ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 3, с. 264–270

УДК 577.13

БИОСИНТЕЗ ПРОТОИЛЛУДЕНОВЫХ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ АРИЛЬНЫХ ЭФИРОВ СИБИРСКИМИ ШТАММАМИ ГРИБОВ РОДА *Armillaria*

© 2019 г. В. П. Желифонова[1], Т. В. Антипова[1], Е. А. Литвинова[2, 3], Б. П. Баскунов[1], Ю. А. Литовка[2, 3], И. Н. Павлов[2], А. Г. Козловский[1, *]

[1]*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, 142290, Россия*

[2]*Институт леса им. В.Н. Сукачёва СО РАН, Красноярск, 660036, Россия*

[3]*Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 660049, Россия*

**e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru*

Поступила в редакцию 29.09.2018 г.
После доработки 19.11.2018 г.
Принята к публикации 18.12.2018 г.

Изучен состав вторичных метаболитов у базидиальных грибов *Armillaria borealis* Marxm. и Korhonen, *A. cepistipes* Velen., *A. gallica* Marxm., *A. ostoyae* (Romagn.) Herink и *A. sinapina* Bérubé и Dessur, выделенных на территории Южной Сибири (Красноярский край и Республика Тыва) и Дальнего Востока (Сихотэ-Алинь). У видов *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* идентифицированы метаболиты, относящиеся к классу протоиллуденовых сесквитерпеновых арильных эфиров к группе меллеолидов. У штаммов отмечены различия спектров синтезируемых меллеолидов. *A. borealis* штамм 74г синтезировал более широкий спектр меллеолидов по сравнению с другими представителями этого вида: меллеолиды B, C, D и H, мелледоналы B и C, 5'-O-метилмелледонал, 13-гидрокси-5'-O-метилмелледонал и армилларинин. Состав среды влиял на количество синтезированных метаболитов. Все изученные штаммы, синтезирующие меллеолиды, проявляли токсикогенное и фитопатогенное действие по отношению к семенам и сеянцам *Picea abies* (L.) H. Karst. и *Abies sibirica* Ledeb, ингибируя энергию прорастания, лабораторную и грунтовую всхожесть, а также развитие корневой системы сеянцев хвойных. Максимальную ингибирующую активность проявляла культуральная жидкость *A. borealis* 74г, отличающаяся наибольшим количеством и разнообразием меллеолидов в профиле метаболома.

Ключевые слова: виды *Armillaria*, протоиллуденовые сесквитерпеновые арильные эфиры, меллеолиды

DOI: 10.1134/S0555109919030152

Комплекс грибов *Armillaria mellea* sensu lato объединяет свыше 40 видов, существенно различающихся по фитопатогенным свойствам. Высоко агрессивные корневые патогены (*A. solidipes* Peck, *A. mellea* (Vahl) P. Kumm. и *A. sinapina*) поражают широкий круг растений-хозяев, включая древесные насаждения (*Abies*, *Picea*, *Pinus* и *Pseudotsuga*) и агрономические посевы, нанося значительный экономический ущерб. Куртинное усыхание деревьев при воздействии *Armillaria* протекает стремительно и, как правило, без предварительного ослабления древостоя. Вирулентность грибов этого рода связывают с наличием у них мощных ферментных систем, активно разлагающих биополимеры древесины. Обсуждается также роль в патогенезе протоиллуденовых сесквитерпеновых арильных эфиров, продуцируемых *Armillaria* [1].

В настоящее время известно около 60 структур протоиллуденовых сесквитерпеновых арильных эфиров, которые различаются положением двойных связей и функциональных групп в молекулах [2]. Следует отметить, что у одного изолята гриба, как правило, присутствует не более 10 соединений, а их состав у представителей одного вида различается. Однако единичны работы по изучению видовой принадлежности изолятов, географического места их выделения, спектра метаболитов и биологической активности [3].

Известно, что некоторые виды (*A. gallica*, *A. mellea* и *A. ostoyae*) широко распространены в лесных древостоях Северного полушария. Ареал *A. borealis* ограничен преимущественно Центральной Европой и Китаем, в то время, как вид *A. sinapina* встречается повсеместно за исключением Центральной Европы [1]. Данные о видах *Armillaria*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке, до настоящего времени широко не обсуждались в за-

рубежной литературе, вследствие отсутствия их генетической верификации.

На территории Южной Сибири (Красноярский край и Республика Тыва) и части Дальнего Востока (Сихотэ-Алинь) комплекс *Armillaria mellea* sensu lato представлен несколькими видами (*A. borealis*, *A. calvescens, A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. ostoyae* и *A. sinapina*). Абсолютное доминирование вида *A. borealis* выявлено в лесах Красноярского края на площади, ограниченной с севера 58° с.ш., с юга – 52° с.ш. [4, 5]. Сведения об образовании протоиллуденовых сесквитерпеновых арильных эфиров сибирскими штаммами *Armillaria* отсутствуют.

Цель работы – изучение вторичных метаболитов, токсикогенности и фитопатогенности у 11 штаммов *Armillaria*, включающих виды *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. ostoyae* и *A. sinapina*, выделенные на территории Южной Сибири и Дальнего Востока в 2009–2016 гг.

МЕТОДИКА

Штаммы грибов и условия выращивания. Объектами исследования служили сибирские штаммы грибов рода *Armillaria* из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачёва СО РАН (Россия), включающие – *A. borealis* Marxm и Korhonen 206г, 74г, 111 и D48/14, *A. cepistipes* Velen. 27D и 73/8, *A. gallica* Marxm. 6D и 22/12, *A. ostoyae* (Romagn.) Herink 26D и *A. sinapina* Bérubé и Dessur S3-16 и A2-16. Штаммы были изолированы из плодовых тел и базидиоспор *Armillaria,* а также из пораженной древесины, и выращены на селективных питательных средах методами, описанными в работах [6–8].

Видовая идентификация была установлена в результате скрещивания моноспоровых культур с тестерами европейских и китайских видов, а также подтверждена секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF-lalpha с использованием оборудования ЦКП "Инновационные технологии защиты растений" Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург-Пушкин, Россия) и ЦКП "Геномика" Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

При изучении продукции вторичных метаболитов штаммы культивировали глубинно в колбах (750 мл) со 100 мл среды на шейкере (220 об/мин) в течение 21 сут при 24°С. При скрининге использовали синтетическую среду Норкранс (**НРК**), содержащую (г/л дистиллированной воды): глюкоза – 10.0, аммоний виннокислый – 1.0, K_2HPO_4 – 1.0, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.5, железо лимоннокислое – 0.005, $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 0.004, $CaCl_2$ – 0.056, тиамин – 0.04, pH 6.5 [9]. Для сравнения биосинтетической способности штаммов использовали органно-минеральную среду (**2**), содержащую (г/л дистиллированной воды): глюкозу – 10.0, пептон – 5.0, KH_2PO_4 – 0.3, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 1.0), pH 5.6 [10], и глюкозо-картофельную среду (**3**). Среды засевали суспензией мицелия, снятого с 14-суточных культур, выращенных на скошенном МА.

Выделение, идентификация и количественное определение вторичных метаболитов. Вторичные метаболиты извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией хлороформом при pH 3.0. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля Silica gel F_{254} ("Merck", Германия) в системах хлороформ-метанол-25%-ный аммиак (90 : 10 : 0.1) и хлороформ-ацетон (93 : 7). Метаболиты обнаруживали по поглощению и флуоресценции при 254 и 366 нм и после опрыскивания пластин 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле и 5%-ным раствором $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ в метаноле. Метаболиты выделяли с помощью препаративной ТСХ на пластинках силикагеля Silica gel F_{254} ("Merck", Германия) в системах растворителей. Идентификацию выделенных метаболитов осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками [11] и базами данных (http://www.hmdb.ca/metabolites). Подробную информацию о структуре соединений получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40%.

УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A ("Shimadzu", Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX ("Thermo Finnigan", Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации при атмосферном давлении.

Анализ суммарного содержания меллеолидов в экстрактах определяли полуколичественно с помощью ТСХ и спектрофотометрически в метаноле при 303 нм. Расчет проводили, используя коэффициент молярной экстинкции меллеолида С ($\varepsilon = 6300$) [11].

Определение фитотоксической и фитопатогенной активности. Фитотоксическую активность штаммов изучали стандартными методами [7], используя в качестве биотестов семена и проростки *Picea abies* и *Abies sibirica*. Фильтрат культуральной жидкости получали из 21-сут культур на среде НРК путем асептической фильтрации жидкости через мембранные фильтры с размерами пор 0.45 мкм (Владипор МФАС-ОС-2, Россия).

Фитопатогенность *Armillaria* оценивали на двух тест-объектах. При проведении 1 теста семена *Picea abies* проращивали на стерильной ватно-марлевой подложке, размещенной на слое ча-

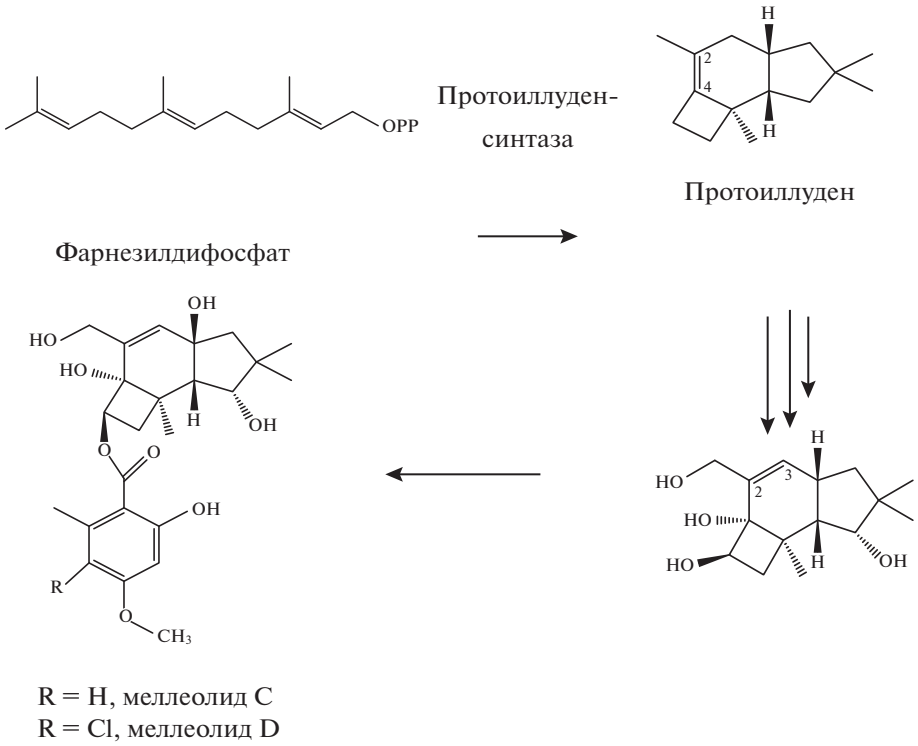

Рис. 1. Схема биосинтеза меллеолидов [13].

стично прогруженной в среду НРК стерильной (контроль) щепы и щепы, предварительно инокулированной грибами *Armillaria*. Тест продолжался в течение 24 сут при 25°С и 12 ч фотопериоде. Для 2 теста семена *Abies sibirica* высевали в контейнеры на поверхность стерильного песка, размещенного над стерильной (контроль) и инокулированной *Armillaria* щепой. Растения инкубировали в течение 3 мес. при 25°С и 12 ч фотопериоде. Оценивали следующие основные показатели: энергию прорастания семян (%), лабораторную и грунтовую всхожесть семян (%), послевсходовую гибель сеянцев (%) и морфометрические показатели растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг вторичных метаболитов у штаммов *Armillaria* проводили на среде НРК, которая обычно применяется для выращивания базидиомицетов [9]. Он показал, что грибы видов *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* синтезировали вторичные метаболиты, которые различались по хроматографической подвижности, поглощали УФ-свет и реагировали с 5%-ным раствором $FeCl_3$ в метаноле и 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле. УФ-спектры выделенных соединений содержали максимальное значение полос поглощения при 216, 263 и 302–304 нм, что указывало на наличие общего структурного ядра в молекулах в виде гидроксилированного ароматического кольца. Все штаммы синтезировали метаболит **1**, который образовывал молекулярный ион 447 $[M-H]^-$. В его МС/МС спектре наблюдали фрагментарный ион, который создавался при расщеплении сложной эфирной связи, что свидетельствовало о наличии 2-гидрокси-4-метокси-6-метилбензоата с *m/z* 181 $[C_9H_9O_4]$. У всех штаммов был обнаружен также метаболит **2**, с молекулярным ионом 481 $[M-H]^-$, который содержал атом хлора с изотопным распределением интенсивностей 3 : 1. В МС/МС спектре метаболита 2 наблюдали фрагментный ион *m/z* 215, также содержащий атом хлора. Этот фрагмент соответствовал 3-хлоро-6-гидрокси-4-метокси-2-метилбензоату. На основе литературных данных эти метаболиты были идентифицированы как меллеолид С и его хлорпроизводное меллеолид D (рис. 1) [11].

Другие штаммы, кроме *A. borealis* 111 и *A. sinapina* A2/16 синтезировали метаболиты **3** и **4** с молекулярными массами 432 и 466 Да, которые также давали фрагментарные ионы *m/z* 181 и *m/z* 215 соответственно. На основе базы данных эти метаболиты были идентифицированы как меллеолид В и его хлорпроизводное мелледонал В. У трех штаммов *A. borealis* 74г, 206г и D48/14 были обнаружены метаболиты **5** и **6** с массами 446 и 480 Да, идентифицированные как 5'-О-метилмелледонал и его хлорпроизводное мелледонал С (табл. 1). Штамм 74г синтезировал также метаболиты **7**, **8** и

Таблица 1. Масс-спектрометрические характеристики выделенных метаболитов

№	Тривиальные названия структур метаболитов	Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС спектрах (% интенсивности) $[M-H]^-$
1	Меллеолид B	23/431(99), 181(100), 137(5)
2	Мелледонал B	23/465(100), 215(55)
3	Меллеолид C	23/447(70), 181(100), 137(8)
4	Меллеолид D	22/481(100), 215(67), 171(12)
5	Мелледонал C	23/479(100), 281(17), 215(94), 171 (5)
6	5'-O-метилмелледонал	22/445(100), 281(40), 181(62), 137(6)
7	Меллеолид H (= армилларигин)	22/429(100), 181(75)
8	13-гидрокси-5'-O-метилмелледонал	23/461(84), 181(100), 137(5)
9	Армилларинин	22/463(100), 215(25)

9 с молекулярными массами 430, 462 и 464 Да, которые соответствовали меллеолиду H, 13-гидрокси-5'-O-метилмелледоналу и армилларинину (табл. 1). Следует отметить, что штамм 74г являлся наиболее активным продуцентом меллеолидов. У видов *A. gallica* и *A. ostoyae* не были обнаружены соединения, идентифицированные у других видов.

По структуре метаболиты, идентифицированные у видов *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina*, относились к группе трициклических сесквитерпеновых арильных эфиров – меллеолидов. Их отличительной особенностью являлось наличие протоилуденнового ядра, связанного эфирной связью с замещенным ароматическим кольцом орселиновой кислоты. Биосинтез прототоиллудена начинался с циклизации универсального предшественника сесквитерпеноидов – фарнезилдифосфата (рис. 1). Эта реакция катализируется протоиллуденсинтазой Pro 1 [12]. Продукт реакции 6-протоиллуден имел двойную связь между $\Delta^{2,3}$ атомами углерода. Далее протоиллуден с помощью цитохром P450-зависимой монооксигеназы изомеризовался в продукт с двойной связью между $\Delta^{2,4}$ атомами углерода. В образовании орселиновой кислоты принимает участие синтаза орселиновой кислоты ArmB [13]. Известно, что у многих микроорганизмов в качестве вторичных метаболитов синтезируются орселиновая кислота и ее производные, а протоиллуданы встречаются у гомобазидиомицетов. Уникальная способность связывать эти два строительных блока посредством этерификации была обнаружена только у грибов рода *Armillaria* [14].

Комбинация таких биосинтетических процессов, как гидроксилирование в различных положениях сесквитерпена, окисление первичного спирта при C-1 до альдегида или карбоксильной группы, сдвиг или восстановление двойной связи циклогексена, образование метилового эфира при O-5' и хлорирование при C-6' приводит к образованию около 60 различающихся структурных вариантов молекул [2, 3].

Было обнаружено, что у всех сибирских штаммов видов *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* преобладали меллеолид C и его хлорпроизводное меллеолид D, а остальные соединения присутствовали в незначительных количествах. Это совпадало с данными, полученными при изучении спектров меллеолидов у видов *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. mellea* и *A. ostoyae*, выделенных в Северной Америке и Западной Европе [3].

У сибирских изолятов были обнаружены штаммовые различия в спектре меллеолидов (табл. 2). Так, у трех из четырех изученных штаммов *A. borealis* спектр меллеолидов различался. Наиболее разнообразные по структуре соединения обнаружены у штамма *A. borealis* 74г. Отсутствие меллеолидов у изученных штаммов *A. gallica* и *A. ostoyae*, вероятно, связанно с трудностями их идентификации вследствие низкого уровня накопления в среде. Известно, что грибы этих видов синтезируют меллеолиды, но североамериканские штаммы *A. ostoyae* отличаются их низкой продукцией [3].

Изучение биосинтеза меллеолидов штаммами *A. borealis* 74г и D48/14 при росте на трех питательных средах показало, что состав среды влиял на количество синтезированных метаболитов. Их концентрация на органоминеральной среде 2 оказалась выше в 2 раза по сравнению с другими изученными средами (рис. 2). Можно предположить, что входящий в состав этой среды пептон способствовал активному функционированию биосинтетического пути, ведущего к образованию сесквитерпеновых арильных эфиров. Однако штаммы различались по биосинтетической активности и независимо от состава среды. Так, *A. borealis* 74г был более активным продуцентом меллеолидов, чем *A. borealis* D48/14 (рис. 2).

При изучении влияния состава питательной среды на биосинтез меллеолидов *A. borealis* 74г и D48/14 было обнаружено, что спектр синтезированных метаболитов не изменялся, но содержал разное соотношение меллеолидов. Если на среде

Таблица 2. Вторичные метаболиты сибирских штаммов рода *Armillaria*

Вид	Штамм	Идентифицированные вторичные метаболиты
A. borealis	74г	Меллеолиды B, C, D, H, мелледоналы B и C, 5'-O-метилмелледонал, 13-гидрокси-5'-O-метилмелледонал, армилларинин
	111	Меллеолиды C и D
	206г	Меллеолиды B, C, D, мелледоналы B и C, 5'-O-метилмелледонал
	D48/14	Меллеолиды B, C, D, мелледоналы B и C, 5'-O-метилмелледонал
A. cepistipes	27D, 73/8	Меллеолиды B, C, D, мелледонал B
A. sinapina	S3-16	Меллеолиды B, C, D, мелледонал B
	A2/16	Меллеолиды C и D

НРК у штаммов основными метаболитами были меллеолиды C и D, то у *A. borealis* 74г на органоминеральной среде 2 преобладал мелледонал B, а на среде 3 – меллеолид C. У штамма *A. borealis* D48/14 на средах 2 и 3 доминировали 5'-O-метилмелледонал и меллеолид D соответственно. Таким образом, состав среды оказывал и регуляторное влияние на синтез меллеолидов.

Изучение фитотоксичности метаболитов *Armillaria* показало, что все изученные меллеолид-синтезирующие штаммы *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* проявляли токсикогенное действие по отношению к семенам и проросткам *P. abies* с различной степенью интенсивности (табл. 3). На фоне незначительного снижения лабораторной всхожести (в среднем в 1.2 раза по сравнению с контролем) наблюдали пролонгированное действие биологически активных соединений по отношению к корневой системе. Так, длина главного корня оказалась меньше в 1.2–2 раза по сравнению с контролем, а масса сухого проростка – в 1.2–1.6 раз. Начиная с 12–14-х сут вегетации, активно протекали некротические процессы более чем у 30% тестируемых растений, приводящие к отмиранию корневой системы. Максимальной фитотоксичностью культуральной жидкости характеризовался штамм *A. borealis* 74г. Фитотоксическая активность практически отсутствовала у штаммов видов *A. gallica* и *A. ostoyae*, не синтезирующих меллеолиды в идентифицируемых количествах.

Следует отметить, что фитотоксическое действие *Armillaria* связывают с присутствием протоиллуденового ядра в структуре меллеолидов [1, 14]. Так, на листьях салата была показана фитотоксичность многих меллеолидов [14] и, в том числе, меллеолида D, 5'-O-метилмелледонала и армилларинина, идентифицированных и у сибирских штаммов.

Изучение фитопатогенности живых культур *Armillaria* на проростках и сеянцах хвойных позволило установить, что некоторые меллеолид-синтезирующие штаммы обладали более выраженными фитопатогенными свойствами (табл. 3). Так, наблюдали максимальное снижение энергии прорастания и лабораторной всхожести семян *P. abies* в 1.7 раза, а также грунтовой всхожести семян *A. sibirica* в 1.5 раза под действием штаммов *A. borealis* 206г и *A. cepistipes* 73/8.

Послевсходовая гибель сеянцев пихты *A. sibirica* под влиянием всех изученных культур *Armillaria* варьировала в пределах 32.4–56.1%, что в 1.6–2.8 раз превышало естественную смертность в контроле. Высокий летальный уровень более взрослых растений, по-видимому, был обусловлен не только биосинтезом меллеолидов, но и другими факторами патогенности, поскольку высокую гибель сеянцев (до 47%) наблюдали и в присутствии штаммов, не образующих метаболиты этой группы.

Меллеолиды проявляют цитотоксичность по отношению к различным клеточным линиям рака человека, ингибируя синтез ДНК [15–17], при этом цитостатическое действие не зависит от положения двойной связи в протоиллуденовом кольце. Отмечено снижение цитотоксичности

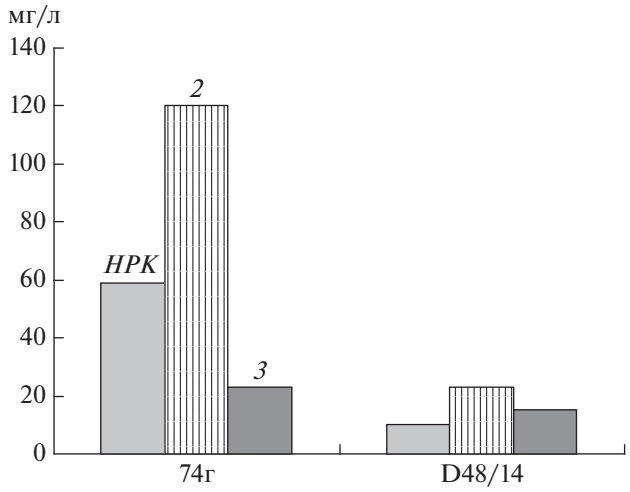

Рис. 2. Продукция меллеолидов (мг/л) *A. borealis* штаммов 74г и D48/14 при росте на средах *НРК*, *2* и *3*.

Таблица 3. Фитотоксичные и фитопатогенные свойства сибирских штаммов рода *Armillaria*

Вид	Штамм	Семена *Picea abies,* обработанные культуральным фильтратом *Armillaria*			Семена и сеянцы *Picea abies* на щепе, инокулированной *Armillaria*		Сеянцы *Abies sibirica* на песке с щепой, инокулированной *Armillaria*	
		лабораторная всхожесть, %	длина главного корня, мм	масса сухого проростка, мг	энергия прорастания, %	лабораторная всхожесть, %	грунтовая всхожесть семян, %	погибшие сеянцы, % от общего количества
A. borealis	206г	71.1	16.1	1.5	**41.8**	**55.7**	16.2	**48.3**
	74г	**67.1**	**9.1**	**1.1**	61.3	71.5	19.2	**56.1**
	111	71.3	15.1	1.4	66.1	71.1	22.4	**47.6**
	D48/14	73.3	14.7	1.4	69.2	79.3	18.6	35.2
A. cepistipes	27D	72.5	15.7	1.6	56.3	77.7	23.4	39.7
	73/8	71.2	11.4	1.3	**42.3**	**57.4**	15.9	**43.1**
A. gallica	6D	77.1	18.1	1.8	71.3	91.2	23.7	**43.2**
	22/12	79.1	20.2	2.0	64.5	89.1	26.1	**47.2**
A. ostoyae	26D	78.1	19.4	2.0	67.7	87.5	22.6	32.4
A. sinapina	S3-16	72.4	15.1	1.6	62.4	72.3	19.8	39.8
	A2-16	71.3	15.7	1.5	64.1	74.2	21.6	**46.6**
Контроль	–	**82.1**	**19.8**	**1.9**	**70.8**	**93.5**	**24.9**	**20.3**

меллеолидов при увеличении гидрофобности молекул, при этом чем меньше в молекуле гидроксильных групп, тем выше цитотоксичность соединения [18].

Некоторые меллеолиды оказывают антифунгальное действие на микоризные базидиомицеты, вызывающие корневые гнили деревьев (*Fomitopsis pinicola*, *Omphalotus illudens*, *Pleurotus ostreatus* и *Tapinella panuoides*), а также на различные почвенные грибы из родов *Aspergillus* и *Penicillium* (*P. notatum*, *P. oxalicum*, *A. flavus*, *A. nidulans*). Меллеолиды не оказывают влияния на *Mucor racemosus* и *Trichoderma harzianum*, повсеместно присутствующие в почве [3, 16]. Известно, что антимикотическую активность проявляют только меллеолиды, имеющие $\Delta^{2,4}$ – двойную связь в протоиллуденовом кольце, но для меллеолидов с $\Delta^{2,3}$ – двойной связью она не показана [3, 16]. Все меллеолиды, идентифицированные у сибирских штаммов *Armillaria*, содержат $\Delta^{2,3}$ – двойную связь в протоиллуденовом кольце и, поэтому их присутствие не будет препятствовать колонизации корней другими грибам. Известно, что меллеолиды, в том числе C и D, проявляют антибактериальную активность по отношению к грам-положительным бактериям [10, 11]. В связи с этим было высказано предположение об экологической роли этих соединений. Метаболиты этой группы могут сдерживать развитие конкурентной микробиоты и предотвращать колонизацию корней другими организмами [1]. Таким образом, сибирские штаммы грибов *Armillaria*, благодаря образованию меллеолидов, обладают антибактериальной и цитотоксичной активностью.

При изучении состава вторичных метаболитов грибов *Armillaria* у 8 из 11 сибирских штаммов были идентифицированы меллеолиды. Все продуценты видов *A. borealis*, *A. cepistipes* и *A. sinapina* образовывали меллеолид C и его хлорпроизводное меллеолид D. Отмечены штаммовые различия в спектре синтезируемых меллеолидов. Штамм *A. borealis* 74г синтезировал более широкий спектр меллеолидов (меллеолиды B, C, D, H, мелледоналы B и C, 5'-O-метилмелледонал, 13-гидрокси-5'-O-метилмелледонал и армилларинин) по сравнению с другими представителями этого вида. Показано, что состав среды культивирования влиял, как на количество, так и на соотношение меллеолидов у штаммов *A. borealis* 74г и D48/14. Все изученные меллеолид-синтезирующие штаммы проявляли токсикогенное и фитопатогенное действие по отношению к семенам и

сеянцам *P. abies* и *A. sibirica*, ингибируя энергию прорастания, лабораторную и грунтовую всхожесть и развитие корневой системы сеянцев хвойных. Максимальной фитотоксичностью характеризовалась культуральная жидкость штамма *A. borealis* 74г, содержащая наибольшее количество и разнообразие меллеолидов в профиле метаболома. У штаммов *A. gallica* и *A. ostoyae*, не синтезирующих меллеолиды в идентифицируемых количествах, фитотоксическая активность практически отсутствовала. Это могло свидетельствовать о наличии связи между способностью синтезировать протоиллуденовые сесквитерпеновые арильные эфиры изученными штаммами *Armillaria* и высокой степенью их фитотоксичности.

Авторы выражают благодарность К. Корхонену (Finnish Forest Research Institute) за активное участие в проведение исследований по видовой идентификации грибов рода *Armillaria*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baumgartner K., Coetzee M.P., Hoffmeister D.* // Mol. Plant Pathol. 2011. V. 12. № 6. P. 515–534.
2. *Wick J., Heine D., Lackner G., Misiek M., Tauber J., Jagusch H., Hertweck Ch., Hoffmeister D.* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. № 4. P. 1196–1204.
3. *Misiek M., Hoffmeister D.* // Mycol. Progress. 2012. V. 11. № 1. P. 7–15.
4. *Pavlov I.N.* // Contemp. Probl. Ecol. 2015. T. 8. № 4. C. 440–456.
5. *Павлов И.Н., Литовка Ю.А., Литвинова Е.А., Тимофеев А.А., Пашенова Н.В., Сафронова И.Е., Кулаков С.С., Мулява В.В., Мулява В.Е.* // АгроЭкоИнфо. 2017. Т. 29. № 3. 18 с.
6. Методы экспериментальной микологии / Ред. Билай В.И. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
7. *Maloy O.C.* // Plant Dis. Reporter. 1974. № 58. P. 902–904.
8. *Whitney R.D., Myren D.T., Britnell W.E.* // Can. J. For. Res. 1978. № 8. P. 348–351.
9. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
10. *Momose I., Sekizava R., Hosokawa N., Iinuma H., Matsui S., Nakamura H., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T.* // J. Antibiotics. 2000. V. 53. № 2. P. 137–143.
11. *Arnone A., Cardillo R., Nasini G.* // Phitochemistry. 1986. V. 25. № 2. P. 471–474.
12. *Engels B., Heining U., Grothe T., Stadler M., Jennewein S.* // J. Biol. Chem. 2011 V. 286. № 9. P. 6871–6878.
13. *Lackner G., Bohnert M., Wick J., Hoffmeister D.* // Chem. Biol. 2013. V. 20. № 9. P. 1101–1106.
14. *Kobori H., Sekiya A., Suzuki T., Choi J., Hirai H., Kawagishi H.* // J. Nat. Prod. 2015. V. 78. № 1. P. 163–167.
15. *Bohnert M., Miethbauer S., Dahse H.M., Ziemen J., Nett M., Hoffmeister D.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 27. № 7. P. 2003–2006.
16. *Bohnert M., Nutzmann H.-W., Schroeckh V., Horn F., Dahse H.-M., Brakhage A.A., Hoffmeister D.* // Phytochemistry. 2014. V. 105. № 9. P. 101–108.
17. *Li Zh., Wang Y., Jiang B., Li W., Zheng L., Yang X., Bao Y., Luguo Sun L., Yanxin Huang Y., Li Y.* // J. Ethnopharmacol. 2016. V. 184. № 3. P. 119–127.
18. *Peipp H., Sonnenbichler J.* // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1992. V. 373. № 8. P. 675–683.

Biosynthesis of Protoilludene Sesquiterpene Aryl Esters by Siberian Strains of the Genus *Armillaria* Fungi

V. P. Zhelifonova[a], T. V. Antipova[a], E. A. Litvinova[b, c], B. P. Bascunov[a], Yu. A. Litovka[b, c], I. N. Pavlov[b], and A. G. Kozlovsky[a, *]

[a]*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, 142290 Russia*
[b]*Sukachev Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, 660036 Russia*
[c]*Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, 660049 Russia*
**e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru*

Received September 29, 2018; revised November 19, 2018; accepted December 18, 2018

Secondary metabolites of the basidiomycetes of *Armillaria borealis* Marxm. and Korhonen, *A. cepistipes* Velen., *A. gallica* Marxm., *A. ostoyae* (Romagn.) Herink and *A. sinapina* Bérubé and Dessur, isolated in Southern Siberia (Krasnoyarsk region and Tyva Republic) and in the Far East (Sikhote-Alin) was studied. Metabolites belonging to the class of protoilludene sesquiterpene aryl esters of the meleleolide group have been identified in the species *A. borealis*, *A. cepistipes* and *A. sinapina*. Strains differ in the spectrum of synthesized melleolides. *A. borealis* strain 74g synthesized a wider range of melleolides compared with other strains of this species: melleolides B, C, D and H, meledonals B and C, 5'-O-methylmeledonal, 13-hydroxy-5'-O-methylmeledonal and armillarinin. It was shown that the composition of the medium influenced the amount of synthesized metabolites. All studied strains synthesizing melleolides exhibited a toxicogenic and phytopathogenic effect on seeds and seedlings of *Picea abies* (L.) H. Karst. and *Abies sibirica* Ledeb. A significant decrease in seed germination energy, laboratory and ground germination of seeds, the development of the root system of conifer seedlings has revealed. The culture liquid of *A. borealis* 74g with the greatest amounts and variety of melleolides in the metabolome profile showed the maximum inhibitory effect.

Keywords: species *Armillaria*, protoilludene sesquiterpene aryl esters, melleolides