

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 632.911.4

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА НА СПЕКТР
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ КУЛЬТУР
РАЗЛИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ГРИБА *BIPOLARIS SOROKINIANA*

© 2020 г. А. О. Берестецкий^{1,*}, Е. Н. Григорьева^{1,**}, М. О. Петрова^{1,***},
И. В. Сендерский^{1,****}, Е. А. Степанычева^{1,*****}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

**e-mail: 8540356@mail.ru

***e-mail: dch1998@qip.ru

****e-mail: senderskiy@mail.ru

*****e-mail: stepanycheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.11.2019 г.

После доработки 15.12.2019 г.

Принята к публикации 20.12.2019 г.

Микромицет *Bipolaris sorokiniana* является глобально распространенным возбудителем заболеваний дикорастущих и культурных злаков, может развиваться эндофитно, эпифитно, сохраняться длительное время в почве и на растительных остатках. Химические механизмы столь хорошей приспособленности этого гриба к различным условиям еще мало изучены. В рамках представленной работы изучен спектр биологической активности экстрактов из культур 4 изолятов гриба различного географического происхождения, полученных на трех питательных субстратах. Состав субстрата и в меньшей степени происхождение изолята оказали существенное влияние на выход экстрактивных веществ, а также степень и спектр биологической активности экстрактов. Относительно высокой инсектицидной активностью в отношении злаковой тли и личинок восковой моли обладали экстракты из мицелия грибов, полученных на жидких питательных средах, высокой цитотоксической активностью в отношении клеточной линии Sf9 — экстракты из твердофазных культур на перловой крупе, фитотоксическую — из фильтрата культуральной жидкости на среде ДМГ. Корреляции между инсектицидной и фитотоксической активностью экстрактов не обнаружено, что говорит о возможной продукции метаболитов, прямо влияющих на развитие насекомых. Обнаруженные нами инсектицидные свойства метаболитов этого гриба объясняют его высокую конкурентную способность за растительный субстрат и расширяют потенциальные возможности его практического применения.

Ключевые слова: биологическая активность, вторичные метаболиты, инсектицидные свойства, экология микроорганизмов, экстракты, *Bipolaris sorokiniana*

DOI: 10.31857/S0026364820030046

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы филлосферы, среди которых преобладают грибы, в цикле своего развития сталкиваются не только с проблемой успешной колонизации растения-хозяина, но и с необходимостью конкурировать за питательный субстрат с эндо- и эпифитами, фитопатогенами, насекомыми-фитофагами, фитонематодами, а также противостоять микофагам и антагонистическим микроорганизмам. Для этого они выработали способность образовывать толстостенные покоящиеся видоизменения мицелия и меланизированные плодовые тела, устойчивые к механическим и химическим воздействиям. Еще одним механизмом повышения конкурентной способности микрооргани-

мов может быть выработка биологически активных соединений, которые прямо или косвенно воздействуют на перечисленные выше организмы. Так, многие некротрофные и гемибиотрофные патогены растений образуют антибактериальные, антифунгальные и нематоцидные вещества (Poluektova, Berestetskiy, 2013, 2018; Berestetskiy, Kurlenya, 2014). Однако достаточно мало еще известно о цитотоксических, инсектицидных, детеррентных и регулирующих рост насекомых метаболитах, образуемых грибами филлосферы (Biedermann et al., 2019). В ряде исследований последних лет показано, что экстракты из культур ряда фитопатогенов и некоторые их токсины обладают инсектицидными свойствами (Cimmino et al., 2013, 2015; Berestetskiy et al., 2014, 2019).

Относительно недавно нами обнаружено, что экстракты из культур ряда патогенов пшеницы обладают инсектицидными свойствами в отношении злаковой тли (*Berestetskiy et al.*, 2018). Среди них особый интерес представляет глобально распространенный возбудитель корневой гнили и темно-бурой пятнистости листьев злаковых культур — *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker. Гриб встречается не только на культурных, но на диких злаках, а также на двудольных растениях, зафиксирован как эндофит (*Manamgoda et al.*, 2014; *Gupta et al.*, 2018). Гриб накапливается и в почве: на сильно зараженных полях содержание его спор может достигать среднего уровня 50 КОЕ/г почвы (*Wildermuth*, 1986). Возможно, его высокая экологическая пластичность обеспечена меланизированными мицелием и конидиями (*Bashyal et al.*, 2010), наличием полового размножения (*Gupta et al.*, 2018), а также способностью образовывать разнообразные по структуре вторичные метаболиты с широким спектром биологической активности. Известна способность этого гриба образовывать фитотоксические, антимикробные и цитотоксические соединения (*Hesseltine et al.*, 1971; *Luke, Gracen*, 1972; *Kalichiki*, 1995; *Kumar et al.*, 2002; *Khiralla et al.*, 2019). В связи с этим и другими свойствами (способность к образованию многочисленных ферментов, адсорбционными свойствами мицелия и др.), этот и другие виды рода *Bipolaris* имеют большие перспективы для применения в биотехнологии (*Bengyella et al.*, 2019). Его химические взаимодействия с насекомыми и другими организмами могут представлять интерес для дальнейшего изучения экологии микроорганизмов филло- и ризосферы.

Несмотря на то, что токсины *B. sorokiniana* изучаются относительно давно, инсектицидные и цитотоксические метаболиты этого гриба еще плохо исследованы; мало известно об изменчивости токсинообразования у различных изолятов гриба, а также о влиянии состава питательного субстрата на образование его вторичных метаболитов. В связи с этим целью данного исследования было изучение спектра биологической активности экстрактов из культур четырех изолятов *B. sorokiniana* различного географического происхождения в зависимости от состава питательного субстрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты. Изоляты *B. sorokiniana* были предоставлены сотрудником лаборатории иммунитета растений к болезням Всероссийского института защиты растений А.В. Анисимовой. Образцы были собраны на сортоучастках в различных регионах Российской Федерации и Республики Беларусь: ЛО (листья ячменя, Волосовский р-н Ленинградской обл.), Бр20 (листья пшеницы, Минск, Республика Беларусь), К7 (листья пшени-

цы, Курганская обл.), ПК (листья пшеницы, Приморский край). Культуры патогенов пшеницы поддерживали в пробирках на стандартной среде КГА (картофельно-глюкозный агар) при температуре 5°C.

Для биотестов использовались листья двухнедельных проростков пшеницы сорта Саратовская 29. Насекомые были предоставлены сотрудницами лаборатории биологической защиты ВИЗР. Лабораторную популяцию обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum*) содержали на проростках пшеницы в термостатированном помещении с температурой $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и продолжительностью светового дня 16 ч. Гусеницы галлерии (большой восковой моли, *Galleria mellonella*) содержали в пластмассовых контейнерах на 20% наполненных кормом на основе меда и воска с добавлением кукурузной и пшеничной круп, дрожжей и сухого молока. Насекомых содержали при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и продолжительности светового дня 16 ч. Культура клеток Sf9 (ЕСАСС 89070101) кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) поддерживается в лаборатории микробиологической защиты ВИЗР. Культура инфузории-туфельки предоставлена Д.О. Виноходовым (Санкт-Петербургский технический университет) и поддерживается на среде Лозина-Лозинского.

Культивирование грибов проводили на двух жидких питательных средах: ДМГ (4 г дрожжевого экстракта, 10 г мальтозного экстракта, 10 г глюкозы, вода до 1 л) и среде Чапека с витаминами (ЧАВ) (20 г глюкозы, 2 г NaNO_3 , 1 г KH_2PO_4 , 0.5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 г KCl , 100 мкг тиамин, 5 мкг биотин, вода до 1 л, pH 6) в двухлитровых культуральных матрацах с 400 мл среды, а также на сыпучей питательной среде на основе перловой крупы (60 г крупы, 40 мл воды, без замачивания перед стерилизацией) в 500-миллилитровых конических колбах. Среды стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C в течение 20 мин. В качестве посевного материала использовали блоки 5 мм в диаметре из края недельных колоний грибов, полученных на КГА при 24°C. Инкубацию культур грибов, осуществляли при постоянной температуре 24°C в темноте в течение трех недель. Для улучшения аэрации и предотвращения комкования твердофазных культур колбы ежедневно тщательно встряхивали. Культивирование грибов выполнено в 4 повторностях.

Получение экстрактов. Экстракцию грибных метаболитов из культуральной жидкости проводили этилацетатом; из сухого измельченного мицелия — гексаном (гексановый экстракт отбрасывали) и затем этилацетатом. Для извлечения грибных метаболитов из твердофазных культур (10 г высушенного и измельченного биоматериала) использовали 50%-й водный ацетон; после удаления органического растворителя из экстракта метабо-

литы переэкстрагировали этилацетатом. Растворители отгоняли из экстрактов при помощи ротационного испарителя при температуре водяной бани 40°C, после чего определяли массу сухого остатка (Berestetskiy et al., 2018).

Биологическая активность экстрактов. Методики оценки фитотоксической активности экстрактов на отсеченных листьях пшеницы и их инсектицидной активности на злаковой тле описаны ранее (Berestetskiy et al., 2018). Для проведения этих биотестов сухой остаток экстрактов растворяли в этаноле и доводили его объем водой так, чтобы финальная концентрация спирта была 5%, а экстракта – 0.5%. В качестве контроля использовали экстракты, полученные из стерильных питательных сред, и 5%-й раствор этилового спирта.

Для определения фитотоксической активности экстрактов во влажную камеру (контейнер с фильтровальной бумагой, смоченной водой) помещали отрезки листьев пшеницы длиной 2 см. Каждый вариант включал 12 повторностей, в шести из которых в центре листа при помощи препаровальной иглы делали надкол. В центр каждого листового сегмента наносили 10 мкл 0.5%-го экстракта. Инкубацию проводили при переменном 12-часовом искусственном освещении и постоянной температуре 24°C. Через 48 ч после обработки измеряли длину некротического пятна.

Для оценки инсектицидной активности комплексов грибных метаболитов на дно и крышку чашки Петри (диаметр 4 см) помещали диски фильтровальной бумаги, пропитанные экстрактами, по 250 мкл на диск (примерно 1 мг/дм²). В каждую чашку вкладывали смоченный в изучаемом экстракте 2-см отрезок листа пшеницы и выпускали 20 имаго тли. Через 24 ч инкубирования при температуре 24°C учитывали живых и погибших насекомых в опыте и контроле, определяли биологическую эффективность экстрактов по формуле Эббота (Fleming, Retnakaran, 1985). Опыт выполнен в четырех повторностях.

Определение действия экстрактов на смертность и развитие галлерии проведено по стандартной методике (Ignasiak, Maxwell, 2017; Berestetskiy et al., 2019). На одну повторность опыта отбирали 10 гусениц однотонной кремовой окраски длиной примерно 2–3 см. Введение 1%-го экстракта в 5%-м этаноле объемом 10 мкл в гемоцель личинок галлерии возраста осуществляли шприцом (Hamilton, Швейцария) с тонкой острой иглой. Между инъекциями шприц промывали последовательно 96%-м этанолом и дистиллированной водой. Инъекцированных личинок переносили в 90-миллиметровые стеклянные чашки Петри с искусственным кормом (3 г на чашку), инкубировали в темноте при постоянной температуре 24°C, учет смертности гусениц, а также ежедневное наблюдение за их развитием вели в течение трех недель.

Цитотоксическую активность экстрактов изучали в отношении клеточной линии Sf9. В луночный планшет вносили 100 мкл 1%-го экстракта, разведенного ацетоном, и упаривали растворитель. Сухой остаток растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида, после чего в каждую лунку вносили 900 мкл питательной среды SF900II и 100 мкл суспензию клеток в концентрации 300 тыс. клеток/лунку. Клетки инкубировали 24 ч при 27°C, окрашивали трипановым синим и определяли долю погибших (окрашенных) клеток по отношению к общему количеству (не менее 50) в нескольких полях зрения (Watts et al., 2003).

Оценку токсичности экстрактов проводили также и в отношении инфузории-туфельки (*Paramecium caudatum*). В лунки 24-луночного планшета вносили 0.5 мл суспензии клеток инфузории (примерно 100 клеток/мл). К суспензии инфузорий добавляли 5 мкл 1%-го экстракта в ацетоне. Таким образом, конечная концентрация экстракта составила 100 мкг/мл, ацетона – 1%. Через 3, 30 и 180 мин после начала эксперимента определяли долю обездвиженных инфузорий. Каждый вариант включал в себя 3 повторности.

Статистическая обработка данных. Статистические расчеты проводили с помощью программы SigmaPlot 12. Тип распределения в вариантах экспериментов оценивали с помощью теста Shapiro-Wilk. Однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ проводили с помощью функции Anova. Поскольку выборки (повторности) вариантов характеризовались нормальным распределением, достоверность различий между средними устанавливали на основе критерия наименьшей средней разности (Fisher's LSD Method) на уровне значимости $P = 0.05$. При учете смертности насекомых данные, выраженные в доле (%) погибших насекомых, трансформировали как $\lg_{10}(X + 1)$, после чего проводили дисперсионный анализ трансформированных данных. Обобщенный анализ полученных данных проводили методом главных компонент с помощью программы Statistica 10 (StatSoft, США) и функции Principal Components Analysis в разделе Multivariate Exploratory Techniques.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выход биомассы и экстрактивных веществ. Состав жидкой питательной среды оказывал существенное влияние ($df 1, F = 2112, p < 0.01$) на конечный pH культуральной жидкости (КЖ), тогда как происхождение изолята было несущественным фактором ($df 3, F = 0.75, p = 0.53$). Через 3 недели культивирования на ДМГ значение pH КЖ всех изученных изолятов *B. sorokiniana* увеличилось со слабокислого (pH 6) до слабощелочного (pH 9). На питательной среде ЧАВ значение pH фильтрата всех изолятов трехнедельных культур было близко к нейтральному. Изученные факторы

Таблица 1. Влияние состава жидкой питательной среды на выход сухой биомассы мицелия и на значение pH фильтрата трехнедельных культур различных изолятов *Bipolaris sorokiniana*

Изолят	pH*		г/л	
	ДМГ	ЧАВ	ДМГ	ЧАВ
ЛО	9.0	6.7	3.8	2.7
БР20	9.1	6.7	2.4	4.0
К7	9.1	6.7	3.7	3.6
ПК	9.1	6.6	3.6	4.2
Среднее	9.1 ± 0.10**	6.7 ± 0.20	3.5 ± 0.40	3.5 ± 1.6
НСР _{0,05}	0.2		1.5	

Примечание. *pH исходных питательных сред – 6.0; **указано среднее значение и стандартное отклонение.

(“изолят” и “состав среды”) не оказали существенного влияния на выход сухой биомассы из трехнедельных культур *B. sorokiniana*. Средний выход мицелия составил около 3.5 г/л среды (табл. 1).

Состав среды оказал существенное (df 1, F = 263, p < 0.01) влияние на выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из КЖ, и не влиял на ВЭВ из мицелия (F = 4.1, p = 0.054). При этом, происхождение изолята существенно влияло как на ВЭВ из КЖ (F = 5.9, p < 0.01), так и ВЭВ из мицелия (F = 4.1, p < 0.05). Взаимодействие обоих факторов (“изолят” и “состав среды”) было несущественным. Средний ВЭВ из КЖ различных изолятов *B. sorokiniana* на полусинтетической среде ДМГ был примерно в 4 раза выше, чем ВЭВ из КЖ на синтетической среде ЧАВ. При культивировании изучаемых микромицетов на ДМГ наиболее высоким ВЭВ из КЖ был у изолята БР20 (198 мг/л), на ЧАВ – у изолята ПК *B. sorokiniana* (45 мг/л). Минимальный выход экзометаболических веществ наблюдали у изолята ЛО. Средний ВЭВ составил 176 мг/л на ДМГ и 39 мг/л – на ЧАВ. Выход эндометаболических веществ при культивировании *B. sorokiniana* на испытанных

жидких средах был на сходном уровне около 45–52 мг/л за исключением изолята БР20, у которого ВЭВ из мицелия при культивировании на ДМГ составил 29 мг/л (табл. 2).

При культивировании *B. sorokiniana* на автоклавированной перловой крупе происхождение изолята существенно (df 3, F = 5.4, p < 0.01) влияло на ВЭВ из колонизированного твердого субстрата. Средний ВЭВ из твердофазных культур гриба был около 1 г/кг субстрата. Максимальный ВЭВ (1.6–1.7 г/кг) отметили у изолятов ЛО и БР20, тогда как у изолятов К7 и ПК этот показатель был в 2–3 раза ниже (табл. 2).

Ранее из культуры *B. sorokiniana* LK12 на среде Чапека с 1% пептона были получены сорокиниол, а также фитотоксичные полипептиды BZR-cotoxin I и BZR-cotoxin IV (Ali et al., 2016). Фитотоксичны виктоксинин и биполароксин был получены на синтетической среде Фриза (Pringle, 1976; Jahani et al., 2014), в состав которой в качестве источника азота вместо нитрата натрия входят виннокислый аммоний и нитрат аммония. Стеригматоцистин и его предшественники, соединения семейства кохлиохинонов, а также некоторые фитотоксичные сексквиптерпены были выделены из экстрактов культур *B. sorokiniana*, полученных на картофельно-глюкозном отваре, при выходе экстрактивных веществ на уровне 25–100 мг/л (Maes, Steyn, 1984; Wang et al., 2016; Qader et al., 2017). Последние были выделены также при культивировании гриба на среде, состоящей из овощного сока и отвара листьев кукурузы (Pena-Rodriguez et al., 1988). Однако экспериментальных данных по влиянию состава питательной среды на образование биоактивных метаболитов у различных изолятов *B. sorokiniana* недостаточно.

В ходе проведенного исследования с четырьмя изолятами *B. sorokiniana*, выделенными из различных географических регионов Российской Федерации и Белоруссии, было показано, что при

Таблица 2. Выход экстрактивных веществ из трехнедельных культур различных изолятов *Bipolaris sorokiniana*, полученных на различных питательных субстратах

Изолят	Источник метаболитов				
	Культуральная жидкость (мг/л)		Мицелий (мг/л)		Колонизированный субстрат (г/кг)
	ДМГ	ЧАВ	ДМГ	ЧАВ	Перловая крупа
ЛО	130	29	53	55	1.7
БР20	198	41	29	52	1.6
К7	172	39	54	58	0.5
ПК	154	45	46	45	0.8
Среднее	176 ± 42.6*	39 ± 8.0	45 ± 13.7	52 ± 10.3	1.1 ± 0.67
НСР _{0,05}	32		14		0.7

Примечание. *Указано среднее значение и стандартное отклонение.

Таблица 3. Фитотоксическая активность 0.5%-х экстрактов из трехнедельных культур четырех изолятов гриба *Bipolaris sorokiniana* на листовых отрезках пшеницы в зависимости от состава питательного субстрата и повреждения листьев

Субстрат	Источник метаболитов	Фитотоксическая активность (длина некротического пятна, мм)				
		Изолят гриба ⁴				Среднее ⁵
		ЛО	Бр20	К7	ПК	
Неповрежденные листья						
ДМГ	КЖ ¹	5.6	5.0	8.8	9.8	7.3 ^{БВ}
	М ²	0	0	3.0	0	0.8 ^З
ЧАВ	КЖ ¹	8.6	4.8	7.8	6.6	7.0 ^В
	М ²	0	1.4	0	3.4	1.2 ^Ж
Перловая крупа	М ³	4.0	0	6.8	0	2.7 ^Д
Поврежденные листья						
ДМГ	КЖ ¹	9.4	11.2	10.8	10.2	10.4 ^А
	М ²	3.6	0.6	5.6	3.6	3.4 ^{ГД}
ЧАВ	КЖ ¹	10.0	6.8	10.0	6.6	8.4 ^Б
	М ²	5.6	3.4	2.8	6.0	4.5 ^Г
Перловая крупа	М ³	7.2	4.0	10.8	6.6	7.2 ^{БВ}

Примечание. ¹Этилацетатный экстракт культуральной жидкости; ²этилацетатный экстракт, полученный из мицелия; ³этилацетатный экстракт, полученный из колонизированного зернового субстрата; ⁴НСР_{0,05} = 2.5; ⁵средние значения по четырем изолятам гриба, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются на уровне $p = 0.05$.

культивировании на жидких средах различные изоляты гриба показали схожие физиологические показатели по конечному рН, выходу биомассы, а также накоплению экстрактивных веществ. При этом, отметили существенное влияние состава среды на эти показатели: при культивировании на ДМГ уровень рН и выход экстрактивных веществ из КЖ был значительно выше, чем при культивировании на ЧАВ (табл. 1, 2). Заметные различия между изолятами по выходу экстрактивных веществ отметили при культивировании на перловой крупе (табл. 2).

Фитотоксическая активность. Дисперсионный анализ трехфакторного эксперимента показал существенное ($p < 0.001$) влияние изученных факторов на фитотоксическую активность экстрактов: происхождение изолята гриба ($df\ 3, F = 18.9$), субстрат/источник получения метаболитов ($df\ 4, F = 91.7$) и повреждение листьев ($df\ 1, F = 11.4.8$). Эффект их взаимодействия был также существенным за исключением взаимодействия “изолят” х “повреждение” ($df\ 3, F = 0.53, p = 0.66$): независимо от фактора “субстрат/источник метаболитов” экстракты из культур всех изученных изолятов *B. sorokiniana* были примерно в 2 раза более токсичными для пораненных отрезков пшеницы, чем для неповрежденных (табл. 3). Без учета факторов “субстрат/источник метаболитов” и “повреждение” максимальную фитотоксичность продемонстрировали экстракты из культур изолята К7, минимальную – БР20. Без учета повреждения ли-

стьев для всех изученных изолятов *B. sorokiniana* наиболее высокие показатели фитотоксической активности зафиксированы для экстрактов из КЖ на среде ДМГ; при культивировании грибов на ЧАВ и перловой крупе фитотоксичность экстрактов была существенно ниже.

На неповрежденных листовых отрезках пшеницы высокую фитотоксическую активность (длина некроза примерно 7.5–10 мм) проявили экстракты из КЖ изолятов К7 и ПК *B. sorokiniana*, полученных на среде ДМГ, и экстракты из КЖ изолятов ЛО и К7, полученных на среде ЧАВ. Листья пшеницы были нечувствительными или слабо чувствительными к экстрактам из мицелия различных изолятов гриба, полученного на жидких питательных средах. Экстракты из твердофазных культур различных изолятов гриба продемонстрировали низкий уровень фитотоксической активности (длина некроза 0–7 мм); среди них относительно высокую фитотоксичность показал экстракт из культуры изолята К7 (табл. 3).

Поврежденные листовые отрезки пшеницы продемонстрировали высокую чувствительность (длина некрозов 9–11 мм) к экстрактам из КЖ всех изолятов гриба, выращенных на ДМГ, к некоторым экстрактам из КЖ на ЧАВ (изоляты ЛО и К7), а также к экстракту из твердофазной культуры изолята К7. Большинство экстрактов из мицелия различных изолятов *B. sorokiniana*, выращенного на жидких средах, показали относительно низкий (3.6–5.6 мм), но существенно отличаю-

Таблица 4. Инсектицидная активность 0.5%-х экстрактов (1 мг/дм²) из культур четырех изолятов гриба *Bipolaris sorokiniana* в отношении обыкновенной злаковой тли

Субстрат	Источник метаболитов	% смертности тли ⁴				Эффективность ⁵
		ЛО	Бр20	К7	ПК	
ДМГ	КЖ ¹	63.8	42.0	40.0*	44.5	21.0 ^B
	М ²	43.8	27.5	49.4	41.2	30.9 ^A
ЧАВ	КЖ ¹	32.9	43.9	37.4	55.1	30.1 ^A
	М ²	41.3	23.3	38.7	37.4	24.8 ^B
Перловая крупа	М ³	11.3*	20.3*	25.0	8.8*	6.3 ^B

Примечание. ¹Этилацетатный экстракт культуральной жидкости; ²этилацетатный экстракт, полученный из мицелия; ³этилацетатный экстракт, полученный из колонизированного зернового субстрата; ⁴НСР_{0.05} = 7.8, звездочкой отмечены значения, не отличающиеся от показателей соответствующего контроля на уровне $p = 0.05$; ⁵средние значения эффективности экстрактов по четырем изолятам гриба, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются на уровне $p = 0.05$.

щийся от контроля уровень фитотоксической активности (табл. 3).

Экстракты из культур различных изолятов гриба проявили относительно высокую фитотоксическую активность как на поврежденных, так и неповрежденных листьях пшеницы (табл. 3). Способность фитотоксических метаболитов гриба проникать в ткани без повреждения листовой поверхности может указывать на определенный гербицидный потенциал экстрактов из культур *B. sorokiniana*, а также метаболитов, входящих в их состав. Так, биполароксин, образуемый грибами *B. sorokiniana* и *B. synodontis*, обладает селективной фитотоксической активностью в отношении злаковых растений и был предложен для углубленного изучения в качестве природного гербицида (Sugawara et al., 1985; Jahani et al., 2014). С другой стороны, фитотоксины *B. sorokiniana* могут оказывать косвенный эффект на насекомых-фитофагов, поскольку они, быстро убивая растительные клетки, приводят к резкому снижению их питательных свойств.

Инсектицидная активность. Результаты дисперсионного анализа показали существенное влияние ($p < 0.01$) изученных факторов – изолят *B. sorokiniana* (df 3, $F = 9.0$) и субстрат/источник получения метаболитов (df 4, $F = 64.0$), а также взаимодействие этих факторов (df 12, $F = 10.9$) на чувствительность злаковой тли к экстрактам.

Относительно высокой афидоцидной активностью (гибель тли на уровне 42–64% через 24 часа после обработки) обладали экстракты из КЖ изученных изолятов гриба на ДМГ. Максимальный летальный эффект зарегистрирован при тестировании экстракта изолята ЛО *B. sorokiniana*. Инсектицидная активность экстрактов из КЖ на ЧАВ варьировала от 32 до 55%. Смертность тли варьировала от 23 до 49% при использовании экстрактов из мицелия. Минимальной инсектицидной активностью, не отличающейся от контроля (экстракт из неинокулированной перловой крупы),

обладали экстракты из твердофазных культур *B. sorokiniana* (табл. 4).

В контроле (через 24 ч после обработки 5%-м этанолом или экстрактами из неинокулированных питательных субстратов) погибло в среднем 20% особей тли, поэтому рассчитывали также биологическую эффективность экстрактов. Дисперсионный анализ трансформированных данных (поскольку некоторые данные варьировали от 0 до 15%) по биологической эффективности экстрактов показал несущественное влияние фактора происхождения изолята (df 3, $F = 2.5$, $p < 0.07$), но существенное влияние состава субстрата (df 4, $F = 29.6$, $p < 0.01$), а также взаимодействие этих факторов (df 12, $F = 5.1$, $p < 0.01$). В таблице 4 приведены суммарные данные биологической эффективности четырех изолятов *B. sorokiniana* в зависимости от состава субстрата/источника экстракции метаболитов. Они показывают, что относительно высокой (на уровне 30%) биологической эффективностью обладали экстракты из мицелия грибов, полученного на ДМГ, а также экстракты из КЖ на ЧАВ. Существенно меньшей активностью (эффективность на уровне 20–25%) обладали экстракты из КЖ на ДМГ и мицелия, полученного на ЧАВ. Экстракты из твердофазных культур гриба продемонстрировали минимальный уровень биологической эффективности экстрактов в отношении злаковой тли (табл. 4).

Проведен скрининговый эксперимент по определению инсектицидной активности экстрактов из культур различных изолятов *B. sorokiniana* с использованием личинок галлерии путем интрагемоцеллюлярного введения. Изученные экстракты в концентрации 100 мкг/гусеницу не обладали острой токсичностью в отношении галлерии. Однако через 3 недели после введения в гусениц экстрактов из мицелия, полученного на жидких средах, наблюдали задержки развития насекомых: из куколок вышло лишь 40–60% имаго.

Таблица 5. Инсектицидная активность 1%-х экстрактов (10 мкл/личинку) из культур четырех изолятов гриба *Viparolaris sorokiniana* в отношении восковой моли

Субстрат	Источник метаболитов	% вышедших из куколок имаго				Среднее ⁴
		ЛО	Бр20	К7	ПК	
ДМГ	КЖ ¹	100	90	100	100	97.5 ^A
	М ²	40	40	80	90	62.5 ^{BB}
ЧАВ	КЖ ¹	70	80	90	100	85.0 ^B
	М ²	60	40	50	60	52.5 ^B
Перловая крупа	М ³	90	70	80	100	85.0 ^B

Примечание. ¹Этилацетатный экстракт культуральной жидкости; ²этилацетатный экстракт, полученный из мицелия; ³этилацетатный экстракт, полученный из колонизированного зернового субстрата; ⁴средние значения по четырем изолятам гриба, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются на уровне $p = 0.05$.

Корреляции между действием экстрактов из культур *V. sorokiniana* на личинок тли и восковой огневки не обнаружено. Существенной связи между фитотоксичностью экстрактов и чувствительностью злаковой тли к ним также не выявлено. Например, максимальная смертность тли отмечена под воздействием экстрактов из КЖ на ДМГ изолята ЛО *V. sorokiniana*, однако его фитотоксическая активность была средней. При этом, выявлена достоверная обратная корреляция ($r = -0.70$, $p = 0.05$) между фитотоксической активностью экстрактов и их действием на галлерию. Эти данные могут указывать на то, что за инсектицидные и фитотоксические свойства экстрактов отвечают различные вещества.

По данным литературы среди известных метаболитов *V. sorokiniana* явными инсектицидными свойствами обладает стеригматоцистин. Так, по данным Matasyoh с соавт. (2011) этот метаболит оказывал ларвицидные свойства в отношении личинок малярийного комара *Anopheles gambiae* в концентрации 13 мкг/мл (LD_{50}), что было сопоставимо с действием коммерческого пиретроидного препарата pylarvex®. *V. sorokiniana* может накапливать стеригматоцистин как в культуральной жидкости (до 27 мг/л), так на зерновых субстратах (от 20 до 400 мг/кг), однако его образование достигает максимума в течение первых 10 дней культивирования, затем его концентрация снижалась (Rabie et al., 1976; Barnes et al., 1994). Возможно, по этой причине 3-недельные экстракты из твердофазных культур изолятов гриба не проявили инсектицидной активности, потенциально связанной с образованием этого микотоксина.

Оценка цитотоксической активности полученных экстрактов. Дисперсионный анализ продемонстрировал существенное влияние происхождения изолята гриба ($df\ 3$, $F = 22.1$, $p < 0.01$), субстрат/источник получения метаболитов ($df\ 4$, $F = 260.0$, $p < 0.01$), а также их взаимодействия ($df\ 12$, $F = 44.0$, $p < 0.01$) на цитотоксическую активность 0.01%-ных экстрактов в отношении клеток линии Sf9.

Без учета происхождения изолятов, максимальной цитотоксической активностью обладали

экстракты из твердофазных культур *V. sorokiniana*, обработка которыми приводила к практически полной гибели клеток Sf9. Минимальную активность – не превышающую достоверно контроль – показали экстракты из КЖ грибов на среде ДМГ. Слабую (гибель клеток в среднем на уровне 42%), но достоверно отличающуюся от контроля смертность клеток, вызвали экстракты из мицелия, полученного на среде ДМГ. В среднем более высокий, но сильно варьирующий уровень цитотоксичности (от 20 до 100%), продемонстрировали экстракты из КЖ и мицелия *V. sorokiniana*, полученного на среде ЧАВ. При расчете эффективности экстрактов относительно контроля получена схожая картина (табл. 6): эффективность экстрактов из КЖ и мицелия на ЧАВ была на уровне 50%, тогда как экстрактов из твердофазных культур – на уровне 98%.

Максимальной цитотоксической активностью обладали экстракты из КЖ изолята ЛО (полная гибель клеток при концентрации 100 мкг/мл и смертность клеток на уровне $67 \pm 1.5\%$ при концентрации экстракта 25 мкг/мл) и из мицелия изолята ПК, выращенных на среде ЧАВ. Отмечена высокая и примерно одинаковая цитотоксичность экстрактов из твердофазных культур различных изолятов *V. sorokiniana*. Причем, при разбавлении твердофазных экстрактов до концентрации 25 мкг/мл их высокая активность сохранялась практически на неизменном уровне. Чувствительность клеток к экстрактам из КЖ различных изолятов *V. sorokiniana* на ДМГ была низкой и не отличалась существенно от контроля за исключением экстракта из культуры изолята К7 (табл. 6).

Большинство изученных 0.01%-ных экстрактов из культур *V. sorokiniana* проявило слабую (гибель клеток через 180 мин после обработки) и среднюю токсичность (гибель клеток через 30 мин) в отношении клеток инфузории-туфельки. Заметную среднюю и острую токсичность проявили экстракты из КЖ на среде ЧАВ и твердофазные экстракты *V. sorokiniana*, среди которых острой токсичностью в отношении *Paramecium caudatum* обладал экстракт изолята ЛО. Следует

Таблица 6. Цитотоксическая активность 0.01%-х экстрактов из культур четырех изолятов гриба *Bipolaris sorokiniana* на культуре клеток Sf9 (% нежизнеспособных клеток)

Субстрат	Источник метаболитов	Смертность клеток, % ⁴				Эффективность ⁵
		ЛО	Бр20	К7	ПК	
ДМГ	КЖ ¹	20.3*	13.7*	31.7	26.9*	-5.1 ^A
	М ²	47.8	37.2	38.7	45.1	26.3 ^B
ЧАВ	КЖ ¹	100	19.5*	78.2	58.2	54.0 ^B
	М ²	36.9	76.6	28.3*	100	48.0 ^B
Перловая крупа	М ³	100	100	94.5	100	97.9 ^Г

Примечание. ¹Этилацетатный экстракт культуральной жидкости; ²этилацетатный экстракт, полученный из мицелия; ³этилацетатный экстракт, полученный из колонизированного зернового субстрата; ⁴НСР_{0.05} = 9.9, звездочкой отмечены значения, не отличающиеся от показателей соответствующего контроля на уровне $p = 0.05$; ⁵средние значения эффективности экстрактов по четырем изолятам гриба, отмеченные одинаковыми буквами, не различаются на уровне $p = 0.05$.

отметить также, что у изолята К7 большинство экстрактов обладало средним уровнем токсичности (табл. 7).

Клеточную линию Sf9 *Spodoptera frugiperda* часто используют для определения цитотоксической активности микотоксинов и инсектицидных веществ, а также возможных механизмов их действия на насекомых (Veeran et al., 2017; Zhang et al., 2017). Инфузория-туфелька является модельным организмом для токсикологической оценки экологических поллютантов, химических пестицидов, микотоксинов и вторичных метаболитов, образующихся продуцентами биопестицидов (Rao et al., 2006; Altomare et al., 2012). Цитотоксическая активность экстрактов гриба *Bipolaris sorokiniana* в отношении клеток Sf9 и инфузорий выявлена нами впервые.

Анализ данных по цитотоксичности экстрактов *B. sorokiniana* показал, что она существенно зависит от состава питательного субстрата и изолята гриба. Особенно высокий уровень токсичности продемонстрировали экстракты из твердофазных культур гриба в пределах концентраций 25–100 мкг/мл. Микотоксин фумонизин в концентрации 100 мкг/мл вызывал гибель лишь 30% клеток Sf9 (Zhang et al., 2017). Экстракты энтомопа-

тогенного гриба *Metarhizium anisopliae* V275, содержащие деструксины, не обладали цитотоксичностью в отношении этих клеток даже в концентрации 500 мкг/мл (Skrobek, Butt, 2005). Активность экстрактов из культур энтомопатогенов из родов *Hypocrella* и *Aschersonia* зависела от вида гриба, изолята и состава питательной среды. Экстракты из культур примерно 25% изолятов этих микромицетов проявили цитотоксическую активность на уровне 100 мкг/мл (Watts et al., 2003). Таким образом, экстракты из твердофазных культур *B. sorokiniana* демонстрируют высокий уровень цитотоксической активности в отношении клеток кукурузной лиственной совки. Такими свойствами могут обладать, например, соединения из группы кохлиохинонов, которые обнаружены у грибов рода *Bipolaris* и обладают высокой активностью (некоторые из них – на уровне цисплатина) в отношении различных линий опухолевых клеток человека (Lim et al., 1998; Wang et al., 2016).

Культуральная жидкость некоторых токсигенных грибов, например, *Stachybotris chartarum* может быть резко токсичной для инфузории-туфельки (Elanskiy et al., 2004). Вторичные метаболиты энтомопатогенных грибов из родов *Beauveria* и *Metarhizium* (деструксины, ооспореин) были слаботоксичны для парамеций при концентрации более 100 мкг/мл (Altomare et al., 2012). ЛД₅₀ высокомолекулярного фосфорорганического пестицида монокротофоса через 10 мин и 2 ч после обработки составила 60 и 40 мкг/мл технического препарата (Rao et al., 2007). Несмотря на преимущественно слабый и средний уровень токсичности экстрактов из культур *B. sorokiniana* в отношении инфузорий, при очистке экстрактов могут быть получены индивидуальные соединения, которые могут продемонстрировать существенно более высокий уровень цитотоксической токсичности для простейших. С учетом информации, что пораженное этим грибом зерно пшеницы может накапливать микотоксин стеригматоцистин (Sęgiełko et al., 2018), полученные нами данные могут

Таблица 7. Цитотоксическая активность 0.01%-х экстрактов из культур четырех изолятов гриба *Bipolaris sorokiniana* в отношении *Paramecium caudatum*

Субстрат	Источник метаболитов	Период для гибели 100% клеток, мин			
		ЛО	Бр20	К7	ПК
ДМГ	КЖ ¹	180	180	30	180
	М ²	180	180	30	180
ЧАВ	КЖ ¹	3	30	30	30
	М ²	180	180	30	180
Перловая крупа	М ³	30	30	180	30

быть важны для дальнейшего изучения экотоксикологии метаболитов *B. sorokiniana*.

Интересно отметить, что цитотоксическая активность экстрактов на клетках Sf9 отрицательно коррелировала с их фитотоксической активностью на поврежденных отрезках пшеницы (на уровне $r = -0.71$ при $p = 0.05$). Связи между цитотоксической активностью на клетках Sf9 и клетках инфузорий не обнаружено. Следует подчеркнуть относительно слабую цитотоксичность экстрактов из культур различных изолятов *B. sorokiniana* на среде ДМГ, которые проявили высокую фитотоксическую активность, по отношению к экстрактам из культур этих грибов на ЧАВ или перловой крупе.

Анализ данных методом главных компонент продемонстрировал сильное влияние состава субстрата и источника выделения (культуральная жидкость или мицелий) на биологическую активность изученных экстрактов без серьезной связи с происхождением изолятов *B. sorokiniana* (рис. 1). Так, экстракты из КЖ различных изолятов гриба на среде ДМГ обладали селективной фитотоксической активностью и образовывали отдельную группу. Вместе группировались экстракты из мицелия различных изолятов *B. sorokiniana*: они проявили умеренную фитотоксическую активность (на поврежденных листовых отрезках пшеницы) и цитотоксичность (на клетках линии Sf9) и, при этом, заметный уровень инсектицидной активности. Экстракты грибов из твердофазных культур на перловой крупе также выделились в отдельную группу: они проявили высокую цитотоксическую активность в отношении клеток Sf9 (рис. 1). Как уже упоминалось выше, в литературе практически нет данных по влиянию состава субстрата на биологическую активность экстрактов и образование индивидуальных метаболитов *B. sorokiniana*, и представленная работа может служить базой для таких исследований.

Таким образом, экстракты из культур *B. sorokiniana*, независимо от географического происхождения изолятов, обладают широким спектром биологической активности. Однако на их активность существенное влияние оказывал состав питательного субстрата. Обнаруженные нами инсектицидные свойства метаболитов этого гриба объясняют его высокую конкурентную способность за растительный субстрат и расширяют потенциальные возможности его практического применения как продуцента биологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-01445), государственной программы “Провести фундаментальные исследования по химической экологии грибов филлосферы и оценить их биотехнологический потенциал как продуцентов новых биорациональных пестицидов” № 0665-2019-0025 (АААА-А16-116080510099-8) и субсидии Санкт-Петербурга на проведение науч-

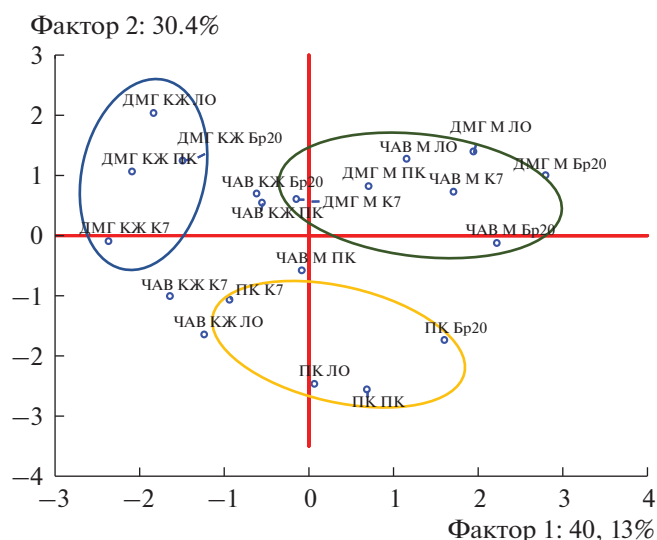


Рис. 1. Анализ биологической активности экстрактов четырех изолятов *Bipolaris sorokiniana* методом главных компонент. ПК – перловая крупа; остальные окрашивания – см. табл. 3–6.

ных исследований и разработок в области сельского хозяйства в 2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berestetskiy A.O., Grigoryeva E.N., Petrova M.O., Stepanycheva E.A. Insecticidal and phytotoxic activity of extracts from cultures of some cereal pathogens. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2018. V. 52 (6). 408–419 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026364818060037>
- Berestetskiy A.O., Inyusheva V.V., Petrova M.O., Sokornova S.V., Stepanycheva E.A. Insecticidal, acaricidal, and cytotoxic activity of extracts from some phyllosphere fungi and soil hypocrealean micromycetes. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2019. V. 53 (1). P. 17–25 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0026364819010033>
- Berestetskiy A.O., Gasich E.L., Poluektova E.V., Nikolaeva E.V., Sokornova S.V., Khlopunova L.B. Biological activity of fungi from the phyllosphere of weeds and wild herbaceous plants. *Microbiology*. 2014. V. 83 (5). P. 523–530 (in Russ.).
- Berestetskiy A.O., Kurlenya A.S. Antimicrobial properties of some phytopathogenic micromycetes. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2014. V. 48 (2). P. 123–134 (in Russ.).
- Ali L., Khan A.L., Hussain J., Al-Harrasi A., Waqas M., Kang S.-M., Al-Rawahi A., Lee I.-J. Sorokinol: a new enzymes inhibitory metabolite from fungal endophyte *Bipolaris sorokiniana* LK12. *BMC Microbiology*. 2016. V. 16. P. 103. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0722-7>
- Altomare C., Pernfuss B., Strasser H. Assessing potential cytotoxicity of biocontrol microorganisms using invertebrate assays beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment. In: I. Sundh, A. Wilcks, M.S. Goettel (eds.). *Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: Safety assessment and regulation*. Wallingford, CAB International, 2012. P. 240–255.
- Barnes S.E., Dola T.P., Bennett J.W., Bhatnagar D. Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by

- species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. Mycopathologia. 1994. V. 125. P. 173–178.
<https://doi.org/10.1007/BF01146523>
- Bashyal B.M., Chand R., Kushwaha C., Sen D., Prasad L.C., Joshi A. K. Association of melanin content with conidogenesis in *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.). World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 309–316.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0177-1>
- Bengyella L., Iftikhar S., Nawaz K., Fonmboh D.J., Yekwa E.L., Jones R.C., Njanu N.M.T., Roy P. Biotechnological application of endophytic filamentous *Bipolaris* and *Curvularia*: a review on bioeconomy impact. World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2644-7>
- Biedermann P.H.W., de Fine Licht H.H., Rohlf M. Evolutionary chemo-ecology of insect-fungus interactions: Still in its infancy but advancing. Fungal Ecol. 2019. V. 38. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.010>
- Cegiełko M., Kiecana I., Mielniczuk E., Waskiewicz A., Bocianowski J. The influence of spring barley grain (*Hordeum vulgare* L.) infection by *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. on the leaf infection and grain contamination by sterigmatocystin. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2018. V. 17. P. 149–166.
<https://doi.org/10.24326/asphc.2018.2.13>
- Cimmino A., Andolfi A., Avolio F., Ali A., Tabanca N., Khan I.A., Evidente A. Cyclopaldic acid, seiridin, and sphaeropsidin A as fungal phytotoxins, and larvicidal and biting deterrents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): structure-activity relationships. Chem. Biodivers. 2013. V. 10. P. 1239–1251.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201200358>
- Cimmino A., Evidente M., Masi M., Ali A., Tabanca N., Khan I.A., Evidente A. Papyracillic acid and its derivatives as biting deterrents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): structure-activity relationships. Medical Chem. Res. 2015. V. 24. P. 3981–3989.
<https://doi.org/10.1007/s00044-015-1439-0>
- Fleming R., Retnakaran A. Evaluating single treatment data using Abbott's formula with reference to insecticides. J. Economic Entomol. 1985. V. 78. P. 1179–1181.
<https://doi.org/10.1093/jee/78.6.1179>
- Gupta P.K., Vasistha N.K., Aggarwal R., Joshi A.K. Biology of *Bipolaris sorokiniana* (syn. *Cochliobolus sativus*) in genomics Era. J. Plant Biochem. Biotechnol. 2018. V. 27. P. 123–138.
<https://doi.org/10.1007/s13562-017-0426-6>
- Hesseltine C.W., Ellis J. J., Shotwell O.L. Secondary metabolites, Southern leaf blight of corn, and biology. Agric. Food Chem. 1971. V. 19. P. 707–717.
<https://doi.org/10.1021/jf60176a020>
- Ignasiak K., Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. BMC Res Notes. 2017. V. 10.
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2757-8>
- Jahani M., Aggarwal R., Gupta S., Sharma S., Dureja P. Purification and characterization of a novel toxin from *Bipolaris sorokiniana*, causing spot blotch of wheat and analysis of variability in the pathogen. Cereal Res. Comm. 2014. V. 42. P. 252–261.
<https://doi.org/10.1556/CRC.2013.0053>
- Kachlicki P. Metabolites of *Helminthosporia*. In: J. Chelkowski (ed.). *Helminthosporia* Metabolites, Biology Plant Diseases. *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserophilum*, Institute of Plant Genetics, Poznan, 1995. P. 1–26.
- Khiralla A., Spina R., Saliba S., Laurain-Mattar D. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. Fungal Biol. Rev. 2019. V. 33. P. 101–122.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.09.002>
- Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Mol. Plant. Pathol. 2002. V. 1. P. 185–195.
<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00120.x>
- Lim C.-H., Miyagawa H., Akamatsu M., Nakagawa Y., Ueno T. Structures and biological activities of phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis* cynA. J. Pesticide Sci. 1998. V. 23. P. 281–288.
<https://doi.org/10.1584/jpestics.23.281>
- Luke H.H., Gracen V.E. *Helminthosporium* Toxins. In: S. Kadis, A. Ciegler, S.J. Ajl (eds.). Fungal Toxins. Academic Press, N.Y., 1972. P. 139–168.
- Maes C.M., Steyn P.S. Polyketide-derived fungal metabolites from *Bipolaris sorokiniana* and their significance in the biosynthesis of sterigmatocystin and aflatoxin B1. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. P. 1137–1140.
<https://doi.org/10.1039/P19840001137>
- Manamgoda D.S., Rossman A.Y., Castlebury L.A., Crous P.W., Madrid H., Chukeatirote E., Hyde K.D. The genus *Bipolaris*. Stud. Mycol. 2014. V. 79. P. 221–288.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Matasyoh J.C., Dittrich B., Schueffler A., Laatsch H. Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospora* sp. against the malaria vector *Anopheles gambiae*. Parasitol. Res. 2011. V. 108. P. 561–566.
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-2098-1>
- Pena-Rodriguez L.M., Armingeon N.A., Chilton W.S. Toxins from weed pathogens. I. Phytotoxins from a *Bipolaris* pathogen of Johnson grass. J. Nat. Prod. 1988. V. 51. P. 821–828.
<https://doi.org/10.1021/np50059a001>
- Poluektova E.V., Berestetskiy A.O. Fungi of the genus *Colletotrichum* as a source for biologically active compounds and bioherbicides. Mikologiya i fitopatologiya. 2018. V. 52 (6). P. 367–381 (in Russ.).
<https://doi.org/10.1134/S0026364818060074>
- Poluektova E.V., Berestetskiy A.O. Secondary metabolites of the fungi belonging to the genus *Phoma*: structure, activity, and practical value. Mikologiya i fitopatologiya. 2013. V. 47 (5). P. 281–289 (in Russ.).
- Pringle R.B. Comparative biochemistry of the phytopathogenic fungus *Helminthosporium*. XVI. The production of victoxinine by *H. sativum* and *H. victoriae*. Can. J. Biochem. 1976. V. 54. P. 783–787.
<https://doi.org/10.1139/o76-112>
- Qader M.M., Kumar N.S., Jayasinghe L., Araya H., Fujimoto Y. Bioactive sesquiterpenes from an endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* isolated from a popular medicinal plant *Costus speciosus*. Mycology. 2017. V. 8. P. 17–20.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1269844>
- Rabie C.J., Lubben A.L., Steyn M. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. App. Environ. Microbiol. 1976. V. 32. P. 206–208.
- Rao J.V., Gunda V.G., Srikanth K., Arepalli S.K. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming be-

- haviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ. Chem.* 2007. V. 89. P. 307–317.
<https://doi.org/10.1080/02772240601010071>
- Rao V.J., Srikanth K., Arepalli S.K., Gunda V.G. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2006. V. 86. P. 131–137.
<https://doi.org/10.1080/02772240601010071>
- Skrobek A., Butt T.M. Toxicity testing of destruxins and crude extracts from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 251. P. 23–28.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.029>
- Sugawara F., Strobel G., Fisher L.E., van Duyne G.D., Clardy J. Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 8291–8294.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.24.8291>
- Veeran S., Shu B., Cui G., Fu S., Zhong G. Curcumin induces autophagic cell death in *Spodoptera frugiperda* cells. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2017. V. 139. P. 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.004>
- Wang M., Sun Z.-H., Chen Y.-C., Liu H.-X., Li H.-H., Tan G.-H., Li S.-N., Guo X.-L., Zhang W.-M. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. *Fitoterapia.* 2016. V. 110. P. 77–82.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.02.005>
- Watts P., Kittakoop P., Veeranondha S., Wanasith S., Thongwichian R., Saisaha P., Intamas S., Hywel-Jones N.L. Cytotoxicity against insect cells of entomopathogenic fungi of the genera *Hypocrella* (anamorph *Aschersonia*): possible agents for biological control. *Mycol. Res.* 2003. V. 107. P. 581–586.
<https://doi.org/10.1017/S0953756203007846>
- Wildermuth G.B. Geographic distribution of common root rot and *Bipolaris sorokiniana* in Queensland wheat soils. *Australian J. Exp. Agric.* 1986. V. 26. N 5. P. 601–606.
<https://doi.org/10.1071/EA9860601>
- Zhang H., Zhang L., Diao X., Li N., Liu C. Toxicity of the mycotoxin fumonisin B1 on the insect Sf9 cell line. *Toxicol. Environ. Chem.* 2017. V. 129. P. 20–27.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.01.018>
- Берестецкий А.О., Григорьева Е.Н., Петрова М.О., Степанычева Е.А. (Berestetskiy et al.) Инсектицидные и фитотоксические свойства экстрактов из культур некоторых патогенов злаков // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 6. С. 408–419.
- Берестецкий А.О., Инюшева В.В., Петрова М.О., Сокорнова С.В., Степанычева Е.А. (Berestetskiy et al.) Инсектицидная, акарицидная и цитотоксическая активность экстрактов некоторых грибов филлосферы и почвенных гипокрейнных микромицетов // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 1. С. 17–25.
- Берестецкий А.О., Гасич Е.Л., Полуэктова Е.В., Николаева Е.В., Сокорнова С.В., Хлопунова Л.Б. (Berestetskiy et al.) Биологическая активность грибов филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений // Микробиология. 2014. Т. 83. № 5. С. 534–542.
- Берестецкий А.О., Курленя А.С. (Berestetskiy, Kurlenya) Антимикробные свойства некоторых фитопатогенных микромицетов // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. № 2. С. 123–134.
- Еланский С.Н., Петрунина Я.В., Лаврова О.И., Лихачев А.Н. (Elanskiy et al.) Сравнительный анализ российских штаммов *Stachybotrys chartarum* // Микробиология. 2004. Т. 73. № 1. С. 73–79.
- Полуэктова Е.В., Берестецкий А.О. (Poluektova, Berestetskiy) Вторичные метаболиты грибов рода *Phoma*: структура, активность и практическое значение // Микология и фитопатология, 2013. Т. 47. № 5. С. 281–289.
- Полуэктова Е.В., Берестецкий А.О. (Poluektova, Berestetskiy) Грибы рода *Colletotrichum* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 6. С. 367–381.

Spectrum of Biological Activity of Extracts from Cultures of Distinct Isolates of *Bipolaris sorokiniana* Produced at Different Media

A. O. Berestetskiy^{a, #}, E. N. Grigoryeva^a, M. O. Petrova^a, I. V. Senderskiy^a, and E. A. Stepanycheva^a

^a All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg 196608, Russian Federation

[#] e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Bipolaris sorokiniana is circumglobally distributed root and leaf pathogen of cereals and grasses. It can grow both endo- and epiphytically, and survives in the soil as well. The chemical mechanisms of such a good persistence of the fungus were poorly studied. In the presented research, biological (phytotoxic, antimicrobial, insecticidal, and cytotoxic) activity of extracts from cultures of four *B. sorokiniana* of distinct geographical origin produced on three different media was evaluated. Media composition and, at lesser extent, isolate origin affected yield of extractive matter, spectrum and level of biological activity of extracts. Extracts from liquid culture mycelium demonstrated relatively high insecticidal activity to wheat aphid and galleria while extracts from solid cultures were highly cytotoxic to Sf9 cell line. Phytotoxic activity was the most pronounced in extracts from culture liquids. No correlation was found between phytotoxic and insecticidal or cytotoxic activity of extracts indicating possible production of insecticidal metabolites by *B. sorokiniana* isolates. Revealed insecticidal properties of the fungal metabolites could explain its high competition activity for plant substrate and broaden the biotechnological potential *B. sorokiniana* of as a producer of bioactive compounds.

Keywords: *Bipolaris sorokiniana*, biological activity, ecology of microorganisms, extracts, insecticidal properties, secondary metabolites