

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра ботаники

Страхова-Шмидт Анна Павловна

Влияние состава питательного субстрата и способа культивирования на биологическую активность экстрактов и метаболитные профили гриба *Pestalotiopsis sp.*, выделенного из листьев *Camellia sinensis*

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в лаборатории
микологии и фитопатологии
ФГБНУ ВИЗР

Руководитель лаборатории
кандидат биологических наук
Берестецкий Александр Олегович

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Власов Дмитрий Юрьевич

Куратор:
научный сотрудник
кандидат биологических наук,
Полужктова Екатерина Викторовна

Санкт-Петербург

2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Литературный обзор	6
1.1. Характеристика грибов рода <i>Pestalotiopsis</i>	6
1.2. Биологически активные метаболиты грибов рода <i>Pestalotiopsis</i>	9
2. Материалы и методы исследования	14
2.1. Оборудование, используемое в работе.....	14
2.2. Материалы исследований	14
2.2.1. Растворители	14
2.2.2. Тест-организмы.....	15
2.3. Методы исследований.....	15
2.3.1. Молекулярная идентификация гриба	15
2.4. Выделение биологически активных метаболитов	16
2.4.1. Получение экстрактов из жидкофазной культуры гриба	16
2.4.2. Получение экстрактов из твердофазной культуры гриба	18
2.5. Оценка биологической активности	19
2.5.1. Фитотоксическая активность.....	19
2.5.2. Антимикробная активность	19
2.6. Анализ хроматографических профилей экстрактов	20
2.6.1. Тонкослойная хроматография	20
2.6.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	20
2.7. Статистическая обработка результатов	20
3. Результаты и обсуждение.....	21
3.1 Идентификация гриба	21
3.1.1. Морфолого-культуральные характеристики изучаемого объекта.....	21
3.1.2. Молекулярно-генетические данные.....	24
3.2. Жидкофазное культивирование	25

3.3. Твердофазное культивирование.....	28
3.4. Оценка биологической активности экстрактов.....	29
3.4.1. Фитотоксическая активность.....	29
3.4.2. Антибиотическая активность.....	30
3.5. Анализ метаболитных профилей экстрактов <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	31
3.5.1. Тонкослойная хроматография.....	31
3.5.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	44
ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

ВВЕДЕНИЕ

Pestalotiopsis - род аскомицетов. Грибы рода *Pestalotiopsis* паразиты и сапрофиты на растениях, так же встречаются как эндофиты. Очень обширный род, большинство грибов, описанных как виды *Pestalotiopsis* обработаны в монографии Наг Раджа (Nag Raj, 1993), который с уверенностью признает в нём 25 видов, однако в списках нерассмотренных и не исключенных видов грибов осталось около 110 видов, которые ожидают критического пересмотра своего таксономического положения.

Из числа видов, описанных в монографии Наг Раджа (Nag Raj, 1993) отнесенных к роду *Pestalotiopsis*, на территории России и других республик бывшего СССР встречается по крайней мере три вида. Одним из них является *Pestalotiopsis theae*, распространенный паразит чая. Особенностью фитопатогенных видов рода *Pestalotiopsis* является то, что гриб способен поражать даже молодые побеги чайного куста, тем самым нанося вред производству чайной продукции.

Род является космополитом, но особенно распространен в тропиках и субтропиках. Предполагается, что изначально, виды *Pestalotiopsis* были изолированы именно как эндофиты из растительных тканей. Эндофитные виды остаются безвредными до тех пор, пока растение не подвергнется стрессу, а затем эндофиты становятся патогенами. Считается, что патогенная фаза может быть вызвана комбинацией факторов окружающей среды, восприимчивостью растений и вирулентностью патогена (Gehlot et al., 2008). Однако необходимы дальнейшие исследования для доказательства эндофитной патогенной взаимосвязи.

На сегодняшний день из видов *Pestalotiopsis* выделяют алкалоиды, терпеноиды, производные изокумарина, кумарины, хиноны, пептиды, ксантоны, производные ксантонов, фенолы, фенольные кислоты и лактоны, что делает этот род особенно богатым источником биологически активных веществ.

Цель работы:

Подобрать питательные субстраты и способы культивирования для получения биологически активных метаболитов *Pestalotiopsis* sp., выделенного из листьев *Camellia sinensis*.

Задачи исследования:

1. Провести идентификацию гриба на основе морфологических признаков и молекулярно-генетических данных.

2. Оценить выход биомассы и экстрактивных веществ при культивировании на различных жидких и твердых субстратах

3. Оценить биологическую активность (фитотоксическую и антимикробную) экстрактов из культуры продуцента, полученных на различных питательных субстратах

4. Провести сравнительный анализ метаболитных профилей (ТСХ- и ВЭЖХ) экстрактов из культуры гриба, полученных при культивировании на различных питательных субстратах

1. Литературный обзор

1.1. Характеристика грибов рода *Pestalotiopsis*

Грибы рода *Pestalotiopsis* паразиты и сапрофиты на растениях, так же встречаются как эндофиты. Очень обширный род, большинство грибов, описанных как виды *Pestalotiopsis* обработаны в монографии Наг Раджа (Nag Raj, 1993), который с уверенностью признает в нём 25 видов, однако в списках нерассмотренных и неисключенных видов грибов осталось 110 видов, которые ожидают критического пересмотра своего таксономического положения.

Их числа тех видов, что были описаны в монографии Наг Раджа (Nag Raj, 1993) отнесенных к роду *Pestalotiopsis*, на территории России и других республик бывшего СССР встречается по крайней мере три вида. Одним из них является *Pestalotiopsis thea*, распространенный паразит чая.

De Notaris (1839) представил род *Pestalotia*, выделенный с листьев *Vitis vinifera* в Италии. Этот вид характеризуется 6-клеточными конидиями с четырьмя оливковыми центральными клетками, дистосептами, гиалинными концевыми клетками и простыми или разветвленными придатками, возникающими из-за этого Steyaert (1949) переработал *Pestalotia* и разделил род на три основные группы, основанные на конидиальных формах. Steyaert (1949) также представил два новых вида: *Truncatella* для 4-клеточных конидиальных форм и *Pestalotiopsis* для 5-клеточных форм, в то время как 6-клеточные формы оставались в *Pestalotia*. Steyaert (1949) далее разделил *Pestalotiopsis* на дополнительные разделы, основанные на количестве апикальных выростов. Это были *Monosetulatae*, *Bistulatae*, *Trisetulatae* и *Multisetulatae*. Конидии с одним отростком (apical appendage) были включены в *Monosetulatae*. Конидии с двумя отростками или, в среднем с двумя, были включены в *Bistulatae*. В *Trisetulatae* были включены конидии с тремя сетулами или тремя мощными отростками. Конидии с более чем тремя отростками были включены в *Multisetulatae*.

В работе K.D. Hyde (2002) было показано, что род *Pestalotia* и *Pestalotiopsis* тесно связаны друг с другом, поскольку они объединяются в одну монофилетическую кладу с высокой поддержкой бутстрапа. Все эти виды характеризуются веретеновидными или слегка изогнутыми конидиями, несущими четырехугольные срединные клетки, которые пигментированы, с апикальными придатками, которые возникают в виде трубчатых расширений из апикальной клетки и центральным базальным придатком, возникающим эндогенно из базальной клетки. Различия в морфологии *Pestalotia* по сравнению с *Pestalotiopsis* в том, что споры обладают срединными клетками, которые имеют несколько

более толстые стенки. Они также имеют более медленный темп роста на синтетических средах по сравнению с видами *Pestalotiopsis*.

Долгое время таксономическое положение *Pestalotiopsis* было спорным (Guba, 1961; Steyeart, 1949). Steyeart (1949) предложил, чтобы все виды *Pestalotia* были перенесены в *Pestalotiopsis* и что *Pestalotia* должна быть монотипичной с *P. pezizoides*. Молекулярные данные согласуются с обработкой Steyeart, поскольку все виды *Pestalotia* сгруппированы вместе с видами *Pestalotiopsis*. (Nag Rag 1988, 1993)

Канидиомы у грибов рода *Pestalotiopsis* очень разнообразные по форме: от ложа до пикнидиоидных или рожковидных, от погруженных до прорывающихся, от однокамерных до неправильно многокамерных, иногда с неполностью развитыми камерами, гладкие от бурых до черных, открывающиеся неправильным разрывом апикальной части оболочки или покрывающей ткани хозяина; стома и оболочка из клеток угловатой, шариковидной, призматической, или переплетенной текстуры. Конидиеносцы могут полностью или частично выстилать камеру конидиомы, могут быть разветвленными, с перегородками, иногда редуцированными до конидиогенных клеток, бесцветными, гладкими, и погруженными в слизь. Конидиогенные клетки аннелидные, дискретные или интегрированные, индетерминированные, с очень небольшим или заметным перекинальным утолщением в зоне воротничка, имеют до 3х пролифераций. Конидии веретеновидные, прямые или слегка согнутые, с настоящими перегородками, с придатками. Базальная клетка конидии обратноконусовидная, с усеченным концом, часто несущим маленькую маргинальную оборочку, от бесцветной до почти бесцветной, тонкостенная. Средние клетки пигментированные, одной или разной степени окраски, со стенками, более толстыми, чем стенки конечных клеток, гладкие, шероховатые, с мелкими бородавочками, часто расположенными продольными рядами, с морщинистой поверхностью, с продольными полосками или с неправильными продольными штрихами. Апикальная клетка от конусовидной до почти сферической, от бесцветной до почти бесцветной, тонкостенная. Придатки, козникающие как трубковидные выросты, сохраняющие протоплазматическую целостность с телом конидии, нитевидные, с оттянутыми концами, извилистые, апикальные придатки в числе от 1 до многих, разветвленные или неразветвленные, имеющие лопатчатое расширение на концах или не имеющие его, базальный придаток часто отсутствует, если имеется, то он осевой.

Развитие поражения, вызванного патогеном может быть тесно связан с его жизненным циклом (Agrios, 2005). Многие виды *Pestalotiopsis* не проявляют узкой специализации очень и могут заражать целый ряд растений из различных семейств (Hopkins

и McQuilken, 2000; Keith et al., 2006). Виды *Pestalotiopsis* способны вызывать множество заболеваний у растений, включая, разрушение хвои, сильный хлороз, плодовые гнили и листовые пятна (Pirone 1978; Kwee and Chong 1990; Xu et al. 1999; Tagne and Mathur 2001; Sousa et al. 2004; Espinoza et al. 2008). Pirone (1978) считает, что виды *Pestalotiopsis* являются слабыми или оппортунистическими патогенами и могут наносить незначительный ущерб декоративным растениям; однако, Hopkins и McQuilken (2000) отметили, что некоторые виды *Pestalotiopsis* могут наносить серьезный ущерб комнатным растениям и количество известных видов растений, поражаемых данным родом постоянно растет.

У патогенных видов *Pestalotiopsis* контакт с хозяином происходит с помощью конидий или фрагментированных спор (Espinoza et al., 2008). Эти инокулы могут выживать в суровых погодных условиях, вызывая первичное заражение.

Вторичный инокулят, полученный на пораженной ткани, может вызывать вторичные инфекции и повышать тяжесть болезни. Источником заражения может быть листовая опад, загрязненные питомники (McQuilken и Hopkins 2004), зараженная вода (Hopkins and McQuilken 1997; Elliott et al. 2004), а также споры в воздухе (Xu et al. 1999). Наиболее слабые патогены проникают через естественные отверстия растений, такие как устьичные отверстия, чечевички и гидатоды (Agrios, 2005). Виды *Pestalotiopsis* часто заражают подверженные стрессу из-за насекомых, пестицидов или при солнечных ожогах (Hopkins and McQuilken 2000). Высокая температура, чрезмерный уровень увлажнения и деятельность человека могут также вызвать инфекции, что может привести к развитию поражения (Tuset et al., 1999; Hopkins and McQuilken 2000; Elliott et al. 2004).

Конидии играют ключевую роль в обеспечении первичного заражения общий цикл болезни для *Pestalotiopsis*. Vatanbe (2000) изучал конидиальную адгезию и прорастания спор *P. neglecta* и было показано, что инфекция происходит в четыре этапа. Вначале нижняя медианная клетка прикрепляется к субстрату. На первом этапе адгезия слабая и достигается за счет слизистой ткани, покрывающей конидии.

Вторая слабая адгезия происходит на основаниях стебля. Следующие два этапа обеспечивают сильное прикрепление путем выпуска фибриллярных адгезивных веществ. На третьем этапе фибриллярные клейкие вещества выводятся к вершине базальной клетки.

Четвертый этап включает выпуск фибриллярного материала в точке появления конидиом. Конидии частично или полностью развиваются внутри конидиом, которые обычно гладкие, округлые и могут быть погруженными в бесцветную слизь (Nag Rag, 1993). Зрелые пикниды можно увидеть невооруженным глазом в виде черных или коричневых масс спор с обильными конидиями.

Elliot (2004) заявлял, что *Pestalotiopsis* может давать большое количество спор, которые легко диспергируются в воздухе или в результате разбрызгивания воды, таким образом своевременная санитарная обработка очень важна для предотвращения развития поражений. Управление водными ресурсами, устранение листового опада, создание умеренной влажности, увеличение расстояния между растениями и увеличение циркуляции воздуха, может уменьшить распространение заболевания на пальмовых плантациях. Неграмотно проведенные уборки на плантациях повлияли на развитие болезни на чае. показали, что самый высокий процент заражения происходил на участках, где применяли непрерывную шпалерную подрезку, а наименее пораженными были участки ручного сбора.

1.2. Биологически активные метаболиты грибов рода *Pestalotiopsis*

Представители рода *Pestalotiopsis* известны как продуценты алкалоидов, терпеноидов, производных изокумарина, кумаринов, хинонов, пептидов, ксантонов, фенолов и фенольных кислот, лактонов, что делает этот род богатым источником биологически активных веществ по сравнению с другими грибными родами. Данные литературы свидетельствуют о том, что метаболиты гриба проявляют антифунгальную, противомикробную и противоопухолевую активность (Jing Xu et al. 2010).

Примерами алкалоидов, образуемых грибами рода *Pestalotiopsis* являются песталохлорид А (рисунок 1). Данный метаболит был выделен из экстракта *Pestalotiopsis adusta* (Ellis & Everh.) и песталотиопсоид (*Pestalotiopsis sp.*). Соединение значительно отличается от других известных алкалоидов. Кроме того, этот метаболит также проявляет высокую антифунгальную активность в отношении *Fusarium culmorum* (Jing Xu et al. 2010).

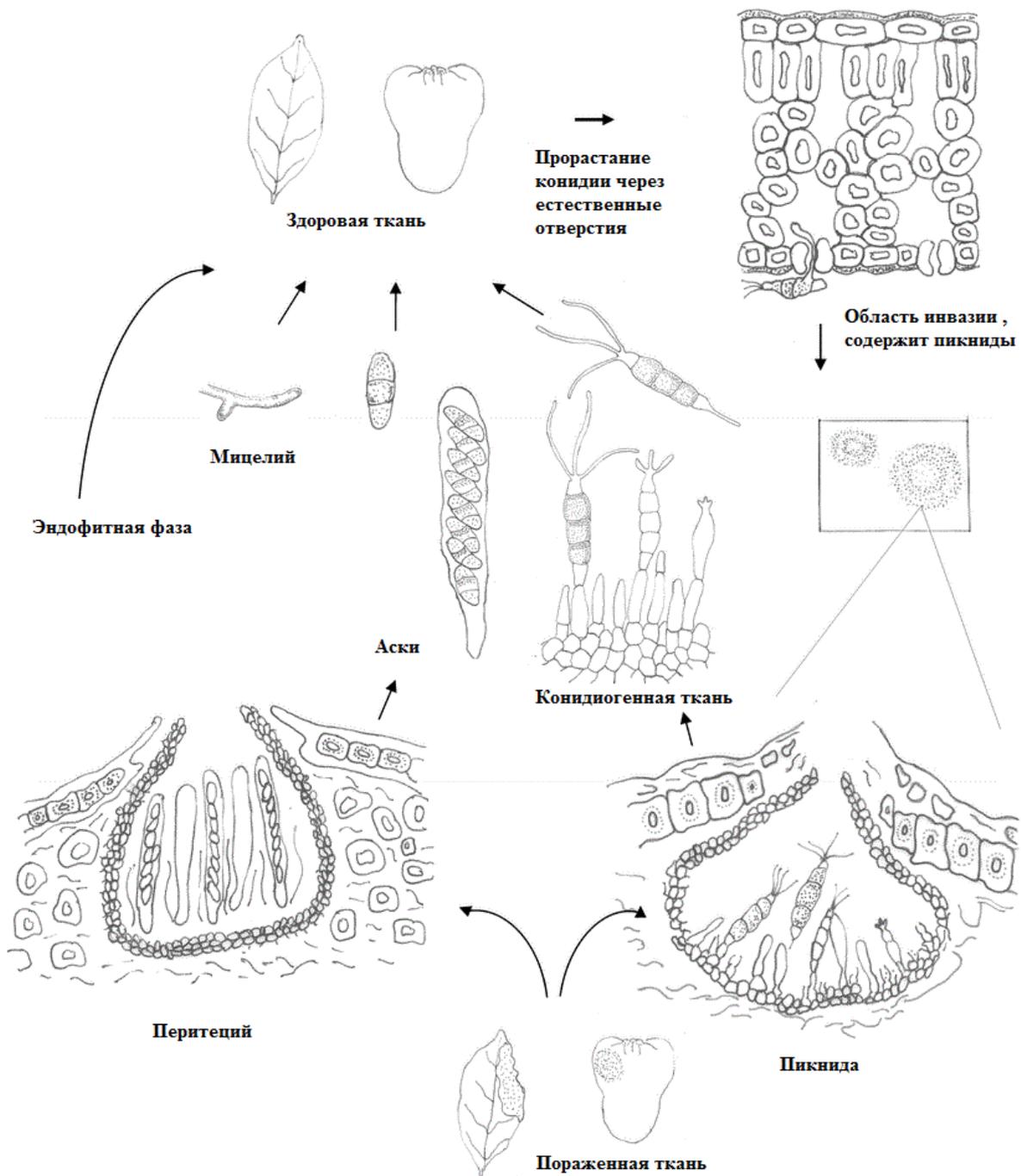


Рисунок 1. Жизненный цикл грибов рода *Pestalotiopsis* (Von Arx 1974). Особенно интересно отметить вид *Pestalotiopsis microspore* (Speg.). Этот эндофитный гриб, выделенный из листьев плюща обыкновенного (*Hedera helix*) в Буэнос-Айресе, обладает уникальными свойствами разрушения полиуретана. Способность этого гриба существовать на полиуретане в анаэробных условиях может быть потенциально полезна для создания средств биоремедиации пластика (Zhao 1995). Известно, что представители рода *Pestalotiopsis* способны образовывать различные биологически активные вещества различной химической структуры.

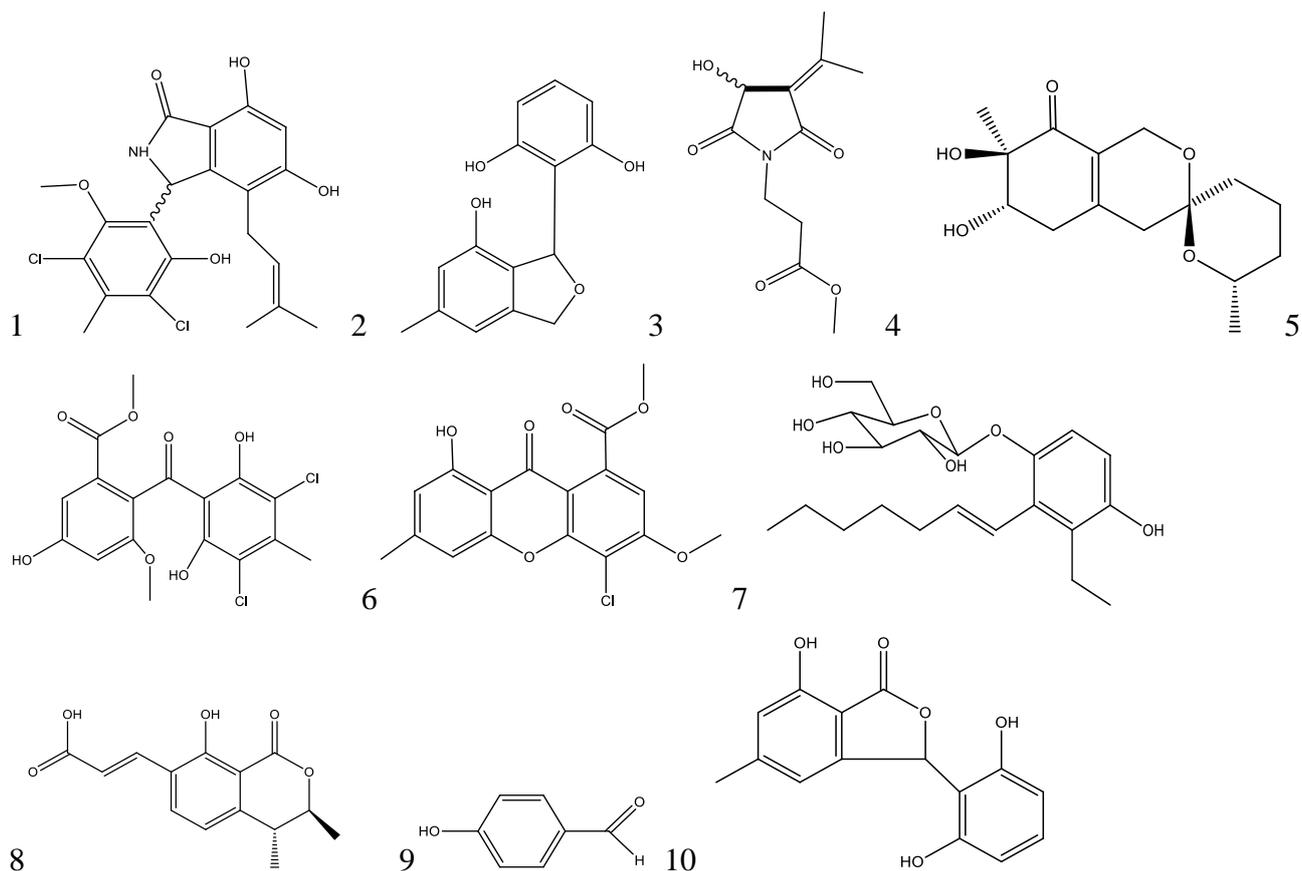


Рисунок 2. Метаболиты различных видов *Pestalotiopsis*. (1)- Песталахлорид А, (2)- Пестацин, (3)- Песталотиопсоид А, (4)-Пестофолид А, (5)-Хлоризосулохрин, (6)-Хлоризосулохрин дегидрат, (7)-Песталозид, (8)-Песталотиопоринин А, (9)-п-гидроксибензальдегид, (10)-изопестацин.

Песталотиопсоид А (рисунок 2.) является амидом пирролидиндиона, был выделен из экстрактов культуры эндофитного гриба *Pestalotiopsis* sp. с листьев китайского мангрового растения *Rhizophora mucronata*.

Среди метаболитов, образуемых грибами этого рода известны вещества с антимикробными, противоопухолевыми свойствами. Пестофолид А (*P. foedan*) (рисунок 2.4), проявляет антифунгальную активность в отношении *Aspergillus fumigatus*, действие вещества в концентрации 100 мкг/диск вызывает появление зоны лизиса 10 мм.

Паклитаксел (рисунок 4) - вещество, которое ранее выделяли только из коры тихоокеанского тиса, было обнаружено у видов *Pestalotiopsis*, таких как *P. microspora* *P. guerinii* и *P. pauciseta*. Паклитаксел является дитерпеном, вещество является блокатором β-фенилаланина, и проявляет сильную противоопухолевую активность. (Liu, 2009)

Песталотиопсорин А (рисунок 2) был получен из экстрактов эндофита *Pestalotiopsis* sp., выделенного с листьев китайского мангрового растения *Rhizophora mucronata*. Это

соединение является единственным известным производным изокумарина выделенным из видов *Pestalotiopsis*.

Два регулятора роста растений, хлоризосулохлорин и дигидрат хлоризосулотрина, были выделены из культурального фильтрата *Pestalotiopsis theae*.

Песталозид, фитотоксин, был выделен из экстрактов культуры *P. microspora* и показал сильную антифунгальную активность против видов *Cladosporium*, *Rhizoctonia solani*, *Geotrichum candidum* и *Agricus campestris*. Пестацин (рисунок 2) показал умеренную антифунгальную активность в отношении патогена *Pythium ultimum*. Кроме того, изопестацин проявлял умеренную антифунгальную активность против растительного патогенного оомицета *Pythium ultimum*, аскомицета *Sclerotinia sclerotiorum* и базидиомицета *Rhizoctonia solani*. А также метаболит, р-гидроксибензальдегид был выделен из эндофитного гриба *Pestalotiopsis* sp. выделенного из листьев китайского мангрового растения *Rhizophora mucronata* (Xu et al., 2010).

Вторичные метаболиты, полученные *Pestalotiopsis sydowiana* от галофита, *Phragmites communis* Trinus, обладали ингибирующей активностью против 20S протеасом (рисунок 3). Соединения 1-3, 5 и 9-10 показали умеренную активность ингибирования протеасом, в то время как соединение 8 демонстрирует сильную активность с IC₅₀ 1,2 ~ 0,3 мкМ. Это первое исследование. Эндофитный гриб *P. sydowiana* может быть хорошим ресурсом для ингибиторов протеасом. (Хуекуй Хиа, 2016).

Два дикетопиперазиновых гетеродимера, песталазины были выделены из патогена растения *P.*, выделенного из *Camellia sinensis*. Соединения песталазин А и асперазин (рисунок 4) показали ингибирующее действие против репликации ВИЧ-1 в клетках С8166 с величинами EC₅₀ 47,4 и 98,9 мкМ соответственно (Ding et al., 2008a).

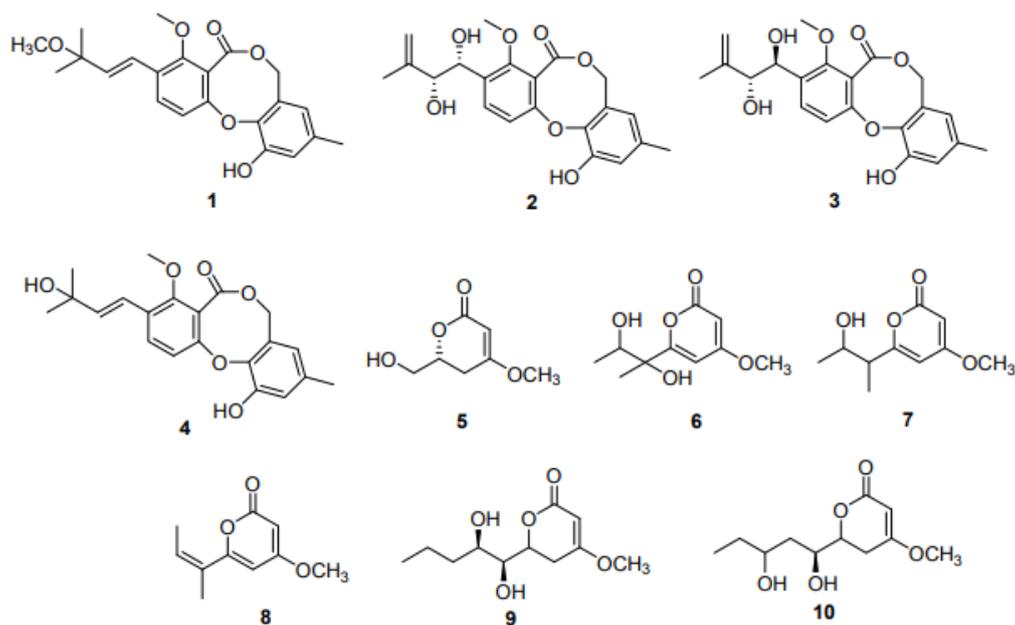


Рисунок 3. Метаболиты *Pestalotiopsis sydowiana*. (1) - 3'-О-метилдигидроизопенициллид, (2) - песталотиоолид В, (3) -, песталотиоолид А, (4) - дегидроизопенициллид, (5) - 6-гидроксиметил-4-метокси-5,6-дигидро- 2Н-пиран-2-он, (6) - песталотиопирон D, (7) - песталотиопирон E, (8) - песталотиопирон G, (9) - LL-P880b и фотопирон B (10).

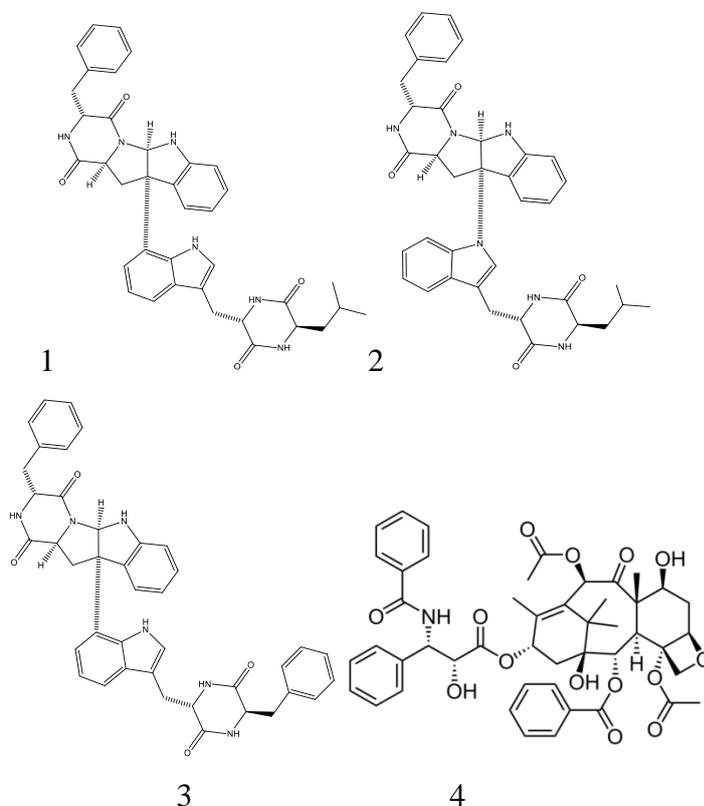


Рисунок 4. (1) - Песталазин А, (2) -Песталазин В, (3) - Асперазин. (4) -Паклитаксел.

2 . Материалы и методы исследования

2.1. Оборудование, используемое в работе

Автоклав - аппарат для проведения различных процессов при нагреве от 126-132°C и под давлением 1,5-2 атмосферы. В данной работе автоклавированием осуществляли стерилизацию питательных сред.

Ламинарный бокс - лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха. Используется при микробиологических и молекулярно-биологических работах, работах с культурой клеток, тканей и органов. Стерильный воздух подаётся в бокс ламинарным потоком (равномерное движение воздуха без завихрений). В данной работе в ламинар-боксе проводили засев питательных сред грибом *Pestalotiopsis*, а также посев микроорганизмов для изучения антимикробной активности ;

Термостат - прибор для поддержания постоянной температуры. Для выращивания грибов устанавливали постоянную температуру 24°C, для бактерий - 30°C.

Ультразвуковая ванна - устройство для создания кавитации в жидкости, налитой в ванну. В данной работе использовалась для ускорения физико-химических процессов в жидкостях (перемешивание, растворение, экстракция) «сапфир»;

Роторный испаритель - это устройство для быстрого удаления жидкостей отгонкой при пониженном давлении. Использовали для концентрирования экстрактов испаритель Heidolph.

2.2. Материалы исследований

2.2.1. Растворители

Анисовый альдегид (8.22314.0250 Identify:1.121-1.124).

Ацетон (ГОСТ 2603-79). «ХЧ» (ЗАО «Вектон»).

Метиловый спирт (ГОСТ 6995-77). «ХЧ» (ЗАО «Вектон»).

Муравьиная кислота (ОКП 26 3411 0321 03) «Ч» (ЗАО «Вектон»).

Этилацетат «ХЧ» (ЗАО «Вектон»)

Этиловый спирт (ТУ 6-09-4512-77)

Ацетонитрил ОСЧ 1 (ТУ 6-09-2167-84) и ОСЧ 5 (ТУ 6-09-2167-84)

2.2.2. Тест-организмы

Штамм гриба. В работе использовали один штамм гриба *Pestalotiopsis*, выделенного из листа чая (*Camellia sinensis*), собранного на чайных плантациях Краснодарского края в районе Дагомыса.

Растения. Для исследований фитотоксической активности экстрактов использовались хорошо развитые листья пырея ползучего (*Elytriga repens*) и бодяка полевого (*Cirsium arvense*). Растения выращивались в контролируемых условиях: 14 ч/день при искусственном освещении и температуре 24°C и 10 ч/день в темноте и температуре 20°C.

Микроорганизмы. В исследованиях антимикробной активности выделенных соединений использовали штаммы грамотрицательной бактерии *Pseudomonas syringae*, (штамм из коллекции ВИЗР), и грамположительной *Paenibacillus polymyxa* (штамм из коллекции ВИЗР), а также дрожжеподобный организм *Candida tropicalis* (штамм из коллекции ВИЗР). Микроорганизмы культивировали на питательной среде КГА при температуре 30°C.

2.3. Методы исследований

2.3.1. Молекулярная идентификация гриба

Для молекулярной идентификации анализировали нуклеотидные последовательности полученные по локусам β -тубулина (TUB1, TUB2), большой субъединицы рРНК 28S (LR5, LROR) и фактора элонгации трансляции TEF (EF1-728f, EF1-986R). Для выделения ДНК использовали мицелий двухнедельных колоний гриба на жидкой среде картофельно-глюкозного бульона. Экстракцию ДНК проводили смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) по стандартной методике (Sambrook, 1989). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Каждая реакционная смесь (25 мкл) содержала 0.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Хеликон, Россия), буфер для Taq полимеразы (Хеликон, Россия), по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), по 0.5 мкМ прямого и обратного праймера. ПЦР проводили в режиме Touch 54.1. Программа амплификации содержала следующие этапы: преденатурация — 94 °С,- 2 мин 30 с; затем 30 циклов: денатурация —92 °С,50 с, отжиг—

57°C, 40 с, элонгация — 72 °C, - 30 с; финальная элонгация — 72 °C, - 3 мин. Далее продукты ПЦР были разделены при помощи электрофореза в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием в 0.5% трисборатном буфере. Выделение ампликонов из геля и их очистку проводили посредством адсорбции на частицах оксида кремния Silica (Хеликон, Россия) в присутствии хаотропного агента (5М гуанидин тиоционат) и последующей элюацией в воде (Malferrari et al., 2002). Определение нуклеотидных последовательностей было осуществлено на секвенаторе ABI Prism 3500 (Hitachi, Япония). Для редактирования и первичного анализа данных использовали приложение BioEdit (Hall, 1999). Длина анализируемых фрагментов составила: для 28S рРНК – 854, ITS – 575, Tef – 459 пар нуклеотидов. Для нахождения сходных нуклеотидных последовательностей и определения степени их идентичности использовали программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетического дерева проводили на базе частичных последовательностей участка LSU. Для построения филогенетических деревьев были использованы нуклеотидные последовательности из материалов статей с описаниями и данные NCBI. Выбор модели для филогенетического анализа осуществляли в приложении jModelTest 0.1 (Posada, 2008). На основе Байесовского информационного критерия была выбрана модель GTR+I+G с коэффициентами 2128.84246, 70, 4728.605141, 20.291870, 3.34×10^{-5} , 0.999923. Дальнейший филогенетический анализ проводили в приложении MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003).

2.4. Выделение биологически активных метаболитов

2.4.1. Получение экстрактов из жидкофазной культуры гриба

Питательные среды доводили до pH 6, с помощью 1 М раствора NaOH, разливали по 100 мл в колбы объёмом 500 мл, стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C в течение 30 мин. Охлаждённые до комнатной температуры питательные среды засеивали двумя блоками, вырезанными из двухнедельной колонии гриба на КГА.

Таблица 1 – Составы жидких питательных сред, использованных в работе.

Название среды	Состав питательной среды (на 1 литр)	
	Компонент	Масса, г
КГА	Картофель	200
	Глюкоза	20
	Вода дистиллированная	До 1 л.
M1D	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,45
	KNO_3	0,15
	KCl	0,15
	NaH_2PO_4	0,03
	Сахароза	45
	Виннокислый аммоний	7,5
	$\text{FeCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,003
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,0375
	H_3BO_3	0,003
	KI	0,015
	MnSO_4	0,75
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,25
ЧАВ	Глюкоза	20
	NaNO_3	2
	KH_2PO_4	1
	MgSO_4	0,5
	KCl	0,5
	Тиамин	0,1
	Биотин	0,005
ДМГ	Дрожжевой экстракт	4
	Мальтозный экстракт	10
	Глюкоза	10
	Вода дистиллированная	До 1 л.

Из чашек Петри с двухнедельной культурой гриба вырезали по два кружочка (5×5 мм) после чего их помещали в колбу со стерильной средой. Засев производили в четырех повторностях для каждого вида жидкой среды. Гриб культивировали при температуре 24°С и

переменном освещении в течение 14 дней. По окончании культивирования культуральный фильтрат отделяли от мицелия фильтрованием. Мицелий высушивали на взвешенных бумажных фильтрах под током стерильного воздуха, после чего взвешивали.

Экстракцию метаболитов из культурального фильтрата проводили этилацетатом в соотношении 1:1 по объёму, повторяя процедуру 2 раза. Затем органическую фазу пропускали через осушитель (Na_2SO_4) для предотвращения попадания водной фазы в экстракт, после чего растворитель упаривали с помощью роторного испарителя.

Высушенный и измельченный мицелий помещали в колбу, добавляли 50 мл ацетона и выдерживали в ультразвуковой ванне в течение 15 минут. После чего полученный раствор пропускали через бумажный фильтр. Экстракцию повторяли. Далее отгоняли растворитель на ротационном испарителе.

2.4.2. Получение экстрактов из твердофазной культуры гриба

Сухой измельченный твердофазный субстрат, колонизированный мицелием гриба, экстрагировали 50%-ным водным ацетоном (50 мл \times 2). После упаривания ацетона водную вытяжку экстрагировали этилацетатом (на 100 мл водной фазы 75 мл этилацетата, экстракцию повторяли дважды). Экстракт обезвоживали фильтрованием через безводный сернокислый натрий, после чего растворитель упаривали.

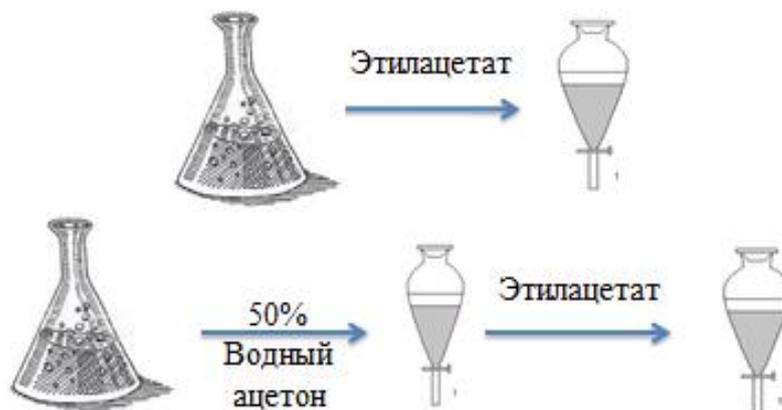


Рисунок 5. Схема экстракции.

2.5. Оценка биологической активности

2.5.1. Фитотоксическая активность

Экстракты оценивали в концентрации 5 мг/мл. Перед проведением биотестов экстракты растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл. Отбирали по 50 мкл в пробирки «Эппендорф» и испаряли растворитель. Добавляли 10 мкл этанола, после полного растворения экстракта в этаноле – 190 мкл дистиллированной воды.

Для опыта использовали листовые диски бодяка полевого ($d=1$ см). Пырей нарезали в виде отрезков длиной около 2 см. Испытуемые растения надкалывали в центре препаровальной иглой.

Подготовленные листовые сегменты помещали в пластиковую камеру на увлажненную водой трёхслойную фильтровальную бумагу. На каждый отрезок наносили по 10 мкл полученного раствора. Контролем служил экстракт из неинокулированного питательного субстрата. Далее пластиковую камеру ставили в инкубатор на двое суток при режиме день – ночь 12/12 ($T_{\text{день}}=24^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{ночь}}=21^{\circ}\text{C}$). Наличие фитотоксических метаболитов определяли по появлению и характеру некрозов и хлорозов растений по сравнению с контролем

2.5.2. Антимикробная активность

Среду КГА (с содержанием агара 1,5%) разогревали в микроволновой печи до жидкого состояния. В стерильном ламинар-боксе, рядом с включенной газовой горелкой, разливали среду в одноразовые чашки Петри.

Далее разогревали среду КГА (с содержанием агара 0,6%), разливали в три конические колбы и остужали. Затем готовили суспензию микроорганизмов *Pseudomonas syringae*, *Paenibacillus polymyxa* и *Candida tropicalis* и засеивали культуры в чашки Петри «газоном».

Экстракты растворяли в ацетоне в концентрации 10 мг/мл, наносили 500 мкг на стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм и помещали в чашки Петри.

Чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C в течение суток. В результате вокруг дисков должны проявиться зоны отсутствия роста бактерий (зоны лизиса), что указывает на то, что экстракт проявляет антимикробные свойства.

2.6. Анализ хроматографических профилей экстрактов

2.6.1. Тонкослойная хроматография

Хроматографические профили экстрактов, полученных из культуры *Pestalotiopsis* sp. на четырех жидких и трех твердых питательных субстратах сравнивали при помощи тонкослойной хроматографии. Для анализа использовали пластины для нормально-фазовой (TLC Silica gel 60 F254, Merck, Германия) тонкослойной хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей толуол-этилацетат-уксусная кислота в соотношении – 35:15:0,5 . Экстракты разводили до концентрации 10 мг/мл, после чего наносили на пластину 10 мкл каждого раствора. Хроматограммы проявляли при длине волны 254 нм и 365 нм.

2.6.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Анализ образцов экстрактов из культуры гриба *Pestalotiopsis* sp. проводили на приборе UPLC Acquity H-Class (Waters) с диодно-матричным детектором. Анализ проводили на колонке Acquity UPLC BEH RP18 (2.1×50) мм с зернением 1.7 мкм (Waters). Температура колонки составила 30°C. Разделение проводили в градиентном режиме в системе ацетонитрил – 0,1% муравьиная кислота в соотношении 10:90 (по объёму) с 1 по 5 минуту; 100:0 с 5 по 7 минуту; 100:0 с 7 по 8 минуту и 10:90 с 8 по 11 минуту. Скорость потока элюента составила 250 мкл/мин. Детектирование осуществляли в диапазоне длины волны 200-600 нм. Объём вводимой пробы составил 1 мкл. Для сравнения метаболитных профилей экстрактов на полученных хроматограммах анализировали время удерживания и ультрафиолетовые спектры метаболитов, полученные с помощью диодно-матричного детектора.

2.7. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в четырёхкратной повторности. Для определения достоверности различий между средними значениями использовали критерий наименьшей существенной разности (НСР) при уровне значимости 0.05. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel и Statistica 8.0. Средние значения данных приводятся в следующем виде: $X \pm \sigma$, где X -среднее арифметическое, а σ -

стандартное отклонение. Кластерный анализ метаболитов проводили в программе Statistica 8.0.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Идентификация гриба

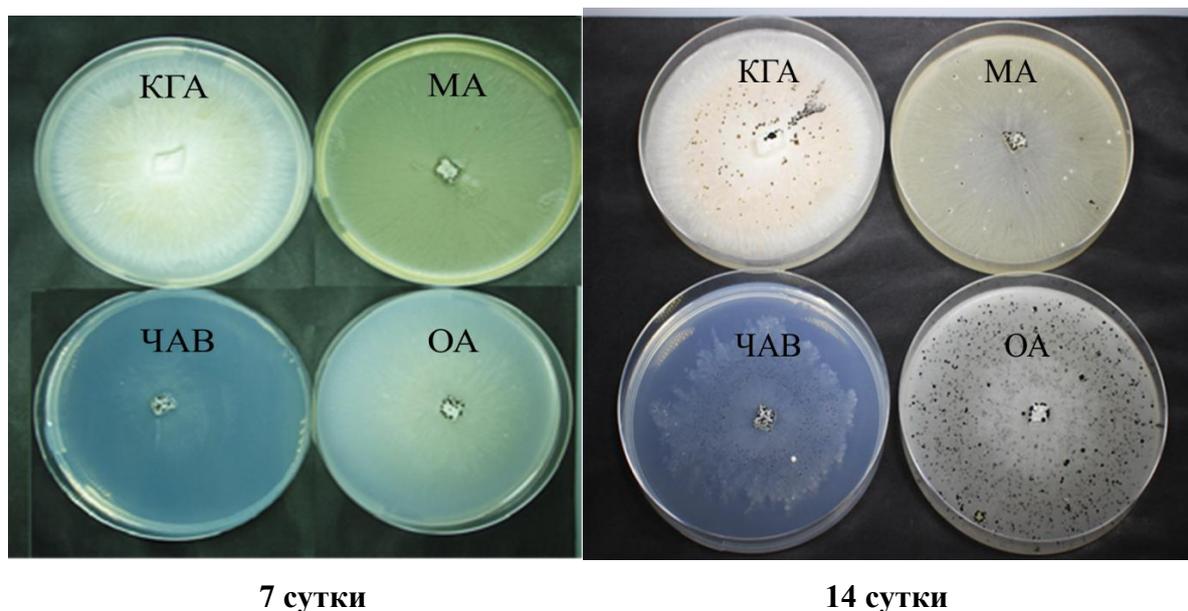
3.1.1. Морфолого-культуральные характеристики изучаемого объекта

Изучаемый гриб характеризовался быстрым ростом на использованных синтетических и полусинтетических агаризованных питательных средах (таблица 2). Диаметр двухнедельных колоний гриба на средах картофельно-глюкозном, мальтозном и овсяном агаре составил 85 мм. В то же время, на среде Чапека с витаминами рост гриба был более чем на 40% медленнее, так диаметр двухнедельной колонии гриба на этой среде составил около 50 мм (таблица 2).

Таблица 2 – Диаметр колонии *Pestalotiopsis* sp. на различных агаризованных средах

Название среды	Диаметр колонии на 7 сутки, мм	Диаметр колонии на 14 сутки, мм
КГА	85	85
МА	85	85
ЧАВ	40±5*	50±5*
ОА	85	85

* данные представлены со стандартным отклонением



7 сутки

14 сутки

Рисунок 6. *Petalotiopsis* sp. на агаризованных среда на 7 и 14-е сутки.

Реизоляцию гриба проводили на различных агаризованных средах для оценки характера и скорости роста. Для этого использовали картофельно-глюкозный агар (КГА), овсяный агар (ОА), мальтозный агар (МА) и агаризованную среду Чапека с витаминами (ЧАВ).

В течение первой недели гриб наращивает массу мицелия, заполняя всю поверхность чашки, за исключением среды ЧАВ, на которой рост гриба был крайне угнетенным, мицелий тонким, паутинистым. На второй неделе созревают конидиомы. На среде КГА отмечается образование розово-персикового пигмента, обилие конидиом, более густо расположенных к месту посева. На среде ЧАВ конидиомы образуются мелкие, непогруженные. На овсяном агаре наблюдается мицелий, который занимает всю поверхность чашки Петри, при этом наблюдаются конидиомы как на поверхности, так и погруженные в субстрат. На мальтозном агаре мицелий также занимает всю поверхность чашки, конидиомы хаотично созревают на поверхности.

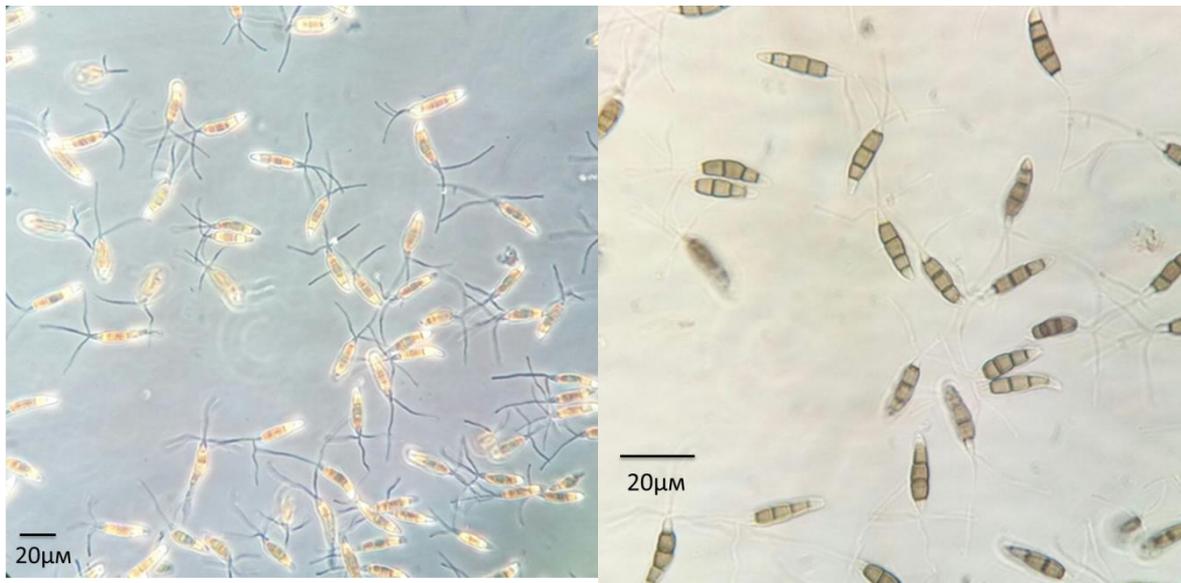
Размер зрелых конидий на культуре КГА составил $18-26 \times 5-8 \mu\text{m}$. Конидии темноокрашенные, пятичленные, концевые клетки полупрозрачные. На одном конце конидии образуются три трубчатых отростка (рисунок 9.1-9.2).



Рисунок 7. Зрелые конидиомы на картофельно-глюкозном агаре (14 сутки культивирования).



Рисунок 8. Лист *Camellia sinensis*, пораженный *Pestalotiopsis* sp.



1

2

Рисунок 9. Конидии *Pestalotiopsis* sp. при увеличении 1 - (40×20), 2 - (63×20).

3.1.2. Молекулярно-генетические данные

Для составления филогенетического дерева использовали молекулярно-филогенетический анализ методом максимального правдоподобия.

Данный метод основан на модели Тамура-Ней. Отображается дерево с наивысшим логарифмическим правдоподобием (-1234,54). Процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны группируются вместе, отображается рядом с ветвями. Исходное дерево для эвристического поиска было получено автоматически, применяя алгоритмы Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененной с использованием метода максимального композитного правдоподобия (MCL), а затем выбирая топологию с более высоким значением вероятности логарифма. Дерево рисуется в масштабе, длина ветвей которого измеряется числом замен на сайт. Анализ включал 51 нуклеотидную последовательность. В числе кодонов были 1 + 2 + 3 + Некодирование. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены. Всего в итоговом наборе данных было 843 позиции. Эволюционные анализы были проведены в MEGA7.

По предварительной оценке по локусу большой субъединицы РНК(LSU) наиболее близким видом является *P. camelliale*. Интересно отметить, что этот вид был выделен в чистую культуру, также как и изучаемый нами объект, как патоген чая. Охарактеризован по молекулярным маркерам этот вид был Ченом (Yingjuan Chen 2017) в 2017 году. Данные о вторичных метаболитах *P. camelliale* отсутствуют.

При получении результатов сиквенсов по гену фактора элонгации трансляции и гену бета-тубулина будет построено мультилокусное филогенетическое древо, что возможно даст более полную информацию. В дальнейшем, точная идентификация в купе с анализом метаболитного профиля позволяет выявлять новые хемотаксономические маркеры родов и видов, а также дает дополнительные возможности целенаправленного поиска метаболитов определенной структуры у представителей близкородственных видов.

3.2. Жидкофазное культивирование

По окончании культивирования уровень рН культурального фильтрата гриба на различных питательных средах был слабощелочным и составил от 5 до 6.5 (Таблица 3).

Наибольший выход биомассы *Pestalotiposis* sp., который составил около 18 г/л, наблюдали при культивировании гриба на среде M1D. При культивировании гриба на среде ЧАВ был минимальный выход биомассы около 5 г/л. Интересно отметить, что выход биомассы на средах КГА и ДМГ составил 6-8 г/л, что более чем в два раза меньше, чем выход биомассы на синтетической среде M1D.

Таблица 3 – Уровень рН и выход биомассы *Pestalotiposis* sp. на разных агаризованных средах

Среда	Выход биомассы, г/л*	рН*
КГА	6,85±0,56	6,5±0,2
M1D	18,36±3,72	5,0±0,3
ДМГ	8,77±0,79	5,5±0,4
ЧАВ	4,79±0,23	5,7±0,3

* данные представлены со стандартным отклонением

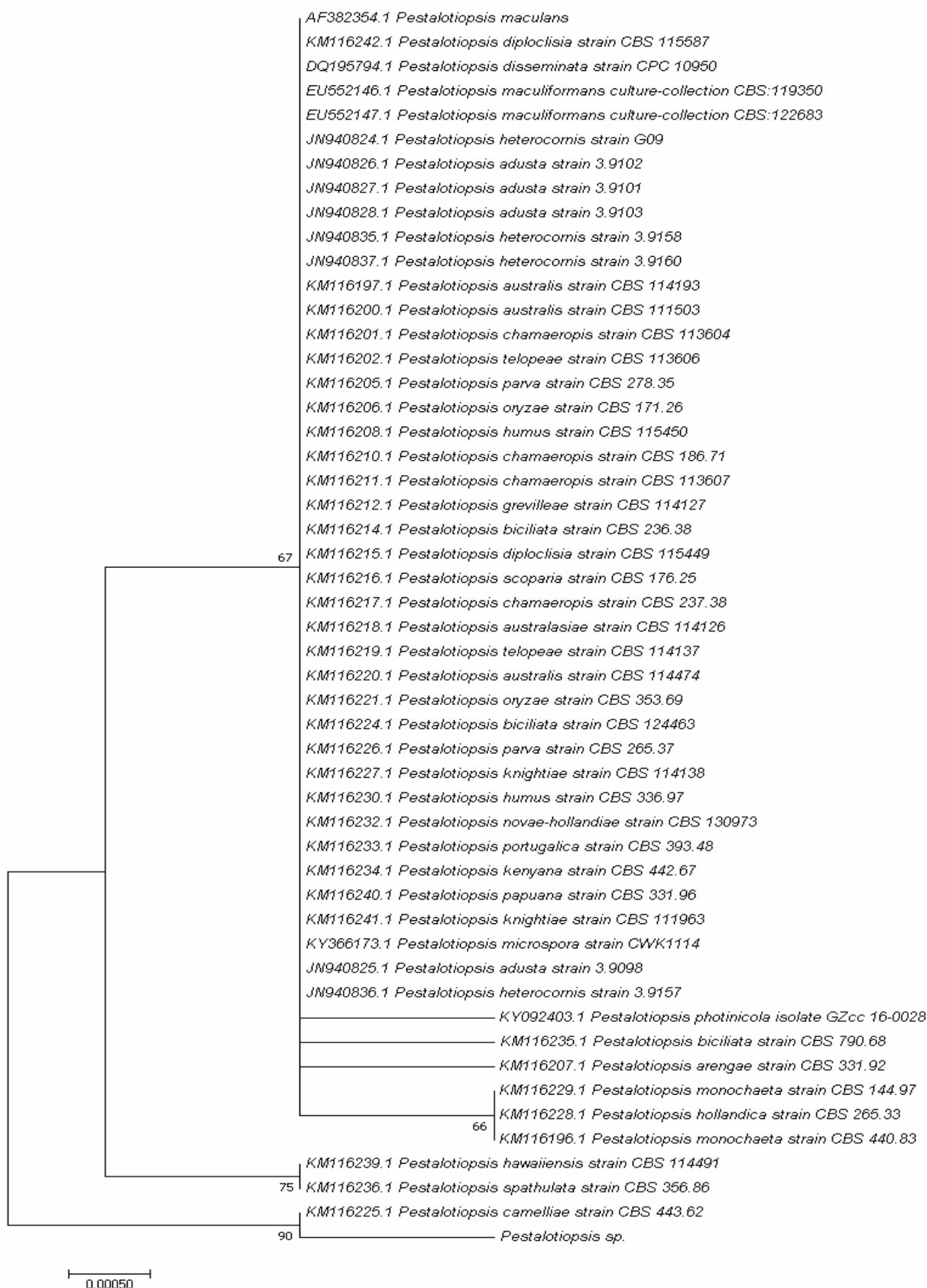


Рисунок 10. Филогенетическое дерево для *Pestalotiopsis* sp. Филограмма построена по локусу гена большой субъединицы РНК (LSU) методом максимального правдоподобия с бутстрап поддержкой. Длина полученного фрагмента по которому строилось дерево 835нп.



Рисунок 11. Культура *Pestalotiopsis sp.* на жидких питательных средах.

Наиболее активно гриб развивается на среде M1D, причем рост мицелия отмечен не только на поверхности, но и был погружен в субстрат, на средах КГА и ДМГ основная масса мицелия образовалась на поверхности жидкой среды, а на среде ЧАВ рост был наименее активным (рисунок 11). Использование синтетической среды ЧАВ неблагоприятно сказывается на развитии биомассы гриба.

Максимальный выход экстрактивных веществ был отмечен для культурального фильтрата гриба на среде ДМГ и составил около 45 мг/л, для культурального фильтрата *Pestalotiopsis sp.* на средах КГА и M1D его значение было ниже и составило 30 и 20 мг/л, соответственно; минимальный выход экстрактивных веществ был выявлен для культурального фильтрата на среде ЧАВ – 15 мг/л.

Интересно отметить, что выход экстрактов из мицелия гриба на среде M1D был сравним с его значением для культурального фильтрата и составил около 20 мг/л, в то время как для остальных 3-х жидких сред выход экстрактов из мицелия был достаточно низким, около 1-5 мг/л (рисунок 12).

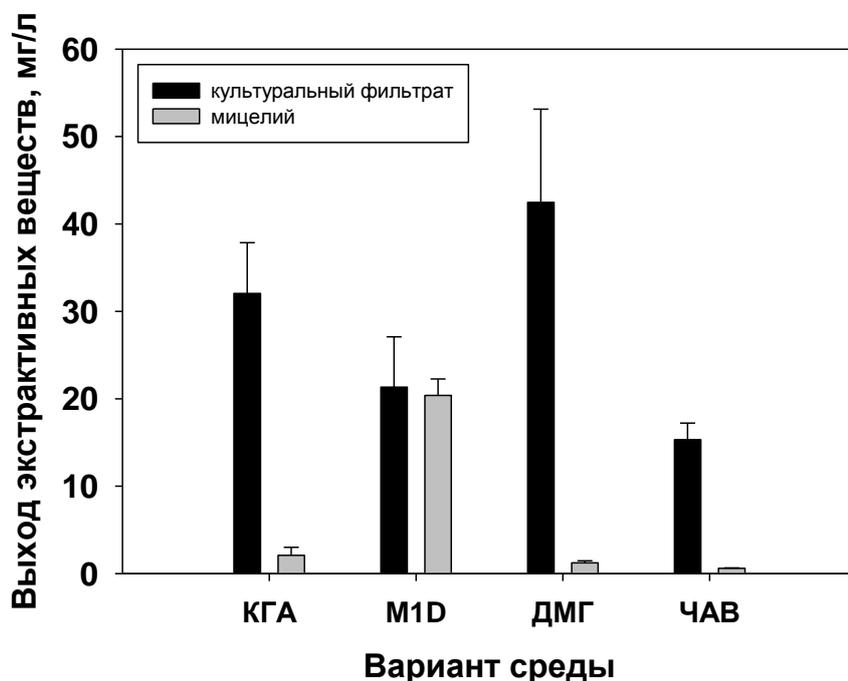


Рисунок 12. Выход экстрактивных веществ из культуры *Pestalotiopsis* sp. на различных средах.

3.3. Твердофазное культивирование

Уровень влажности на трёх зерновых субстратах составил около 40% и существенно не различался на разных субстратах (Таблица 4).

Стоит отметить, что уровень влажности на всех субстратах примерно одинаковый, но выход экстрактов на пшённой крупе был максимальным и составил около 6 г/кг, что почти в два раза превышает выход экстрактов на рисовой и пшеничной крупе.

Таблица 4 – Выход экстрактов из твердофазной культуры *Pestalotiopsis sp.*

Вид субстрата	Влажность %*	Выход экстракта г/кг*
Рисовая крупа	39,49±0,87	3.024±0.79
Пшеничная крупа	41,93±1,49	5.9875±1.43
Перловая крупа	41,74±2,15	3.796±1.28

* данные представлены со стандартным отклонением

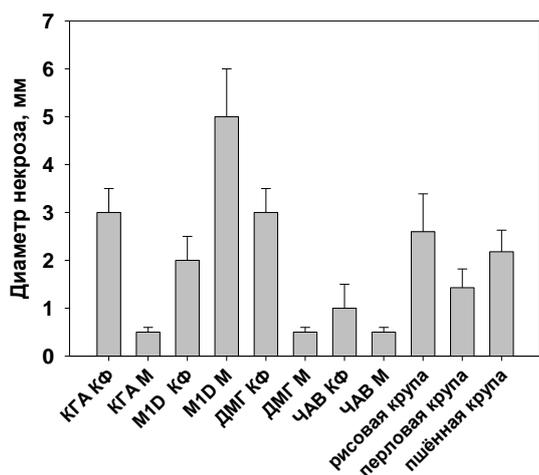
3.4. Оценка биологической активности экстрактов

3.4.1. Фитотоксическая активность

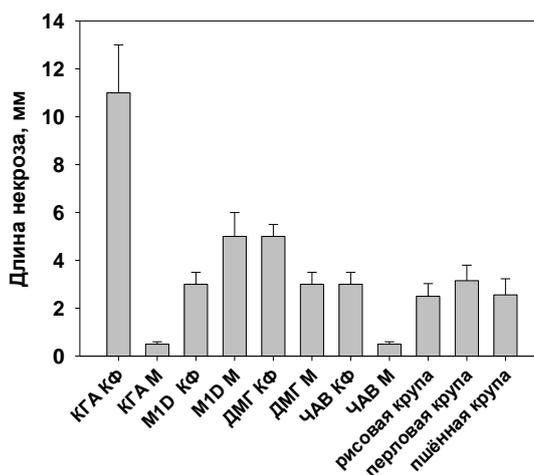
Было обнаружено, что экстракты из жидкой культуры *Pestalotiopsis sp.* обладают неспецифической фитотоксической активностью. Наибольшую фитотоксическую активность как на бодяке полевом, так и на пырее ползучем проявили экстракты, полученные при культивировании гриба на средах КГА, ДМГ и М1D (рисунок 13). Лучше всего активность проявилась у экстрактов культурального фильтрата гриба на среде КГА, длина некроза на пырее ползучем составила в среднем 11мм (рисунок 13). В отношении бодяка полевого наиболее активным был экстракт мицелия гриба на среде М1D, диаметр некроза составил 5мм (рисунок 4.2), стоит отметить, что это - единственный экстракт из мицелия, который обладал выраженной фитотоксической активностью.

В целом, экстракты с твердофазной культуры гриба были менее активны, за исключением довольно активного экстракта с рисовой крупы, для которого диаметр некроза был в среднем 3мм (рисунок 13), в отношении бодяка полевого. Для экстрактов твердофазной культуры гриба на других твердых субстратах диаметр некроза был в среднем в два раза меньше (рисунок 13).

Фитотоксическая активность экстрактов из культуры гриба как для твердых, так и для жидких субстратов в отношении пырея ползучего варьировалась от 3 до 5 мм. Самая низкая активность была отмечена у экстракта из мицелия на картофельно-глюкозном бульоне и среде ЧАВ. Самую высокую активность проявил экстракт из культурального фильтрата на картофельно-глюкозном бульоне и составил в среднем 11 мм, что в три раза превышало активность остальных экстрактов.

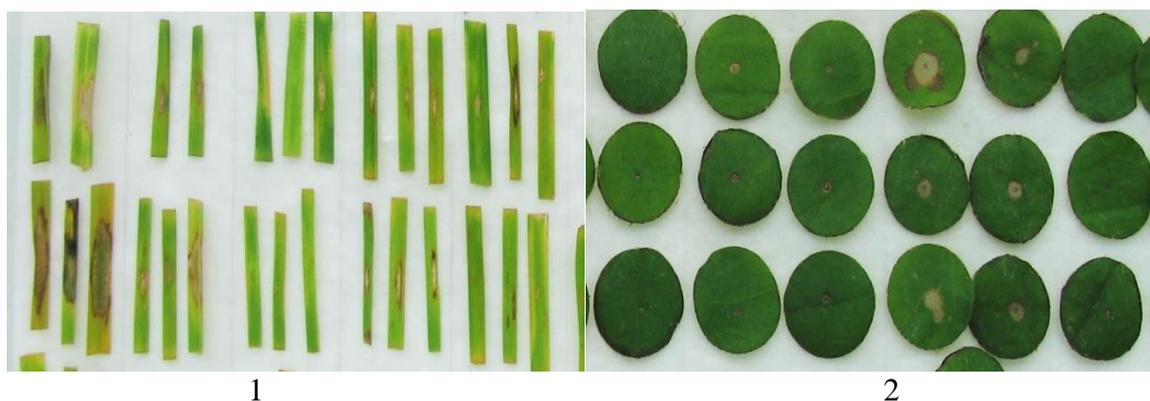


1



2

Рисунок 13. Фитотоксическая активность экстрактов из культуры *Pestalotiopsis* sp. на различных питательных субстратах. (1)- Бодяк полевой, (2)- Пырей ползучий.



1

2

Рисунок 14. Фитотоксическая активность экстрактов из культуры *Pestalotiopsis* sp. на 1-пырее ползучем (*Elymus repens*) и 2- бодяке полевом (*Cirsium arvense*).

3.4.2. Антибиотическая активность

Было отмечено, что экстракты из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. проявили антимикробную активность в отношении только одного из трёх тест-микробов, *Raenibacillus polytuxa*. Экстракты из культурального фильтрата гриба на картофельно-глюкозном бульоне, средах ДМГ и М1D обладали антимикробной активностью в отношении этого вида бактерий (таблица 5). В отношении *Candida tropicalis* и *Pseudomonas syringae* активность для всех экстрактов не наблюдалась. В то же время, важно отметить, что экстракт из мицелия гриба на среде М1D показал антимикробную активность, также в отношении

Paenibacillus polymyxa, при том, что экстракты из мицелия гриба на остальных средах были не активны.

Экстракты из твердофазной культуры гриба не проявили антимикробной активности в отношении всех тест-организмов.

Таблица 5 – Антимикробная активность экстрактов *Pestalotiopsis sp.* на жидких питательных субстратах в отношении *Paenibacillus polymyxa*

Среда	Участок лизиса в мм*
КГА	5 ± 1
ДМГ	4 ± 1
М1Д	2 ± 1
М1Д(м)	2 ± 1

* данные представлены со стандартным отклонением

3.5. Анализ метаболитных профилей экстрактов *Pestalotiopsis sp.*

3.5.1. Тонкослойная хроматография

Было выявлено, что многие метаболиты в составе комплекса экстрактов *Pestalotiopsis sp.* не детектируются при длине волны 254 нм, что говорит о том, что они содержат крайне мало ароматических соединений, веществ с карбонильными и похожими группами или изопреноидных групп (рисунок 16). При этом было отмечено наличие в экстрактах общих метаболитов средней полярности с $R_f = 0,53$ и $0,66$, а также неполярных метаболитов с $R_f = 0,88$ (рисунок 16).

Вещество с $R_f = 0,66$, было отмечено во всех экстрактах, кроме экстракта из культурального фильтрата на картофельно-глюкозном бульоне и очень слабо выражено в экстракте М1Д с мицелия. Общее неполярное вещество с $R_f = 0,88$ слабо детектировалось на всех экстрактах при проявлении на 365 нм (рисунок 15), а с $R_f = 0,88$ на 254 нм были отмечены общие вещества на экстрактах культурального фильтрата М1Д, ЧАВ, а также в экстрактах мицелия гриба на этих средах и на всех экстрактах с твердофазной культуры гриба.

Экстракты из культуры *Pestalotiopsis sp.* на твёрдых субстратах содержали несколько общих метаболитов. При этом, важно отметить, что экстракт из твердофазной культуры

гриба на рисовой крупе содержал неполяные метаболиты, которые светились красным цветом при проявлении под ультрафиолетовым светом с длиной волны 365 нм. Что предположительно может говорить о том, что данный экстракт содержит в своём составе алкалоиды.

Рисунок 15. Хроматограмма экстрактов *Pestalotiopsis sp.*, проявление при 365 нм.

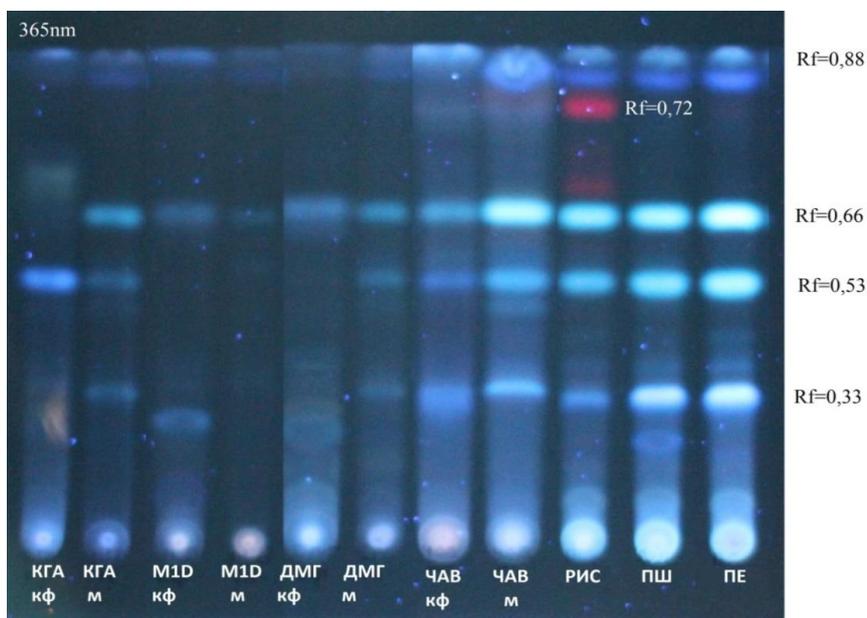
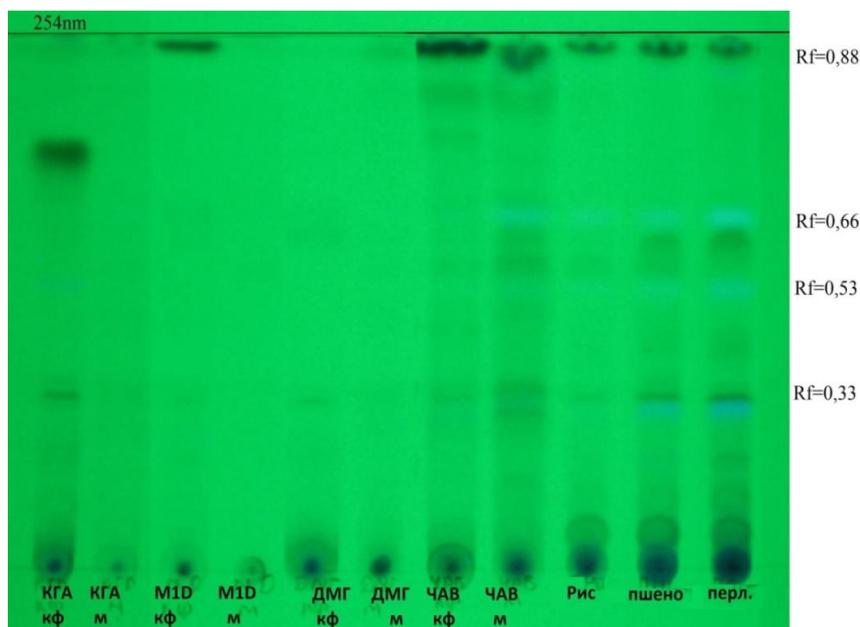


Рисунок 16. Хроматограмма экстрактов *Pestalotiopsis sp.*, проявление при 254 нм.



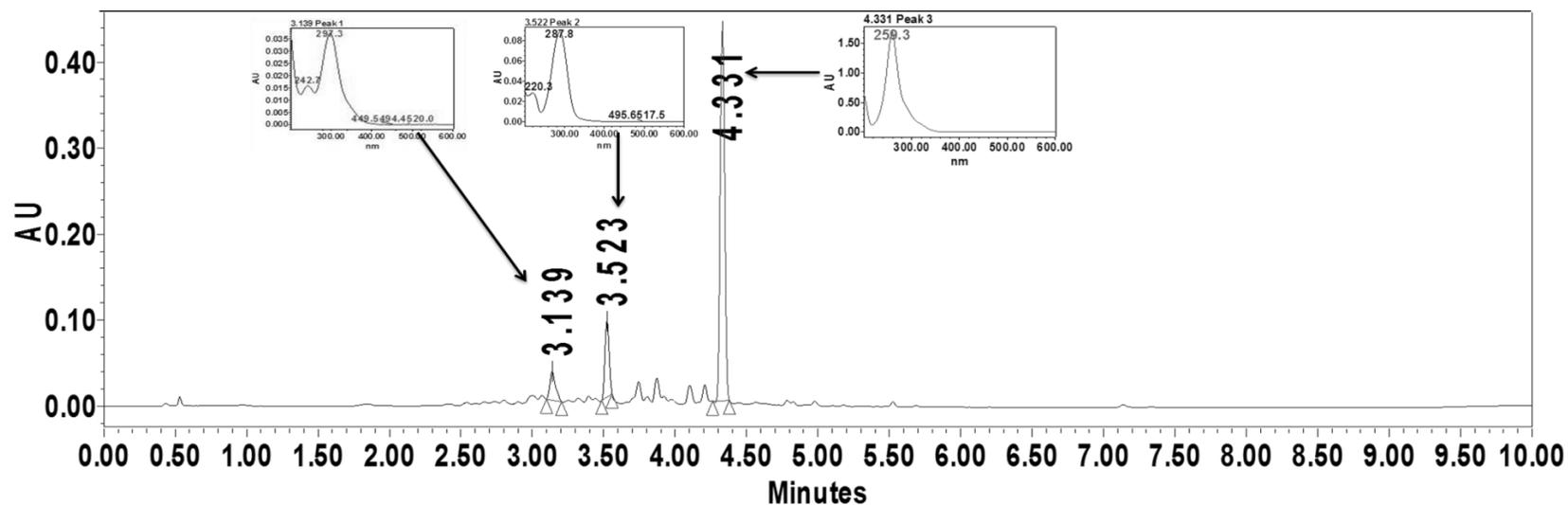
3.5.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Было выявлено методом ВЭЖХ, что метаболитные комплексы экстрактов из твердофазной культуры гриба содержат общие метаболиты и достаточно похожи между собой (рисунок 17), что также подтверждает данные тонкослойной хроматографии. Интересной особенностью является наличие среднеполярного метаболита с $R_t = 4.8$, содержание которого в твердофазной культуре *Pestalotiopsis* sp. на пшённой и перловой крупах было существенно выше, чем на рисовой. В то же время, все экстракты из твердофазной культуры гриба на рисе и пшённой крупе содержали метаболит с $R_t = 3.52$ (261.7 нм), а также неполярные метаболиты с $R_t = 6.8$ (240 нм) и 7.1 (286 нм), в то время как на перловой крупе содержание этих метаболитов было существенно ниже.

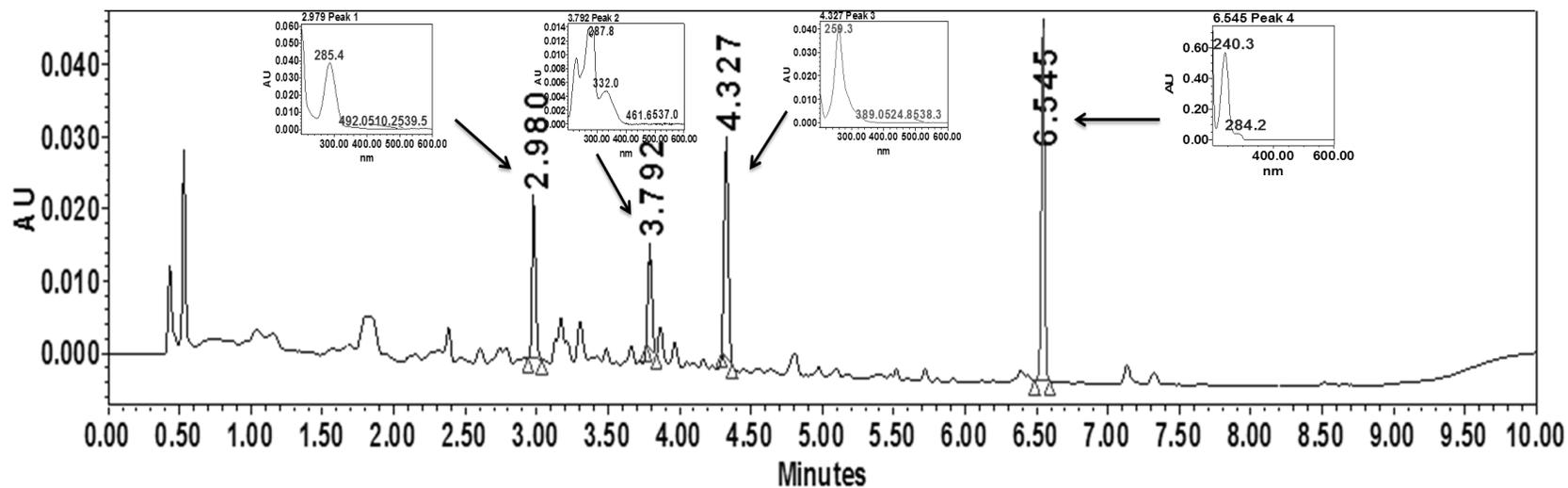
Экстракты из мицелия гриба на жидких средах отличались, подтверждением этому может служить тот факт, что экстракты из мицелия гриба на разных жидких средах не кластеризуются в одну группу. Так, экстракт из мицелия гриба на среде M1D, проявивший высокую активность в своём метаболитном профиле содержал некоторые неполярные метаболиты с $R_t = 7.15$ (282 нм) и 7.35, которые также были отмечены в экстрактах из мицелия гриба на средах ДМГ и ЧАВ в существенно более низком количестве. Вероятно, наличием этих метаболитов в большом количестве обусловлен фитотоксический эффект экстракта на растениях.

Сравнение метаболитного профиля экстрактов из культурального фильтрата гриба на жидких средах также показало значительные отличия между ними, на кладограмме они также не образовывали общий кластер. Наиболее существенно отличался от всех остальных экстрактов метаболитный профиль экстракта из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде M1D. В целом было показано, что наибольшее разнообразие метаболитов достигается при культивировании гриба на жидких питательных средах (рисунок 18).

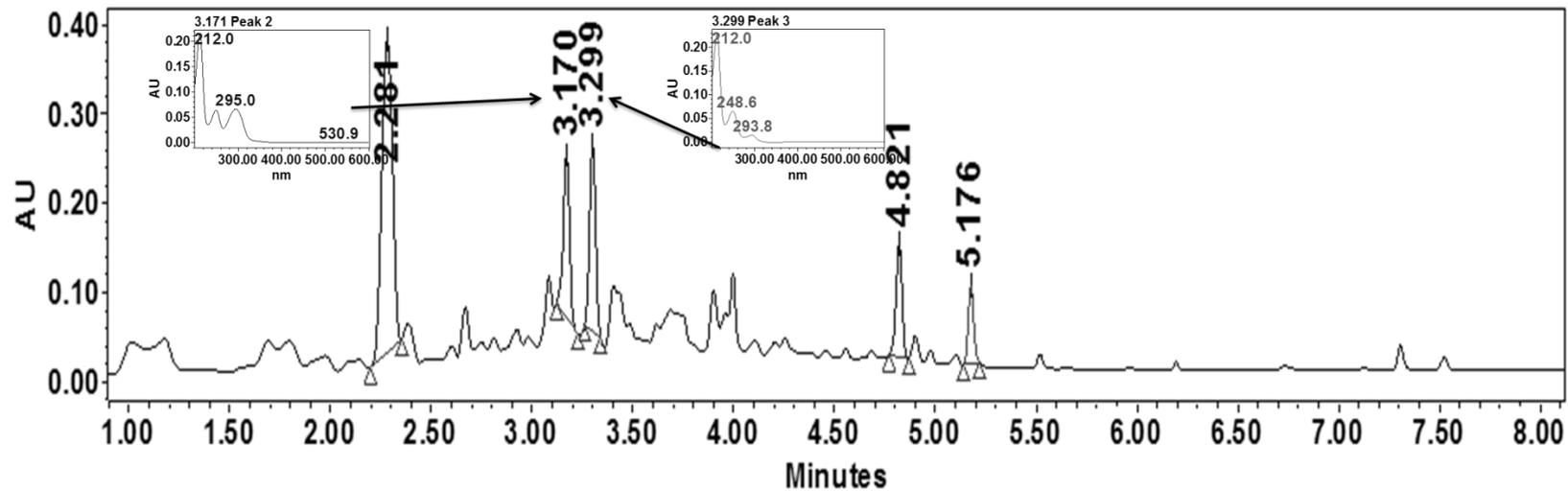
Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на картофельно-глюкозном бульоне.



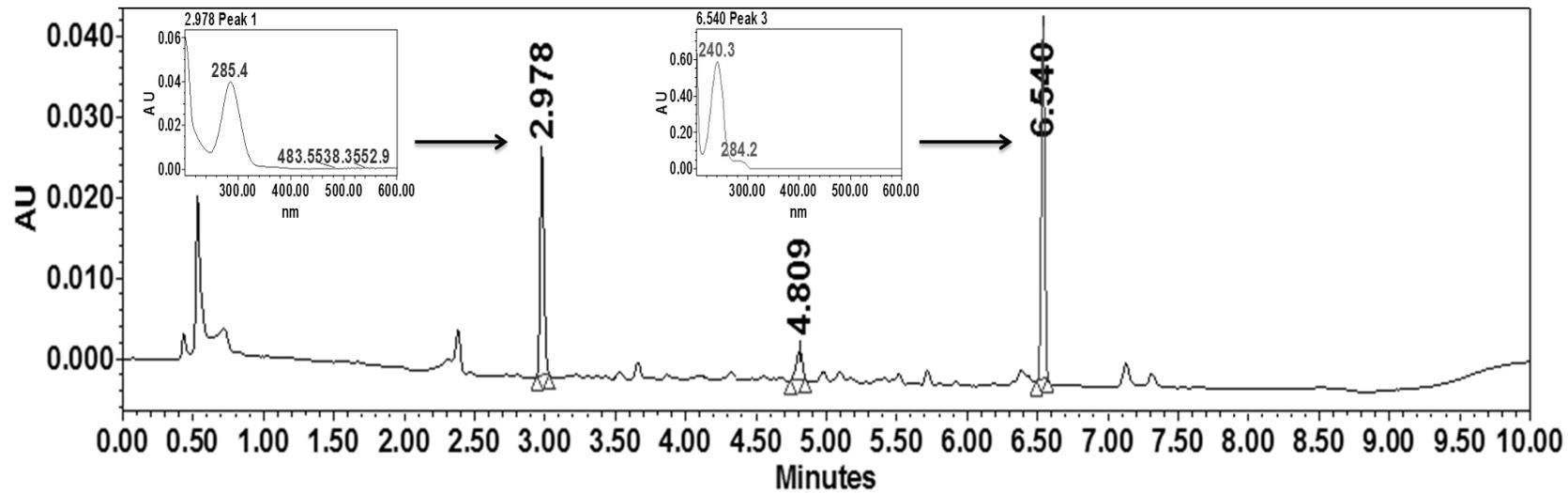
Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде M1D



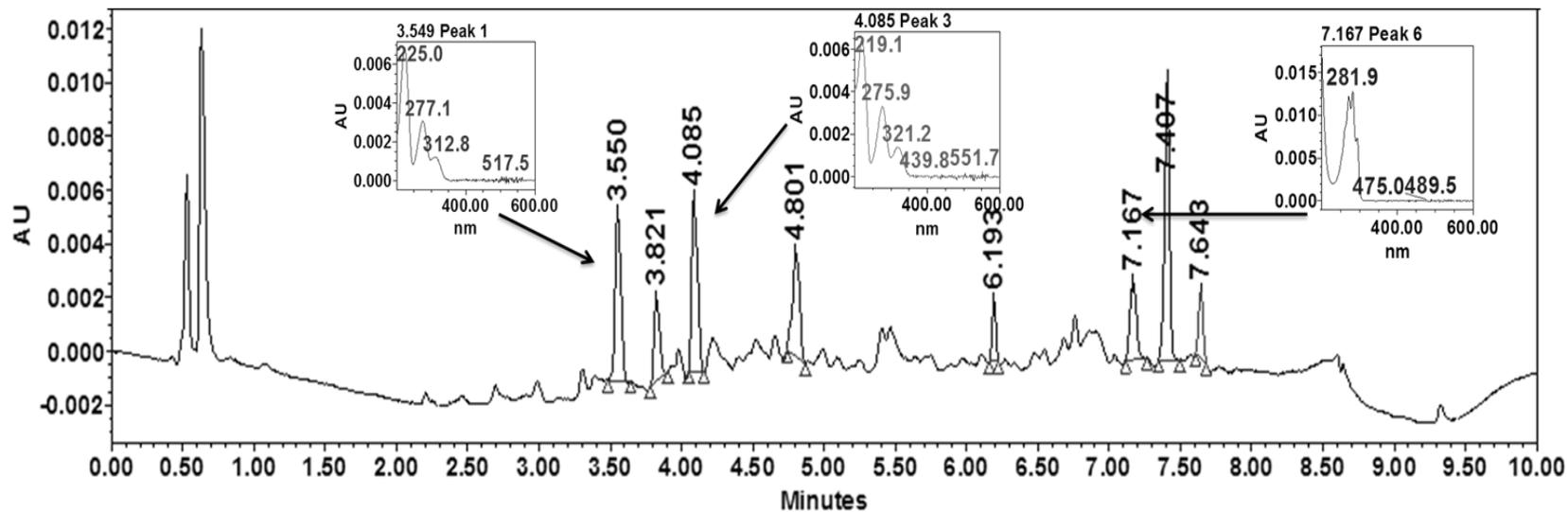
Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде ДМГ



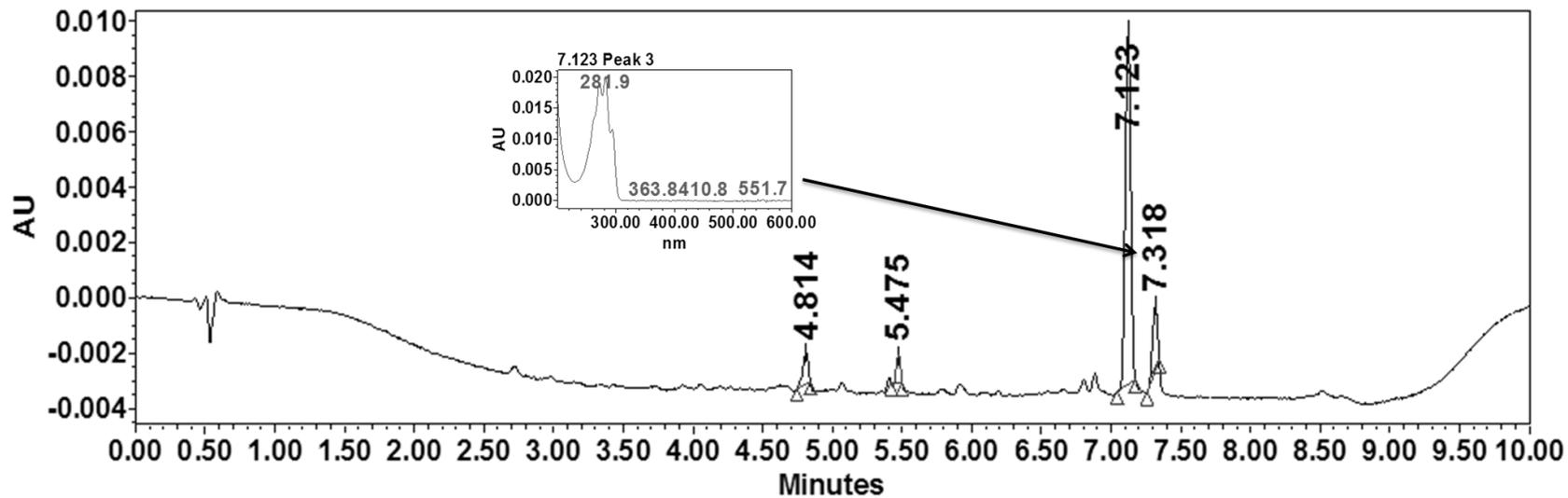
Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде ЧАВ



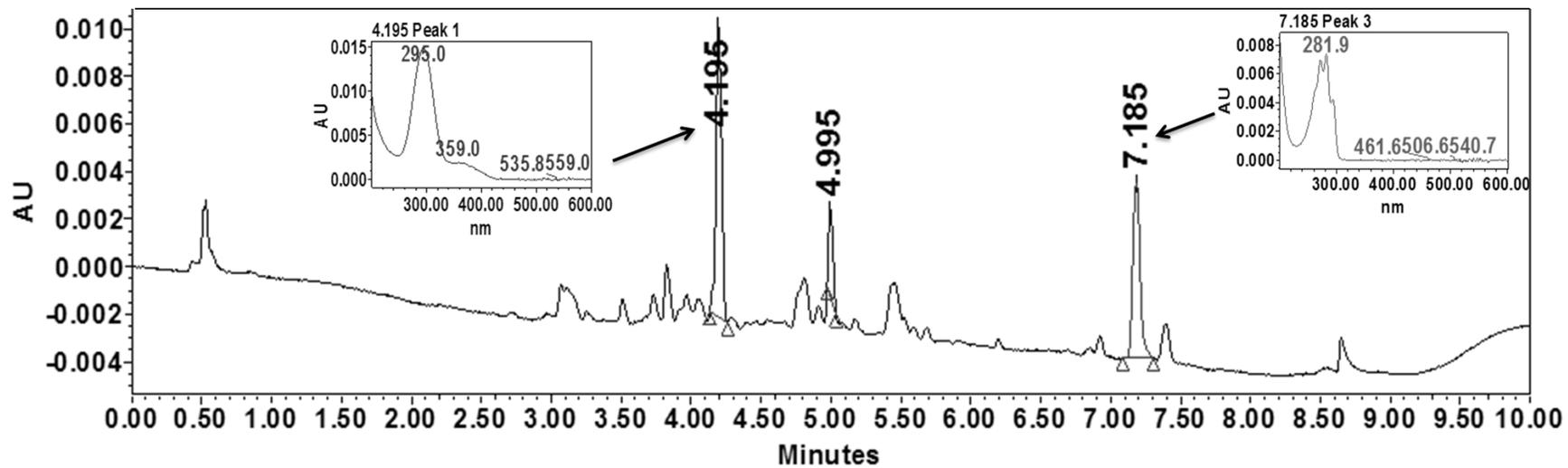
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на картофельно-глюкозном бульоне



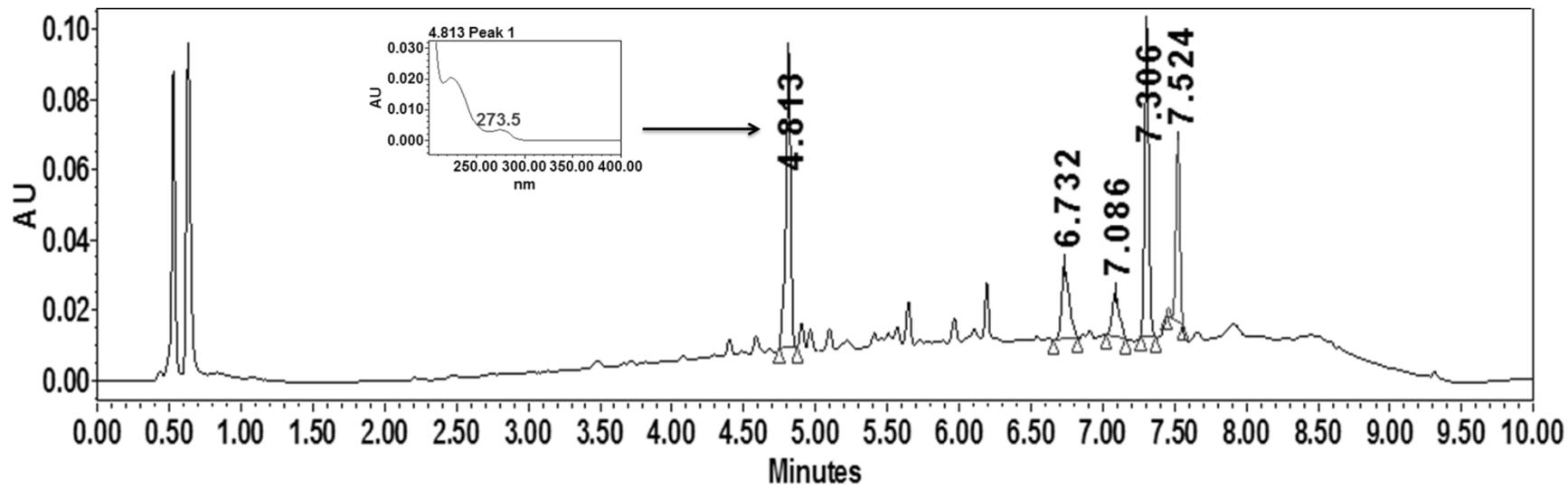
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде M1D



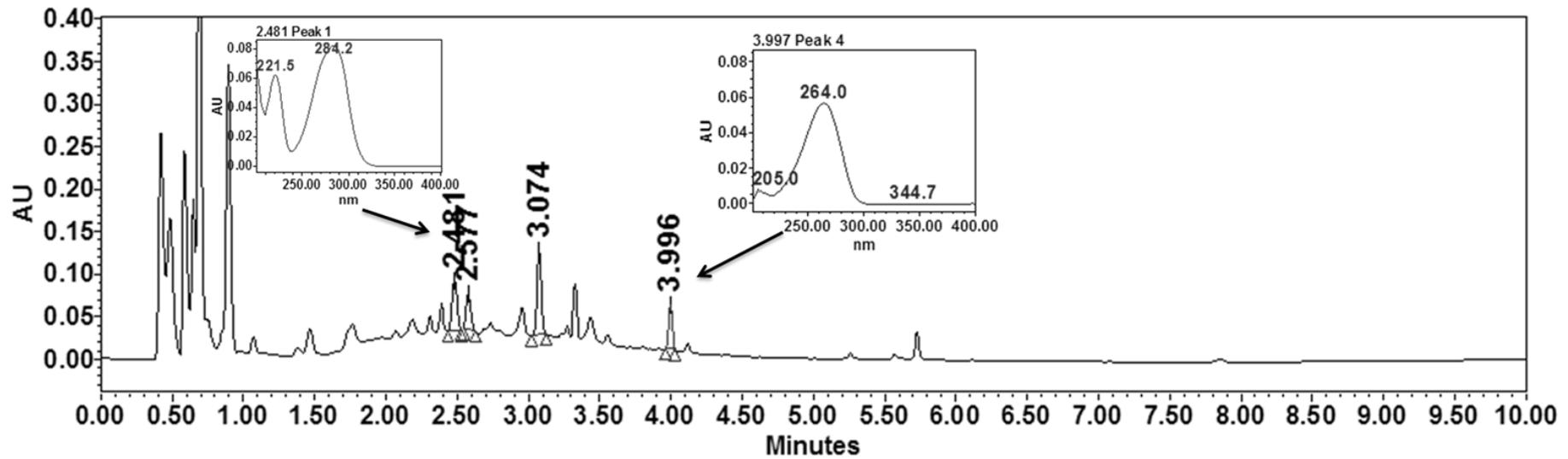
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде ДМГ



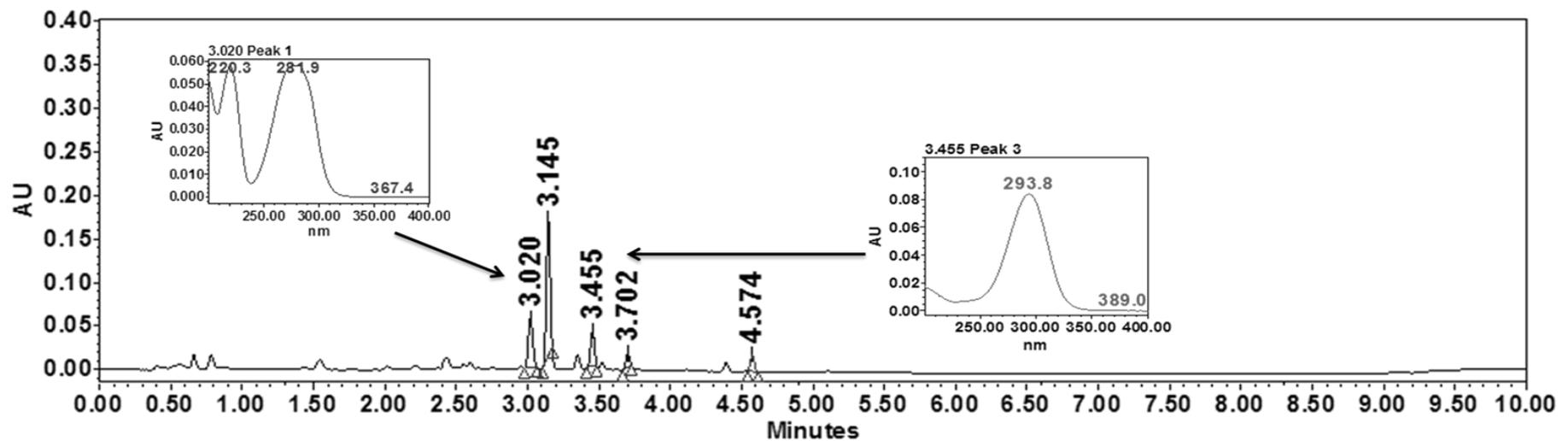
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде ЧАВ



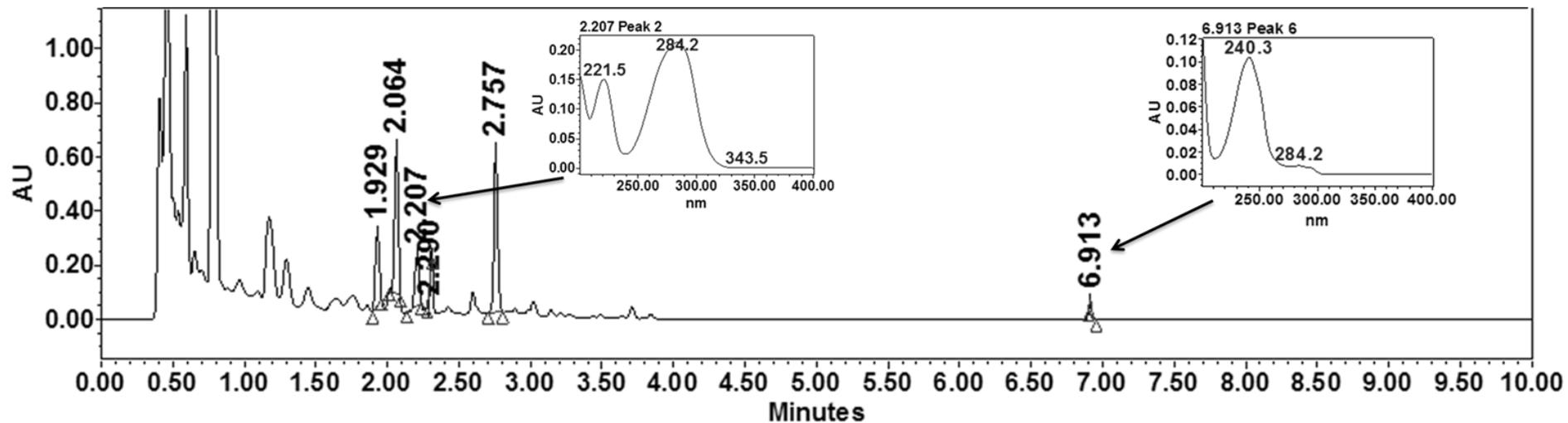
Экстракт из неинокулированного картофельно-глюкозного бульона (контроль)



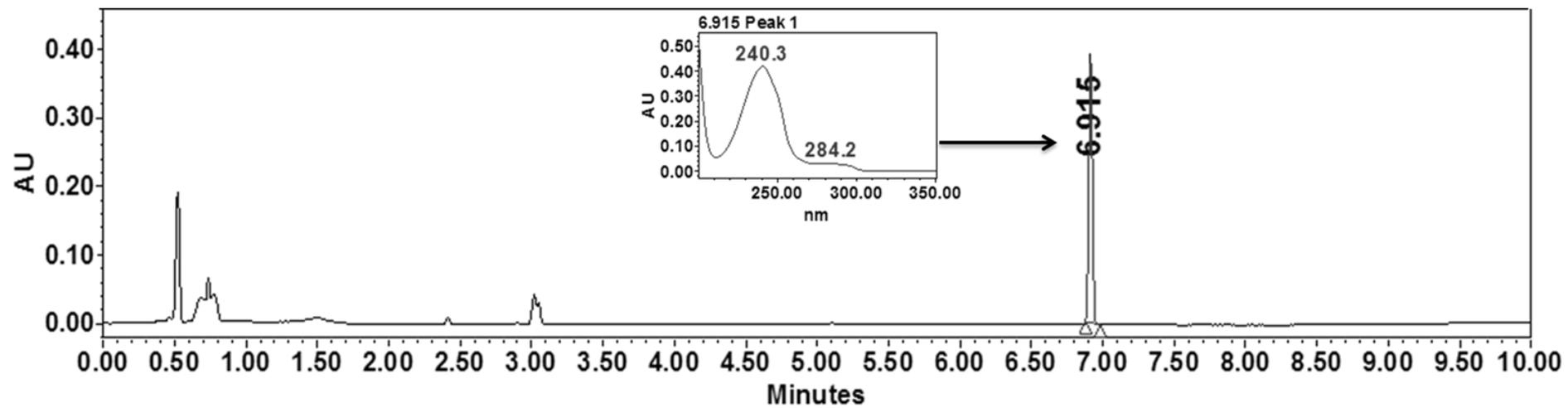
Экстракт из неинкулированной среды M1D (контроль)



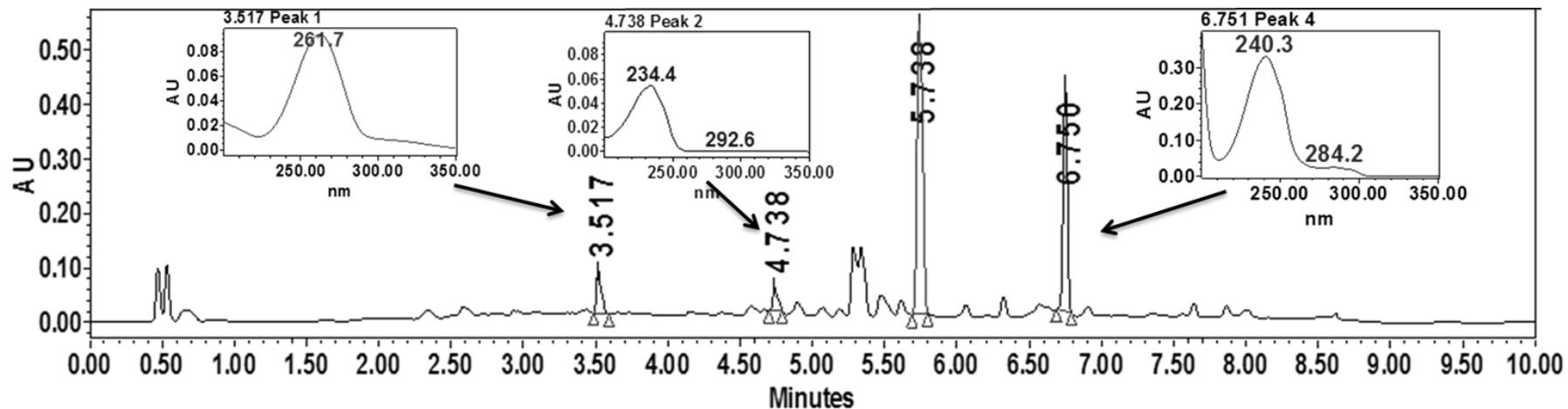
Экстракт из неинкулированной среды ДМГ (контроль)



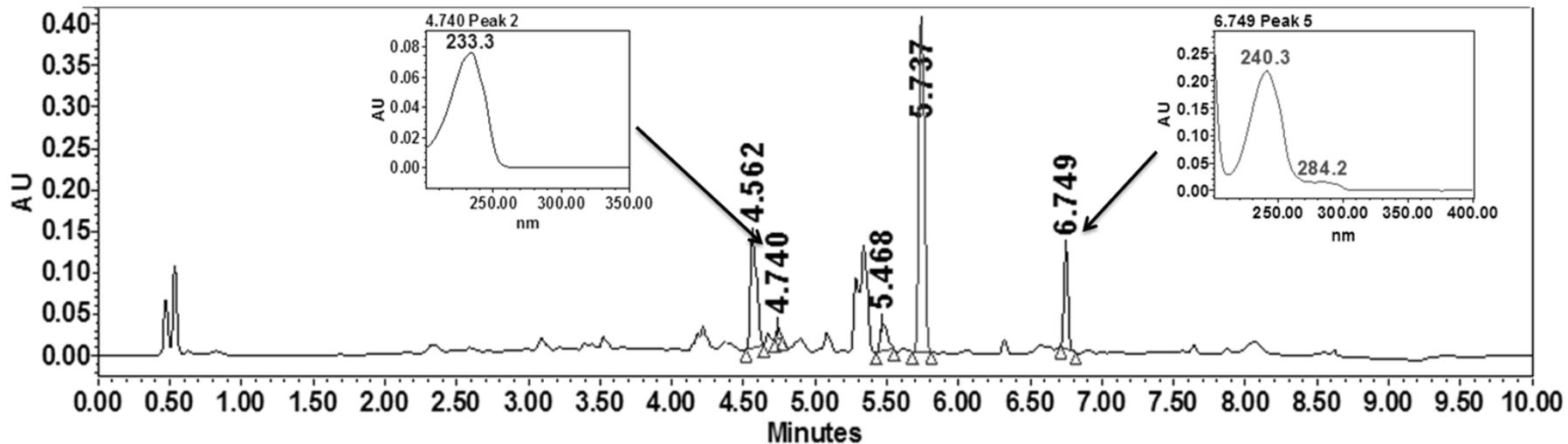
Экстракт из неинокулированной среды ЧАВ (контроль)



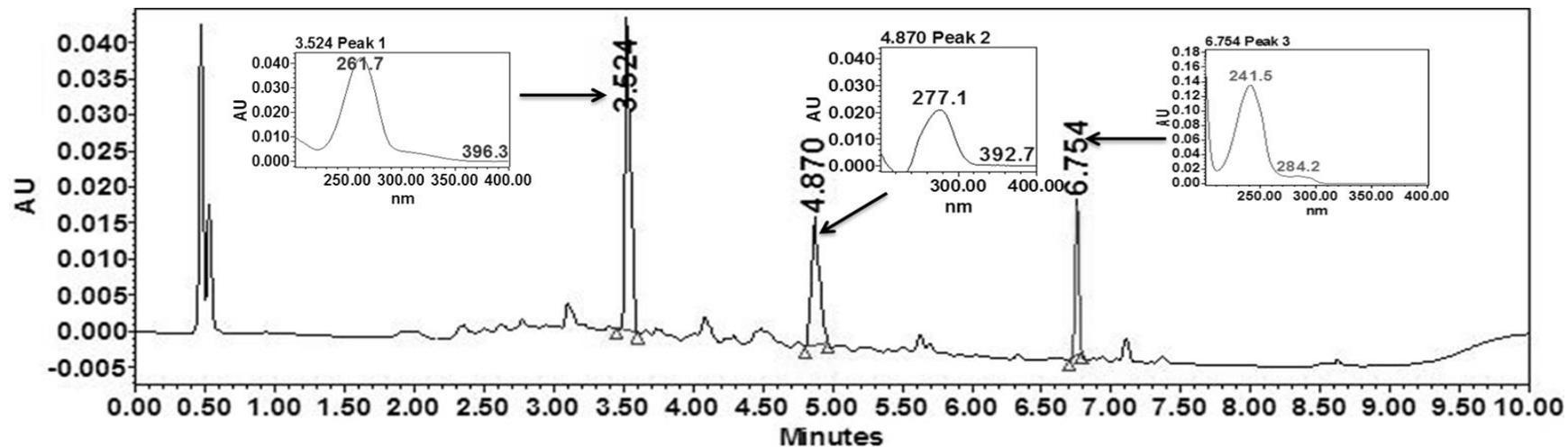
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на рисовой крупе



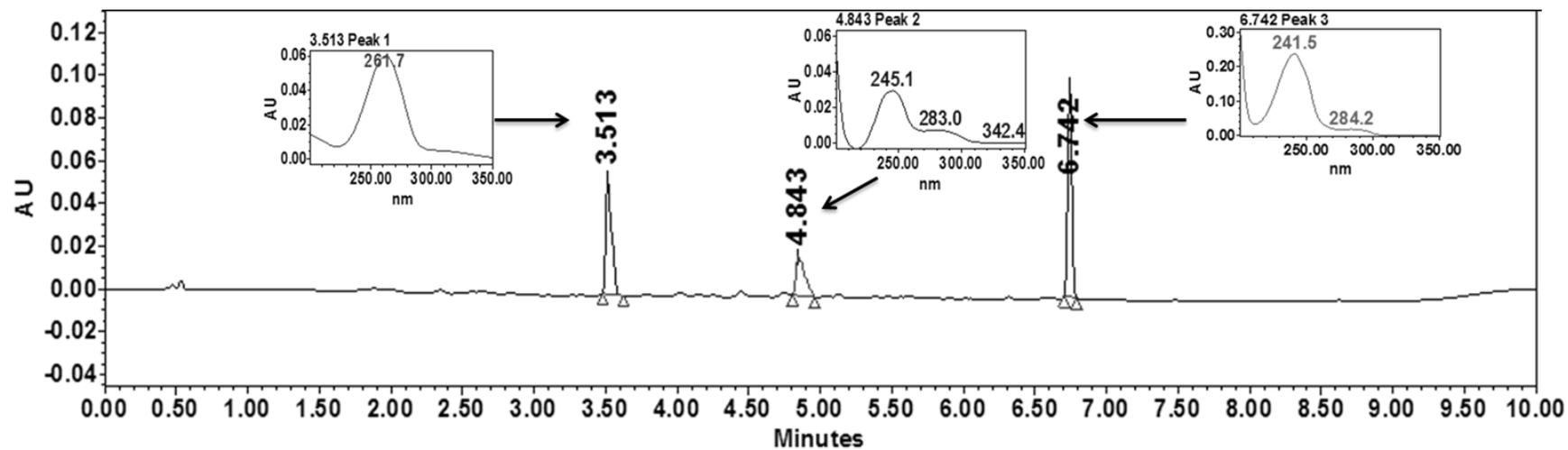
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на пшённой крупе



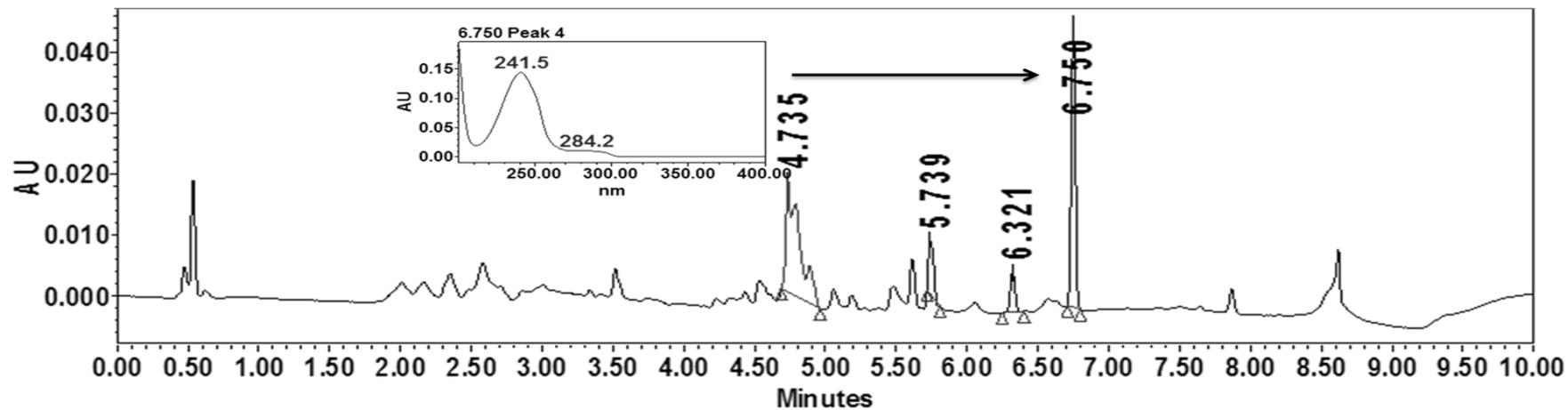
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на перловой крупе



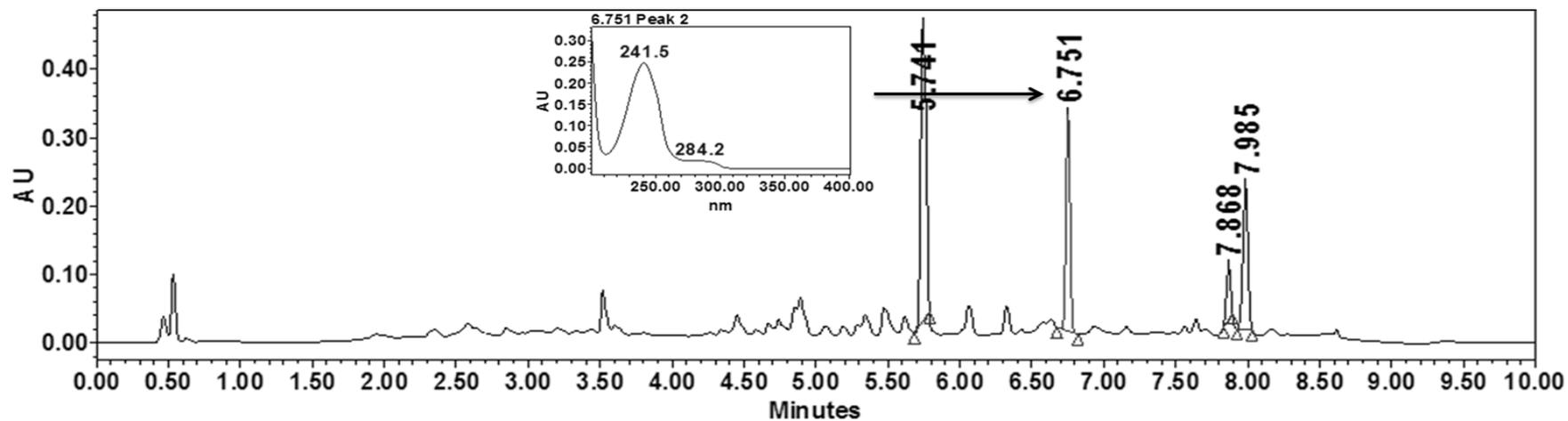
Экстракт из неинкулированной рисовой крупы (контроль)



Экстракт из неинкулированной пшённной крупы (контроль)



Экстракт из неинокулированной перловой крупы (контроль)



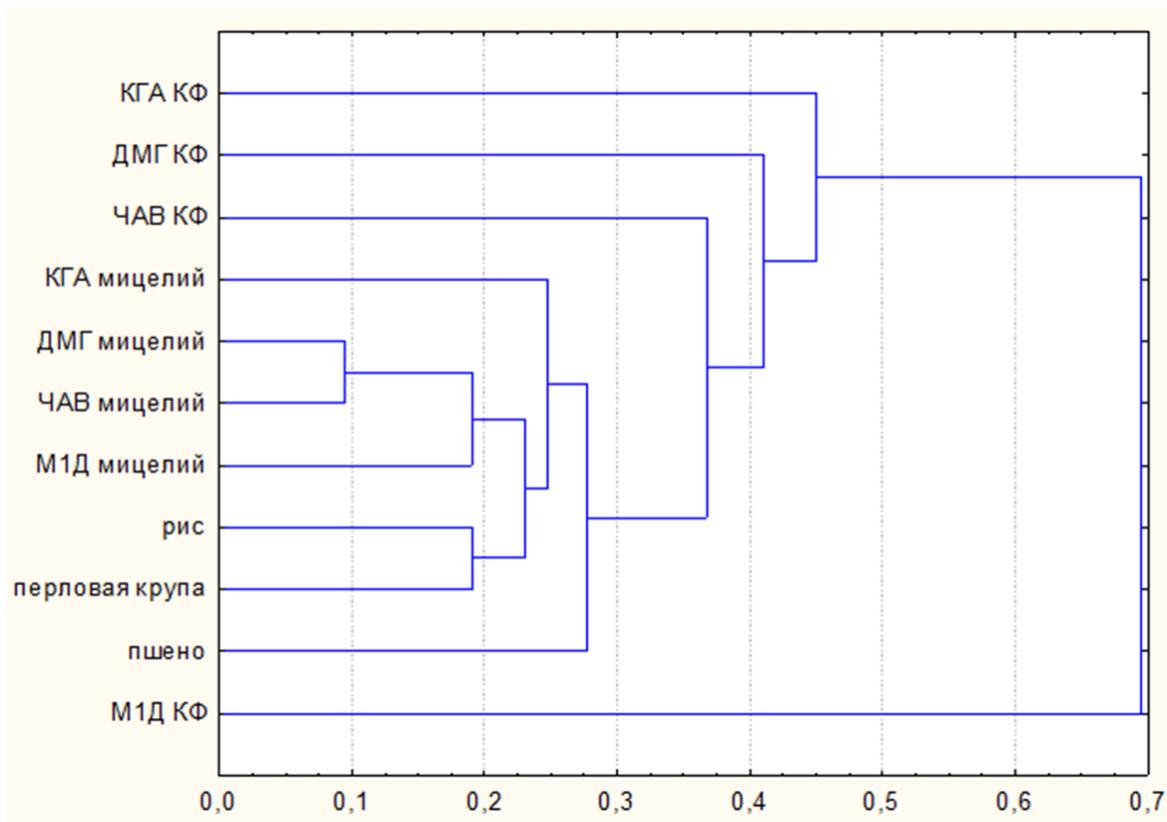


Рисунок 17. Кладограмма экстрактов из культуры *Pestalotiopsis* sp. на разных питательных субстратах (Weighted pair-group average).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы из гербарного образца чая *Camellia sinensis*, собранного на чайных плантациях в районе Дагомыса (Краснодарский край), в чистую культуру был выделен гриб, который по морфолого-культуральным характеристикам был отнесен к роду *Pestalotiopsis*. Дальнейший анализ по локусу большой субъединицы РНК показал, что наиболее близким видом к изучаемому микромицету является *P. camelliale*. Литературные данные о вторичных метаболитах *P. camelliale* отсутствуют.

Для анализа вторичных метаболитов продуцента использовали жидкие и твердые питательные субстраты. По окончании культивирования гриба оценивали выход биомассы и экстрактивных веществ. Для экстрактов, полученных из культурального фильтрата, мицелия и твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. оценивали антимикробную и фитотоксическую активности.

Наиболее высокая фитотоксическая и антимикробная активность была выявлена для экстрактов из культурального фильтрата гриба на жидких средах, в частности, картофельно-глюкозном бульоне, среде M1D и ДМГ. Для экстрактов из культурального фильтрата гриба на среде ЧАВ были отмечены самые низкие показатели. Выход биомассы и экстрактивных веществ, а также активность экстрактов были самые низкие по сравнению с другими питательными средами. Можно заключить, что данная среда является не подходящей для получения биологически активных веществ.

В целом, наибольшее разнообразие метаболитов *Pestalotiopsis* sp. было отмечено для экстрактов из культуры гриба на жидких средах. В дальнейшем возможно провести оптимизацию условий культивирования для увеличения выхода биоактивных метаболитов, а также расширить круг тест-организмов для оценки фитотоксической и антимикробной активности.

Стоит отметить, что по данным литературы ранее у экстрактов из культуры грибов рода *Pestalotiopsis*, выделенных с чая не оценивали фитотоксичность. Быстрое накопление биомассы, а также наличие данной активности у экстрактов, полученных из культуры изучаемого объекта делает его потенциальным продуцентом веществ с гербицидной и антимикробной активностью.

В дальнейшем, точная идентификация в купе с анализом метаболитного профиля позволяет выявлять новые хемотаксономические маркеры родов и видов, а также дает дополнительные возможности для целенаправленного поиска метаболитов определенной структуры у представителей близкородственных видов.

ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ

1. В результате проведённой работы из гербарного материала, листа *Camelia sinensis* был выделен в чистую культуру гриб, который по морфолого-культуральным характеристикам и молекулярно-филогенетическим данным был отнесён к роду *Pestalotiopsis*, и предварительно определён как *P. camelliale*.
2. Культура гриба была получена на 4-х жидких и 3-х твердофазных зерновых субстратах. Максимальный выход биомассы был отмечен при культивировании гриба на среде M1D (18 г/л), на средах КГА и ДМГ его значение было ниже и составило около 9 и 6 г/л, соответственно, минимальный – на среде ЧАВ (5 мг/л).
3. Выход экстрактивных веществ из культурального фильтрата гриба на жидких средах варьировал в диапазоне 10-45 мг/л. Максимальный выход экстрактов из мицелия гриба был отмечен на среде M1D и составил 20 мг/л, для остальных жидких сред его значение было в пределах 0.5-3 мг/л. Для твёрдых субстратов выход экстрактов составил от 3 до 6 г/кг. Максимальный выход экстракта был отмечен на перловой крупе.
4. Было показано, что экстракты из культурального фильтрата гриба на средах ДМГ, M1D и картофельно-глюкозном бульоне проявляют фитотоксическую и антимикробную активность в отношении тест-организмов. Экстракт из мицелия гриба на среде M1D обладал наиболее выраженными фитотоксическими и антимикробными свойствами по сравнению с другими экстрактами из мицелия. Экстракты гриба из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. не проявили антимикробную активность, но в большинстве вариантов обладали слабой фитотоксической активностью, за исключением экстракта из культуры гриба на рисовой крупе, проявившего более высокую фитотоксическую активность в отношении бодяка полевого в сравнении с экстрактами из твердофазной культуры гриба на других средах.
5. При анализе метаболитных профилей экстрактов из культуры *Pestalotiopsis* sp. было выявлено, что наибольшего разнообразия метаболитов удаётся достичь при культивировании гриба на жидких средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

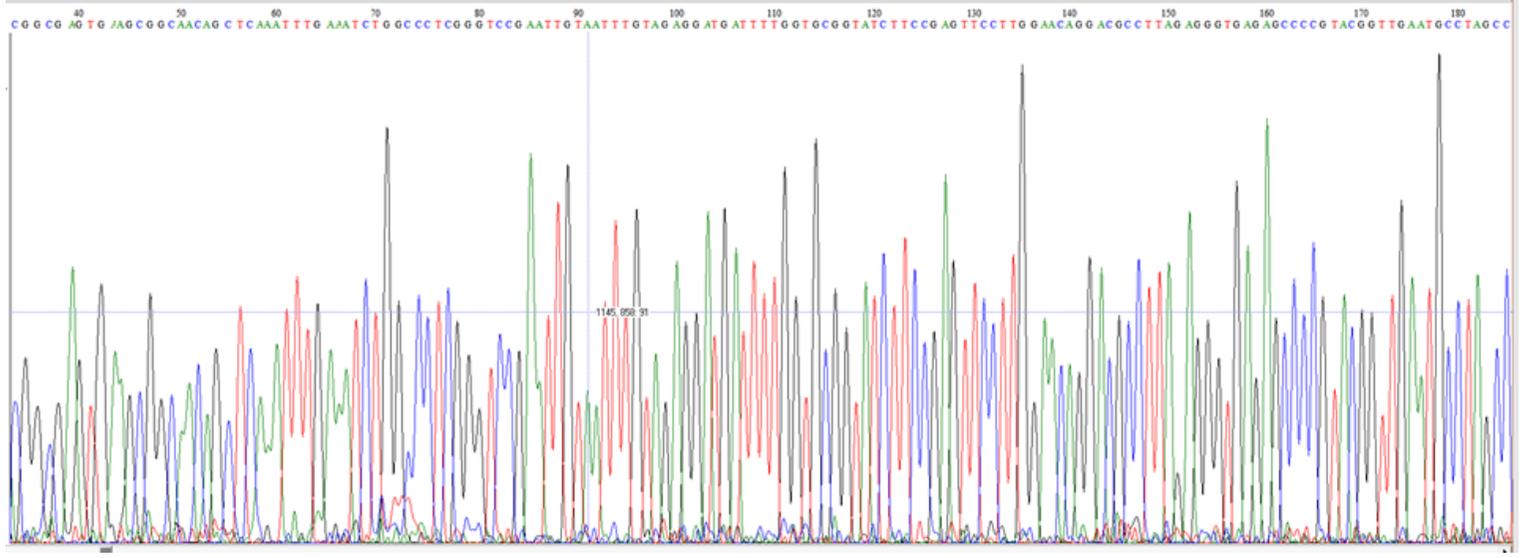
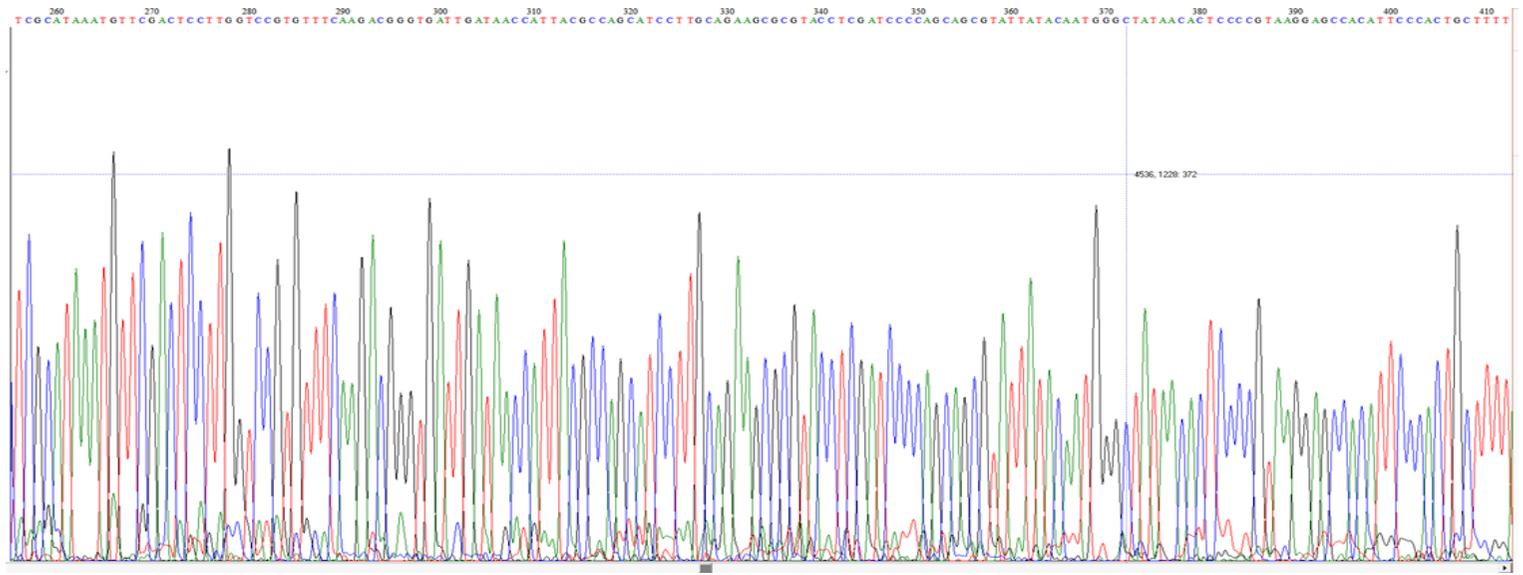
1. Ayoubi, N. & Soleimani, M. J. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis asiatica* causing leaf spot on sweet almond. // *J. Plant Pathol.* 2016. V. 98(2). P. 180–194.
2. Berestetskiy A.O., Fyodorova A.F., Kustova S. A laboratory technique for the evaluation of pathogenicity of *Septoria cirsii* for *Cirsium arvense*, XV Congress of European mycologists, 2007. P. 242.
3. De Notaris G (1839) *Micromycetes italiei* Dec II. *Mere R Acad Sci Torino* II 3:80–81
4. Ding G, Jiang LH, Guo LD, Chen XL, Zhang H, Che YS Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus *Pestalotiopsis theae* // *J Nat Prod.* 2008. V. 71. P. 1861–1865.
5. Doyle JJ & Doyle JL A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues // *Phytochem Bull.* 1987. V.19. P. 11-15.
6. Fang Liu, Lingwei Hou, Mubashar Raza & Lei Ca *Pestalotiopsis* and allied genera from *Camellia*, with description of 11 new species from China // *Scientific reports.* 2017. V. 7. P. 6-27.
7. Hopkins KE, McQuilken MP Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK // *Eur J Plant Pathol.* 2000. V.106. P. 77–85.
8. Jeewon R, Liew ECY, Simpson JA, Hodgkiss IJ, Hyde KD Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2003. V. 27. P. 372–383.
9. Jing Xu et al. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites // *Fungal diversity* 2010.V. 44(1). P. 15-31.
10. Jing Xu, Julia Kjer, Jandirk Sendker, Victor Wray, Huashi Guan, RuAngelie Edrada, Wenhan Lin, Jun Wu, and Peter Proksch Chromones from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese Mangrove Plant *Rhizophora mucronata* // *Journal of Natural Products.* 2009. V.72 (4). P.662-665.
11. Joshi SD, Sanjay R, Baby UI, Mandal AKA Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers // *Indian Journal of Biotechnology.* 2009. V. 8(4). P. 377–383.
12. Ko Ko TW, Stephenson SL, Bahkali AH, Hyde KD From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? // *Fungal Diversity.* 2011.V. 50. P. 113–120.
13. Kobayashi T, Ishihara M, Ono Y A new species of *Pestalosphaeria*, the telomorph of *Pestalotiopsis neglecta* // *Mycoscience.* 2001. V. 42. P. 211–216.

14. Lateef, A. A., Sepiah, M. & Bolhassan, M. H. Description of *Pseudopestalotiopsis kubahensis* sp. nov., a new species of microfungi from Kubah National Park, Sarawak, Malaysia // *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 2015. V5 (4). P. 376–381.
15. Lee, S., Crous, P. W. & Wingfield, M. J. Pestalotioid fungi from *Restionaceae* in the Cape Floral Kingdom // *Stud. Mycol.* V. 55. P. 175–187.
16. Liu AR, Chen SC, Wu SY, Xu T, Guo LD, Jeewon R, Wei JG. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2010. V. 57. P. 528–535.
17. Liu AR, Xu T, Guo LD.. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China // *Fungal Diversity.* 2007. V. 24.P. 23–36.
18. Liu L, Tian RR, Liu SC, Chen XL, Guo LD, Che YS Pestalofones A–E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis* // *Bioorg Med Chem.* 2009. V. 17. P. 606–613.
19. Liu, A. R., Chen, S. C., Wu, S. Y. & Wei, J. G. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010. V. 57. P. 528–535.
20. Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity // *Fungal Diversity.* 2011. V. 50. P. 167–187.
21. Maharachchikumbura, SSN, Guo LD, Cai L, Chukeatirote E, Wu WP, Sun X, Crous PW, Bhat DJ, Hyde KD A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species // *Fungal Diversity.* 2012. V. 56. P. 95–129.
22. Mondal TK, Bhattacharya A, Lakshmikumaran M, Ahuja PS Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 2004. V76(3). P. 195–254.
23. Nag Raj, T. R. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, Waterloo, Ontario, Canada. (1993).
24. Nag Raj, T.R. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia// Mycologue publications, Waterloo, 1993. V. 1.P. 1-101.
25. Russell J.R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi// *Appl Environ Microbiol.* 2011. V. 77. P. 76-84.
26. S.S.N. Maharachchikumbura, K.D. Hyde, J.Z. Groenewald, J. Xu, and P.W. Crous *Pestalotiopsis* revisited // *Studies in mycology.* 2014. V. 79. P. 121–186.
27. Sajeewa S. N. Maharachchikumbura, Liang-Dong Guo, Ekachai Chukeatirote, Ali H. Bahkali, Kevin D. Hyde *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity// *Fungal Diversity.* 2011. V. 50. P. 167.

28. Sajeewa S.N. Maharachchikumbura, Ekachai Chukeatirote, Liang-Dong Guo , Pedro W. Crous, Eric H.C. Mckenzie & Kevin D. Hyde Pestalotiopsis species associated with *Camellia sinensis* (tea) // Fungal Diversity. 2008. V. 123. P. 47–61
 29. Sanjay R Studies on *Pestalotiopsis* spp. affecting tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in southern India. Ph D Thesis, Bharathiar University, Coimbatore, 2004.
 30. Sarvottam D Joshi, R Sanjay, U I Baby and A K A Mandal Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers // Indian Journal of Biotechnology. 2009. V8 (4). P. 377-383.
 31. Song, Y. et al. *Pestalotiopsis* species from Thailand point to the rich undiscovered diversity of this chemically creative genus // *Cryptogamie Mycol.* 2014. **35**(2). P. 139–149.
 32. Song, Y. et al. Two new species of *Pestalotiopsis* from Southern China // *Phytotaxa* .2013. V. 126(1). P. 22–32.
 33. Song, Y., Maharachchikumbura, S. S. N., Jiang, Y. L., Hyde, K. D. & Wang, Y. *Pestalotiopsis keteleeria* sp. nov., isolated from *Keteleeria pubescens* in China // *Chiang Mai J. Sci.* 2014. V. 41(4). P. 885–893.
 34. Steyaert RL Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. *Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov // Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles. 1949. V. 19. P. 285–354.
 35. Steyaert RL New and old species of *Pestalotiopsis* // Trans BrMycol Soc. 1953. V. 36. P. 81–89.
 36. Steyaert RL *Pestalotia, Pestalotiopsis et Truncatella* // Bull.Jard. Bot. Bruxelles.1955. V. 25. P. 191–199.
 37. Steyaert RL Type specimens of Spegazzini's collections in the *Pestalotiopsis* and related genera (Fungi Imperfecti: Melanconiales) // Darwinia Buenos Aires.1961. V.12. P. 157–190.
 38. Von Arx JA The genera of fungi sporulating in pure culture. In:Cramer J (ed) The genera of fungi sporulating in pure culture. A.R.Gantner Veriag Kommanditgesellschaft, Vaduz. (1974)
 39. Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y, Pan XH. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China // Fungal Diversity 2007. V. 24. P. 55–74.
 40. Worapong J, Inthararaungsom S, Stroble GA, Hess WM A new record of *Pestalotiopsis* theae, existing as an endophyte on *Cinnamomum iners* in Thailand // Mycotaxon. 2003. V. 88. P. 365–372.
- McQuilken MP, Hopkins KE Biology and integrated control of *Pestalotiopsis* on container-grown ericaceous crops // Pest ManagSci. 2004. V. 60. P. 135–142.

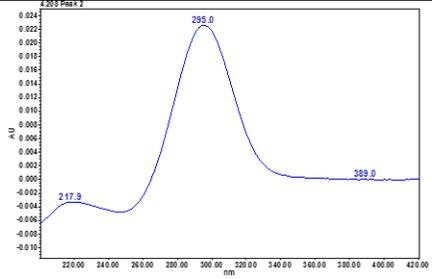
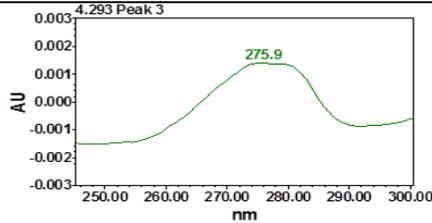
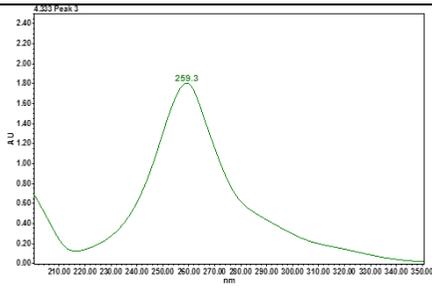
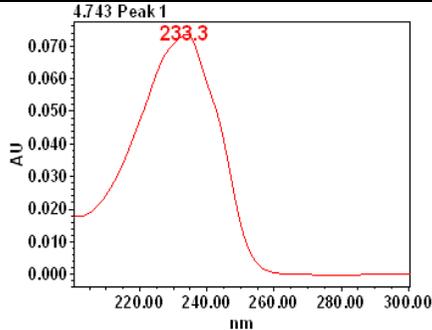
41. Xu J, Ebada SS, Proksch P. *Pestalotiopsis* a highly creativegenus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites // Fungal Divers. 2010.V. 44(1). P. 15–31.
42. Xu L, Kusakari S, Hosomi A, Toyoda H, Ouchi A Postharvestdisease of grape caused by *Pestalotiopsis* species // AnnPhytopathol Soc Jpn. 1999. V. 65. P.305–311.
43. Xuekui Xia, Soonok Kim, Changheng Liu and Sang Hee Shim Secondary Metabolites Produced by an Endophytic Fungus *Pestalotiopsis sydowiana* and Their 20S Proteasome Inhibitory Activities // Molecules. 2016. V. 17. P. 6-14.
44. Y. J. Chen, L. Zeng, N. Shu, H. Wang, and H. R. Tong First Report of *Pestalotiopsis camelliae* causing Grey Blight Disease on *Camellia sinensis* in China // Plant disease. 2017. V. 101. P. 1034.
45. Yingjuan Chen, Liang Zeng, Na Shu, Maoyuan Jiang, Han Wang, Yunjin Huang, Huarong Tong *Pestalotiopsis*-like species causing Grey blight disease on *Camellia sinensis* in China // Plant Disease "First Look" 2017. V. 102. P 98-106.
46. Малый практикум по геной инженерии // Т. В. Матвеева, Д. И. Богомаз, Л. А. Лутова. — СПб : Реноме, 2011. — 52 с.: ил.

Приложение 1. Фрагменты хроматограммы прямого и обратного сиквенсов.

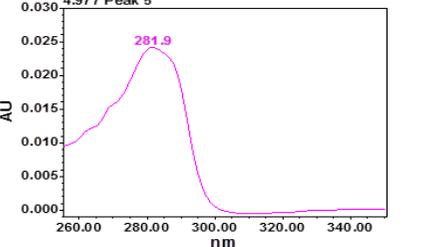
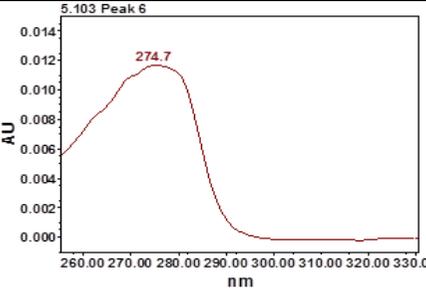
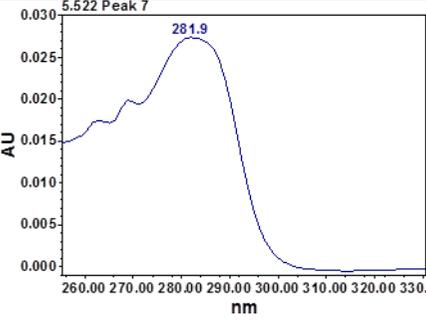
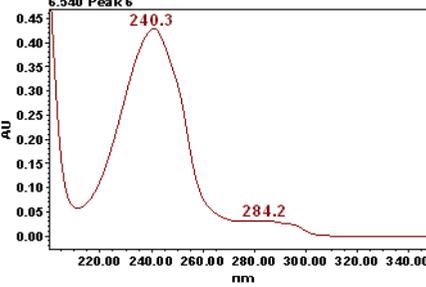


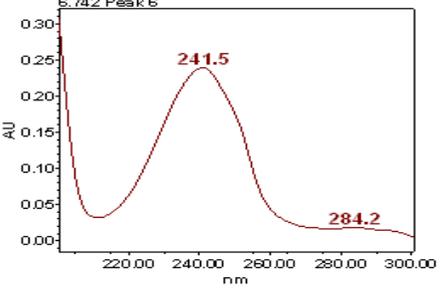
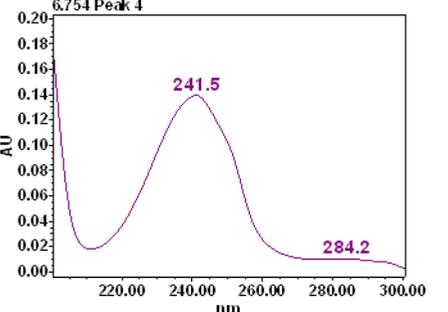
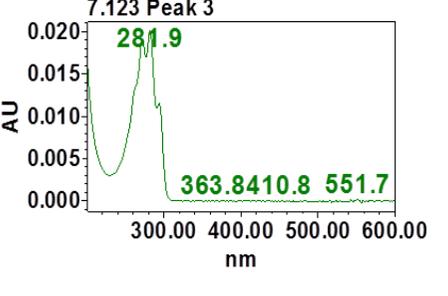
		КГА КФ	КГА _М	МІD КФ	МІD _М	ДМГ КФ	ДМГ _М	ЧАВ КФ	ЧАВ _М	РИС	ПШ	ПЕРЛ
1		+	-	-	-	+	-	-		-	-	-
		55596				184722						
2		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
				8740		497611						
3		-	-	-	-	-	-	-	-	37747	22476	-

4	<p>3.521 Peak 2 287.8 219.1</p>	561999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<p>3.872 Peak 3 249.8 328.4</p>	680863	-	17899	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<p>4.164 Peak 1 219.1 277.1 315.2 414.4 431.3</p>	1,272 MJH	6505	3649	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<p>4.137 Peak 2 228.5</p>	-	-	3725	-	-	-	-	-	-	-	-

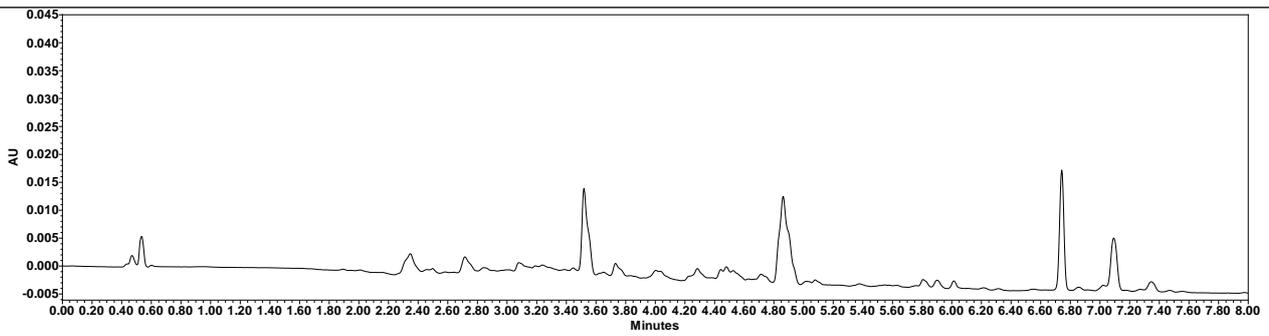
8		6000	5186	-	-	23298	-	-	-	-	27787	-
9		-	-	2315	-	-	-	-	-	-	-	-
10		4,302 MJH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11		-	-	-	-	-	-	-	-	169231	109383	272891

12		-	-	3636	2371	248154	-	1339	-	-	-	-
13		-	-	3630	9214	3842	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
15		-	-	-	-	-	-	5704	-	-	-	105247

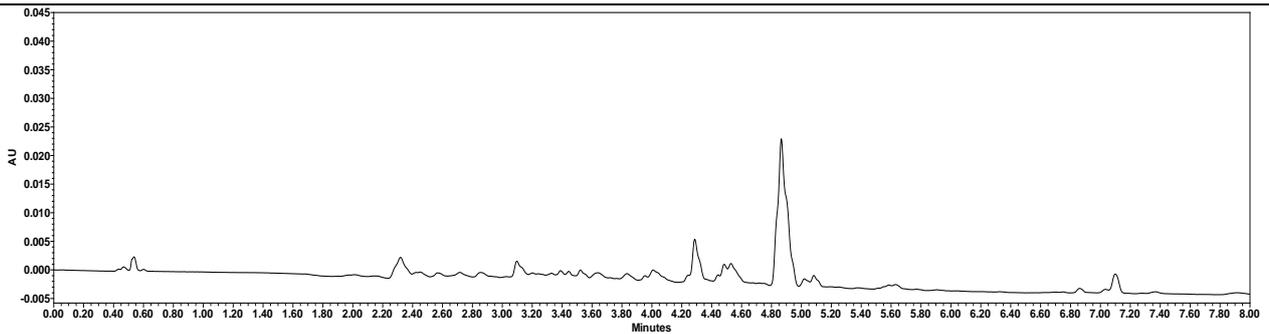
16		-	-	34550	-	1331	-	4887	-	-	-	-
17				1921								
18				40425								
19		7106	40543				47922		39670			

20								45867				
21		-	-	41169	-	-	-	-	-	-	27669	
22		-	49712	6008	28109	3094	48842	5565	10364	23887	29980	7316

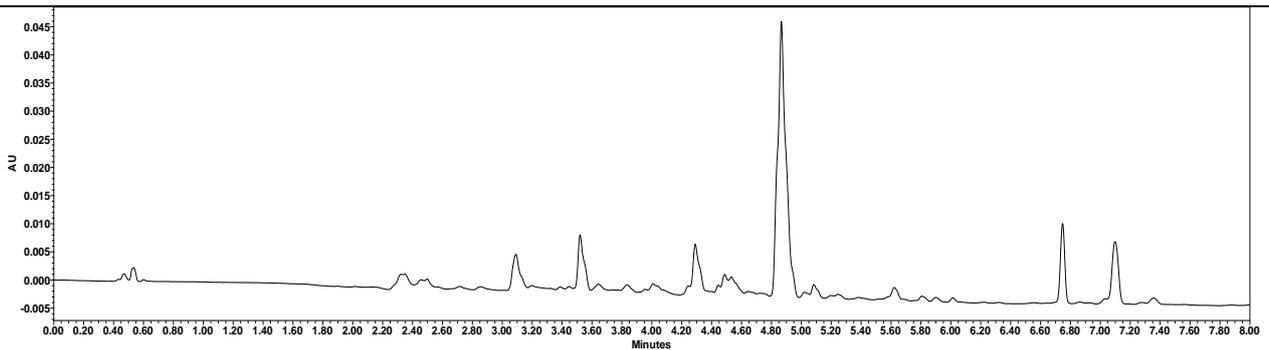
Приложение 3. Хроматограммы экстрактов *Pestalotiopsis* sp. на разных средах



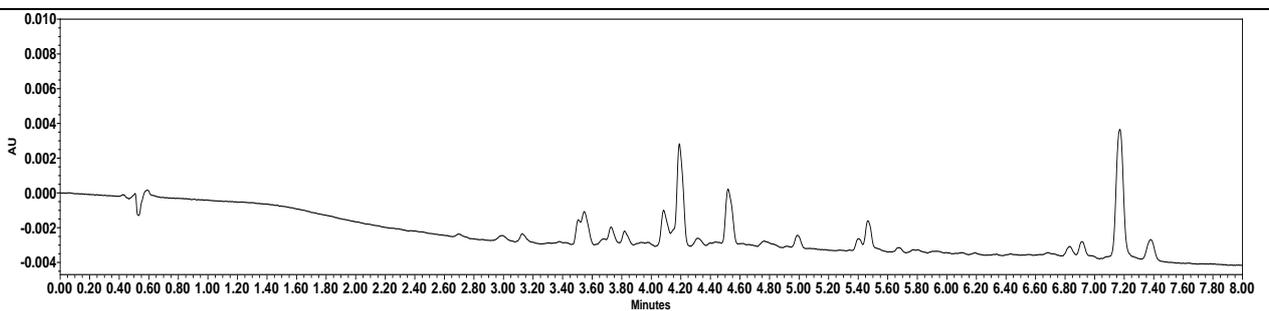
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на рисовой крупе



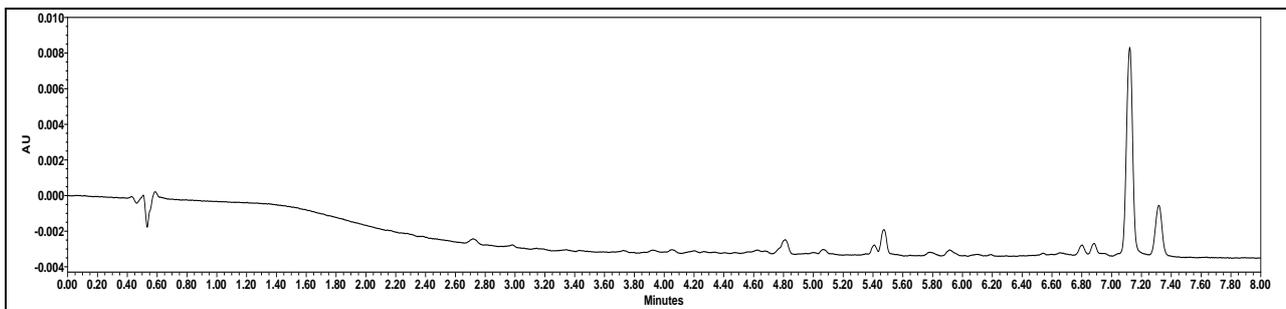
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на перловой крупе



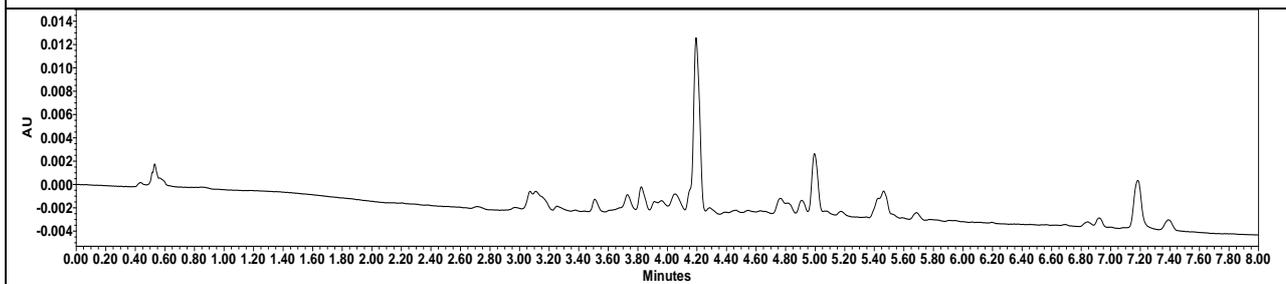
Экстракт из твердофазной культуры *Pestalotiopsis* sp. на пшённной крупе



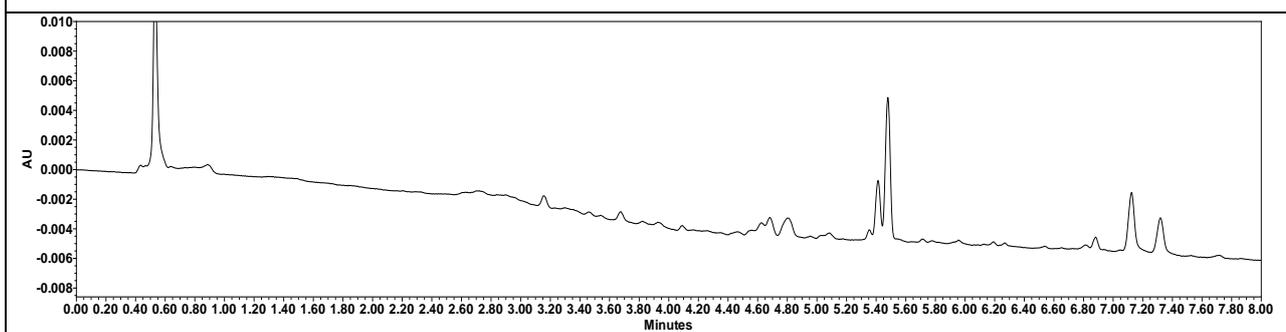
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на картофельно-глюкозной среде



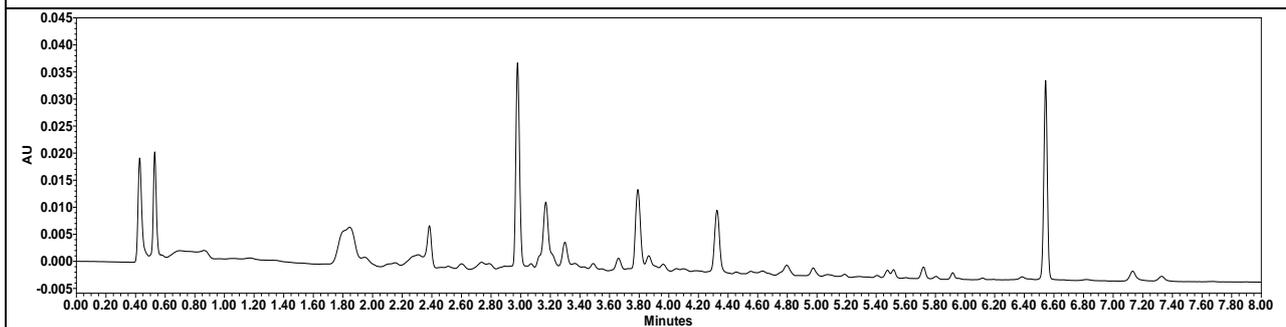
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде M1D



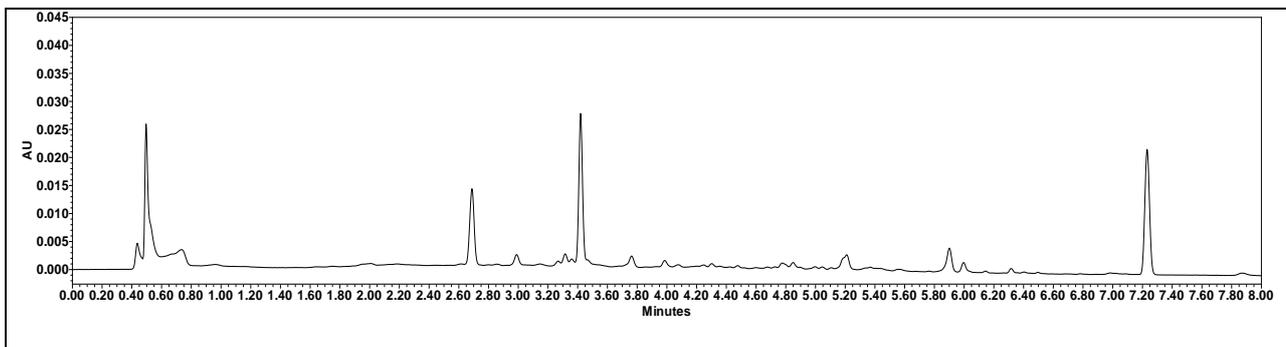
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде ДМГ



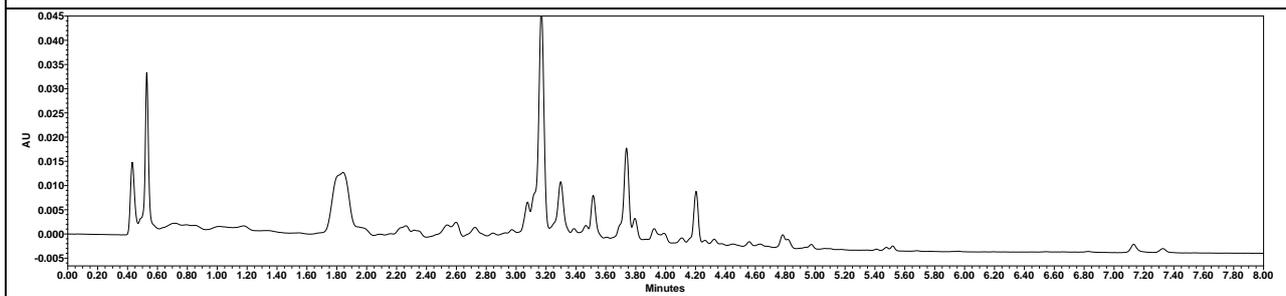
Экстракт из мицелия *Pestalotiopsis* sp. на среде ЧАВ



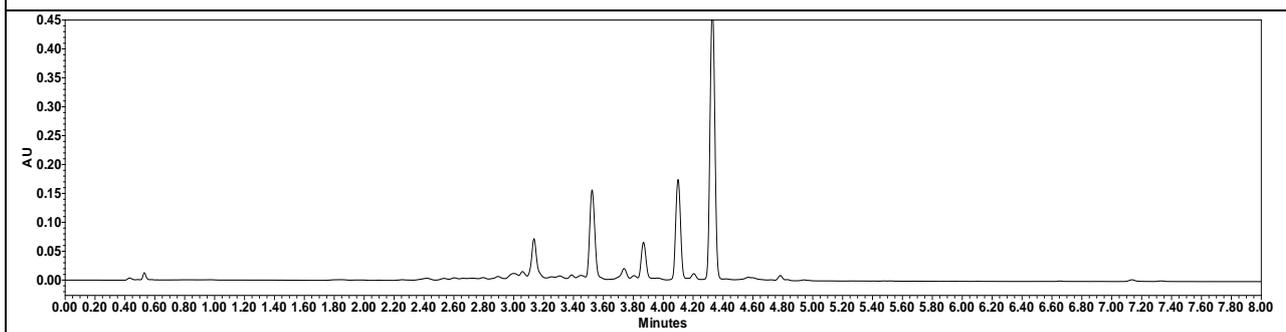
Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде M1D



Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде ЧАВ



Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде ДМГ



Экстракт из культурального фильтрата *Pestalotiopsis* sp. на среде КГА