярных экстрактов были остротоксичными, так, например, этилацетатный экстракт из мицелия штамма 253-011, полученного на среде ЧАВ, вызывал немедленную гибель простейших через 3 минуты после внесения экстракта в среду культуры *P. caudatum* (приложение А, таблица А.7).

Экстракты из *A. tenuissima*, полученной на перловой крупе, были слаботоксичны и вызывали гибель *P. caudatum* через 180 минут инкубации (приложение А, таблица А. 6).

3. 4 Анализ метаболитных профилей экстрактов

На следующем этапе работы с помощью ВЭЖХ-МС был проведен анализ качественного состава экзогенных и эндогенных вторичных метаболитов в экстрактах из культур *Alternaria* spp., полученных на разных питательных средах.

Анализ хроматограмм показал значительные качественные различия в экстрактах из культур *A. japonica*, *A. sonchi* и *A. tenuissima*, касающиеся как мажорных, так и минорных метаболитов. ЭндоНМ из культур, полученных при твердофазном культивировании, имели бедный ВЭЖХ-профиль. Эта стадия обезжиривания позволила удалить нежелательные метаболиты (жирные кислоты), не представляющие интереса (Evaluation of culture media ..., 2013).

Типичные хроматограммы экстрактов из фильтрата культур изученных грибов, полученных на синтетической (среда М1Д) и полусинтетической (среда Сабуро) жидких средах, представлены на рисунке 14 и 15. Типичные хроматограммы экстрактов из мицелия культур *Alternaria* spp., полученных на различных жидких питательных средах, представлены на рисунке 16. Хроматограммы экстрактов из твердофазных культур *Alternaria* spp., полученных на перловой крупе показаны на рисунке 17.

Экзогенные метаболиты. Анализ хроматограмм ЭкзоНМ и ЭкзоПМ, показал высокую степень схожести компонентного состава экстрактов из различных штаммов *A. japonica* (Салимова Д. Р. и др., 2018). Основными мажорными компонентами неполярных экстрактов из культуральной жидкости *A. japonica* были соединения с пиками, соответствующими молекулярной массе 720, 702 и 684 Да. (рисунок.14а и 15а). Два последних соединения, очевидно, отличаются от первого на одну и две гидроксильные группы, что подтверждается их хроматографической подвижностью (Mw 720 Да, t_R 11.7; Mw 702 Да, t_R 13.6; Mw 684 Да, t_R 15.3 мин). При этом, все они схожи фрагментным ионом $[M-127]^+$ и отсутствием поглощения в УФ (Идентификация и токсикологическая..., 2021). Соединение с молекулярной массой 684 Да может быть идентифицировано как брассициколин А, соединение с Mw 720 Да – как дигидробрассициколин А, – метаболиты гриба *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire (Structure of brassicicolin A ..., 1988; Pedras, Park, 2015). Содержание этих метаболитов в неполярных экстрактах из *A. japonica*, полученных на среде М1Д, было выше (в 2–3 раза) относительно экстрактов ЭкзоНМ из культур с полусинтетических сред. Дигидробрассициколин А присутствовал в профиле ЭкзоПМ из *A. japonica*, полученных на синтетических средах, в качестве минорного компонента

экстракта. При культивировании на среде М1Д, в составе полярных экстрактов были мажорные метаболиты с молекулярными массами Mw 414 Да (t_R 14.8 мин) и Mw 424 Да (t_R 17.3 мин) (рисунок 14б). Профиль ЭкзоПМ из культур *A. japonica*, полученных на полусинтетических средах значительно отличался (рисунок 14б) наличием соединений с Mw 186 Да (t_R 5.4 мин), Mw 283 Да (t_R 7.0 мин), Mw 542 Да (t_R 8.7 мин), Mw 520 Да (t_R 9.5 мин), Mw 459 Да (t_R 14.3 мин, m/z 415 $[M-45]^+$, 460 $[M+H]^+$) (Идентификация и токсикологическая..., 2021). Полярные экстракты из фильтрата культур *A. japonica* не содержали ранее известных метаболитов гриба.

Анализ профилей ЭкзоНМ и ЭкзоПМ из экстрактов культур *A. sonchi* показал, что в их составе преобладали соединения, молекулярная масса которых не превышала 400 Да. Мажорными метаболитами неполярных экстрактов из *A. sonchi* S-102, полученных на синтетических средах, были соединения с Mw 415 Да (t_R 7.2 мин, УФ λ_{max} 233, 295 нм) и Mw 228 Да (t_R 7.3 мин) (рисунок 14в). Все ВЭЖХ-МС- профили ЭкзоНМ из экстрактов штаммов *A. sonchi* содержали пики метаболитов с Mw 258 Да и 352 Да (рисунок 14в и 15в). Их молекулярная масса и УФ-спектры согласуются с литературными данными и соответствуют альтерналиолу (Mw 258 Да; УФ λ_{max} 255, 288, 299, 337 нм) и хлормонилининовой кислоте В (Mw 352 Да; УФ λ_{max} 247, 334 нм) (Инсектицидная, акарицидная ..., 2019). Последний присутствовал в качестве мажора вместе с метаболитом с Mw 270 (t_R 12.3 мин, УФ λ_{max} 235, 248, 300, 362 нм) в профилях ЭкзоПМ из экстрактов *A. sonchi*, выращенных на среде М1Д. При культивировании на полусинтетических жидких средах, в профилях полярных экстрактов из штаммов *A. sonchi* преобладали соединения с молекулярной массой 283 Да (t_R 6.8 мин, УФ λ_{max} 237, 279 нм) и 278 Да (t_R 7.6 мин, УФ λ_{max} 233, 278 нм) (рисунок 15г). Из всех пиков, обнаруженных в профилях ЭкзоПМ, пик с Mw 352 Да по УФ-спектрам и молекулярной массе был идентифицирован как хлормонилининовая кислота В (Инсектицидная, акарицидная ..., 2019).

Хроматограммы ЭкзоНМ экстрактов из *A. tenuissima* 253-011, полученных на различных жидких средах, были схожи наличием метаболита с Mw 414 Да и 416 Да – тентоксин и дигидротентоксин, соответственно (рисунок 14д и 15д). Также в состав неполярных экстрактов из *A. tenuissima*, полученных на синтетических средах, входили мажорные экзометаболиты, предположительно относящиеся к группе меротерпеноидов, такие как АСТГ-токсины и трициклоальтенарены (Mw 348 и 362 Да), точная идентификация которых затруднена из-за наличия изомеров (Идентификация и токсикологическая..., 2021; Studies on host-selective ..., 1986; Tricycloaltemarenes produced ..., 1997; Ostry, 2008; Amino acid-oriented ..., 2019). Эти метаболиты не были обнаружены даже в качестве минорных компонентов экстрактов ЭкзоНМ и ЭкзоПМ из различных штаммов *A. japonica* и *A. sonchi* (Идентификация и токсикологическая..., 2021).

Анализ профиля ЭкзоПМ показал, что состав питательной среды не влиял на качественный комплекс вторичных метаболитов из *A. tenuissima*. Общим мажорным метаболитом в полярных

экстрактах было соединение с Mw 197 Да (t_R 10.7 мин) (рисунок 14е и 15е). Молекулярная масса и УФ-спектр этого соединения (УФ λ_{max} 233, 275 нм) соответствовали тенуазоновой кислоте – микотоксину, продуцируемому грибами рода *Alternaria*. Полярные экстракты из культур *A. tenuissima* 253-011, полученных на средах Сабуро и ДМГ, отличались лишь наличием одного минорного пика вещества с Mw 272 (t_R 13.6 мин, УФ λ_{max} 251, 236 нм). Хроматографические характеристики которого соответствуют метиловому эфиру альтернариола (Stability of mycotoxins ..., 2020) (рисунок 15е).

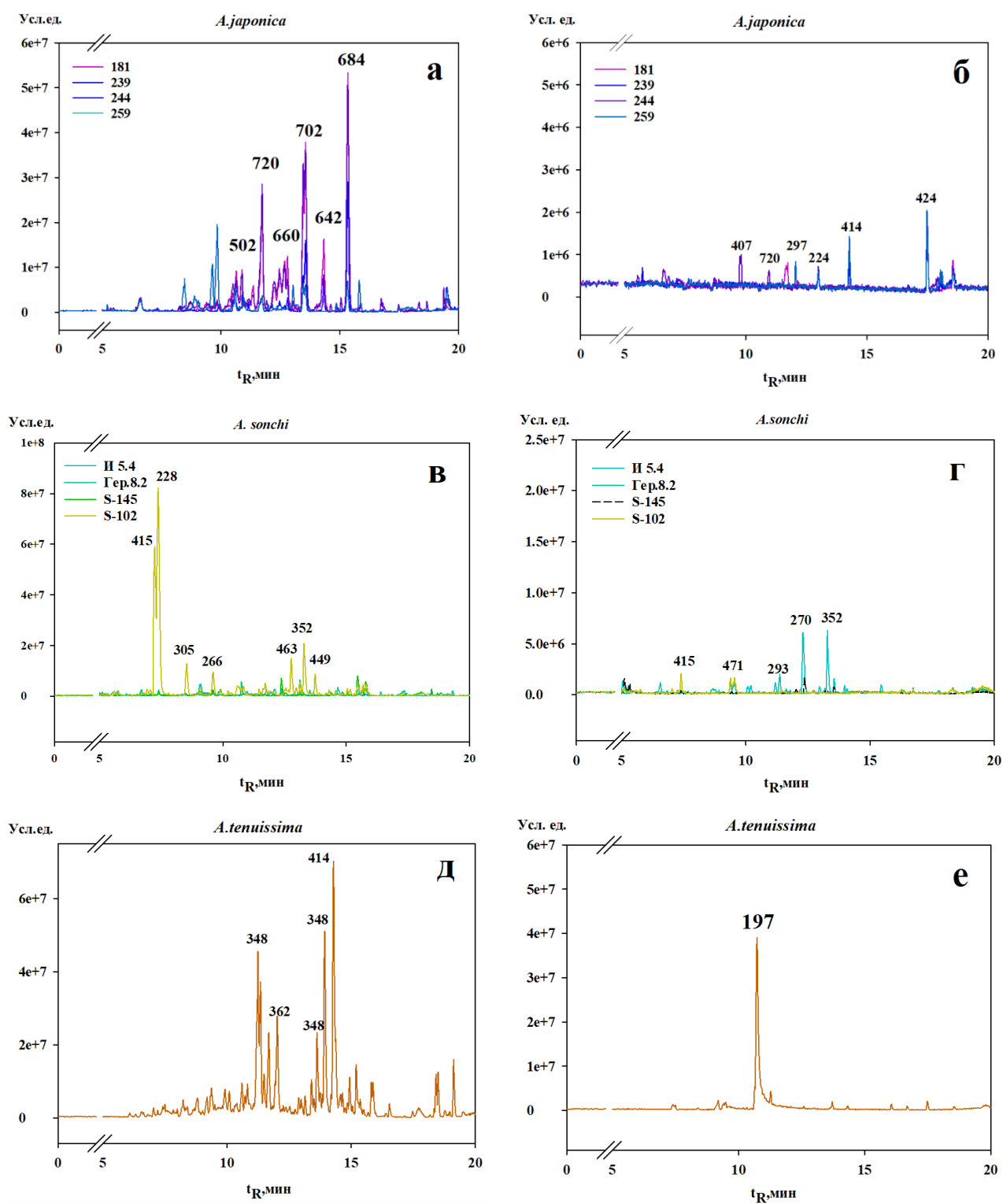


Рисунок 14 – Типичные ВЭЖХ-МС хроматограммы экстрактов из фильтрата различных культур *Alternaria* spp., полученных на жидкой среде М1Д

Хлористометиленовые (а) и этилацетатные (б) экстракты из *A. japonica*; хлористометиленовые (в) и этилацетатные (г) экстракты из *A. sonchi*; хлористометиленовые (д) и этилацетатные (е) экстракты из *A. tenuissima*

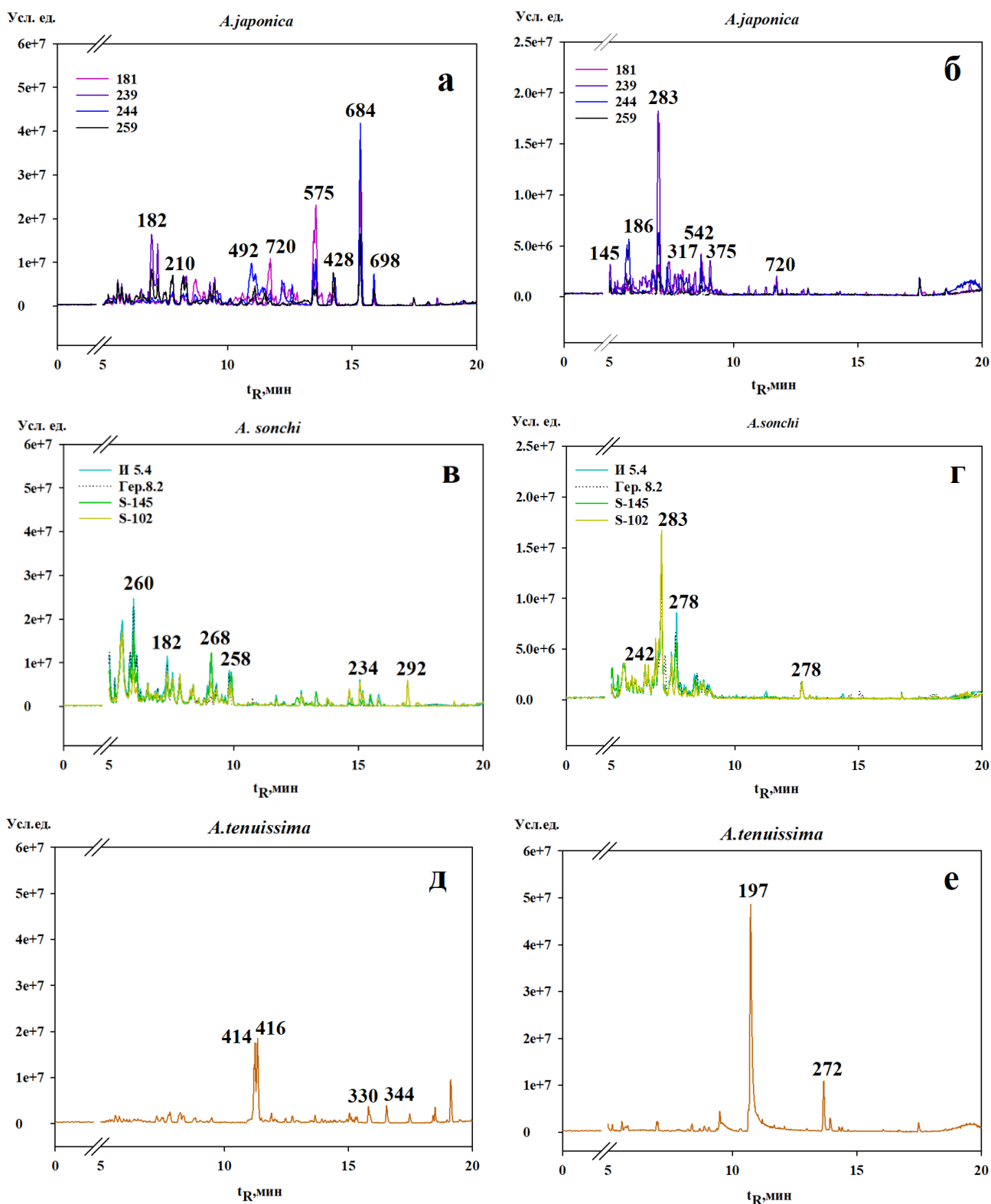


Рисунок 15 – Типичные ВЭЖХ-МС хроматограммы экстрактов из фильтрата различных культур *Alternaria* spp., полученных на жидкой среде Сабуро

Хлористометиленовые (а) и этилацетатные (б) экстракты из *A. japonica*; хлористометиленовые (в) и этилацетатные (г) экстракты из *A. sonchi*; хлористометиленовые (д) и этилацетатные (е) экстракты из *A. tenuissima*

Эндогенные метаболиты при жидкофазном культивировании. В ВЭЖХ-МС-профилях ЭндоПМ из обезжиренного мицелия штаммов *A. japonica* присутствовали те же соединения (Mw 720 Да и 415 Да), что и в хроматограммах ЭкзоНМ и ЭкзоПМ. Также в составе полярных эндогенных экстрактов детектированы два пика соединений с Mw 234 (t_R 14.6 и 15.0 мин) (рисунок 16а), характеризующиеся в УФ-спектре несколькими полосами поглощения в диапазоне λ_{max} 220–225, 255–260 нм и 330–340 нм. По хроматографическим параметрам эти два метаболита были идентифицированы как фоменин А (=фомапирон А) и фоменин Б, известные у видов *A. brassicicola*, *A. infectoria* E.G. Simmons, *Phoma lingam* (Tode) Desm. и *Ph. tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch, Gikaschvili (Phomenins A and B ..., 1993; Phomalairdenone: a new ..., 1999; Ivanova et al., 2010; Pedras, Park, 2015). В обезжиренном экстракте из мицелия *A. japonica* 259-011 мажорным метаболитом был эфир альтернариола (Mw 272 Да) и вещество с Mw 292 (рисунок 16б). Основную часть компонентного состава экстрактов из мицелия *A. japonica* составляли вторичные метаболиты с молекулярной массой, не превышающей 350 Да.

Состав питательной среды повлиял на качественный состав эндометаболитов в экстрактах из культур *A. sonchi* с различных жидких сред. Профили ЭндоПМ из обезжиренного мицелия были схожи наличием тентоксина и изомера 4-хлорпинзелина (t_R 14.5) (рисунок 16в и 16г). Последний идентифицировали согласно данным литературы по молекулярной массе 334 Да и характерным УФ-спектрам (λ_{max} 238, 265, 298, 390 нм). На хроматограммах ЭндоПМ из экстрактов *A. sonchi*, полученных на синтетических средах, мажорными были пики соединений с Mw 273 Да (t_R 3.15 мин), Mw 317 Да (t_R 3.3 мин) (отсутствуют полосы поглощения в УФ-области) (рисунок 15в) и Mw 252 Да (t_R 15.4 мин, УФ λ_{max} 235, 292 нм) (рисунок 16в и 16г). Последнее было одним из мажорных компонентов в комплексе ЭндоПМ из обезжиренного мицелия культур, полученных на среде Сабуро. При культивировании *A. sonchi* на среде М1Д ВЭЖХ-профили ЭндоПМ отличались наличием комплекса мажорных пиков соединений с Mw 182 Да (t_R 7.3 мин), Mw 258 Да (t_R 9.8 мин), Mw 308 Да (t_R 11.7 мин) (рисунок 16г). Полосы поглощения в УФ-области этих соединений отсутствуют, что затрудняет идентификацию метаболитов, исходя только из молекулярной массы.

Анализ хроматограмм ЭндоПМ экстрактов из обезжиренного мицелия *A. tenuissima* 253-011, полученного на различных средах содержали пики тентоксина (рисунок 15д и 15е) с Mw 414 (t_R 11.2 мин, УФ λ_{max} 284 нм) (Stability of mycotoxins ..., 2020) и метилового эфира альтернариола с Mw 272 Да (t_R 13.6 мин, УФ λ_{max} , нм: 250, 332) (рисунок 16е). Пик соединения с Mw 161 (t_R 8.9 мин, УФ-спектр отсутствует) был отмечен в профилях ЭндоПМ из обезжиренного мицелия, полученного на полусинтетических средах. При культивировании *A. tenuissima* на синтетических средах, хроматограммы эндогенных полярных экстрактов из мицелия отличались наличием пиков с Mw 374 Да (t_R 14.3 мин и t_R 16 мин) с Mw 394 Да (t_R 15.7 мин) (рисунок 16д).

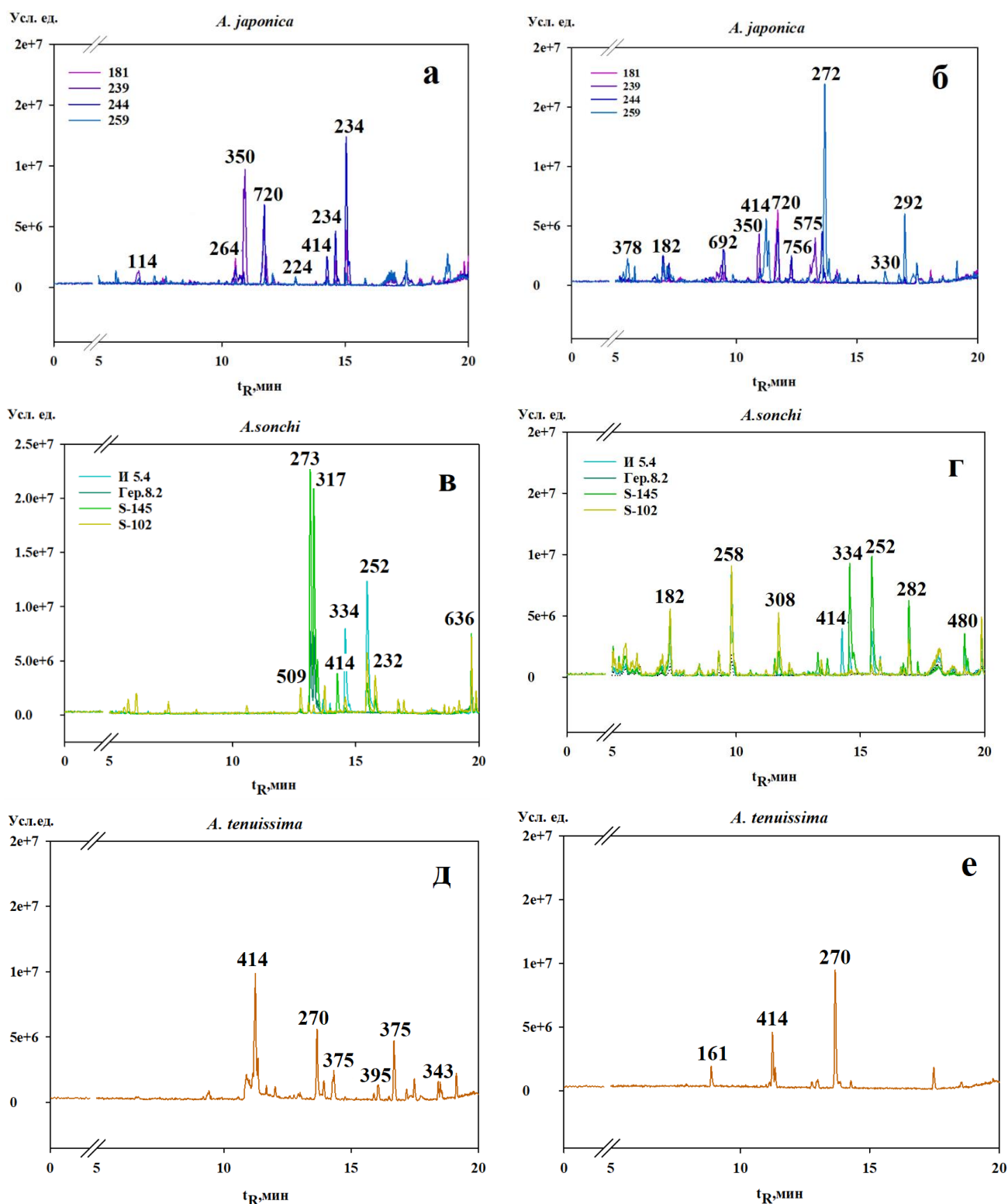


Рисунок 16 – Типичные ВЭЖХ-МС хроматограммы полярных экстрактов из мицелия различных культур *Alternaria* spp., полученных на жидких средах М1Д и Сабуро
 Экстракты из *A. japonica* на среде М1Д (а) и среде Сабуро (б); экстракты из *A. sonchi* на среде М1Д (в) и среде Сабуро (г); экстракты из *A. tenuissima* на среде М1Д (д) и среде ДМГ(е)

Экстрактивные метаболиты при твердофазном культивировании. Анализ хроматографических профилей неполярных и полярных метаболитов из экстрактов культур *A. japonica*, полученных твердофазным культивированием, показал отсутствие известных

метаболитов, характерных для грибов рода *Alternaria*. Общим на профилях неполярных и полярных (мажорный компонент) эндогенных метаболитов из экстрактов *A. japonica* был пик соединения с Mw 297.1 Да, продуцируемый штаммом 259-011 (рисунок 17б). Профили экстрактивных метаболитов отличаются наличием низкомолекулярных соединений с Mw 222 Да, Mw 234 Да и Mw 344 Да (рисунок 17а) в неполярных экстрактах и минорным пиком соединения с Mw 538 Да, который соответствует брассицицену А.

ВЭЖХ-МС-профили экстрактивных метаболитов из культур *A. sonchi*, полученных при твердофазном культивировании, были более информативными, чем профили эндометаболитов из экстрактов этих же грибов, полученных при поверхностно-глубинном культивировании (рисунок 17в и 17г). Неполярные и полярные комплексы метаболитов из экстрактов содержали в своем составе общие соединения, характерные для вида *A. sonchi* и идентифицированные как 4-хлорпинзелина и его изомеры с Mw 334 Да (рисунок 17в). Также был идентифицирован пик соединения с Mw 300 Да, который возможно соответствует одному из изомеров пинзелина, продуцируемого *A. sonchi* (Инсектицидная, акарицидная ..., 2019) (рисунок 17г). В профилях неполярных экстрактов эти метаболиты были в малом количестве, но помимо них в составе экстракта присутствовали соединения с Mw 574 Да и 640 Да. В профилях полярных экстрактов из различных штаммов *A. sonchi* мажорным пиком был метаболит с молекулярной массой 252 Да (рисунок 17г).

Состав неполярного экстракта из *A. tenuissima* 253-011, при твердофазном культивировании, значительно отличался от комплекса метаболитов в экстрактах из *A. japonica* и *A. sonchi*. ВЭЖХ-МС профиль неполярного экстракта содержал пик соединения с Mw 362 Да, которое может относиться к периленхинонам, и минорный пик соединения с Mw 292 Да (рисунок 17д). Мажорными компонентами неполярного экстракта были не идентифицированные соединения с Mw 344 Да и Mw 323 Да (рисунок 17д).

Анализ хроматограммы полярного экстракта из *A. tenuissima* 253-011, полученного на твердом субстрате, показал наличие мажорного пика соединения с Mw 197 Да – тенуазоновая кислота и комплекс минорных пиков метаболитов с Mw 320 Да, 348 Да, Mw 360 Да и 538 Да (рисунок 17е).

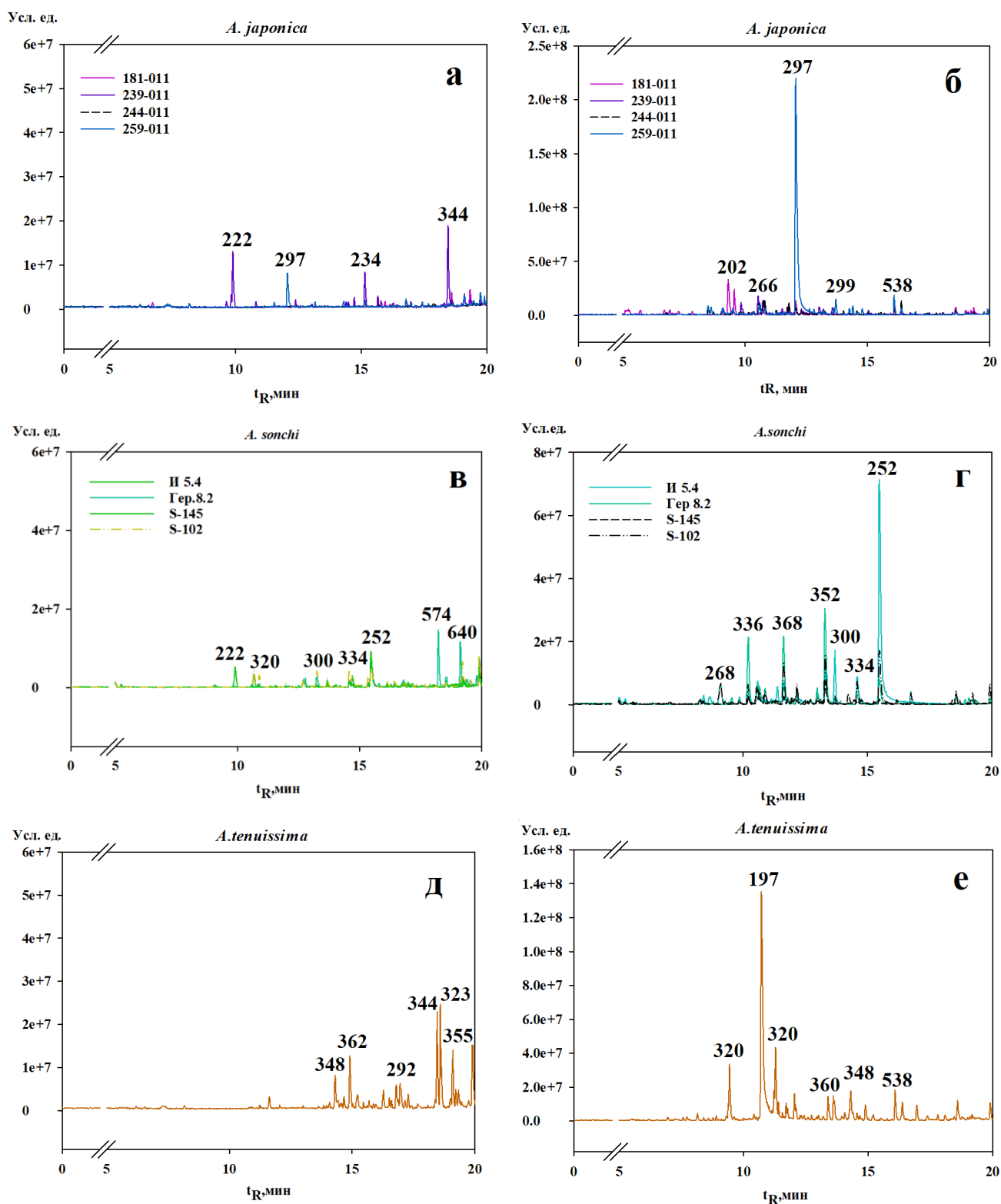


Рисунок 17 - Типичные ВЭЖХ-МС хроматограммы экстрактов из различных культур *Alternaria* spp., полученных твердофазным культивированием на перловой крупе Гексановые (а) и этилацетатные (б) экстракты из *A. japonica*; гексановые (в) и этилацетатные (г) экстракты из *A. sonchi*; гексановые (д) и этилацетатные (е) экстракты из *A. tenuissima*

Сравнительный анализ метаболитных профилей экстрактов из культур изучаемых штаммов, полученных на различных жидких питательных средах, показал, что *A. japonica* не

образует микотоксины характерные для мелкоспоровых *Alternaria* spp. секции *Alternaria*, в частности: альтернариол, его монометилловый эфир, тенуазоновую кислоту, тентоксин и альтенуен. При этом в культурах *A. tenuissima* 253-011 эти микотоксины были обнаружены. Таким образом, *A. japonica* и *A. tenuissima* различаются не только по морфологическим и молекулярным признакам, но и по составу образуемых метаболитов. Обнаружение рядом авторов указанных микотоксинов в культурах *A. japonica* с высокой долей вероятности связано с неправильной видовой идентификацией рабочих штаммов.

К настоящему моменту токсические свойства метаболитов *A. japonica* только начинают изучаться: получены первые данные по фитотоксичности, цитотоксичности, а также акарицидной и инсектицидной активности экстрактов *A. japonica* 181-011, полученных из культур на среде ДМГ (Спектр биологической ..., 2018; Инсектицидная, акарицидная ..., 2019). В представленной работе показано, что экстракты из культуральной жидкости всех четырех изученных штаммов *A. japonica* были фитотоксичными для листьев редиса, но нетоксичными или слаботоксичными для инфузории-туфельки. Этилацетатные экстракты из мицелия различных штаммов *A. japonica*, напротив, проявили высокий уровень цитотоксичности – на уровне экстрактов из культур *A. tenuissima* 253-011.

Культуры одноклеточных простейших, таких как инфузории, используются как индикаторы загрязненности кормов и воды ксенобиотиками, а также как биомаркеры токсичности пестицидов, микотоксинов и метаболитов продуцентов биопестицидов (Altomare et al., 2012). Данных по действию микотоксинов грибов *Alternaria* на инфузории недостаточно. Известно, что мицелиальные экстракты и культуральная жидкость *A. alternata* (Fr.) Keissl. токсичны для клеток *P. caudatum* (Domsch et al., 2007; Pankova et al., 2018). С другой стороны, более десяти поликетидных метаболитов, выделенных из твердой культуры *A. sonchi* J.J. Davis, были нетоксичными для инфузорий (Analysis and isolation ..., 2020).

На основании анализа ряда физико-химических характеристик (хроматографическая подвижность, УФ- и масс-спектры) и данных литературы в экстрактах *A. japonica* идентифицированы некоторые мажорные метаболиты, характерные для *A. brassicicola* и *A. infectoria*: брассициколин А, дигидробрассициколин А, фоменин А (= фомапирон А) и фоменин Б. Известно, что брассициколин А обладает фитотоксическими свойствами в отношении горчицы *Brassica juncea* (Pedras, Yu, 2009). Данные по фитотоксичности фоменинов пока противоречивы: фоменин А вызывал увядание срезанных стеблей томатов в концентрации 200 мкг/мл, в то время как фоменины А и Б были нетоксичны для листьев крестоцветных. При этом, фоменины А и Б токсичны для рачков вида *Artemia salina* с ЛД₅₀ 38 и 31 мкг/мл соответственно (Phomenins A and B ..., 1993; Pedras, Yu, 2009). Смесь фоменинов А и Б в соотношении 10:1 обладала слабой токсичностью в отношении линии клеток человека MRC-5 (Ivanova et al., 2010); структурно

близкие пироны из *Xylaria hypoxylon* – слабой цитотоксичностью ($LD_{50} > 50$ мкг/мл) в отношении ряда линий опухолевых клеток человека (Schüffler et al., 2007). Таким образом, можно предположить, что фитотоксические свойства хлористометиленовых экстрактов из культуральной жидкости *A. japonica* могут быть частично обусловлены доминирующим в них брассициколином А, а токсичность этилацетатных экстрактов из мицелия в отношении инфузорий – за счет фоменинов А и Б.

В экстрактах этого вида гриба осталось много неидентифицированных минорных соединений, которые, обладая биологической активностью, также могут играть определенную роль в развитии их продуцента. Вполне вероятно, что они могут являться родственными структурами обнаруженных веществ из групп изоцианидов и пиранов: об этом свидетельствуют как молекулярные массы хроматографических пиков, так и УФ-спектры.

Сравнительный анализ метаболитных профилей экстрактов из культур *A. sonchi*, полученных на различных питательных субстратах, показал, присутствие в экстрактах соединений известных в литературе как пинзелин, 4-хлорпинзелин, монилифенон и хлоромонилининовая кислота В. Важно отметить, что среди метаболитов культур *A. sonchi* не было обнаружено известных микотоксинов грибов рода *Alternaria* – альтерналиола и его метилового эфира, тенуазоновой кислоты, тентоксина.

Пинзелин, 4-хлорпинзелин, монилифенон и хлоромонилининовая кислота В содержат общий структурный фрагмент – альтехромон А, который впервые был выделен из эндофитного штамма *A. brassicicola* (Structural Revision ..., 2010).

В данной работе показано, что экстракты из культур *A. tenuissima* 253-011, полученные различными способами, обладают энтомотоксическими, фитотоксическими, антимикробными и цитотоксическими свойствами. В экстрактах из культуральной жидкости нами обнаружен ряд известных и неидентифицированных соединений, однако их состав существенно варьировал в зависимости от композиции субстратов.

Часть из вторичных метаболитов мелкоспоровых *Alternaria* spp. охарактеризованы как микотоксины (тенуазоновая, кислота, альтерналиол и его метиловый эфир, альтертоксины), другие – как вещества с интересной фитотоксической (альтенуен, тенуазоновая кислота, тентоксин и ряд хозяин-специфических токсинов), цитотоксической активностью (би- и трициклоальтернарены) и другими типами биологической активности (ингибиторы ферментов, антиоксиданты и проч.). Соответственно, спектр и степень биологической активности культур и экстрактов из них зависят от наличия указанных и других биологически активных веществ (Lou et al., 2013; Pinto, Patriarca, 2017; Далинова и др., 2020).

Известно, что тенуазоновая кислота, образуемая некоторыми видами рода *Alternaria*, была энтомотоксична по отношению к личинкам первого возраста зеленой мясной мухи *Lucilia*

sericata (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) (ЛД₅₀ 120 мкг/мл), но не была активна по отношению к другим тестируемым насекомым из различных отрядов: *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae), *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae) и *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) (Insecticidal activity of ..., 1975). В концентрации 0.06 мкг/мл, нетоксичной для чайной розы и розовой тли, тенуазоновая кислота способна достоверно снижать плодовитость этого насекомого, что, предположительно, связано с индукцией образования репеллентов в обработанных этим токсином листьях (*Alternaria* toxin-induced ..., 2015; Tenuazonic acid-induced ..., 2020).

3. 5 Оценка взаимосвязи типов активности и состава экстрактов

С помощью метода главных компонент провели анализ биологически активных экстрактов на наличие взаимосвязи между химическим составом экстрактов и типом их активности. Анализ полученного массива данных включал только экстракты, биологическое действие которых было на уровне свыше 50 % в отношении тест-объектов.

A. japonica. Рассчитанный 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) (рисунок 18). В отдельную группу вошли экстракты, которые проявили умеренную, но селективную фитотоксическую активность (на листовых высеках осота и пшеницы). В составе этих экстрактов присутствовали соединения с молекулярной массой 283 и 414 Да. Фитотоксическая активность в отношении листьев редиса наблюдалась у экстрактов, которые одновременно были умеренно токсичны для грамположительной бактерии и гусениц большой вощиной огневки. В состав группы этих экстрактов входит предварительно идентифицированный дигидробрассициколин А. Сам brassициколин А, входил группу, которую образовали экстракты, обладающие антимикробной активностью в отношении дрожжевого гриба *C. albicans*. Помимо brassициколина А в группе присутствуют соединения близкие к его молекулярной массе, возможно, его структурные аналоги или продукты распада. Четвертую группу образуют экстракты с умеренным афидоцидным действием (относительно контроля) в отношении злаковой тли и высокой цитотоксичностью для клеточной линии насекомых (Sf9) (основная часть экстрактов этой группы вызывала полную гибель клеток).

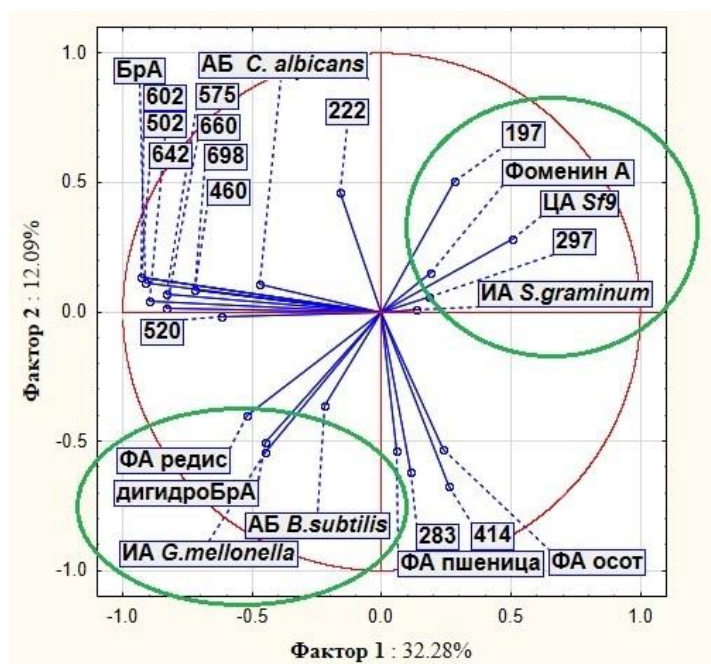


Рисунок 18 – Анализ связи между активностью экстрактов из различных культур *A. jaronica* и содержанием в них мажорных метаболитов. Проекция переменных на факторную плоскость (факторы 1 x 2) на основе матрицы корреляций.

Примечание: **ИА** – инсектицидная активность: смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10).; **ЦА** – цитотоксическая активность: доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01%-ном экстракте; **ФА** – фитотоксическая активность: диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; **АБ** – антибиотическая активность: радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск); * – молекулярная масса неидентифицированного соединения в составе экстракта; **БрА** – фракция с брассициколином А; **дигидроБрА** – дигидробрассициколин А

A. sonchi. 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 *S. graminum* и гусениц *G. mellonella* с наличием в составе уже известных соединений (например, хлормонилиниковая кислота В) (рисунок 19). Параллельно эти экстракты были фитотоксичны (для листовых высечек осота) и ингибировали рост колоний *B. subtilis*. В состав данной группы не вошли предварительно идентифицированные метаболиты *A. sonchi*. Также два типа биологической активности было характерно для группы, в состав которой из идентифицированных метаболитов входили монилифенон и хлормонилиниковая кислота В, неидентифицированных – соединения с молекулярной массой 336 Да и 368 Да. Для данных сгруппированных экстрактов характерно цитотоксическое действие на клетки линии Sf9 и фитотоксичность (для листовых отрезков пшеницы). Селективную антибиотическую активность в отношении *C. albicans* проявили экстракты в состав которых входили как известные идентифицированные (4-хлорпинзелин и его

изомер) метаболиты *A. sonchi* так и неидентифицированные (с молекулярной массой 252, 574, 640 Да). В отдельную группу объединились соединения, не проявившие ни один из возможных типов биологической активности. Среди этих метаболитов был альтерналиол, остальные 5 метаболитов (228, 268, 308, 378, 414 Да) не идентифицированы. Вероятно, они были сопутствующими минорными компонентами в составе экстрактов.

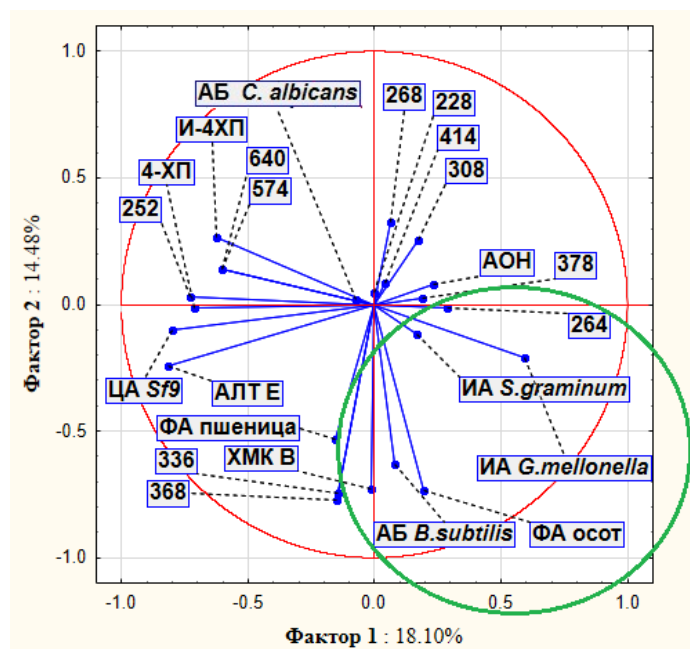


Рисунок 19 – Анализ связи между активностью экстрактов из различных культур *A. sonchi* и содержанием в них мажорных метаболитов. Проекция переменных на факторную плоскость (факторы 1 x 2) на основе матрицы корреляций.

Примечание: **ИА** – инсектицидная активность: смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10).; **ЦА** – цитотоксическая активность: доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01%-ном экстракте; **ФА** – фитотоксическая активность: диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; **АБ** – антибиотическая активность: радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск); * – молекулярная масса неидентифицированного соединения в составе экстракта; **4-ХП** – 4-хлорпинзелин; **И-4ХП** – изомер 4-хлорпинзелина; **АОН** – альтерналиол; **ХМК В** – хлромонилининовая кислота В; **АЛТ Е** – альтернэтанокин Е

A. tenuissima. 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 %) (рисунок 20). Все полярные экстракты из фильтрата 253-011, которые содержали в своем составе теназоновую кислоту и обладали преимущественно высокой токсичностью в отношении *G. mellonella*, *B. subtilis* и вызывали некроз на листовых высечках осота и редиса формировали отдельную группу (Entomotoxic activity of ..., 2021). Инсектицидная

активность в отношении *G. mellonella* связана с содержанием тенуазоновой кислоты, и в меньшей степени с соединением с Mw 320 Да. С этим метаболитом связана антибиотическая активность в отношении *B. subtilis*. Вместе сгруппировались хлористометиленовые экстракты из фильтрата 253-011 *A. tenuissima*, полученного на средах М1Д, ДМГ и Сабуро. Они проявили заметный уровень инсектицидной активности в отношении злаковой тли (смертность тли, относительно контроля, на уровне 60-80 %) и высокую антибиотическую активность против *C. albicans* (радиус ингибирования роста колонии составил 10 мм). В составе метаболитного профиля этих экстрактов присутствовали идентифицированные тентоксин и дигидротентоксин, а также низкомолекулярные (348 Да и 328 Да) соединения, которые возможно относятся к группе меротерпеноидов, такие как АСТГ-токсины и трициклоальтенаарены (Entomotoxic activity of ..., 2021). Инсектицидная активность на злаковой тле связана с содержанием тентоксина и дигидротентоксина, а также фитотоксичностью на листьях пшеницы и антифунгальным действием в отношении *C. albicans*. Возможно, тентоксин косвенно действует на тлю, через растение, влияя на качество питательного субстрата. Соединения с приблизительно схожей молекулярной массой (339, 344, 362 Да) выделились в отдельную группу (рисунок 20), для которой была характерна высокая цитотоксическая активность на клетках линии Sf9 (100%-ая гибель клеток).

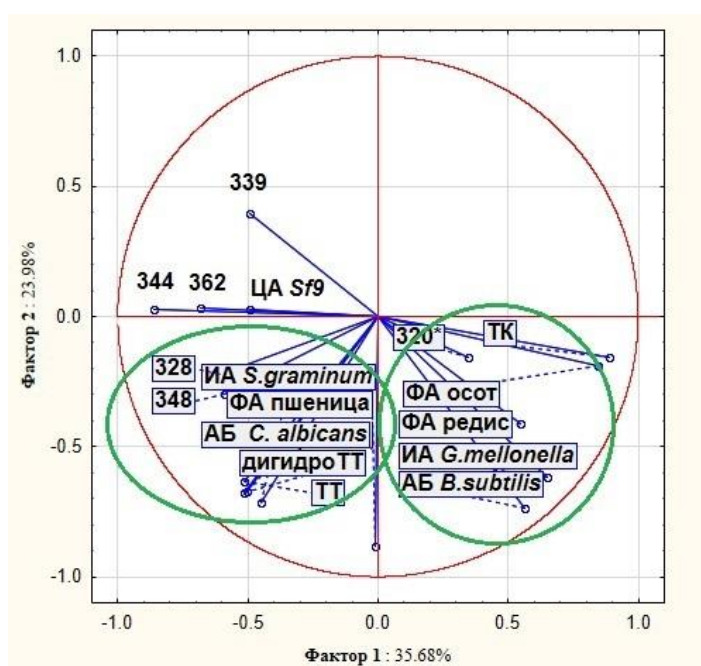


Рисунок 20 – Анализ связи между активностью экстрактов *A. tenuissima* 253-011 и содержанием в них мажорных метаболитов. Проекция переменных на факторную плоскость (факторы 1 x 2) на основе матрицы корреляций.

Примечание: ИА – инсектицидная активность: смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10).; ЦА – цитотоксическая активность: доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01%-ном экстракте;

ФА – фитотоксическая активность: диаметр/длина некроза (мм) на листовых высеках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; **АБ** – антибиотическая активность: радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск); * – молекулярная масса неидентифицированного соединения в составе экстракта; **ТК** – тенуазоновая кислота; **ТТ** – тентоксин; **дигидроТТ** – дигидротентоксин

Таким образом, применение анализа методом главных компонент позволило визуализировать взаимосвязь между составом метаболитного профиля и типом биологической активности полученных экстрактов из культур *Alternaria* spp. На основании полученных данных, возможно подробное изучение действия конкретных метаболитов в отношении биологических объектов, в частности, действия тенуазоновой кислоты на *G. mellonella* и других насекомых, ввиду высокой корреляции ($r=0.86$) токсина с инсектицидной активностью в отношении гусениц большой вощиной огневки.

ГЛАВА 4. ЭНТОМОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

Поскольку тенуазоновая кислота (ТК) была основным метаболитом в экстрактах из культуры *A. tenuissima* 253-011, продемонстрировавших токсичность в отношении личинок воициной огневки, для выделения токсина в большем количестве и более подробного изучения его действия в отношении различных видов членистоногих, фильтрат культуральной жидкости гриба нарабатывали глубинным культивированием в биореакторе (условия культивирования подробно описаны в п. 2.4 главы «Материалы и методы исследования»). Из экстракта культуральной жидкости *A. tenuissima* 253-011 при помощи гель-хроматографии, колоночной адсорбционной хроматографии и препаративной ВЭЖХ (ход фракционирования и финальной очистки описан в п. 2.4) были выделены тенуазоновая кислота (ТК) и валин-тенуазоновая кислота (Val-ТК) с выходом свыше 150 мг/л и 11.6 мг/л среды, соответственно.

Точную идентификацию ТК и Val-ТК проводили с использованием ЯМР-спектроскопии. В таблице 4 приведено сравнение данных ^1H и ^{13}C ЯМР спектров выделенных соединений (ТК и Val-ТК). Сигналы атомов водорода и углерода были соотнесены по данным двумерного ЯМР-спектра ближнего взаимодействия (HSQC). Сигналы четвертичных атомов углерода были соотнесены исходя из двумерных спектров дальнего взаимодействия (HMBC), основные корреляции представлены на рисунке 21.

Тенуазоновая кислота: ^1H и ^{13}C ЯМР спектры указывают на наличие трех метильных (δ_{H} 2.47 s; 1.03 d; 0.91t; δ_{C} 19.7; 15.6; 11.7 м. д.), одной метиленовой (δ_{H} 1.39 s; δ_{C} 23.9 м. д.), две метиновые группы (δ_{H} 1.97 m; 3.8 s; δ_{C} 37.3; 67.1 м. д.) вторая из которых входит в структуру пирролидинового кольца. Остальные четыре атома углерода были отнесены к четвертичным (δ_{C} 184.4; 102.46; 176.33; 195.4), причем, сигнал при 184.4 м. д. предполагает наличие карбонильного углерода. Присутствующий в ^1H ЯМР спектре сигнал при δ_{H} 6.65 м. д. указывает на протон гидроксильной группы. HMBC взаимодействия от H-7 (δ_{H} 2.47) к C-6 (δ_{C} 184.4), C-3 (δ_{C} 102.46), от H-5 (δ_{H} 3.8) к C-4 (δ_{C} 195.4), C-2 (δ_{C} 176.33), C-8 (δ_{C} 37.3), C-9 (δ_{C} 23.3), C-11 (δ_{C} 19.6), от H-1 к C-4 (δ_{C} 195.4) позволяют установить скелетную структуру соединения. ^1H - ^1H COSY ЯМР спектр позволил идентифицировать спиновую систему C-2/C-3/C-6/C-7 и C-5/C-8/C-9/C-10/C-11, соответствующую фрагментам структуры.

Валин-тенуазоновая кислота: ^1H и ^{13}C ЯМР спектры указывают на наличие трех метильных (δ_{H} 2.5 s; 0.88 d; 1.06 d; δ_{C} 19.38; 15.89; 19.04 м. д.), две метиновые группы (δ_{H} 2.25 s; 3.76 d; δ_{C} 30.12; 63.35 м. д.) вторая из которых входит в структуру пирролидинового кольца.

Остальные четыре атома углерода были отнесены к четвертичным (δ_C 175.57; 193.24; 102.26; 184.7) последний из которых предполагает наличие карбонильного углерода. Присутствующий в 1H ЯМР спектре сигнал при δ_H 6.5 м. д. указывает на наличие протона гидроксильной группы. НМВС взаимодействия от H-7 (δ_H 2.5) к C-6 (δ_C 184.7), C-3 (δ_C 102.26), от H-5 (δ_H 3.76) к C-4 (δ_C 193.24), C-2 (δ_C 175.57), C-8 (δ_C 30.12), C-10 (δ_C 15.89) от H-1 к C-4 (δ_C 193.24) позволяют установить скелетную структуру соединения.

1H - 1H COSY ЯМР спектр позволил идентифицировать спиновую систему C-2/C-3/C-6/C-7 и C-5/C-8/C-9/C-10, соответствующую фрагментам структуры. Структуры ТК и Val-ТК были определены в результате анализа данных 1H - 1H COSY, HSQC и НМВС экспериментов и представлены на рисунке 22.

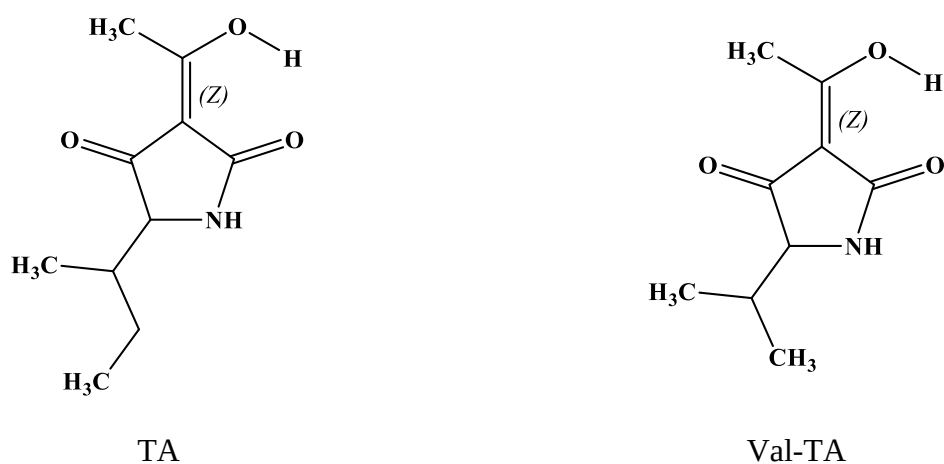


Рисунок 21 – Структурная формула соединений, выделенных из культуры *A. tenuissima* 253-011

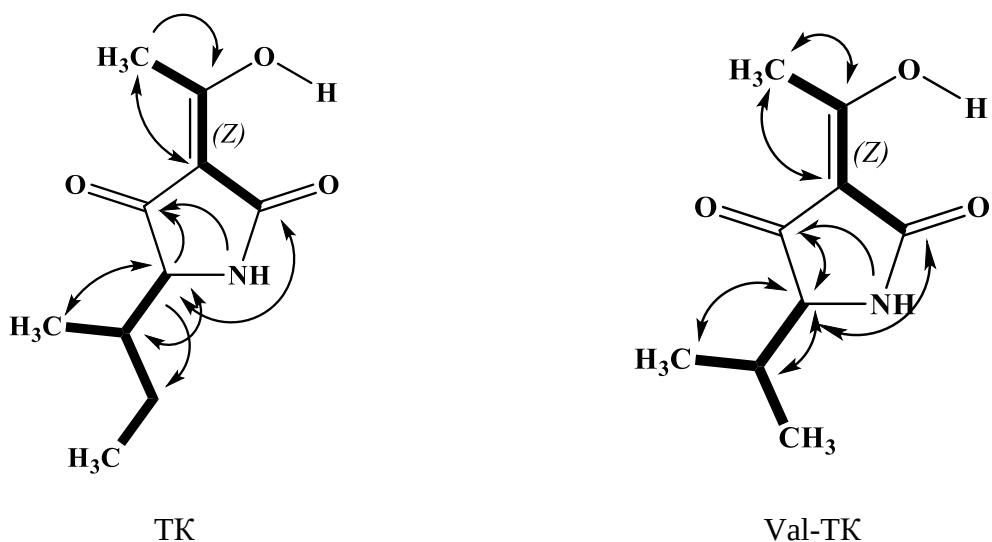


Рисунок 22 — Дальние протон-углеродные взаимодействия в молекулах ТК и Val-ТК

Таблица 4 — Химические сдвиги сигналов атомов ^1H и ^{13}C тенуазоновой кислоты и валин-тенуазоновой кислоты

Атом	ТК (Structure and tautomerism ..., 2013) (хлороформ)	ТК (дейтерированный хлороформ)		Val-ТК (Reversed-phase ..., 1991) (трихлорэтилен)		Val-ТК (дейтерированный хлороформ)	
	δ_{C} , ppm	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm	δ_{C} , ppm	δ_{H} , ppm
1	-	-	-	-	6.972 s	-	-
2	175.53 s	176.33	-	175.71 s	-	175.57	-
3	105.79 s	102.46	-	102.30 s	-	102.26	-
4	195.56 s	195.41	-	195.36 s	-	193.24	-
5	67.22	67.11	3.8 s	67.45 D	3.711 d ³	63.35	3.76 d ⁶
6	184.63	184.4	-	184.56 S	-	184.7	-
7	19.65	19.7	2.47 s	19.46 Q	2.422 s	19.38	2.5 s
8	37.10	37.3	1.97 m	30.12 D	2.20 m	30.12	2.25 s
9	23.75	23.9	1.24 d	19.35 Q	0.824 d ⁴	19.04	1.06 d ⁷
10	11.86	11.7	0.91 t ¹	15.86 Q	1.017 d ⁵	15.89	0.88 d ⁸
11	15.91	15.6	1.03 d ²				

Примечание. Константы спин-спинового взаимодействия: 1— $J=7.06$ Hz, 2— $J=7.2$ Hz, 3— $J=3.6$ Hz, 4— $J=6.8$ Hz, 5— $J=7.0$ Hz, 6— $J=3.5$ Hz, 7— $J=6.8$ Hz, 8— $J=7.1$ Hz

Структура тенуазоновой кислоты впервые была описана Стикингом (Stickings, Townsend, 1961) и позже более подробно исследована научной группой под руководством Вассела (Nolte et al, 1980). Тенуазоновая кислота, как производное ацетилтетрамовой кислоты, существует в виде смеси таутомерных и ротамерных форм, что затрудняет ее точную идентификацию химической структуры (Structure and tautomerism ..., 2013). Поскольку уровень действия биологически активного вещества обусловлен не только наличием определенных функциональных групп, но и пространственной изомерией соединения, важно определить точную форму пространственного изомера.

Анализ совокупности данных масс-спектров (приложение Б, рисунок Б. 1), углеродных и протонных ЯМР-спектров (приложение Б, рисунок Б. 2 и Б. 3), двумерных спектров ближнего (HSQC) (приложение Б, рисунок Б. 4) и дальнего (HMBC) (приложение Б, рисунок Б. 5) взаимодействия и сопоставление с литературными данными (таблица 4) свидетельствуют о выделении Z-изомеров тенуазонной и валин-тенуазоновой кислоты.

4.2. Энмотоксические, акарицидные и цитотоксические свойства тенуазоновой кислоты

Известно, что ряд морфометрических (вес, плодовитость) и популяционных (рождаемость, смертность, темп развития) признаков может служить интегральными показателями состояния организма и популяции насекомых (Дубовский, 2015). В связи с этим, нами было исследовано влияние ТК на некоторые морфометрические и популяционные признаки различных видов членистоногих с целью подтверждения ее энмотоксической активности. В разделе 2.1.2 «тест-организмы» приведен перечень видов членистоногих, использованных в биотестах. В работу были включены членистоногие, выводимые или размножаемые в лабораторных условиях. При оценке действия тенуазоновой кислоты применяли различные методы испытания токсина (при контактной обработке, при скормливании с пищей, индивидуальная обработка — способ инъекций) и количественную оценку его токсичности.

4.2.1 Пероральный эффект

Известно, что на действие токсинов, поступающих вместе с пищей в организм насекомых, влияет множество факторов, таких как, вид насекомого, стадия его развития, химическая структура токсина и его количественное содержание в диете насекомых.

Двухфакторный дисперсионный анализ lg-трансформированных данных показал, что питание личинок *Galleria mellonella* (L.) на фоне различных концентраций ТК приводило к существенному снижению прироста их биомассы (df 4, F=70.1, P<0.001). Фактор времени был несущественным (df 5, F=1.4, P=0.25). Взаимодействие факторов «время» и «концентрация ТК» было достоверным (df 20, F=6.4, P<0.001). Существенную (при P=0.05) разницу массы личинок по сравнению с контролем отметили при концентрации токсина 2.5 мг/г корма, начиная с 4 суток после обработки, а на 10 сутки наблюдений она была примерно в 2 раза ниже, чем у контрольных (рисунок 23). При концентрации 0.25 мг/г корма достоверные отличия от контроля наблюдали на 6-е сутки эксперимента. Следует отметить, что визуально гусеницы большой вощиной огневки отказывались от корма, содержащий 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 of ..., 2021).

Антифидантный эффект ТК на гусениц *G. mellonella* сравнивали с действием токсинов *Alternaria* spp.: диверсолановым эфиром, хлормонилининовой кислотой В из культуры *A. sonchi* S-102 (Isolation and bioactivity ..., 2020), альтернариолом из *A. simmonsii* S-142. Установили, что ни один из исследуемых токсинов в концентрации 2 мг/г искусственного корма не вызывал гибель насекомых, за исключением ТК, которая существенно влияла на динамику роста и набор массы гусениц *G. mellonella* (рисунок 24). Динамика роста массы гусениц вощиной огневки под

действием остальных токсинов не отличалась от динамики роста нативных гусениц *G. mellonella*. Биотесты по скармливанию ТК содержащейся в искусственном корме личинкам IV–V возраста *G. mellonella*, *Zophobas morio* (F.) и имаго домашнего сверчка *Acheta domesticus* (L.) позволили оценить эффект действия ТК на выживаемость и развитие различных членистоногих.

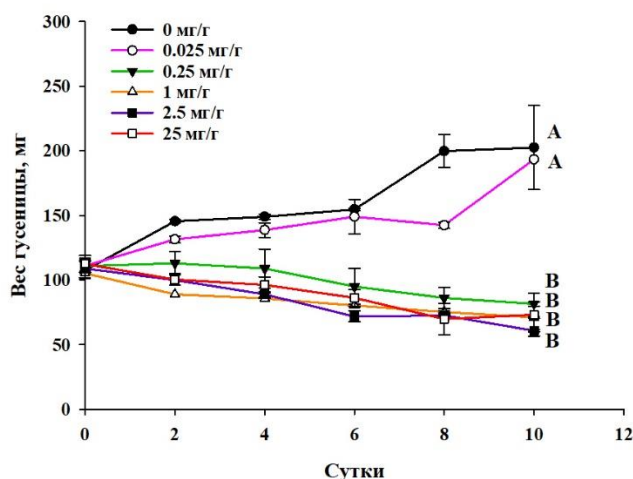


Рисунок 23 - Влияние концентрации теназоновой кислоты в искусственном корме на рост биомассы гусениц *Galleria mellonella*.

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.

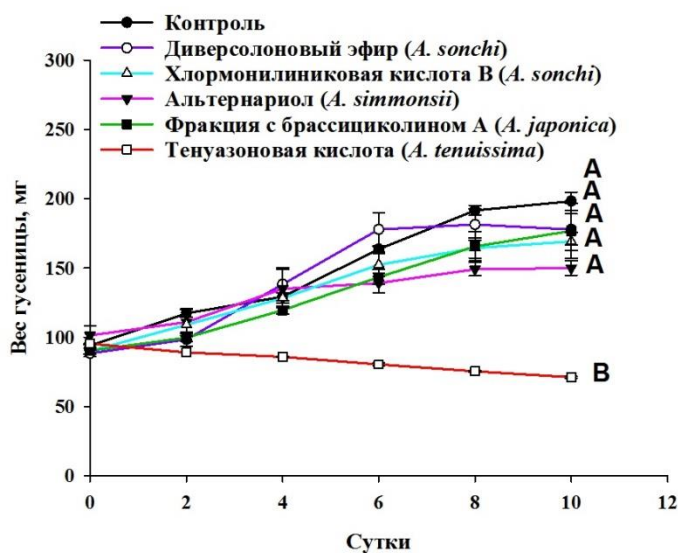


Рисунок 24 - Динамика набора массы личинок *Galleria mellonella* под воздействием токсинов *Alternaria* spp. в концентрации 2 мг/г корма.

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. В качестве растворителя использовали: контроль 1–ацетон, контроль 2–метанол.

Через 2 суток инкубации сверчки полностью потребили обработанный и контрольный корм, и во всех вариантах он был заменен на свежий (без добавления ТК). При этом имаго *A. domesticus* были чувствительными к добавлению в корм различных концентраций ТК (рисунок

25). У погибших особей наблюдалась меланизация. Выявлена статистически значимая разница ($df\ 3$, $p=16.4$, $P<0.001$, логранг-тест) между кривыми выживаемости насекомых, получавших корм с различным содержанием ТК. Уровень смертности сверчка был достоверно (при $P=0.05$) выше контроля при всех использованных концентрациях ТК, однако различия между вариантами обработки были несущественными. Медианная выживаемость сверчка составила 3 ± 0.2 , 5 ± 1.5 и 7 ± 0.9 суток при концентрации токсина 2.5, 1 и 0.25 мг/г корма соответственно (Entomotoxic activity of ..., 2021).

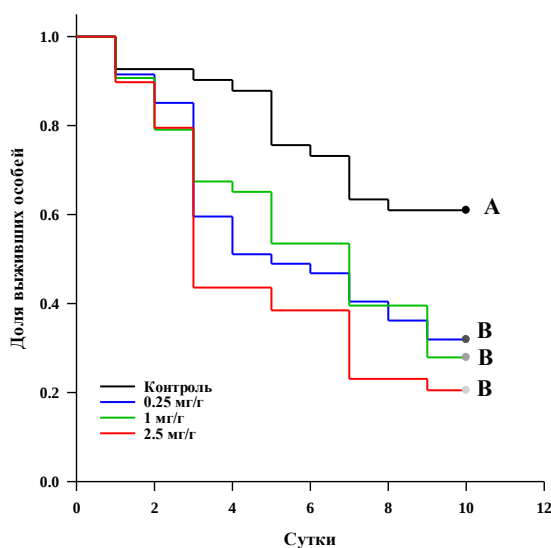


Рисунок 25 – Выживаемость имаго *Acheta domestica* при добавлении различных концентраций тенауазоновой кислоты в корм.

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

В результате оценки перорального эффекта ТК в концентрациях 0.25, 1, 2.5 мг/г искусственного корма в отношении личинок *Z. morio* влияния на динамику набора массы и смертность личинок не наблюдалось и соответствовало данным контрольного варианта.

4.2.2 Остро-контактная активность

Личинки *Galleria mellonella* (L.) были чувствительны к инъекциям ТК в гемоцель насекомых в испытанных концентрациях (рисунок 26 А). Погибшие гусеницы меланизировались. Выявлена статистически значимая разница между кривыми выживаемости ($df\ 3$, $p=9.2$, $P=0.027$, логранг-тест). Существенно (при $P=0.05$) отличающуюся от контроля выживаемость воцинной огневки отметили при концентрации ТК 50 мкг/личинку ($LT_{50}=5\pm 0.7$ сут).

Личинки *Zophobas morio* (F.) были также чувствительными к инъекции различных концентраций ТК (рисунок 26 Б). Выявлена статистически значимая разница между кривыми выживаемости ($df\ 3$, $p=12.7$, $P=0.005$, логранг-тест). Существенно (при $P=0.05$) отличающуюся от

контроля выживаемость зофобоса отметили при концентрации ТК 20 мкг/личинку ($LT_{50}=4\pm4.5$ сут) и 50 мкг/личинку ($LT_{50}=2\pm0.7$ сут).

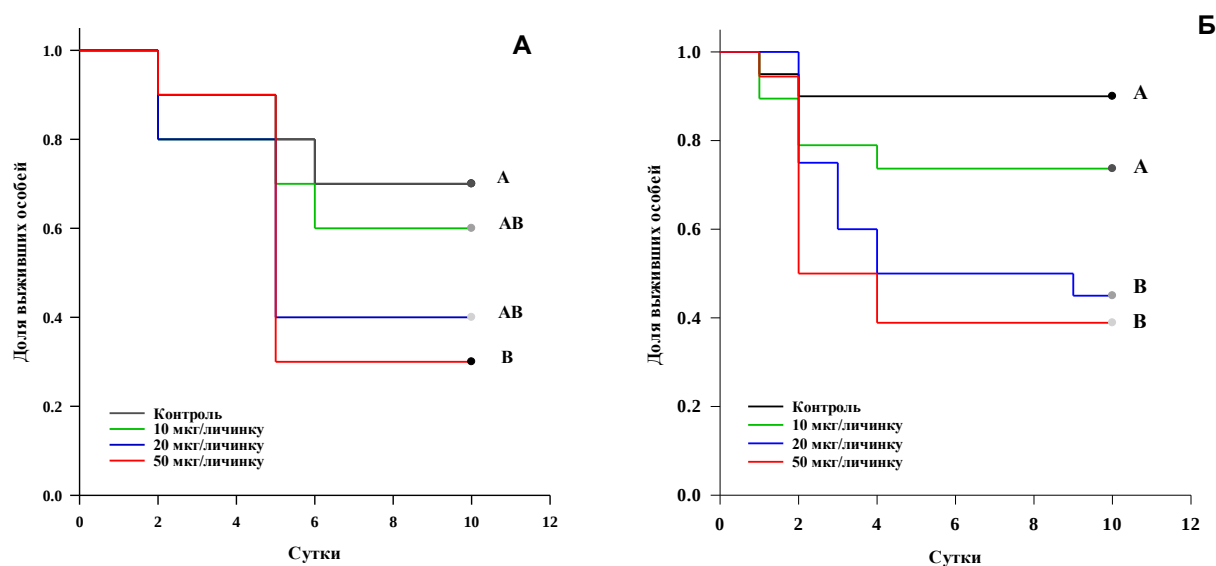


Рисунок 26 – Кривые выживаемости личинок *Galleria mellonella* (А) и *Zophobas morio* (Б) после инъекции тенуазоновой кислоты в различных концентрациях.

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

4.2.3 Контактно-кишечная активность

ТК при разных концентрациях оказала существенное ($p<0.001$, $df\ 3$) влияние на смертность злаковой тли ($F=28.4$) и самок паутиного клеща ($F=31.4$) через 24 ч после обработки (Entomotoxic activity of ..., 2021). Существенную (при $P=0.05$) афидоцидную активность ТК отметили при концентрации токсина 1.0 мг/мл (смертность 27% особей тли), акарицидную – при его концентрации 0.5 мг/мл (смертность 12 % самок клещей) (рисунок 27 А, Б). При максимальной концентрации 2 мг/мл смертность тлей и клещей составила 43 % и 19 % соответственно. Боверицин в концентрации 0.5 мг/мл вызывал 100 % -ную смертность тестируемых членистоногих. Следует отметить, что через 24 ч после обработки на замоченных в растворе ТК отрезках листьев пшеницы симптомы фитотоксичности не проявлялись, тогда как на листовых высечках фасоли отмечены небольшие некрозы при концентрации ТК 2 мг/мл (Entomotoxic activity of ..., 2021).

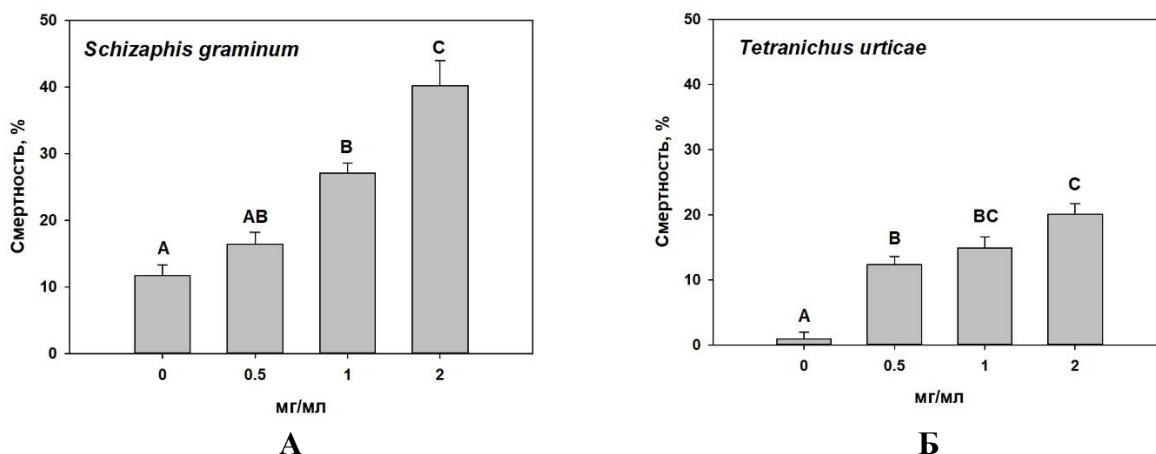


Рисунок 27 –Токсичность различных концентраций tenuazonic кислоты в отношении *Schizaphis graminum* (А) и *Tetranychus urticae* (Б) через 24 ч после обработки. Среднее знач. $\pm$ std. отклонения, отмеченные одинаковыми буквами, достоверно не различаются на уровне $P = 0.05$ по тесту Тьюки HSD.

4.2.4 Цитотоксическая активность

ТК была примерно в 5 раз менее токсична с ИК₅₀ примерно 25 мкг/мл (126 мкМ), чем боверицин с ИК₅₀ 4 мкг/мл (5 мкМ), в отношении клеток линии Sf9 *Spodoptera frugiperda* (Smith). В отличие от боверицина при всех изученных концентрациях ТК вызывала вакуолизацию клеток Sf9. Следует отметить, что точный расчет ИК₅₀ для ТК был затруднен из-за того, что погибшие клетки быстро разрушались (рисунок 28). При этом, ТК была нетоксична в отношении *Paramecium caudatum* в пределах концентраций 1–100 мкг/мл (Entomotoxic activity of ..., 2021).

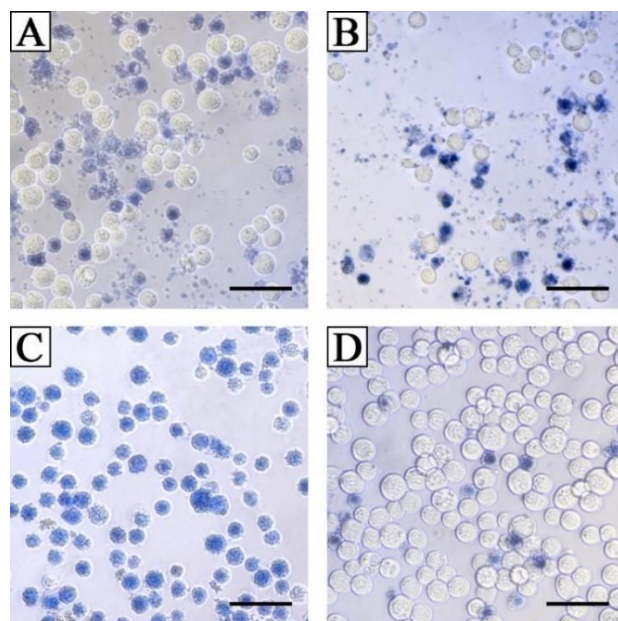


Рисунок 28 –Морфология клеток Sf9 через 24 ч инкубирования с tenuazonic кислотой: (А – 15 мкг / мл, В – 25 мкг / мл) и боверицин (С – 25 мкг / мл) на клетках Sf9; D – контроль. Шкала 50 мкм.

Часть вторичных метаболитов мелкоспоровых *Alternaria* spp. охарактеризована как микотоксины (ТК, альтерналиол и его метиловый эфир, альтертоксины), другие – как вещества с интересной фитотоксической (альтенуен, тенуазоновая кислота, тентоксин и ряд хозяин-специфических токсинов), цитотоксической активностью (би- и трициклоальтернарены) и другими типами биологической активности (ингибиторы ферментов, антиоксиданты и проч.). Соответственно, спектр и степень биологической активности культур и экстрактов из них зависят от наличия указанных и других биологически активных веществ (Lou et al., 2013; Pinto, Patriarca, 2017; Isolation and bioactivity ..., 2020).

Мы впервые оценили энтомотоксические свойства ТК в отношении личинок вощиной огневки. Метод инъекций токсина с использованием личинок *G. mellonella* успешно применяется для токсикологической характеристики различных химических веществ (*Galleria mellonella* larve..., 2018). Например, оадаевая кислота из моллюсков в концентрациях ≥ 75 нг/личинка приводила к значительному снижению выживаемости личинок *G. mellonella* (> 65 % смертности) через 24 часа после инъекции (ЛД₅₀ ~ 239 мкг/кг), что сравнимо с токсической дозой для крыс (Coates et al., 2019). Этот метод был использован для оценки острой токсичности вторичных метаболитов энтомопатогенных грибов. Так, например, смесь эфрапептинов из *Tolypocladium* spp. была токсична для гусениц *G. mellonella* с ЛД₅₀ 30 нг/личинка (Production of efrapetins ..., 2000). Боверицин в концентрации 8.6 мкг/личинку был токсичен для гусениц большой вощиной огневки *G. mellonella* и вызывал смертность на уровне 37 % (Safavi, 2013). ЛД₅₀ кордицепина составляла примерно 200 мкг/личинку через 6 дней после инъекции токсина (Cordycepin, a metabolite ..., 2020). В наших экспериментах значительное снижение жизнеспособности *G. mellonella* наблюдалось при концентрации 20 мкг/личинку (ок. 100 мг/кг) с LT₅₀ ~ 7 дней (рисунок 26 А). Также впервые было показано, что личинки кормового насекомого *Zophobas morio* (*Tenebrio molitor* and ..., 2020), также чувствительны к инъекции ТК в дозе 20 мкг/личинку (~ 140 мг/кг) с LT₅₀ ~ 4 дня (рисунок 26 Б). Эти данные демонстрируют умеренный уровень острой ларвицидной активности ТК, сравнимый с энтомотоксичностью боверицина и кордицепина.

В ряде пероральных опытов было показано, что добавление диацетоксисцирпенола и неосоланиола – токсинов *F. sambucinum* в концентрации 50 мкг/г корма оказывало заметный антифидантный эффект (потребление корма снижалось примерно на уровне 50 % по сравнению с необработанным) на гусениц *G. mellonella* при добавлении в корм (Toxicity of mycotoxins..., 1992). Ооспореин, выделенный из *Beauveria brogniartii* был нетоксичен для насекомых в концентрации 142 мкг/г корма (Abendstein et al., 2001). Биоактивные алкалоиды гарман и нонгарман, содержащиеся в энтомопатогенном грибе *Conidiobolus coronatus*, при употреблении в нелетальной концентрации 1.25 мг/г корма вызывали значительную задержку развития *G. mellonella* (Harman and norharman ..., 2018). В наших опытах в течение 10 суток инкубации при

концентрации ТК 2.5 мг/г корма смертность личинок *G. mellonella* не наблюдалось. Более того, ТК не была 100 % летальной даже при 25 мг/г (данные не представлены). Однако при концентрации 250 мкг/г корма наблюдалось значительное ингибирование роста биомассы личинок (рисунок 23). Низкая токсичность в сочетании с потерей биомассы может указывать на антифидантный эффект ТК на *G. mellonella*; однако эта гипотеза нуждается в дополнительных доказательствах. Ранее ничего не было известно о действии микотоксинов на другое тестируемое кормовое насекомое, *Acheta domesticus* (Novel foods: a risk ..., 2018). При добавлении ТК к рациону сверчков наблюдалась значительная смертность насекомых при концентрации 250 мкг/г корма с LT_{50} примерно 7 дней (рисунок 25).

При оценке контактного действия нами было обнаружено, что ТК обладает умеренной афидоцидной активностью с 40 % смертностью через 24 часа после обработки при концентрации 2 мг/мл (рисунок 27 А), тогда как боверицин был значительно более токсичным, вызывая 100 % смертность при более низкой концентрации 0.5 мг/мл. Однако, по данным Ганасси (Effects of beauvericin ..., 2002), боверицин в той же концентрации был менее токсичен для *S. graminum* и приводил к гибели лишь 23% тли через 24 после обработки. Различия в афидоцидной активности боверицина можно объяснить изменчивостью популяции *S. graminum*. Как упоминалось выше, некоторые другие токсины грибов рода *Alternaria*, например, диверсолонный эфир и хлормонилининовая кислота Б, были более токсичны, чем ТК, вызывали смертность *S. graminum* на уровне 70–80 % при концентрации 1 мг/мл (Isolation and bioactivity ..., 2020; Analysis and isolation ..., 2020). Инсектицид тиаклоприд из группы неоникотиноидов был существенно более токсичен для злаковой тли с LD_{50} примерно 210 мкг/мл (Lethal and sublethal ..., 2019). Чувствительность тлей к семи фосфорорганическим инсектицидам варьировала в диапазоне LD_{50} от 0.1 до 60 мкг/мл в зависимости от уровня устойчивости популяции *S. graminum* (Tenuazonic acid – triggered ..., 2000).

Паутиный клещ *T. urticae* был менее чувствителен к действию ТК, чем *S. graminum*. Однако значительная смертность (чуть более 10 %) была обнаружена при концентрации токсина 0.5 мг/мл после 24-часового воздействия (рисунок 27 Б). Для сравнения, боверицин проявлял заметные акарицидные свойства со значениями LD_{50} от 0.66 до 33 мкг/мл в зависимости от чувствительности популяции *T. urticae* к токсину (Al Khoufy et al, 2019). Экстракт из почвенного микромицета *Aspergillus melleus*, в состав которого входили мелаид, охратоксин С, нодулиспорная кислота, 7-оксокурвуларин и 6-(4'-гидрокси-2'-метилфенокси) -(-) -(3R)-меллеин, был существенно менее токсичен для клещей, с LD_{50} 10 мг/мл (Mycotoxins as ..., 2019). Таким образом, ТК продемонстрировала низкую активность против сосущих насекомых в

контактно-кишечных тестах. С другой стороны, оценка антифидантного и овицидного действия ТК на *S. graminum* и *T. urticae* представляется интересной для дальнейшего изучения.

Тестирование энтомотоксических веществ на клетках насекомых и млекопитающих полезно для первичного определения механизмов их действия на членистоногих (Triangulation of methods ..., 2021). Среди 65 протестированных микотоксинов ТК обладала относительно слабой цитотоксичностью как по отношению к клеткам насекомых, так и к клеткам млекопитающих. Было показано, что клетки Sf9 в два раза более чувствительны к боверицину, чем к ТК (In vitro screening ..., 2021). При тестировании на линии эпителиальных клеток тощей кишки свиньи (IPEC-J2) цитотоксичность ТК была в 10 раз ниже, чем боверицина (Twenty-eight fungal ..., 2019). В целом, это подтверждает полученные нами данные. Однако, в отличие от боверицина, ТК вызывала быструю гибель клеток Sf9 при минимальной изучаемой концентрации 15 мкг/мл (рисунок 28), но индикаторный одноклеточный организм как *Paramecium caudatum* был нечувствителен к ТК в концентрации ≤ 100 мкг/мл.

Результаты наших исследований по энтомотоксичности ТК против различных видов членистоногих дают дополнительную биологическую информацию и, следовательно, могут представлять интерес для изучения механизма действия токсина. Ранее сообщалось о гербицидном потенциале ТК (Patent № 2008/0280761 USA ..., 2008; Chen, Qiang, 2017) и есть предположение, что токсин может быть токсичен для насекомых опосредованно через растение.

ГЛАВА 5. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НАСЕКОМЫХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕНУАЗОНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

Известно, что природные и синтетические инсектициды влияют на общефизиологические и поведенческие реакции, а также на параметры иммунитета насекомых: клеточного (инкапсуляция) и гуморального (активность фенолоксидаз, антиоксидантных, детоксицирующих ферментов и др.) (James, Xu, 2012). Одним из последствий такого воздействия является усиление восприимчивости насекомых к энтомопатогенам и, в частности, к грибам на уровне аддитивного или синергетического эффектов (Крюков и др., 2020). Эффект воздействия на смертность насекомых при совместном заражении токсином фитопатогена и конидиальной суспензией энтомопатогенного гриба был проанализирован на основе биномиального теста, который включал сравнение ожидаемого и наблюдаемого уровня смертности с использованием критерия χ^2 (Robertson, Preisler, 1992).

Для установления уровня взаимодействия при комбинированном действии токсина *A. tenuissima* – tenuazonовой кислоты (ТК) и живой культурой энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Sar-31) проводили сравнительное исследование скорости гибели гусениц большой воцинной огневки и общефизиологических нарушений у них (нарушение питания и отставание в развитии) при монообработке и комбинированной обработке указанными агентами (методы обработки насекомых представлены в разделе 2.7 главы «Материалы и методы исследования»). Проведенные наблюдения выявили наличие синергетического эффекта между указанными агентами по скорости гибели насекомых. Скрининг разных доз ТК, энтомопатогенного гриба *B. bassiana* и их комбинаций показал, что наиболее сильный синергизм ($\chi^2 = 10.5-102.8$, $df = 1$, $P < 0.01$) был при концентрации токсина 1 мг/г искусственного корма и титра конидиальной суспензии 1×10^8 конидий/мл (рисунок 29). При данных концентрациях синергетический эффект был зарегистрирован в период с 3-х по 8-е сутки после обработки корма и личинок. Следует отметить, что и при снижении дозировки ТК до уровня 0.25 мг/г корма синергизм сохранялся, но на более низком уровне и более коротком промежутке времени ($\chi^2 = 9.8-19.5$, $df = 1$, $P < 0.01$ с 5-х по 8-е сутки после обработки).

Показано, что при обработке личинок *G. mellonella* только спорами энтомопатогенного гриба эффекта в нарушении питания и развитии гусениц не наблюдалось (тест Манна — Уитни, $P > 0.06$ по сравнению с контролем). В варианте обработки с ТК в концентрации 1 мг/г корма, напротив, токсин приводил к стабильной и существенной остановке роста (тест Манна — Уитни,

$P < 0.03$) личинок воцинной огневки по сравнению с контролем (данная не летальная концентрация ТК была выбрана исходя из описанных результатов в пункте 4.2.1). Схожий эффект на этот общезиологический показатель был зарегистрирован при комбинированной обработке ТК (1 мг/г корма) и суспензией конидий *B. bassiana* (Sar-31). Следует отметить, что во всех вариантах моно- и комбинированных обработок корма и гусениц большой воциной огневки нарушений в питании не наблюдалось. Таким образом, наличие синергетического эффекта по показателю изменения массы тела гусениц при одновременном воздействии ТК и *B. bassiana* обнаружено не было.

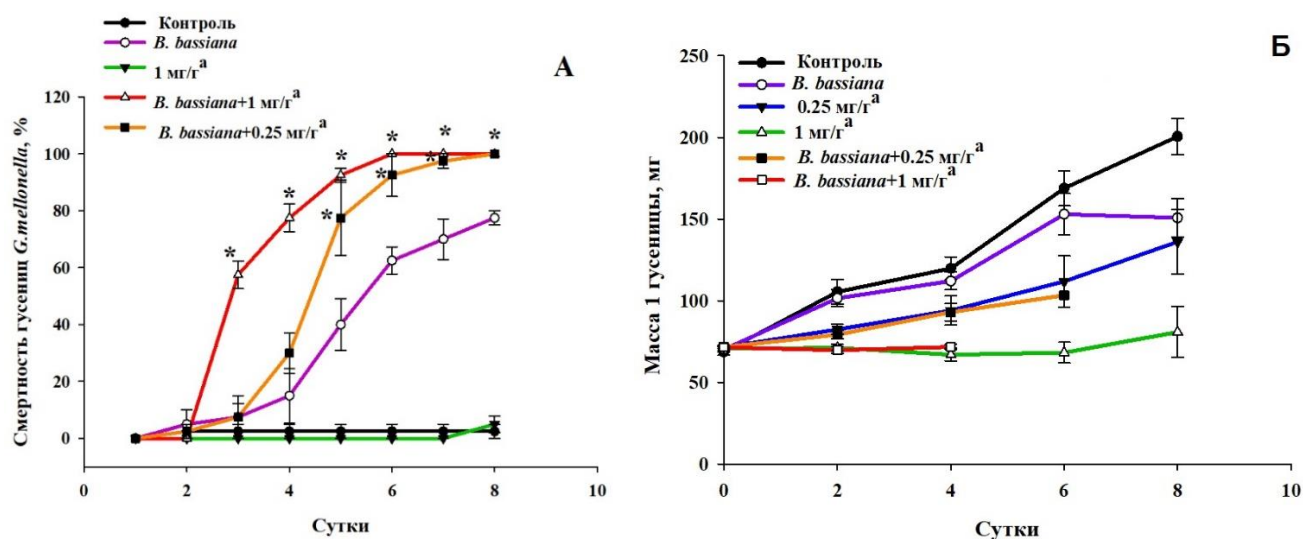


Рисунок 29 – Динамика смертности (А) и набора массы (Б) гусениц *Galleria mellonella* после совместной обработки *Beauveria bassiana* Sar-31 (1×10^8 спор/мл) и тенуазоновой кислотой. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической для 3х повторностей. * – показывают синергетический эффект, а – концентрация тенуазоновой кислоты

Для изучения механизма синергетического эффекта между энтомопатогенным грибом и токсином фитопатогенного гриба и роли реакций клеточного и гуморального иммунитета провели сравнительное исследование реакций иммунной системы у личинок воцинной огневки при раздельном и совместном воздействиях ТК и грибной инфекции *B. bassiana*. Комплексное исследование включало анализ динамики изменений активности защитных реакций в различных тканях и органах (гемолимфа, кишечник) насекомых в течении 2 суток.

Общее число гемоцитов. Концентрация гемоцитов в гемолимфе нативных личинок воцинной огневки составляла 3.5×10^7 ($\pm 0.2 \times 10^7$) на мл. Было показано, что при заражении насекомых суспензией спор энтомопатогена общее число гемоцитов (ОЧГ) достоверно снижалось на 1-е сутки ($p \leq 0.001$) по сравнению с контролем, концентрация гемоцитов составляла 2.0×10^7 ($\pm 0.3 \times 10^7$) на мл (рисунок 30). Эффект снижения данного параметра от обработки ТК был слабым, несущественным и проявлялся только на 2-е сутки после обработки. Совместная обработка токсином и грибной инфекцией не привела к значительному снижению

ОЧГ ни на 1-е ($3.1 \times 10^7 (\pm 0.2 \times 10^7)$ на мл), ни на 2-е ($3.2 \times 10^7 (\pm 0.3 \times 10^7)$ на мл) сутки эксперимента. Таким образом, уменьшение ОЧГ отмечено только при заражении личинок *G. mellonella* конидиальной суспензией *B. bassiana*.

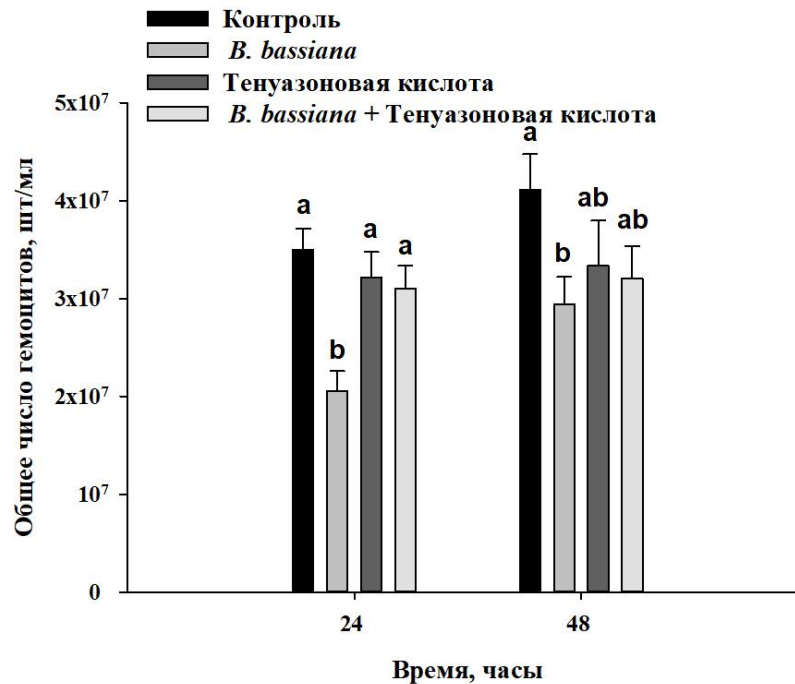


Рисунок 30 – Численность общего числа гемоцитов у гусениц *Galleria mellonella* после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1мг/мл) и их совместном действии.

Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической. Одинаковые буквы указывают на несущественные различия $P < 0.13$ по тесту Фишера HSD.

При обработке ТК не было зафиксировано достоверного лизиса гемоцитов по сравнению с контролем ни через 24 часа (14.1 % и 15.0 % соответственно), ни через 48 часов (7.2 % и 9.6 % соответственно). Также разница процентного показателя распластывания гемоцитов в контрольном варианте и в варианте с ТК была незначительной. Способность клеток к распластыванию на 2-е сутки в исследуемых вариантах увеличилась всего лишь на 10 % и составила у нативных личинок вошинной огневки $90.5 (\pm 10.8 \%)$, у личинок, корм которых обрабатывали ТК, $96.8 (\pm 11.5 \%)$ (данные не представлены).

Фенолоксидазная активность. ТК приводила к повышению уровня активности фермента на 1-е и 2-е сутки после обработки относительно контрольного варианта. Монообработка ТК приводила к двукратному повышению активации ФО по сравнению с контролем и вариантом монообработки энтомопатогеном (рисунок 31). Напротив, эффект от грибной инфекции был направлен на снижение активации этого фермента, как при монообработке, так и при комбинированной обработки с ТК ($H_{1,119} = 4.2$, $P = 0.04$). При этом на 1-е сутки было отмечено существенное взаимодействие факторов между грибной инфекцией и токсикозом, вызванным ТК

($H_{1,119} = 3.83$, $P = 0.05$). На 2-е сутки эффект от ТК был четко направлен на повышение активации ФО в плазме как в случае монотоксикоза, так и комбинированной обработки с энтомопатогеном ($H_{1,119} = 11.8$, $P = 0.0006$). Отметим, что воздействие только гриба приводило к незначительному повышению уровня активности ФО в плазме на 1-е сутки с последующим слабым снижением активации на 2-е (Тест Данна, $P > 0.18$). При совместном действии *B. bassiana* и ТК уровень фермента оставался на уровне контрольных значений.

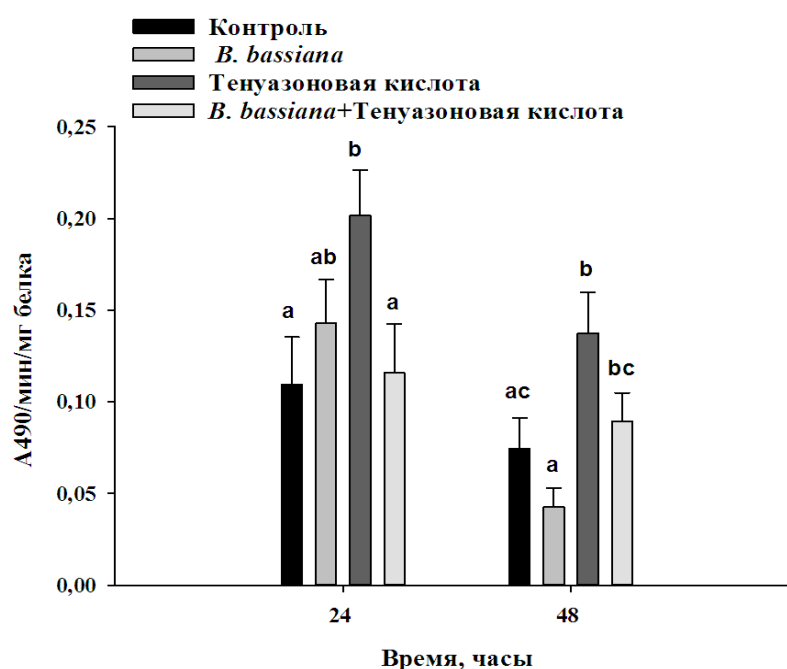


Рисунок 31– Активность фенолоксидазы в гемолимфе гусениц *Galleria mellonella* после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1 мг/мл) и их совместном действии.

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

Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз. Исследование детоксицирующей системы при скормливании ТК личинкам вошинной огневки показало, что происходит достоверное увеличение уровня активности неспецифических эстераз (ЭСТ) в гемолимфе насекомых на 1-е сутки эксперимента (двухфакторный тест Шейрера: $H_{1,119} = 5.38$, $P = 0.02$) (рисунок 32 А). Грибная инфекция также приводила к активации фермента, но на более низком уровне, относительно действия токсина ($H_{1,119} = 2.3$, $P = 0.13$). Тем не менее, наибольший существенный подъем активности эстераз регистрировался при комбинированном воздействии ТК и *B. bassiana* (Тест Данна, $P = 0.007$), по сравнению как с монообработками, так и с контролем. На 2-е сутки после обработок уровень ЭСТ во всех вариантах снижался до контрольных значений. Подобные изменения наблюдались в уровне активности глутатион-S-трансфераз (ГСТ). Существенное повышение активности фермента детоксицирующей системы под

воздействием ТК было зарегистрировано на 1-е сутки после обработки ($H_{1,111} = 4.3$, $P = 0.04$) (рисунок 32 Б), в отличие от грибной инфекции, которая не приводила к значимым изменениям уровня ГСТ ($H_{1,111} = 1.2$, $P = 0.28$). На 2-е сутки эксперимента уровень активности ГСТ во всех вариантах также снижался до контрольных значений, как и уровень активности ЭСТ.

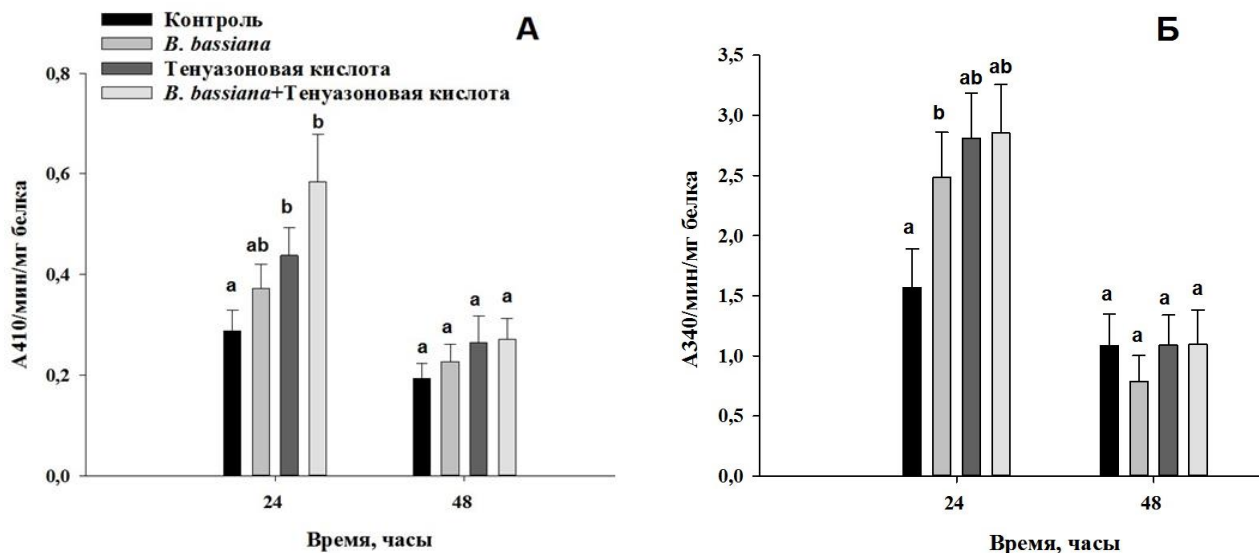


Рисунок 32 – Активность неспецифических эстераз (А) и глутатион-S-трансфераз (Б) в гемолимфе гусениц *Galleria mellonella* после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1 мг/мл) и их совместном действии. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической. Одинаковые буквы указывают на несущественные различия.

Анализ культивируемой микрофлоры среднего кишечника гусениц *G. mellonella*. Посев содержимого среднего кишечника 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 группы *Enterococcus* как после обработки только токсином фитопатогена, так и после комбинированной обработки ТК и суспензией конидий энтомопатогена (эффект тенуазоновой кислоты: $H_{1,23} = 7.2$, $P = 0.007$ для энтерококков и $F_{1,14} = 5.4$, $p = 0.036$ для энтеробактерий) (рисунок 33). Полученные результаты показали, что интоксикация личинок вошинной огневки ТК может приводить к размножению грамположительных бактерий в кишечнике и приводить к дисбиозу.

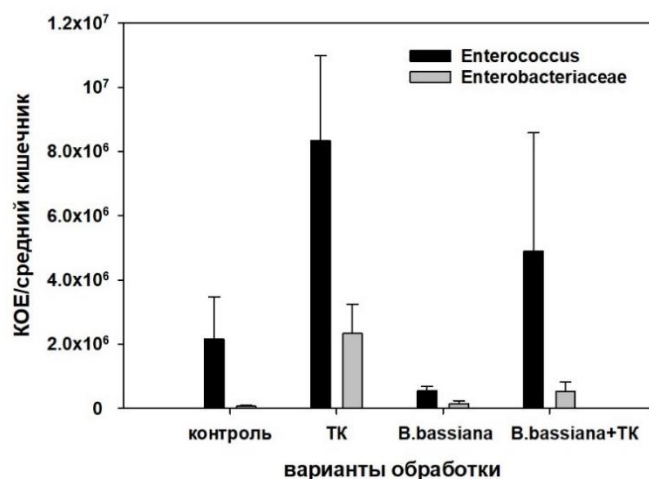


Рисунок 33 – Численность культивируемых бактерий среднего кишечника гусениц *Galleria mellonella* на 2-е сутки после обработки конидиальной суспензией *Beauveria bassiana* (1×10^8 спор/мл), тенуазоновой кислотой (1 мг/мл) и их совместном действии. Вертикальные линии показывают ошибки средней арифметической.

Подводя итог настоящего раздела следует отметить, что нами впервые был показан синергетический эффект между ТК и энтомопатогеном *B. bassiana* на гусеницах большой вощиной огневки. Динамика смертности и массы тела личинок в наших экспериментах была схожа с той, которая описана в ряде работ по синергизму между инсектицидами и энтомопатогенными грибами. Так, например, при комбинированном воздействии имидаклоприда и гриба *Metarhizium brunneum* был зафиксирован синергетический эффект в смертности жука *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera: Cerambycidae) (Starvation and imidacloprid ..., 2017). На личинках колорадского жука было показано, что природные инсектициды (комплекс авермектинов актиномицета *Streptomyces avermitilis*) являются сильными синергистами *Metarhizium robertsii* (Immune–physiological aspects ..., 2016; Combined action of ..., 2017). В ходе наших экспериментов синергетического эффекта между ТК и *B. bassiana* на показатель нарушения питания и развития насекомых зафиксировано не было, снижение набора веса гусениц вощиной огневки было связано только с интоксикацией ТК. Схожий эффект интоксикации авермектинами приводил к снижению потребления корма личинками колорадского жука, но особенно важную роль природные инсектициды сыграли в остановке развития личинок на определенной стадии онтогенеза (Immune–physiological aspects ..., 2016; Combined action of ..., 2017).

Повышение уровня активности ФО в гемолимфе личинок *G. mellonella* после монообработки ТК вероятно указывает на интоксикацию насекомых. Подъем активности данного фермента является неспецифической ответной реакцией насекомого на интоксикацию организма токсичными метаболитами различного происхождения, как в случаях воздействия

инсектицидов, так и при развитии микозов у насекомых и других инфекций, а также различными повреждающими факторами (Активность неспецифических ..., 2011; Увеличение активности ..., 2013; Крюков и др., 2020; Zibaee, Bandani, 2012). В ряде исследований было показано, что у таких насекомых, как *Ostrinia furnacalis* (Guenee) (Lepidoptera: Crambidae), *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), и у *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) было зафиксировано увеличение уровня активации ФО в гемолимфе, что приводило к формированию устойчивости к инсектицидам (Gang, Zhizhen, 1992; Inhibition of bacterial RNA, 2005; BmNPV affecting the ..., 2016). Также значительно повышенная активность ФО была отмечена у устойчивых к токсину Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* популяций капустной моли *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (Characterization of immune-related ..., 2019). По результатам наших экспериментов на более поздних стадиях (48 ч) было зафиксировано стабильное повышение уровня активности ФО, что, может указывать на деструктивные процессы в тканях и органах насекомых под действием ТК. Существуют примеры активации образования ФО при развитии различных бактериозов и повреждении тканей насекомых, а также при образовании узелков гемоцитов и их меланизации (Activation of insect ..., 2009; Factors functioning in ..., 2014; Encapsulation and ..., 2016).

Нами показано, что комбинированная обработка ТК и *B. bassiana* приводила к краткосрочной активации детоксицирующих ферментов (ГСТ, ЭСТ) в гемолимфе личинок *G. mellonella* на ранних стадиях (24 ч) токсикоза и грибной инфекции. Основная роль ГСТ и ЭСТ в организме насекомых заключается в инактивации токсичных продуктов, образующихся при токсикозах, вызванных инсектицидами (Resistance to ..., 1997; Influence of ..., 2006; The pyrethroid resistance ..., 2013), а также при микозах (The activity of ..., 2012). Так, например, повышенная регуляция ГСТz2 снижает восприимчивость мухи *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) к абамектину (The transcription factor ..., 2019). Кроме того, ГСТ может участвовать в инактивации вторичных метаболитов грибов (Loutelier et al., 1994) и активных форм кислорода (Sherratt, Hayes, 2002).

При анализе микробиоты среднего кишечника личинок *G. mellonella* мы наблюдали увеличение количества культивируемых бактерий в сообществе грамположительных энтерококков после монообработки ТК. Возможно, внесение ТК в пищу насекомых может приводить к дисбиозу. Так, сдвиги в структуре сообществ бактерий в кишечниках воцинной огневки были зафиксированы при других токсикозах, например, развитии инфекции *Bacillus thuringiensis* (Encapsulation and nodulation ..., 2016), при заражении паразитоидами *Habrobracon hebetor* (Parasitoid envenomation ..., 2019).

Таким образом, синергетический эффект между токсином фитопатогенного гриба *A. tenuissima* и живой культурой *B. bassiana*, наблюдаемый при их комбинированном действии, по-

видимому, связан с физиологическими изменениями на ранних стадиях токсикоза и инфекции. В частности, наблюдается рост активности ряда ферментов при комбинированной обработке, связанных с детоксикационной и иммунной системами. Однако, важно отметить, что полученные результаты исследования показывают, что синергетическое действие на смертность гусениц также может быть обусловлено изменениями численности ассоциированных бактерий насекомых. Более того, показано, что ТК повышает восприимчивость личинок большой восковой моли к энтомопатогену, что подтверждает предположение о косвенном влиянии вторичных метаболитов фитопатогенных грибов на насекомых. Подобные комбинации могут быть использованы для понимания взаимодействий между насекомыми и фитопатогенами, опосредованных общим питательным субстратом.

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 монометилвый 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* дигидробрассициколина 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, хлормонилиниковой 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 контактнo-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 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.

Тезисы докладов на конференциях

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 // Материалы IV международной научно-практической конф. – Ялта, 2019. – 238 с.
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. 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 // Сборник тезисов международной научной конференции PLAMIC 2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», г. Уфа, 13–17 июня 2018 г. 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 // Сборник тезисов второй международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», г. Саратов, 5–9 октября 2020 г. С. 214.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Активность неспецифических эстераз и глутатион-Странсфераз у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* / И.М. Дубовский, Н.Д. Слямова, В.Ю. Крюков [и др.] // Зоологический журнал. – 2011. – Т. 90, № 11. – С. 1360–1364.
- Берестецкий, А.О. Перспективные подходы к поиску метаболитов грибов для борьбы с вредными членистоногими / А.О. Берестецкий, Г.Р. Леднев, Ц. Ху // Вестник защиты растений. – 2021. – Т. 4, вып. 1. – С. 6–27.
- Берестецкий, А.О. Биорациональные средства защиты растений / А.О. Берестецкий // Защита и карантин растений. – 2017. – Вып. 8. – С. 9–14.
- Биология взаимоотношений грибов рода *Fusarium* и насекомых (обзор) / Т.Ю. Гагкаева, И.В. Шамшев, О.П. Гаврилова, О. Г. Селицкая // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – Вып. 3. – С. 13–23.
- Влияние различных наполнителей на биологическую эффективность биомассы конидий энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* против саранчовых в условиях Казахстана / В.Ю. Крюков, Г.Р. Леднев, М.В. Левченко [и др.] // Агрохимия. – 2010. – Вып. 12. – С. 26–30.
- Выделение, идентификация и характеристика фитотоксина, образуемого грибом *Alternaria cirsinioxia* / Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С. [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, вып. 1. – С. 84–88.
- ГОСТ Р 52337-2005 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. Дата введения 2006-07-01. Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов: [сайт]. Кодекс, 2022. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200039948> (дата обращения 15.04. 2021).
- Далинова, А.А. Вторичные метаболиты гриба *Alternaria sonchi* S-102 – патогена осота полевого: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Анна Александровна Далинова; Всероссийский НИИ защиты растений. – Санкт-Петербург, 2017. – 163 с.
- 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.
- 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 // Материалы IV международной научно-практической конф. – Ялта, 2019. – 238 с.
- Дубовский, И.М. Эволюция резистентности вошинной огневки *Galleria mellonella* (L.) к энтомопатогенным бактериям и грибам: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Иван Михайлович Дубовский; Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук. – Новосибирск, 2015. – 287 с.
- Инсектицидная, акарицидная и цитотоксическая активность экстрактов некоторых грибов филлосферы и почвенных гипокрейнных микромицетов / А.О. Берестецкий, В.В. Инюшева, М.О. Петрова [и др.] // Микология и фитопатология. – 2019. – Т. 53, вып. 1. – С. 17–25.
- Крюков, В.Ю. Физиолого-экологические аспекты взаимоотношений между энтомопатогенными грибами (Ascomycota, Нуроскреales) и насекомыми / В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, В.В. Глузов // Паразитология – 2020. – Т. 54, вып. 6. – С. 443–469.

- Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / Н.А. Семина, С.В. Сидоренко, С.П. Резван [и др.]. – Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
- Методическое пособие по мониторингу альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. / Ф.Б. Ганнибал. – Санкт-Петербург: ВИЗР, 2011. – 70 с.
- Определение содержания микотоксинов в кормах и кормовом сырье методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором / Р.Н. Селимов, А.А. Джатдоева, П.С. Метальников, А.А. Комаров // Ветеринария. – 2017. – вып. 12. – С. 53–57.
- Идентификация и токсикологическая характеристика штаммов *Alternaria japonica* / Д. Р. Салимова, С. В. Сокорнова, А. С. Орина [и др.] // Микология и фитопатология. – 2021. – Т. 55. – вып. 3. – С. 203–218.
- 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 // Сборник тезисов международной научной конференции PLAMIC 2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», г. Уфа, 13–17 июня 2018 г. С. 223.
- 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. С. 181–182.
- Спектр биологической активности грибов рода *Alternaria*, выявленных в филлосфере травянистых растений / А.О. Берестецкий, Ф.Б. Ганнибал, Е.В. Минкович [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, вып. 6. – С. 706–717.
- Тамарина, Н.А. Техническая энтомология – новая отрасль прикладной энтомологии / Н.А. Тамарина // Итоги науки и техники. Серия Энтомология – 1987. – Т. 7. – С. 1–247.
- Увеличение активности иммунной системы вошинной огневки *Galleria mellonella* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* под влиянием фосфорорганического инсектицида / И. М. Дубовский, О.Н. Ярославцева, В.Ю. Крюков, [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2013. – Т. 49, вып. 6. – С. 428–432.
- Функциональные производные тетрамовой кислоты. Новые подходы к синтезу гетеротрициклических соединений / И.К. Сорокина, Л.М. Алексеева, В.А. Паршин, В.Г. Граник // Химико-фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41, вып. 10. – С. 33–37.
- Характеристика евразийских изолятов *Alternaria sonchi* по морфолого-культуральным, молекулярным и физиолого-биохимическим признакам / А.О. Берестецкий, В.М. Терлецкий, Ф.Б. Ганнибал [и др.] // Микология и фитопатология. – 2013. – Т. 47, вып. 2. – С. 120–128.
- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide / W.S. Abbott // Journal of Economic Entomology. – 1925. – Vol. 18, N 2. – P. 265–267.
- Abendstein, D. Effect of the fungal metabolite oosporein on feeding behaviour and survival of larvae of *Melolontha melolontha* L. and *Galleria mellonella* L. / D. Abendstein, W. Schweigkofler, H. Strasser // Laimburg Journal. – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 1–4.
- Acetylcholinesterase inhibitory potential and insecticidal activity of an endophytic *Alternaria* sp. from *Ricinus communis* / B. Singh, A. Thakur, S. Kaur [et al.] // Applied biochemistry and biotechnology. – 2012. – Vol. 168, iss. 5. – P. 991–1002.

- Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors / G. Bidla, T. Hauling, M.S. Dushay, U. Theopold // *Journal of Innate Immunity*. – 2009. – Vol. 1, N 4. – P. 301–308.
- The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in *Locusta migratoria* larvae infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales) / I.M. Dubovskiy, N.D. Slyamova, V.Y. Kryukov [et al.] // *Entomological review*. – 2012. – Vol. 92, iss. 1. – P. 27–31.
- Al Khoury, C. Lethal activity of beauvericin, a *Beauveria bassiana* mycotoxin, against the two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch / C. Al Khoury, J. Guillot, N. Nemer // *Journal of Applied Entomology*. – 2019. – Vol. 143, N 9. – P. 974–983.
- Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* / B.B. Cota, L.H. Rosa, R.B. Caligiorne [et al.] // *FEMS Microbiology letters* 2008. – Vol. 285, iss. 2. – P. 177–182.
- Alternaria alternata* crofton-weed toxin: a natural inhibitor of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* thylakoids/ Y.X. Liu, X.M. Xu, X.B. Dai, S. Qiang // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2007. – Vol. 55, N 13. – P. 5180–5185.
- Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids / C.H. Christias, P. Hatzipapas, A. Dara [et al.] // *BioControl*. – 2001. – Vol. 46, iss. 1. – P. 105–124.
- Alternaria brassicae* produces a host-specific protein toxin from germinating spores on host leaves / R.Y. Parada, E. Sakuno, N. Mori [et al.] // *Phytopathology*. – 2008. – Vol. 98, iss. 4. – P. 458–463.
- Alternaria* redefined / J.H.C. Woudenberg, J.Z. Groenewald, M. Binder, P.W. Crous // *Studies in mycology*. – 2013. – Vol. 75, N 1. – P. 171–212.
- Alternaria* toxin-induced resistance in rose plants against rose aphid (*Macrosiphum rosivorum*): effect of tenuazonic acid / F.Z. Yang, B. Yang, B. Li, C. Xiao // *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. – 2015. – Vol. 16, N 14. – P. 264–274.
- Alternaria* toxins: altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells / S.C. Fleck, B. Burkhardt, E. Pfeiffer, M. Metzler // *Toxicology Letters*. – 2012. – Vol. 214, N 1. – P. 27–32.
- Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis / M. Meena, S.K. Gupta, P. Swapnil [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1451.
- Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIa isoform / M. Fehr, G. Pahlke, J. Fritz [et al.] // *Molecular nutrition & food research*. – 2009. – Vol. 53, iss. 4. – P. 441–451.
- Alternatives to chemical control of insect pests / E. J. Rebek, S. D. Frank, T. A. Royer, C. E. Bográn // *Insecticides: basic and other applications*. – Rijeka; Shanghai: InTech, 2012. – P. 171–96.
- Altomare, C. Assessing potential cytotoxicity of biocontrol microorganisms using invertebrate assays beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment / C. Altomare, B. Pernfuss, H. Strasser // *Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: Safety assessment and regulation*. – Wallingford: CAB International, 2012. – P. 240–255.
- Amino acid-oriented poly-substituted heterocyclic tetramic acid derivatives as potential antifungal agents / S. Wang, L. Bao, D. Song [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2019. – Vol. 179. – P. 567–575.
- An in vitro investigation of endocrine disrupting effect of the mycotoxin alternariol / C. Frizzell, D. Ndossi, S. Kalayou [et al.] // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2013. – Vol. 271, iss. 1. – P. 64–71.

- Analysis and isolation of secondary metabolites of *Bipolaris sorokiniana* by different chromatography techniques and the spectrum of their biological activity / A.O. Berestetskiy, A.A. Dalinova, V.R. Dubovik [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiolog. – 2020. – Vol. 56, iss. 5. – P. 569–582.
- Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity / M.H. Teiten, F. Mack, A. Debbab [et al.] // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 21, iss. 13. – P. 3850–3858.
- Antifeedent activity of long-chain alcohols, and fungal and plant metabolites against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) as potential biocontrol strategy / T. Aznar-Fernandez, A. Cimmino, M. Masi [et al.] // Natural Product Research. – 2018. – Vol. 33, iss. 17. – P. 2471–2479.
- Antifeedent and toxic activity of endophytic *Alternaria alternata* against tobacco caterpillar *Spodoptera litura* / H.P. Kaur, B. Singh, A. Kaur, S. Kaur // Journal of pest science. – 2013. – Vol. 86, N 3. – P. 543–550.
- Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* / S. Johann, L.H. Rosa, C.A. Rosa [et al.] // Revista iberoamericana de micologia. – 2012. – Vol. 29, iss. 4. – P. 205–209.
- Ashida, M. The prophenoloxidase activating system in crayfish / M. Ashida, K. Söderhäll // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. – 1984. – Vol. 77, N 1. – P. 21–26.
- Athanasellis, G. Tetramic and tetronic acids as scaffolds in bioinorganic and bioorganic chemistry / G. Athanasellis, O. Igglessi-Markopoulou, J. Markopoulos // Bioinorganic Chemistry and Applications. – 2010. – Vol. 2010. – P. 11.
- Benassi, F. Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin alternariol / F. Benassi, C. Gallerne, O. Sharaf Dein // Toxicology In Vitro. – 2012. – Vol. 26, N 6. – P. 915–923.
- Berestetskiy, A.O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use / A.O. Berestetskiy // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2008. – Vol. 44, N 5. – P. 453–465.
- Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity / H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck // ChemBioChem. – 2002. – Vol. 3, N 7. – P. 619–627.
- Bills, G.F. Biologically active secondary metabolites from the fungi / G.F. Bills, J.B. Gloer // Microbiology spectrum. – 2016. – Vol. 4, N 6. – P. 4–6.
- Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus / C.J. Zheng, C. Shao, Z.Y. Guo [et al.] // Journal of Natural Products. – 2012. – Vol. 75, iss. 2. – P. 189–197.
- Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. / Y. Wang, M. Yang, X. Wang [et al.] // Fitoterapia. – 2014. – Vol. 99. – P. 153–158.
- The biological and chemical diversity of tetramic acid compounds from marine-derived microorganisms / M. Jiang, S. Chen, J. Li, L. Liu // Marine drugs. – 2020. – Vol. 18, N 2. – P. 114.
- Biorational insecticides in pest management / G. Rosell, C. Quero, J. Coll, A. Guerrero // Journal of Pesticide Science. – 2008. – Vol. 33, N 2. – P. 103–121.
- Blocking the QB-binding site of photosystem II by tenuazonic acid, a non-host-specific toxin of *Alternaria alternata*, activates singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling in *Arabidopsis* / S. Chen, C. Kim, J.M. Lee [et al.] // Plant, cell and environment. – 2015. – Vol. 38, iss. 6. – P.1069–1080.

- BmNPV affecting the activity and gene expression of phenoloxidase in *Bombyx mori* / F.F. Tang, W.K. Yang, F. Zhu [et al.] // Chinese Agricultural Science Bulletin. – 2016. – Vol. 32, iss. 32. – P. 25–28.
- Bobylev, M.M. Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*) / M.M. Bobylev, L.I. Bobyleva, G.A. Strobel // Journal of agricultural and food chemistry. – 1996. – Vol. 44, N 12. – P. 3960–3964.
- Bottini, A.T. Phytotoxins. I. A 1-aminodimethylheptadecapentol from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* / A.T. Bottini, D.G. Gilchrist // Tetrahedron Letters. – 1981. – Vol. 22, N 29. – P. 2719–2722.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
- Bretschneider, T. Tetroneic acid insecticides and acaricides inhibiting acetyl-CoA carboxylase / T. Bretschneider, R. Fischer, R. Nauen [et al.] // Bioactive heterocyclic compound classes: agrochemicals. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2012. – P. 265–278.
- Characterization and identification of naturally transgenic species *Linaria vulgaris* pathogenic mycomycetes / S.V. Sokornova, E.L. Gasich, V.D. Bemova [et al.] // Ekologicheskaya genetika. – 2018. – Vol. 16, iss. 1. – P. 27–34.
- Characterization of immune-related PGRP gene expression and phenoloxidase activity in Cry1Ac-susceptible and resistant *Plutella xylostella* (L.) / A. Liu, X. Huang, L. Gong [et al.] // Pesticide biochemistry and physiology. – 2019. – Vol. 160. – P. 79–86.
- Characterization of the *Fusarium* toxin equisetin: the use of phenylboronates in structure assignment / N.J. Phillips, J.T. Goodwin, A. Fraiman [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 1989. – Vol. 111, iss. 21. – P. 8223–8231.
- Chen, S. Recent advances in tenuazonic acid as a potential herbicide / S. Chen, S. Qiang // Pesticide biochemistry and physiology. – 2017. – Vol. 143. – P. 252–257.
- Cho, Y. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma / Y. Cho // Eukaryotic Cell. – 2015. – Vol. 14, N 4. – P. 335–343.
- Cholinesterase inhibitor (altenuene) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: optimization, purification and characterization / J. Bhagat, A. Kaur, R. Kaur [et al.] // Journal of applied microbiology. – 2016. – Vol. 121, iss. 4. – P. 1015–1025.
- Cole, M. Microbial metabolites with insecticidal properties / M. Cole, G.N. Rolinson // Journal of applied microbiology. – 1972. – Vol. 24, N 4. – P. 660–662.
- Combined action of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae) / Yu.B. Akhanev, O.G. Tomilova, O.N. Yaroslavtseva // Entomological Review. – 2017. – Vol. 97, N 2. – P. 158–165.
- Complex regulation of secondary metabolism controlling pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* / S. Takaoka, M. Kurata, Y. Harimoto // New Phytologist. – 2014. – Vol. 2014, iss. 4. – P. 1297–1309.
- A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* / R. Hatta, K. Ito, Y. Hosaki [et al.] // Genetics. – 2002. – Vol. 161, iss. 1. – P. 59–70.

- Cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, reduces immune-related gene expression in insects / V.C. Woolley, G.R. Teakle, G. Prince, C.H. [et al.] // Journal of Invertebrate Pathology. – 2020. – Vol. 177. – P. 1–11.
- Cotty, P.J. Zinniol production by *Alternaria* species / P.J. Cotty, I.J. Misaghi // Phytopathology. – 1984. – Vol. 74, N 7. – P. 785–788.
- Cudaj, J. Total synthesis of altenusin and alterlactone / J. Cudaj, J. Podlech // Synlett. – 2012. – Vol. 2012, N 3. – P. 371–374.
- Cyclopaldic acid, seiridin, and sphaeropsidin A as fungal phytotoxins, and larvicidal and biting deterrents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): structure activity relationships / A. Cimmino, A. Andolfi, A. Avolio [et al.] // Chemistry and Biodiversity. – 2013. – Vol. 10, iss. 7. – P. 1239–1251.
- Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* / A.H. Aly, R. Edrada-Ebel, I.D. Indriani [et al.] // Journal of natural products. – 2008. – Vol. 71, iss. 6. – P. 972–980.
- Cytotoxicity against insect cells of entomopathogenic fungi of the genera *Hypocrella* (anamorph *Aschersonia*): possible agents for biological control / P. Watts, P. Kittakoop, S. Veeranondha [et al.] // Mycological Research. – 2003. – Vol. 107, iss. 5. – P. 581–586.
- The cytotoxicity and anticancer mechanisms of alterporriol L, a marine bianthraquinone, against MCF-7 human breast cancer cells / C. Huang, H. Jin, B. Song [et al.] // Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – Vol. 93, iss. 2. – P. 777–785.
- Dall'Asta, C. Mycotoxins from *Alternaria*: toxicological implications / C. Dall'Asta, M. Cirlini, C. Falavigna // Advances in molecular toxicology. – 2014. – Vol. 8. – P. 107–121.
- Davis, G.R.F. Effects of dietary T-2 toxin concentrations fed to larvae of the yellow mealworm at three dietary protein levels / G.R.F. Davis, H.B. Schiefer // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. – 1982. – Vol. 73, N 1. – P. 13–16.
- Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking / D. Siegel, M. Feist, P.M. Koch [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry. – 2010. – Vol. 58, iss. 17. – P. 9622–9630.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi / K.H. Domsch, W. Gams, T.H. Anderson. – Eching: IHW-Verla, 2007. – 672 p.
- Effect of *Alternaria alternata* on the coccinellid pest *Henosepilachna vigintioctopunctata* and its implications for biological pest management / A. Sharma, A. Thakur, S. Kaur, P.K. Pati // Journal of pest science. – 2012. – Vol. 85, N 4. – P. 513–518.
- Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 / N. Bouras, F. Mathieu, N. Sabaou, A. Lebrihi // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 100, N 2. – P. 390–397.
- Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae) / S. Ganassi, A. Moretti, A.M.B. Pagliai [et al.] // Journal of invertebrate pathology. – 2002. – Vol. 80, iss. 2. – P. 90–96.
- Effects of Oberon® 240 SC on bumblebees pollinating greenhouse tomatoes / P. Bielza, J. Contreras, V. Quinto [et al.] // Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. – 2005. – Vol. 58, iss. 3. – P. 469–484.
- Encapsulation and nodulation in insects / I.M. Dubovskiy, N.A. Kryukova, V.V. Glupov, N.A. Ratcliffe // Invertebrate Survival Journal. – 2016. – Vol. 13, N 1. – P. 229–246.
- 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.

- Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review / E.J. Scholte, B.G. Knols, R.A. Samson, W. Takken // Journal of insect science. – 2004. – Vol. 4, N 1. – P. 19.
- Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer / G. Liu, Y. Qian, P. Zhang [et al.] // Chinese Medical Journal. – 1992. – Vol. 105, iss. 5. – P. 394–400.
- Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program / K.M. VanderMolen, H.A. Raja, T. El-Elmat, N.H. Oberlines // Applied Microbiology and Biotechnology Express. – 2013. – Vol. 3, N 1. – P. 1–7.
- Evaluation of the anticancer activities of two fungal polycyclic ethanones, alternethanoxins A and B, and two of their derivatives / M. Bury, B. Punzo, A. Berestetskiy [et al.] // International journal of oncology. – 2011. – Vol. 38, iss. 1. – P. 227–232.
- Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test / T.J. Schrader, W. Cherry, K. Soper [et al.] // Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis. – 2001. – Vol. 21, iss. 4. – P. 261–274.
- Expanding the chemical diversity of an endophytic fungus *Bulgaria inquinans*, an ascomycete associated with mistletoe, through an OSMAC approach / N.P. Ariantari, G. Daletos, A. Mándi [et al.] // RSC advances. – 2019. – Vol. 9, 43. – P. 25119–25132.
- Factors functioning in nodule melanization of insects and their mechanisms of accumulation in nodules / A. Tokura, G.S. Fu, M. Sakamoto [et al.] // Journal of Insect Physiology. – 2014. – Vol. 60. – P. 40–49.
- Fleck, S.C. Permeation and metabolism of *Alternaria* mycotoxins with perylene quinone structure in cultured Caco-2 cells / S.C. Fleck, E. Pfeiffer, M. Metzler // Mycotoxins research. – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 17–23.
- Fusicoccane-derived diterpenoids from *Alternaria brassicicola*: investigation of the structure-stability relationship and discovery of an IKKB inhibitor / Hu Z., Sun W., Li F. [et al.] // Organic letters. – 2018. – V. 20, iss. 17. – P. 5198–5202.
- Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of the toxic and non-toxic chemicals / E. Allegra, R.W. Titball, J. Carter, O.L. Champion // Chemosphere. – 2018. – Vol. 198. – P. 469–472.
- Gang, W.U. Effects of atabron on phenoloxidase and chitinase in the cuticle of *Ostrinia furnacalis* larva / W.U. Gang, S. Zhizhen // Acta Entomologica Sinica. – 1992. – Vol. 35, N 3. – P. 306.
- Gao, J.R. Comparative toxicity of selected organophosphate insecticides against resistant and susceptible clones of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) / J.R. Gao, K.Y. Zhu // Journal of agricultural and food chemistry. – 2000. – Vol. 48, N 10. – P. 4717–4722.
- Grafton-Cardwell, E.E. Efficacy of acaricides for control of citrus red mite, 2007 / E.E. Grafton-Cardwell, S.J. Scott // Arthropod Management Tests. – 2008. – Vol. 33, N 1. – P. 1–2.
- Grafton-Cardwell, E.E. Efficacy of Dimilin against citrus peelminer, 2006 / E.E. Grafton-Cardwell, C.A. Reagan // Arthropod Management Tests. – 2007. – Vol. 32, N 1. – P. 1–70.
- Green, S. Effects of leaf maturity, infection site, and application rate of *Alternaria cirsinia* conidia on infection of Canada thistle (*Cirsium arvense*) / S. Green, K.L. Bailey // Biological Control. – 2000. – Vol. 19, N 2. – P. 167–174.
- Griffin, G.F. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay / G.F. Griffin, F.S. Chu // Applied and Environmental Microbiology. – 1983. – Vol. 46, N 6. – P. 1420–1422.
- Gu, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana* / W. Gu // World journal of microbiology and biotechnology. – 2009. – Vol. 25, N 9. – P. 1677–1683.

- Habig, W.H. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // *Journal of biological Chemistry*. – 1974. – Vol. 249, N 22. – P. 7130–7139.
- Harman and norharman, metabolites of entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales), disorganize development of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) and affect serotonin-regulating enzymes / A.K. Wrońska, M.I. Boguś, A. Kaczmarek, M. Kazek // *PLOS One*. – 2018. – Vol. 13. – P. 1–18.
- Hartley, S.E. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context / S.E. Hartley, A.C. Gange // *Annual review of entomology*. – 2009. – Vol. 54. – P. 323–342.
- Horowitz, A. R., Ellsworth, P. C., Ishaaya, I. Biorational pest control – an overview / A. R. Horowitz, P. C. Ellsworth, I. Ishaaya // *Biorational control of arthropod pests*. – Springer Dordrecht, 2009. – P. 1–20.
- Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata* / T. Tsuge, Y. Harimoto, K. Akimitsu [et al.] // *FEMS microbiology reviews*. – 2013. – Vol. 37, iss. 1. – P. 44–66.
- Ibrahim, A.A. Production and characterization of destruxins from local *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* / A.A. Ibrahim, M.S. Asker // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2012. – Vol. 6, N 5. – P. 284–288.
- Identification and characterization of *Alternaria* species causing leaf spot on cabbage, cauliflower, wild and cultivated rocket by using molecular and morphological features and mycotoxin production / I. Siciliano, G. Gilardi, G. Ortu [et al.] // *European Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 149, iss. 2. – P. 401–413.
- Identification and functional characterization of a novel acetyl-CoA carboxylase mutation associated with ketoenol resistance in *Bemisia tabaci* / B. Lueke, V. Douris, J.E. Hopkinson [et al.] // *Pesticide biochemistry and physiology*. – 2020. – Vol. 166. – P. 104583–104615.
- Immune–physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in *Colorado potato beetle* larvae / O.G. Tomilova, V.Yu. Kryukov, B.A. Duisembekov [et al.] // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2016. – Vol. 140. – P. 8–15.
- Immunoassay of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed / W. Yu, F.Y. Yu, D.J. Undersander, F.S. Chu // *Food Agricultural Immunology*. – 1999. – Vol. 11, N 4. – P. 307–319.
- In vitro screening of 65 mycotoxins for insecticidal potential / M.I. Boguś, A.K. Wrońska, A. Kaczmarek, M. Boguś-Sobocińska, // *PLOS One*. – 2021. – Vol. 16, N 3. – P. 18.
- Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae) / S. Boyer, M. Paris, S. Jegou [et al.] // *Biological Control*. – 2012. – Vol. 62, iss. 2. – P. 75–81.
- Influence of medium constituents on the biosynthesis of cephalosporin-C / V.K. Nigan, R. Verma, A. Kumar [et al.] // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 10, iss. 2. – P. 230–239.
- Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation / S. Tuske, S.G. Sarafianos, X. Wang [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 122, iss. 4. – P. 541–552.
- Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme* / E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266, iss. 22. – P. 14486–14490.

- The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid / C.J. Coates, J. Lim, K. Harman [et al.] // Cell biology and toxicology. – 2019. – Vol. 35, iss. 3. – P. 219–232.
- Insecticidal activity of some tenuazonic acid analogues / E.A.S. La Croix, S.E. Mhasalkar, P. Mamalis, F.P. Harrington // Pesticide Science. – 1975. – Vol. 6, N 5. – P. 491–496.
- Insecticidal effects of *Ungernia severtzovii* buld extracts against the grain aphid *Schizaphis graminum* (Rondani) / T.D. Chermenskaya, E.A. Stepanycheva, A.V. Shchenikova [et al.] // Industrial Crops and Products. – 2012. – Vol. 36, iss. 1. – P. 122–126.
- Ismail, A.A. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity / A.A. Ismaiel, J. Papenbrock // Agriculture. – 2015. – Vol. 5, N 3. – P. 492–537.
- Isolation and bioactivity of secondary metabolites from solid culture of the fungus, *Alternaria sonchi* / A. Dalinova, L. Chisty, D.A. Kochura [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, iss. 1. – P. 81.
- Ivanova, L. Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria* / L. Ivanova, D. Petersen, S. Uhlig // Toxicon. – 2010. – Vol. 55, N 6. – P. 1107–1114.
- James, R.R. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. / R.R. James, J. Xu // Journal of Invertebrate Pathology. – 2012. – Vol. 109, N 2. – P. 175–182.
- Jaronski, S.T. Mass production of fungal entomopathogens / S.T. Jaronski, G.M. Mascarin // Microbial control of insect and mite pests. – Amsterdam: Elsevier, 2017. – P. 141–155.
- Kaur, M. First record of *Alternaria macrospora* MKP1 causing leaf spot disease on *Parthenium hysterophorus* from India / M. Kaur, N. Kumar Aggarwal // Journal of Crop Protection. – 2015. – Vol. 4, N 20. – P. 719–726.
- Klotz, M.G. The action of tentoxin on membrane processes in plants / M.G. Klotz // Physiologia Plantarum – 1988. – Vol. 74, N 3. – P. 575–582.
- Koch, K. Total synthesis of alternariol / K. Koch, J. Podlech, E. Pfeiffer, M. Metzler // The Journal of Organic Chemistry. – 2005. – Vol. 70, N 8. – P. 3275–3276.
- Korres, N.E. Weed control: sustainability, hazards, and risks in cropping systems worldwide / N.E. Korres, N.R. Burgos, S.O. Duke. – CRC Press, 2018. – 680 p.
- Koul, M. *Penicillium* spp. prolific producer for harnessing cytotoxic secondary metabolites / M. Koul, S. Singh // Anti-Cancer Drugs. – 2017. – Vol. 28, N 1. – P. 11–30.
- Lacey, L.A. Entomopathogens used as microbial control agents / L.A. Lacey // Microbial control of insect and mite pests. – Amsterdam: Elsevier, 2017. – P. 3–12.
- Lawrence, D. P. Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria* / D.P. Lawrence, F. Rotondo, P.B. Gannibal // Mycological Progress. – 2016. – Vol. 15, N 1. – P. 3.
- Lee, H.B. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology / H.B. Lee, A. Patriarca, N. Magan // Mycobiology. – 2015. – Vol. 43, iss. 2. – P. 93–106.
- Lehmann, L. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells / L. Lehmann, J. Wagner, M. Metzler // Food and Chemical Toxicology. – 2006. – Vol. 44, N 3. – P. 398–408.
- Leonard, C. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells / C. Leonard, N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley // Journal of Insect Physiology. – 1985. – Vol. 31, N 10. – P. 789–799.
- Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri* / L. Planes, J. Catalán, A. Tena [et al.] // Journal of Pest Science. – 2013. – Vol. 86, iss. 2. – P. 321–327.

- Lethal and sublethal effects of thiacloprid on *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) and its predator *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae) / P. Aeinehchi, B. Naseri, H. Rafiee Dastjerdi [et al.] // *Toxin Reviews*. – 2019. Vol. 40, iss. 4. – P. 1–11.
- Liebermann, B. Isotentoxin, a conversion product of the phytotoxin tentoxin / B. Liebermann, R. Ellinger, E. Pinet // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 42, N 6. – P. 1537–1540.
- Lou, J. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities / J. Lou, Y. Peng, L. Fu // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, N 5. – P. 589–5935.
- Loutelier, C. Conjugation reactions of cyclodepsipeptide to glutathionyl adducts by direct ‘in-beam’ synthesis under negative-ion fast-atom bombardment conditions / C. Loutelier, J.C. Cherton, C. Lange // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1994. – Vol. 8, N 10. – P. 844–848.
- L-Tenuazonic acid, a new inhibitor of *Paenibacillus larvae* / G.L. Gallardo, N.I. Peña, P. Chacana [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 20, iss. 6. – P. 609–612.
- MÁ, P.M. The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases / P.M. MÁ, G. Alonso, R. Martín de Santos // *Nutricion hospitalaria*. – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 1772–1781.
- Martin, J.A. The synthesis of zinniol / J.A. Martin, E. Vogel // *Tetrahedron*. – 1980. – Vol. 36, N 6. – P. 791–794.
- Mass spectrometry as a tool for the selective profiling of destruxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum* / T.M. Butt, N.B.E. Hadj, A. Skrobek [et al.] // *Rapid Communications in Mass Spectrometry: an international journal devoted to the rapid dissemination of up-to-the-minute research in mass spectrometry*. – 2009. – Vol. 23, iss.10. – P. 1426–1434.
- Meah, M.B. Effect of media composition on vegetative and reproductive growth of *Alternaria brassicicola* and *Bipolaris sorokiniana* / M.B. Meah, F.H. Tumpa, M.A. Hossain // *Current Agriculture Research Journal*. – 2017. – Vol. 5, N 3. – P. 266.
- Meena, M. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: an overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects / M. Meena, S. Samal // *Toxicology reports*. – 2019. – Vol. 6. – P. 745–758.
- Melophlins A and B, novel tetramic acids reversing the phenotype of ras-transformed cells, from the marine sponge *Melophlus sarassinorum* / S. Aoki, K. Higuchi, Y. Ye [et al.] // *Tetrahedron*. – 2000. – Vol. 56, iss. 13. – P. 1833–1836.
- Mo, X. Naturally occurring tetramic acid products: isolation, structure elucidation and biological activity / X. Mo, Q. Li, J. Ju // *RSC Advances*. – 2014. – Vol. 4, N 92. – P. 50566–50593.
- Möbius, N. Fungal phytotoxins as mediators of virulence / N. Möbius, C. Hertweck // *Current opinion in plant biology*. – 2009. – Vol. 12, N 4. – P. 390–398.
- Monneret, C. Histone deacetylase inhibitors / C. Monneret // *European journal of medicinal chemistry*. – 2005. – Vol. 40, N 1. – P. 1–13.
- Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* sp. causing leaf blight of *Solanaceous* plants in Algeria / N. Bessadat, P. Simoneau, S. Benichou [et al.] // *African Journal of Microbiology Research*. – 2014. – Vol. 8, iss. 37. – P. 3422–3434
- Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients / E. Streit, C. Schwab, M. Sulyok, K. [et al.] // *Toxins*. – 2013. – Vol. 5, iss. 3. – P. 504–523.

- Myco-metabolites as biological control agents against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) / M.E. Osman, A.A.A. Elnasr, M.A. Nawar, G.A. Hefnawy // Egyptian Journal of Biological Pest Control. – 2019. – Vol. 29, N 1. – P. 1–10.
- Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment / S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis // Food and chemical toxicology. – 2013. – Vol. 60. – P. 218–237.
- Natural zinniol derivatives from *Alternaria tagetica*. Isolation, synthesis, and structure–activity correlation / M. Gamboa-Angulo, F. Escalante-Erosa, K. Garcia-Sosa [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry – 2002. – Vol. 50, iss. 5. – P. 1053–1058.
- Nishikawa, J. Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range / J. Nishikawa, C. Nakashima // Fungal Systematics and Evolution. – 2020. – Vol. 5. – P. 197.
- Nolte, M.J. Structural investigations of 3-acylpyrrolidine-2, 4-diones by nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography / M.J. Nolte, P.S. Steyn, P.L. Wessels // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1. – 1980. – P. 1057–1065.
- Novel foods: a risk profile for the house cricket (*Acheta domesticus*) / X. Fernandez-Cassi, A. Supeanu, A. Jansson, [et al.] // EFSA Journal. – 2018. – Vol. 16. – P. 1–15.
- O'Brien, J. An ecological perspective of microbial secondary metabolism / J. O'Brien, G.D. Wright // Current Opinion in Biotechnology. – 2011. – Vol. 22, N 4. – P. 552–558.
- Occurrence of *Alternaria japonica* on seeds of wild and cultivated rocket / G. Gilardi, S. Demarchi, G. Ortu [et al.] // Journal of Phytopathology. – 2015. – Vol. 163, iss. 5. – P. 419–422.
- Olszak, R.W. Influence of some insecticides and acaricides on beneficial mites and on *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) larvae / R.W. Olszak, M. Sekrecka // Pesticides and Beneficial Organism IOBC/wprs Bulletin. – 2008. – Vol. 35. – P. 101–108.
- OSMAC Strategy Integrated with Molecular Networking for Accessing Griseofulvin Derivatives from Endophytic Fungi of *Moquiniastrium polymorphum* (Asteraceae) / V.F. Farinella, E.S. Kawafune, M.M.P. Tangerina [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, iss. 23. – P. 7316.
- Ostry, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs / V. Ostry // World Mycotoxin Journal. – 2008. – Vol. 1, N 2. – P. 175–188.
- Pankova, A.V. Identification of phytotoxic and phytopathogenic fungi on grains and wheat seedlings / A.V. Pankova, L.R. Valiullin, D.V. Afordoanyi [et al.] // International scientific and practical conference "Agro-SMART-Smart solutions for agriculture"(Agro-SMART 2018). – Tymen: Atlantis Press, 2018. – P. 759–765.
- Parasitoid envenomation alters the *Galleria mellonella* midgut microbiota and immunity, thereby promoting fungal infection / O.V. Polenogova, M.R. Kabilov, M.V. Tyurin [et al.] // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9, iss. 1. – P. 1–12.
- Patent № 2004290516 Australia, IPC A01N 43/36 (2006.01). 2-Ethyl-4, 6-Dimethyl-Phenyl-Substituted Tetramic Acid Derivatives as Pest Control Agents and/or Herbicides: № 10354628.6: date of filing: 2004.11.09: publication date: 2005.06.02 / Fischer R., Lehr S., Feucht D. [et al.]; applicant(s) Bayer CropScience Aktiengesellschaft. – P. 8410–8411.
- Patent № 2008/0280761 USA, IPC AOIN 63/04 (2006.01), AOIPI3/00 (2006.01). Biological control of weeds using the metabolites of *Alternaria alternata*: № 11/815,013: date of filing: 2005.12.29: publication date: 2008.05.14 / Qiang S., Dong Y., An C., Zhou B.; worldwide applications. – 6 p.
- Patent № EP 0 645 963 B1 European Patent Office, IPC A01 N 43/36, C07D 207/44, C07D 405/10. Fungicidal and insecticidal compounds and compositions derived from fungal strains of

- Pyrenophora teres*: № 93915424.1: date of filing: 18.06.1993: publication date: 2005.06.02 / Bachmann T.L., Heide M., Manker D.C. [et al.]; applicant(s) Novo Nordisk A/S 2880 Bagsvaerd (DK), Novo Nordisk Entotech, Inc. Davis, CA 95616-4880 (US). – 19 p.
- Pedras, M.S.C. Metabolite diversity in the plant pathogen *Alternaria brassicicola*: factors affecting production of brassicicolin A, depudecin, phomapyrone A and other metabolites / M.S.C. Pedras, M.R. Park // *Mycologia*. – 2015. – Vol. 107, N 6. – P. 1138–1150.
- Pedras, M.S.C. Phytotoxins, elicitors and other secondary metabolites from phytopathogenic “blackleg” fungi: structure, phytotoxicity and biosynthesis / M.S.C. Pedras, Y. Yu // *Natural Product Communications*. – 2009. – V. 4, N 9. – P. 1291–1304.
- Pedrini, N. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi / N. Pedrini, R. Crespo, M.P. Juárez // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. – 2007. – Vol. 146, N 1/2. – P. 124–137.
- Peruch, L.A.M. Survey of the intensity of *Alternaria* black spot and black rot on brassica species under organic farming systems in Pernambuco and Santa Catarina states / L.A.M. Peruch, S.J. Michereff, I.B. Araújo // *Horticultura Brasileira*. – 2006. – Vol. 24, N 4. – P. 464–469.
- Phomalairdenone: a new host-selective phytotoxin from a virulent type of the blackleg fungus *Phoma lingam* / M.S.C. Pedras, C.C. Erosa-López, J.W. Quail, J.L. Taylor // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 1999. – Vol. 9, N 23. – P. 3291–3294.
- Phomenins A and B, bioactive polypropionate pyrones from culture fluids of *Phoma tracheiphila* / C. Tringali, A. Parisi, M. Piattelli, G.M. San Lio // *Natural Product Letters*. – 1993. – Vol. 3, N 2. – P. 101–106.
- The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation / M.S.C. Pedras, P.B. Chumala, W. Jin [et al.] // *Phytochemistry*. – 2009. – Vol. 70, iss. 3. – P. 394–402.
- Phuwapraisirisana, P. New antitumour fungal metabolites from *Alternaria porri* / P. Phuwapraisirisana // *Natural product research*. – 2009. – Vol. 23, N 12. – P. 1063–1071.
- Pinto, V.E.F. *Alternaria* species and their associated mycotoxins / V.E.F. Pinto, A. Patriarca // *Mycotoxigenic Fungi: methods and protocols*. – New York: Springer Science+Business Media LLC, 2017. – P. 13–32.
- Plant–insect–pathogen interactions: a naturally complex ménage à trois / F.P. Franco, D.S. Moura, J.M. Vivanco, M.C. Silva-Filho // *Current opinion in microbiology*. – 2017. – Vol. 37. – P. 54–60.
- Prabhakaran, S.K. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.) / S.K. Prabhakaran, S.T. Kamble // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 1995. – Vol. 25, N 4. – P. 519–524.
- Prasad, V. *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* and its toxin trigger production of H₂O₂ and ethylene in tomato / V. Prasad, R.S. Upadhyay // *Journal of Plant Pathology*. – 2010. – P. 103–108.
- Production of efrapeptins by *Tolypocladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties / A.R. Bandani, B.P.S. Khambay, J.L. Faull [et al.] // *Mycological Research*. – 2000. – Vol. 104, N 5. – P. 537–544.
- Production of trichothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation / H. Hestbjerg, K.F. Nielsen, U. Thrane, S. Elmholt // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50, N 26. – P. 7593–7599.
- Pusztahelyi, T. Secondary metabolites in fungus-plant interactions / T. Pusztahelyi, I.J. Holb, I. Pócsi // *Frontiers in plant science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 573.

- The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico / H.A. Aponte, R.P. Penilla, F. Dzúl-Manzanilla [et al.] // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2013. – Vol. 107, iss. 2. – P. 226–234.
- Rahimloo, T. The occurrence of *Alternaria* species on cabbage in Iran / T. Rahimloo, Y. Ghosha // Zemdirbyste-Agriculture. – 2015. – Vol. 102, N 3. – P. 343–350.
- Reis, A. (2010). *Alternaria* species infecting *Brassicaceae* in the Brazilian neotropics: Geographical distribution, host range and specificity / A. Reis, L.S. Boiteux // Journal of Plant Pathology. – 2010. – Vol. 92, N 3. – P. 661–668.
- Resistance to insecticides in insect vectors of disease: est α 3, a novel amplified esterase associated with amplified est β 1 from insecticide resistant strains of the mosquito *Culex quinquesfasciatus* / D. DeSilva, J. Hemingway, H. Ranson, A. Vaughan // Experimental Parasitology. – 1997. – Vol. 87, N 3. – P. 253–259.
- Rethinking biorational insecticides for pest management: unintended effects and consequences / K. Haddi, L.M. Turchen, L.O. Viteri Jumbo [et al.] // Pest management science. – 2020. – Vol. 76, iss. 7. – P. 2286–2293.
- Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids / G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham [et al.] // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1991. – Vol. 566, iss. 1. – P. 195–205.
- Rincón, R.A. Botanicals against *Tetranychus urticae* Koch. under laboratory conditions: a survey of alternatives for controlling pest mites / R.A. Rincón, D. Rodríguez, E. Coy-Barrera // Plants. – 2019. – Vol. 8, N 8. – P. 272.
- Roberts, D.W. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects / D.W. Roberts, R.J. St Leger // Advances in applied microbiology. – 2004. – Vol. 54, N 1. – P. 1–70.
- Robertson, J.L. Pesticide Bioassays with Arthropods / J.L. Robertson, H.K. Preisler. – Boca Raton: CRC Press, 1992. – P. 224.
- Royles, B.J.L. Naturally occurring tetramic acids: structure, isolation, and synthesis / B.J.L. Royles // Chemical reviews. – 1995. – Vol. 95, N 6. – P. 1981–2001.
- Safavi, S.A. In vitro and in vivo induction, and characterization of beauvericin isolated from *Beauveria bassiana* and its bio-assay on *Galleria mellonella* larvae / S.A. Safavi // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2013. – Vol. 15, N 1. – P. 1–10.
- 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 // Сборник тезисов второй международной научной конференции PLAMIC 2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», г. Саратов, 5–9 октября 2020 г. С. 214.
- Scheirer, C.J. The analysis of ranked data derived from completely randomized factorial designs. / C.J. Scheirer, W.S. Ray, N. Hare // Biometrics. – 1976. – Vol. 32, N 2. – P. 429–434.
- Schobert, R. Tetramic and tetronic acids: an update on new derivatives and biological aspects / R. Schobert, A. Schlenk // Bioorganic & medicinal chemistry. – 2008. – Vol. 16, N 8. – P. 4203–4221.
- Schüffler, A. Cytotoxic α -pyrones from *Xylaria hypoxylon* / A. Schüffler, O. Sterne, H. Anke // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2007. – V. 62, N 3/4. – P. 169–172.
- Shaaban, M. Seven naphtho- γ -pyrones from the marine-derived fungus *Alternaria alternata*: structure elucidation and biological properties / M. Shaaban, K.A. Shaaban, M.S. Abdel-Aziz // Organic and medicinal chemistry letters. – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 1–8.

- Shabana, Y.M. *Alternaria infectoria*, a promising biological control agent for the fig wax scale, *Ceroplastes rusci* (Homoptera: Coccidae), in Egypt / Y.M. Shabana, M.E. Ragab // Biocontrol Science and Technology. – 1997. – Vol. 7, N 4. – P. 553–564.
- Shabana, Y.M. Evaluation of *Alternaria eichhorniae* as a bioherbicide for waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) in greenhouse trials / Y.M. Shabana, R. Charudattan, M.A. Elwakil // Biological Control. – 1995. – Vol. 5, N 2. – P. 136–144.
- Sherratt, P.J. Glutathione S-transferases / P.J. Sherratt, J.D. Hayes // Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics. – John Wiley & Sons Ltd: Hoboken, 2002. – P. 319–352.
- Simmons, E.G. *Alternaria: An Identification Manual* / E.G. Simmons // St. Paul: APS PRESS, 2007. – P. 775.
- Singh, B.K. An efficient synthesis of tetramic acid derivatives with extended conjugation from L-ascorbic acid / B.K. Singh, S.S. Bisht, R.P. Tripathi // Beilstein journal of organic chemistry. – 2006. – Vol. 2, N 1. – P. 24.
- Spiromesifen and spirotetramat resistance in field populations of *Bemisia tabaci Gennadius* in Spain / P. Bielza, I. Moreno, A. Belando [et al.] // Pest management science. – 2019. – Vol. 75, iss.1. – P. 45–52.
- Stability of mycotoxins in individual stock and multi-analyte standard solutions / M. Kiseleva, Z. Chalyy, I. Sedova, I. Aksenov // Toxins. – 2020. – Vol. 12, N 2. – P. 94.
- Starrat, A.N. Zinniol: a major metabolite of *Alternaria zinniae* / A.N. Starrat // Canadian Journal of Chemistry. – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 767–770.
- Starvation and imidacloprid exposure influence immune response by *Anoplophora glabripennis* (coleoptera: cerambycidae) to a fungal pathogen / J.J. Fisher, L.A. Castrillo, B.G.G. Donzelli, A.E. Hajek // Journal of Economic Entomology. – 2017. – Vol. 110, N 4. – P. 1451–1459.
- Stickings, C.E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. Metabolites of *Alternaria tenuis* Auct.: the biosynthesis of tenuazonic acid / C.E. Stickings, R.J. Townsend // Biochemical Journal. – 1961. – Vol. 78, N 2. – P. 412–418.
- Stierle, A.S. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata* / A.S. Stierle, J.H. Cardellina, G.A. Strobel // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Vol. 85, N 21. – P. 8008–8011.
- Structural characterization of three new AAL toxins produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* / E.D. Caldas, A.D. Jones, B. Ward [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1994. – Vol. 42, iss. 2. – P. 327–333.
- Structural Revision and Synthesis of Altechromone A / P. Königs, B. Rinker, L. Maus [et al.] // Journal of natural products. – 2010. – Vol. 73, iss. 12. – P. 2064–2066.
- Structure and tautomerism of tenuazonic acid—a synergetic computational and spectroscopic approach / H. Mikula, E. Horkel, P. Hans [et al.] // Journal of hazardous materials. – 2013. – Vol. 250. – P. 308–317.
- Structure of brassicicolin A: a novel isocyanide antibiotic from the phylloplane fungus *Alternaria brassicicola* / J.B. Gloer, G.K. Poch, D.M. Short, D.V. McCloskey // The journal of organic chemistry. – 1988. – Vol. 53, N 16. – P. 3758–3761.
- The studies of isolation, identification and mutagenicity of alternariol monomethyl ether / A. Yu-Hui, Z. Tian-Zheng, M. Jian [et al.] // Acta Academica Medica Henan. – 1986. – Vol. 21, iss. 2. – P. 204–207.

- Studies on host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins / Y. Kono, J.M. Gardner, Y. Suzuki, S. Takeuchi // *Agricultural and biological chemistry*. – 1986. – Vol. 50, N 6. – P. 1597–1606.
- Syntheses of cyclotetrapeptides, AM-toxin I and its analogs / S. Lee, H.Y. Aoyagi, Shimohigashi [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 1976. – Vol. 17, iss. 11. – P. 843–846.
- Synthesis and bioactivity of novel strobilurin derivatives containing the pyrrolidine-2, 4-dione moiety / G.H. Lu, H.B. Chu, M. Chen, C.L. Yang // *Chinese Chemical Letters*. – 2014. – Vol. 25, N 1. – P. 61–64.
- Synthesis and investigation of antimicrobial properties of pyrrolidine appended calix [4] arene / S. Muneer, S. Menon, Q. Khan [et al.] // *Journal of Analytical Science and Technology*. – 2017. – Vol. 8, iss 1. – P. 1–6.
- Tack, A.J.M. Plant pathogens structure arthropod communities across multiple spatial and temporal scales / A.J.M. Tack, M. Dicke // *Functional Ecology*. – 2013. – Vol. 27, N 3. – P. 633–645.
- Templeton, G.E. *Alternaria* toxins related to pathogenesis in plants / G.E. Templeton // *Microbial toxins*. – 2016. – Vol. 8. – P. 169–192.
- Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* full-fat meals as functional feed additives affect broiler chickens' growth performance and im-mune system traits / A. Benzertiha, B. Kierończyk, P. Kołodziejski [et al.] // *Poultry science*. – 2020. – Vol. 99, iss. 1. – P. 196–206.
- Tenuazonic acid – triggered cell death is the essential prerequisite for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler to infect successfully host *Ageratina adenophora* / J. Shi, M. Zhang, L. Gao [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, iss. 5. – P. 1010.
- Tenuazonic acid: a promising antitubercular principle from *Alternaria alternate* / V. Sonaimuthu, S. Parihar, J. Prakash Thakur [et al.] // *Microbiology Research*. – 2011. – Vol. 2, iss. 2. – P. 63–65.
- Tenuazonic acid-induced change in volatile emission from rose plants and its chemometrical analysis / F.Z. Yang, Y.X. Li, M. Tang [et al.] // *Journal of Plants Diseases and Protection*. – 2020. – Vol. 127, iss. 2. – P. 129–140.
- (–)-Terpestacin and L-tenuazonic acid, inducers of pigment and aerial mycelium formation by *Fusarium culmorum* JP 15 / B. Schlegel, M. Schmidtke, H. Dörfelt [et al.] // *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. – 2001. – Vol. 41, iss. 3/4. – P. 179–183.
- Thomma, H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite / H. J. Thomma // *Molecular plant pathology*. – 2003. – Vol. 4, N 4. – P. 225–236.
- Total biosynthesis of brassicicenes: Identification of a key enzyme for skeletal diversification / A. Tazawa, Y. Ye, T. Ozaki [et al.] // *Organic letters*. – 2018. – Vol. 20, iss. 19. – P. 6178–6182.
- Toxicity of metabolites produced by the "*Alternaria*" / R.W. Pero, H. Posner, M. Blois [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. – 1973. – Vol. 4. – P. 87–94.
- Toxicity of mycotoxins of *Fusarium sambucinum* for feeding in *Galleria mellonella* / G. Mulè, A. D'Ambrosio, A. Logrieco, A. Bottalico // *Entomologia experimentalis et applicata*. – 1992. – Vol. 62, N 1. – P. 17–22.
- The transcription factor MafB regulates the susceptibility of *Bactrocera dorsalis* to avermectin via GSTz2 / G. Tang, Y. Xiong, Y. Liu [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1068.

- Triangulation of methods using insect cell lines to investigate insecticidal mode-of-action / M. Mak, K.D. Beattie, A. Basta [et al.] // Pest Management Science. – 2021. – Vol. 77, iss. 1. – P. 492–501.
- Trichosetin, a novel tetramic acid antibiotic produced in dual culture of *Trichoderma harzianum* and *Catharanthus roseus* callus / E.C. Marfori, S.I. Kajiya, E.I. Fukusaki, A. Kobayashi // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2002. – Vol. 57, N 5–6. – P. 465–470.
- Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* related to ACTG-toxins / B. Liebermann, R. Ellinger, W.I. Günther [et al.] // Phytochemistry. – 1997. – Vol. 46, iss. 2. – P. 297–303.
- Tsai, C.J.Y. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing / C.J.Y. Tsai, J.M.S. Loh, T. Proft // Virulence. – 2016. – Vol. 7, N 3. – P. 214–229.
- Twenty-eight fungal secondary metabolites detected in pig feed samples: their occurrence, relevance and cytotoxic effects in vitro / B. Novak, V. Rainer, M. Sulyok [et al.] // Toxins. – 2019. – Vol. 11, iss. 9. – P. 537.
- Using the *Paramecium caudatum* test object to determine acute toxicity of physiologically active substances / Andreev V.A., Andreeva E.Yu., Erdniyev L.P. [et al.] // Vestnik voenno-meditsinskoy akademii. – 2019. – Vol. 66, iss. 2. – P. 110–113.
- Wang, C. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* / C. Wang, R. J. St. Leger // Eukaryotic Cell. – 2005. – Vol. 4, N 5. – P. 937–947.
- Zhou, B. Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata* / B. Zhou, S. Qiang // African journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, N 8. – P. 1151–1156.
- Zibae, A. Methoxyfenozide and pyriproxifen alter the cellular immune reactions of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) against *Beauveria bassiana* / A. Zibae, A.R. Bandani, D. // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2012. – Vol. 102, N 1. – P. 30–37.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Таблица А.1 - Биологическая активность хлористометиленовых экстрактов из фильтрата трехнедельных культур *Alternaria japonica* на различных жидких субстратах

Среда	Штамм	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б			Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C.albicans</i>
ЧАВ	181-011	24.1	50	0	0	3.2±1.2	22±5.4	-	0	0
	239-011	75.7	0	0	0	4.8±1.0	25.5±0.5	-	2	0
	244-011	0	50	0	0	3.2±0.8	25.3±4.1	-	0	0
	259-011	0.9	20	0	1.4±0.8 ^д	2.2±0.6	39.5±15.1	-	0	0
М1Д	181-011	14	50	0	0	4.3±0.6	22.7±5.0	-	0	0
	239-011	21.1	80	0	2.1±0.5	4.8±0.8	96.5±6.1	+	7	0
	244-011	0	40	0	0	1.2±0.5	34.1±6.2	-	0	5
	259-011	0	50	0	0	3.3±1.0	57.0±28.6	+	0	0
ДМГ	181-011	0	40	0	0	3.3±1.0	14.7±7.4	-	0	0
	239-011	6.9	80	0	0	2.3±0.8	34.6±8.8	-	0	3
	244-011	4	40	0	0	1.5±0.5	39.4±11.1	-	0	5
	259-011	1.4	50	0	0	3.3±1.8	78.3±33.2	-	4	0
Сабуро	181-011	5.6	30	0	0	2.5±1.0	26±12.5	-	0	0
	239-011	13.5	40	0	0	2.8±0.4	29.5±3.2	-	0	0
	244-011	1.4	50	0	0	3.3±1.0	56.2±14.5	-	0	0
	259-011	1.4	30	0	2.8±0.7	3.2±0.8	47.4±11.6	-	2	0
Контроль		-	10	0	0	0	9.6±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+»,

«++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «←» – клетки не погибли (n=100).

^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.2 - Биологическая активность этилацетатных экстрактов из фильтрата трехнедельных культур *Alternaria japonica* на различных жидких субстратах

Среда	Штамм	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б			Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S. graminum</i>	<i>G. mellonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	181-011	0	0	2±0 ^д	1.2±0.7	3.5±1.1	0	-	0	0
	239-011	0	30	2.8±0.5	6.2±2.0	4.5±1.8	20.9±4.4	-	2	0
	244-011	2.7	0	4±1.2	4.3±1.5	4.7±1.5	0	-	0	0
	259-011	0	40	1.3±0.8	3.3±1.3	4.7±2.0	24.9±13.9	-	5	0
М1Д	181-011	7.3	40	2±0.5	1.2±0.8	3.8±0.8	36±7.6	-	5	0
	239-011	0	10	2.7±0.8	2±0	3.8±0.8	33.6±7.7	-	4	0
	244-011	33	40	4.3±2.1	4.7±1.1	5±1.5	0	-	5	0
	259-011	0	30	3.7±1.2	4±0.5	4.5±2.0	22.4±13.9	-	5	0
ДМГ	181-011	1.1	10	2.2±1.0	0	2.5±1.0	39.2±8.4	-	4	0
	239-011	1.8	0	2.9±1.1	0	2.8±0.8	36.3±13.4	-	4	0
	244-011	6.7	50	4.5±2.0	5±2.1	3.5±1.0	36.9±6.8	-	3	0
	259-011	11.6	40	1.3±0.7	2.5±0.7	4.2±0.8	18.5±11.9	-	4	0
Сабуро	181-011	0	40	2.5±1.0	0	2.5±0.5	22.5±4.7	-	3	0
	239-011	4.3	40	2.2±0.8	1.7±0.5	3.3±0.7	56.2±9.7	-	0	0
	244-011	5.3	80	2.8±1.1	2.3±1.0	4.5±1.0	47.9±9.4	-	3	0
	259-011	0	10	1.3±0.5	3.2±1.0	4.5±1.0	23.4±11.1	-	4	0
Контроль		–	0	0	0	0	9.6±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+»,

«++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «←» – клетки не погибали (n=100).

^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.3 - Биологическая активность гексановых экстрактов из мицелия трехнедельных культур *Alternaria japonica* на различных жидких субстратах

Среда	Штамм	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б			Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S. graminum</i>	<i>G. mellonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	181-011	10.7	20	-	-	-	-	+	0	0
	239-011	8	10	-	-	-	-	-	0	0
	244-011	0	20	-	-	-	-	-	0	0
	259-011	2.2	30	-	-	-	-	+	0	0
М1Д	181-011	14.9	10	0	0	0	100	-	0	0
	239-011	8	60	0	0	0	100	-	0	0
	244-011	6.5	40	0	0	0	34.6±2.6 ^д	-	0	0
	259-011	10.1	0	0	0	0	96.5±4.1	-	0	0
ДМГ	181-011	8.7	60	0	0	0	95.7±11.3	-	0	0
	239-011	12.6	0	0	0	0	85.1±3.5	-	0	0
	244-011	24.3	30	0	0	0	77.4±6.0	-	0	0
	259-011	16.2	30	0	0	0	89.9±9	-	0	0
Сабуро	181-011	5	0	0	0	0	56.2±3.1	-	0	0
	239-011	10	40	0	0	0	12.9±4.1	++	0	0
	244-011	17.8	20	0	0	0	25.3±2.7	-	0	0
	259-011	12.5	0	0	0	0	34.1±1.5	-	0	0
Контроль ^д		—	0	0	0	0	9.6±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01%-ном экстракте, «←» – клетки не погибали (n=100).

^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.4 - Биологическая активность этилацетатных экстрактов из мицелия трехнедельных культур *Alternaria japonica* на различных жидких субстратах

Среда	Штамм	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б			Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S. graminum</i>	<i>G. mellonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	181-011	3.7	20	0	0	0	-	+	0	0
	239-011	1.2	60	0	0	0	-	+	0	0
	244-011	2.4	10	0	0	0	-	+	0	0
	259-011	1.2	0	0	0	0	-	+++	0	0
М1Д	181-011	13.1	60	0	0	0	19.7±4.1 ^д	++	0	0
	239-011	0.1	20	0	0	0	54.3±5.9	++	0	0
	244-011	1.7	30	0	0	0	56.1±6.7	+++	0	0
	259-011	0	30	0	0	0	23.7±6.3	+++	0	0
ДМГ	181-011	6.3	20	0	0	0	28.6±4.7	+	0	0
	239-011	8.7	50	0	0	0	33.2±8.2	++	0	0
	244-011	14	10	0	0	0	30.2±4.2	++	0	0
	259-011	1.1	10	0	0	0	30.1±3.7	++	0	0
Сабуро	181-011	3.7	50	0	0	0	31.1±10.8	++	0	0
	239-011	1.2	30	0	0	0	16±2.6	+++	0	0
	244-011	2.4	30	0	0	0	42.2±10.2	++	0	0
	259-011	1.2	10	0	0	0	37±2.7	++	0	0
Контроль		-	0	0	0	0	9.6±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «-» – клетки не погибали (n=100).

^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.5 - Биологическая активность экстрактов из твердофазных культур *Alternaria japonica* на твердом субстрате

Субстрат	Экстрагент ^а	Изолят	Биологическая активность								
			Инсектицидная ^б		Фитотоксическая ^в			Цитотоксическая ^г		Антимикробная ^д	
			<i>S. graminu m</i>	<i>G. melonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Перловая крупа	Г	181-011	23.9	10	0	1.7±0.5	3.3±1.0	100	+	2	0
		239-011	-	30	7.3±2.2 ^е	0	0	100	-	2	0
		244-011	83.7	20	0	0	0	100	+	3	0
		259-011	22.6	20	1.3±0.5	0	4.3±1.1	100	-	0	0
	ЭА	181-011	41.8	40	0	6.3±2.4	4.7±1.7	100	+	2	0
		239-011	49.1	50	0	0	2.2±0.5	100	+	3	0
		244-011	-	30	0	4.8±0.8	4.5±0.5	100	+	0	0
		259-011	-	40	0	1.7±0.8	3.3±0.7	100	-	0	0
Контроль			-	10	0	0	0	6.4±1.8	-	0	0

Примечание. ^а – Г – гексан; ЭА – этилацетат. ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1%-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^г – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «–» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^е – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.6 - Биологическая активность экстрактов из фильтрата и твердофазных культур *Alternaria tenuissima* на различных жидких и твердом питательных субстратах

Среда	Экстрагент ^а	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^б		Фитотоксическая ^в			Цитотоксическая ^г		Антимикробная ^д	
		<i>S. graminum</i>	<i>G.mellonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	ХМ	0	30	2.8±1.2 ^е	0	5.0±0.6	100	-	0	0
	ЭА	0	40	4.5±0.7	1.7±0.6	4.7±0.5	53.9±12.6	-	5.1±0.8	0
М1Д	ХМ	82.2	90	3.3±1.0	9.8±3.2	5.7±0.8	100	+	7±0	12±0
	ЭА	17.3	100	6.7±2.1	6.7±1.8	5.5±1.0	54.7±15.8	-	12±0	0
ДМГ	ХМ	15.3	50	5.3±0.5	3.5±0.8	2.3±0.8	12.9±3.7	+	9±0	10±0
	ЭА	26	100	6.3±0.8	5.2±0.4	6.3±2.2	23.1±5.0	-	11±0	0
Сабуро	ХМ	59.3	50	4.8±2.3	4.2±1.0	4.0±1.3	59.5±20.1	+	5±0	2.0±0
	ЭА	0	100	6±2.0	4.5±1.1	4.3±0.5	54.7±9.8	-	7.8±0.1	0
Перловая крупа	Г	41.6	40	4.2±1.1	3.5±0.8	4.6±0.8	100	+	2.8±0.4	0
	ЭА	40.9	100	7.5±2.3	3.8±1.0	8.2±1.3	100	+	10±0	0
Контроль		—	10	0	0	0	8.3±1.4	-	0	0

Примечание. ^а – ХМ – хлористый метилен, экстракция при pH 7; ЭА – этилацетат, экстракция при pH 2; Г – гексан, экстракция при pH 7. ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^г – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01%-ном экстракте, «-» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^е – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.7 - Биологическая активность экстрактов из мицелия трехнедельных культур *Alternaria tenuissima* на различных жидких питательных субстратах

Среда	Экстрагент ^а	Биологическая активность								
		Инсектицидная ^б		Фитотоксическая ^в			Цитотоксическая ^г		Антимикробная ^д	
		<i>S. graminum</i>	<i>G. mellonella</i>	осот	пшеница	редис	Sf9	<i>P. caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	Г	8	20	0	0	0	55.6±21.0	-	0	0
	ЭА	13.1	30	0	1.8±0.4 ^с	0	8.5±0.5	+++	0	0
М1Д	Г	2.3	40	0	0	0	59.5±8.5	-	0	0
	ЭА	40.2	30	0	3.5±2.8	1.1±0.7	100	++	0	0
ДМГ	Г	14	70	0	0	0	90±4.3	-	0	0
	ЭА	2.6	20	0	0	0	58.6±3.4	++	0	0
Сабуρο	Г	17.5	20	0	0	0	39.5±1.9	++	0	0
	ЭА	10.8	40	0	3.6±2.1	1.3±0.5	14.0±2.3	++	0	0
Контроль		—	10	0	0	0	8.3±1.4	-	0	0

Примечание. ^а – Г – гексан, экстракция из высушенного мицелия; ЭА – этилацетат, экстракция из мицелия после гексана; ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^г – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «-» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^с – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.8 - Биологическая активность хлористометиленовых экстрактов из фильтрата трехнедельных культур *Alternaria sonchi* на различных жидких питательных субстратах

Среда	Изолят	Биологическая активность							
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б		Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	И 5.4	-	90	0	0	18.7±4.1	+	7.5±0.5	0
	Гер.8.2	-	90	0	0	23.6±5.1	+	3.0±0	0
	S-145	-	90	0	0	27.5±3.2	+	4.0±0	0
	S-102	-	0	0	0	59.9±15.4	-	1.0±0	0
М1Д	И 5.4	81.3	80	1.5±0.5 ^д	0	59.1±5.4	+	8.3±1.5	6.5±1.5
	Гер.8.2	23.8	70	0.8±0.4	2.0±0.9	21.5±5.0	-	5.0±0	1.0±0
	S-145	20.0	0	1.5±0.5	0.8±0.4	21.0±1.8	-	9.0±1.0	4.7±1.2
	S-102	27.7	30	0	0	38.1±3.8	+	10.3±0.6	8.0±0
ДМГ	И 5.4	46.6	70	1.3±0.8	0	21.4±2.8	-	8.7±2.9	3.3±2.5
	Гер.8.2	66.3	100	2.3±0.5	2.0±0.9	17.6±3.0	-	5.7±0.6	1.0±0
	S-145	11.3	90	1.8±0.4	0	56.0±3.2	-	7.3±0.6	1.3±0.6
	S-102	24.6	80	2.5±1.0	1.5±0.8	37.4±7.4	+	8.3±0.6	1.7±0.6
Сабуро	И 5.4	7.5	30	0	0	14.9±1.9	-	1.0±0	0
	Гер.8.2	10.9	100	0	0	18.7±3.6	-	1.0±0	0
	S-145	16.0	60	2.0±0.9	0	13.2±1.3	-	1.7±0.6	0
	S-102	17.3	30	2.8±1.7	0	29.8±8.5	-	1.0±0	0
Контроль		-	10	0	0	9.6±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «-» – клетки не погибали (n=100).

^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.9 - Биологическая активность этилацетатных экстрактов из фильтрата трехнедельных культур *Alternaria sonchi* на различных жидких питательных субстратах

Среда	Изолят	Биологическая активность							
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б		Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	И 5.4	-	-	0	0	18.7±4.1	-	3.7±0.6	0
	Гер.8.2	-	100	0	0	18.6±4.3	-	2.0±0	0
	S-145	-	60	0	0	14.0±1.0	+	1.0±0	0
	S-102	-	-	0	0	29.1±9.8	+	3.0±0	0
М1Д	И 5.4	28.8	65	5.0±1.1 ^д	7.6±2.8	20.2±4.3	-	11.3±1.2	0
	Гер.8.2	55.0	60	3.6±0.8	0	14.8±3.5	-	11.0±0	0
	S-145	16.3	40	4.3±0.5	5.3±3.4	13.7±2.5	-	11.7±0.6	0
	S-102	20.8	40	4.3±0.5	4.5±3.8	17.3±3.1	-	15.3±0.6	0
ДМГ	И 5.4	26.3	90	2.3±0.4	2.8±0.7	18.3±3.3	-	9.7±0.6	0
	Гер.8.2	88.8	100	2.0±0.6	0	15.4±2.4	-	10.7±0.6	0
	S-145	12.6	70	2.2±0.4	3.0±0.8	12.7±1.1	-	9.3±0.6	0
	S-102	21.1	70	2.0±1.2	2.8±1.8	13.9±3.6	-	11.0±0	0
Сабуро	И 5.4	12.5	100	0	0	14.9±1.9	-	3.0±0	0
	Гер.8.2	15.0	20	2.8±0.7	0	17.9±4.3	-	4.0±0	0
	S-145	10.1	50	0	0	19.9±6.2	-	2.0±0	0
	S-102	0	60	0	0	12.5±3.2	-	3.3±0.6	0
Контроль		-	0	0	0	4.2±1.9	-	0	0

Примечание. ^а – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^б – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «-» – клетки не погибали (n=100). ^г – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^д – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.10 - Биологическая активность гексановых экстрактов из мицелия трехнедельных культур *Alternaria sonchi* на различных жидких питательных субстратах

Среда	Изолят	Биологическая активность							
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б		Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	И 5.4	-	-	0	0	16.2±2.2	++	0	1.3±0
	Гер.8.2	-	-	0	0	27.0±4.3	++	0	0
	S-145	-	-	0	0	18.8±5.5	-	0	0
	S-102	-	-	0	0	15.9±4.0	-	0	0
М1Д	И 5.4	-	20	0	0	37.8±1.4	+	3.7±0.6	0
	Гер.8.2	-	-	0	0	24.7±2.8	-	1.0±0	0
	S-145	48.1	-	0	0	12.9±2.7	-	2.0±0	0
	S-102	-	-	0	1.3±0.5 ^д	19.4±4.3	-	1.0±0	0
ДМГ	И 5.4	-	30	0	0	21.7±5.0	+	1.3±0.6	0
	Гер.8.2	-	20	0	0	43.2±2.2	-	1.0±0	0
	S-145	22.5	10	0	0	13.2±2.1	+	3.0±0	0
	S-102	26.5	10	0	0	50.8±3.1	+	2.0±0	0
Сабуро	И 5.4	-	20	0	0	17.9±8.2	++	0	0
	Гер.8.2	-	20	0	0	15.5±3.0	+	0	0
	S-145	22.5	20	0	0	20.6±2.1	++	0	1.3±0.6
	S-102	-	10	0	0	13.6±2.0	-	0	0
Контроль		-	10	0	0	6.4±1.8	-	0	0

Примечание. ^а – Г – гексан; ЭА – этилацетат; ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^г – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «–» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^е – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.11 - Биологическая активность этилацетатных экстрактов из мицелия трехнедельных культур *Alternaria sonchi* на различных жидких питательных субстратах

Среда	Изолят	Биологическая активность							
		Инсектицидная ^а		Фитотоксическая ^б		Цитотоксическая ^в		Антимикробная ^г	
		<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
ЧАВ	И 5.4	-	-	0	0	13.2±1.8 ^д	+	0	1.7±0.6
	Гер.8.2	-	-	0	0	25.4±5.8	++	0	0
	S-145	-	-	0	0	40.2±4.7	++	0	0
	S-102	-	-	0	0	22.3±6.5	-	0	0
М1Д	И 5.4	43.8	40	0	0	28.6±2.7	+	4.8±0.8	0
	Гер.8.2	-	30	0	0	18.2±1.4	-	0	0
	S-145	51.2	30	0	0	15.5±4.1	-	2.3±1.2	0
	S-102	42.6	90	0	1.0±0	52.5±17.6	-	3.0±0	0
ДМГ	И 5.4	22.3	70	0	0	62.0±4.8	+	4.3±0.6	0
	Гер.8.2	-	60	0	0	36.2±3.7	-	0	0
	S-145	13.8	0	0	0	36.7±12.1	++	5.0±0	2.0±0
	S-102	85.0	20	0	0	29.9±3.1	+	3.0±0	0
Сабуро	И 5.4	32.9	30	0	0	17.3±4.3	+	0	0
	Гер.8.2	-	-	0	0	26.5±3.9	+	0	0
	S-145	36.3	10	0	0	82.8±6.1	++	0	1.3±0.6
	S-102	32.3	0	0	0	97.5±2.6	-	0	0
Контроль		-	0	0	0	11.1±4.2	-	0	0

Примечание. ^а – Г – гексан; ЭА – этилацетат; ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^в – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «–» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^е – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Таблица А.12 - Биологическая активность экстрактов из твердофазных культур *Alternaria sonchi*, на твердом субстрате

Субстрат	Экстргент ^а	Изолят	Биологическая активность							
			Инсектицидная ^б		Фитотоксическая ^в		Цитотоксическая ^г		Антимикробная ^д	
			<i>S.graminum</i>	<i>G.melonella</i>	осот	пшеница	Sf9	<i>P.caudatum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Перловая крупa	Г	И 5.4	12.5	0	2.8±1.2 ^е	0	100±0	++	5.7±0.6	0
		Гер.8.2	32.2	0	4.5±0.5	0	100±0	++	8.3±0	0
		S-145	62.7	10	2.8±0.8	0	100±0	+	7.0±0	0
		S-102	27.6	50	3.3±1.4	0	100±0	++	7.3±0.6	5.0±0
	ЭА	И 5.4	16.2	50	2.7±1.9	1.5±0.8	100±0	++	6.0±0	0
		Гер.8.2	16.2	60	1.2±0.8	2.7±0.8	100±0	++	7.8±0.3	0
		S-145	0	90	0	1.0±0	100±0	++	7.0±0	0
		S-102	49.3	60	4.8±1.2	3.8±1.0	100±0	+	6.7±1.2	2.3±0.6
Контроль			-	10	0	0	6.4±1.8	-	0	0

Примечание. ^а – Г – гексан; ЭА – этилацетат; ^б – Смертность *Schizaphis graminum* относительно контроля (%) через 24 ч после обработки 0.5 %-ным экстрактом (1 мг/дм²); кумулятивная смертность *Galleria mellonella* через 10 сут после инъекции 10 мкл 0.1 %-ного экстракта в гемоцель гусениц (n=10). ^в – Диаметр/длина некроза (мм) на листовых высечках/сегментах через 48 ч после обработки 10 мкл 0.5 %-ного экстракта; ^г – доля (%) погибших клеток линии Sf9 в тестовых лунках через 24 ч инкубации в 0.01 %-ном экстракте; «+», «++», «+++» – гибель клеток инфузорий *Paramecium caudatum* через соответственно 180, 30 и 3 минуты инкубации в 0.01 %-ном экстракте, «–» – клетки не погибали (n=100). ^д – радиус зоны ингибирования роста, мм (500 мкг/диск). ^е – указаны средние значения и стандартные отклонения.

Приложение Б

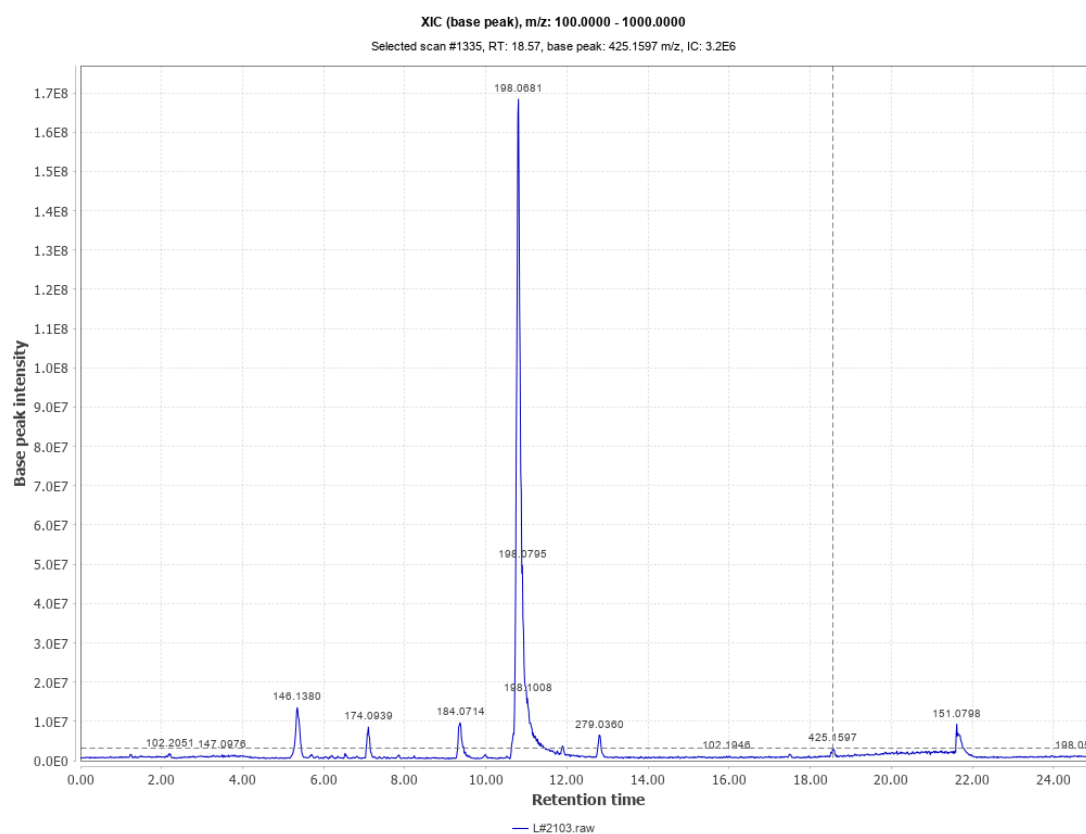


Рисунок Б. 1 — Масс-спектр тенуазоновой кислоты

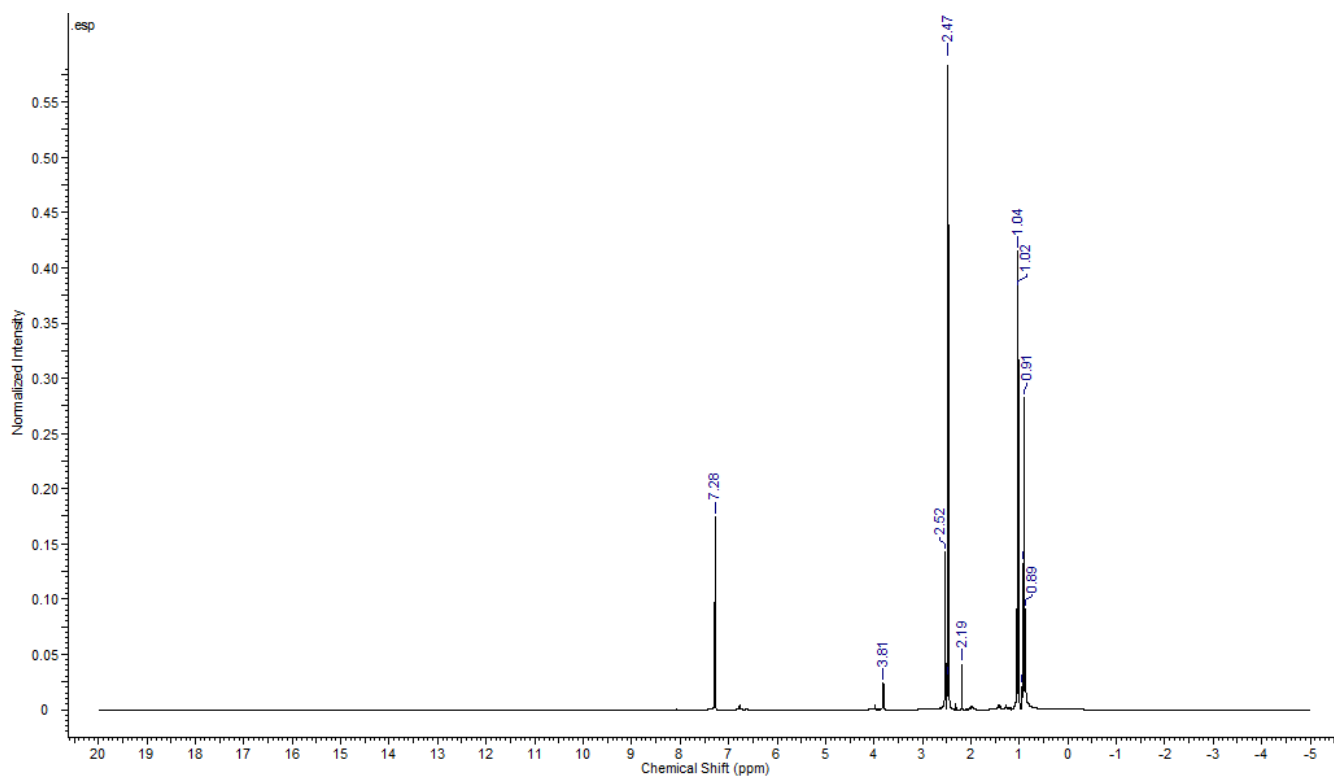


Рисунок Б. 2 — ^1H -ЯМР спектр тенуазоновой кислоты

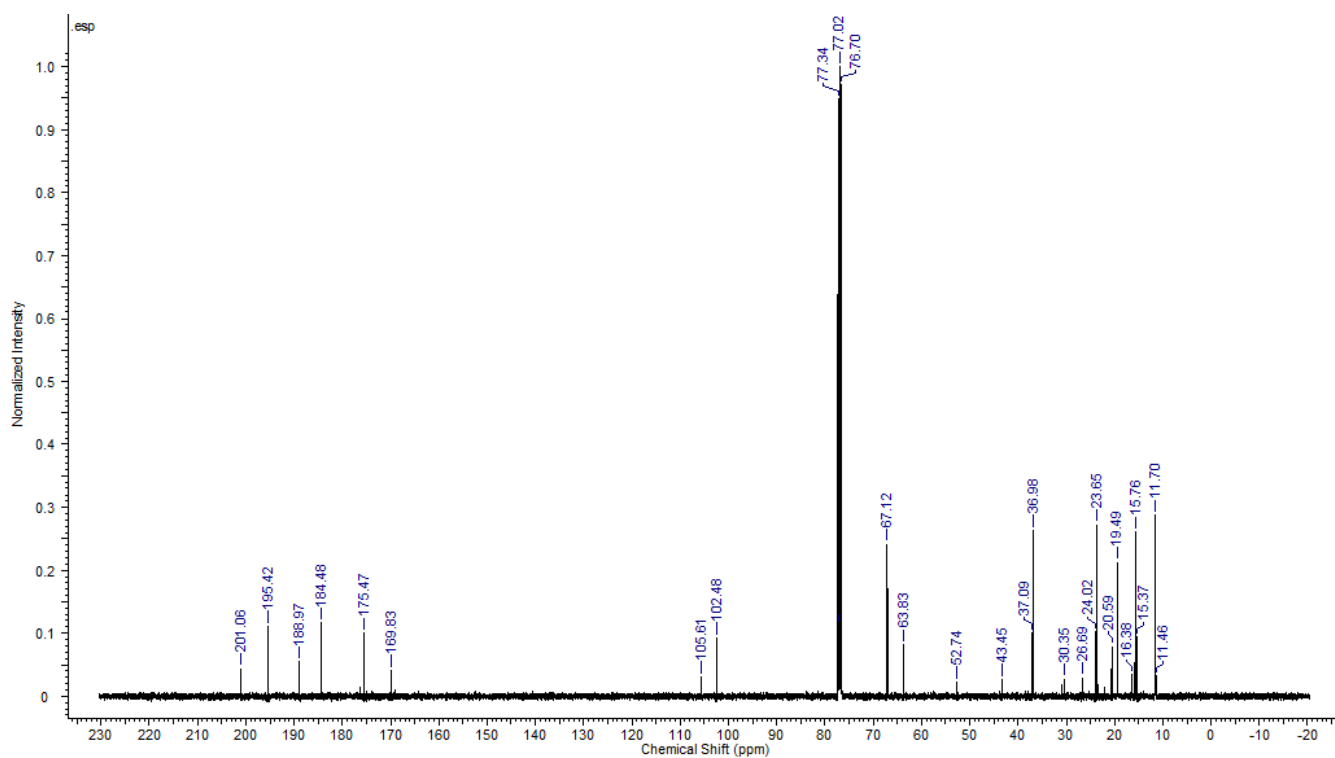


Рисунок Б. 3 — ^{13}C -ЯМР спектр тенуазоновой кислоты

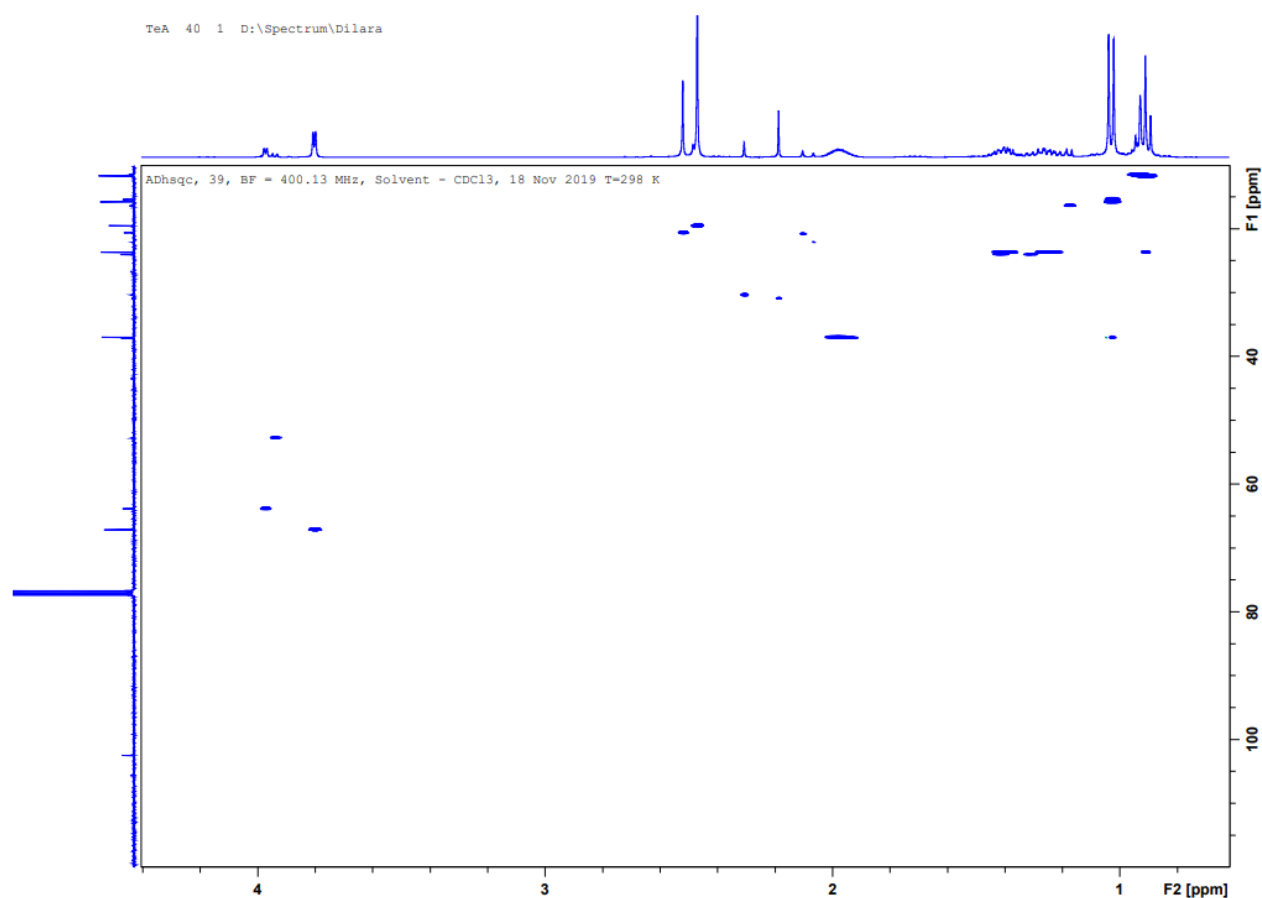


Рисунок Б. 4 — ЯМР-спектр ближних протон-углеродных взаимодействий (HSQC) тенуазоновой кислоты

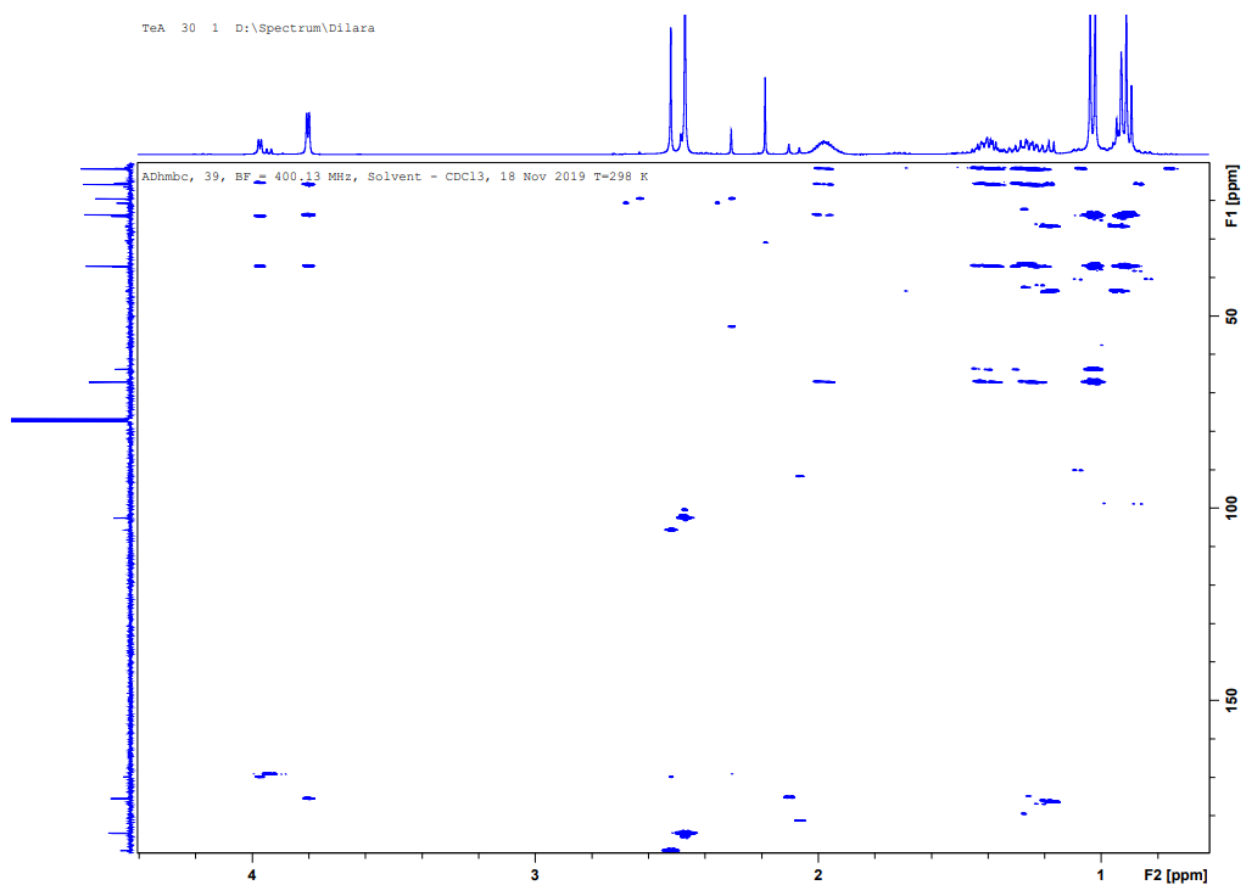


Рисунок Б. 5 — ЯМР-спектр дальних протон-углеродных взаимодействий (HMBC) тенуазоновой кислоты