

УДК 577.13

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ СИБИРСКИХ ШТАММОВ ГРИБОВ *Heterobasidion annosum sensu lato*

© 2020 г. Т. В. Антипова¹, В. П. Желифонова¹, Ю. А. Литовка^{2,3}, И. Н. Павлов^{2,3},
Б. П. Баскунов¹, А. А. Тимофеев^{2,4}, А. Г. Козловский^{1, *}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр
“Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушчино, 142290 Россия

²Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, 660036 Россия

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

⁴Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук”, Красноярск, 660036 Россия

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

Поступила в редакцию 29.09.2019 г.

После доработки 15.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Изучен состав вторичных метаболитов у базидиальных грибов рода *Heterobasidion*, выделенных на территории Средней и Западной Сибири, а также Южной Кореи. На основе морфолого-культуральных и молекулярно-генетических методов установлена принадлежность исследуемых культур к видам *H. annosum* (Fr.) Bref. (5 штаммов), *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (4 штамма) и *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Dai (1 штамм). В профиле метаболома трех штаммов *H. annosum* и всех штаммов *H. abietinum* преобладал фоманноксин. Два штамма *H. annosum* синтезировали близкие по структуре к фоманноксину соединения 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид. У *H. annosum* 45-2 были идентифицированы фоманнозин и его предшественники. Показано, что состав ферментационной среды оказал влияние на количество и состав синтезируемых метаболитов. В условиях *in vitro* все исследуемые штаммы *H. annosum* и *H. abietinum* проявляли фитопатогенное действие в отношении сеянцев *Pinus sylvestris* L., вызывая различной степени некротическое поражение стеблей и гибель растений. Более высокая фитопатогенность была характерна для штаммов *H. annosum*, максимальная агрессивность, наибольшее разнообразие соединений в профиле метаболома и активная продукция фоманноксина отмечена у *H. annosum* 45-2.

Ключевые слова: *Heterobasidion annosum sensu stricto*, *Heterobasidion abietinum*, корневая губка, фитопатогенность, фоманноксин, фоманнозин

DOI: 10.31857/S0555109920020038

Проблема корневых гнилей хвойных пород, вызываемых фитопатогенными грибами рода *Heterobasidion*, привлекает пристальное внимание вследствие огромных размеров ущерба, причиняемого лесному хозяйству [1, 2]. К наиболее опасным и вредоносным возбудителям корневых и комлевых гнилей хвойных растений относят грибы комплекса *H. annosum sensu lato* (s. l.) (корневая губка) [3–7]. Этот комплекс состоит из пяти видов грибов, распространенных в умеренных климатических регионах планеты. Виды комплекса различаются по морфологическим, генетическим и экологическим признакам, а также географическому распространению. Виды *H. annosum sensu stricto* (s. s.) (Fr.) Bref., *H. abietinum* Niemelä & Korhonen и *H. parviporum* Niemelä & Korhonen распространены повсеместно в Евра-

зии. Виды *H. irregulare* (Underw.) Garbelotto & Otrrosina и *H. occidentale* Otrrosina & Garbelotto встречаются в Северной Америке [2]. В Сибири грибы рода *Heterobasidion* представлены преимущественно видами *H. annosum* и *H. abietinum*. Наибольший вред корневая губка наносит насаждениям *Pinus sylvestris* L. в ленточных борах Минусинской котловины и Алтайского края [8–10]. Все они являются эндофитами и сапро-некротрофными фитопатогенами, паразитирующими на более чем двухстах видах растений.

Механизм заражения деревьев *H. annosum* s. l. представляет собой инфицирование смешанного типа [2]. Первичное инфицирование происходит воздушно-капельным путем, преимущественно базидиоспорами на свежеповрежденные поверхности деревьев (верхушки пней и ствольные и кор-

невые раны). После основного заражения может возникнуть вторичное инфицирование неповрежденных деревьев за счет вегетативного роста мицелия и его распространения через корневые контакты. К важным факторам в патогенезе корневой губки относятся ферментные системы, активно разлагающие биополимеры древесины, а также низкомолекулярные соединения. Известно, что грибы комплекса *H. annosum* s. l. способны продуцировать вторичные метаболиты – фоманнозин, фоманноксин, фомаджорины и др. [11–13]. Показано, что фоманноксин и фоманнозин обладают антибактериальной, антифунгальной и фитотоксичной активностью [12]. Недавно установлено, что фоманноксин является ингибитором биосинтеза бета-амилоидного пептида, который вовлечен в развитие болезни Альцгеймера [14].

Работы по изучению видовой принадлежности изолятов корневой губки, географического места их выделения, спектра метаболитов и их биологической активности единичны [13]. В настоящее время отсутствуют данные о составе вторичных метаболитов у сибирских штаммов различных видов *Heterobasidion* и их связи с фитопатогенностью.

Цель работы – изучение *in vitro* биосинтеза вторичных метаболитов и фитопатогенности у 10 штаммов грибов рода *Heterobasidion*, выделенных из хвойных насаждений с различной степенью патологического опада на территории Средней и Западной Сибири, а также Южной Кореи (о. Чеджу).

МЕТОДИКА

Выделение и идентификация штаммов. Объектами исследования служили 10 штаммов Н1, Н2, Н3, Н4, А-На-1, К-На-4, Но-16К, Нр-8, Т-На и 45-2 грибов рода *Heterobasidion* из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). Штаммы были выделены в 2014–2018 гг. из плодовых тел и базидиом *Heterobasidion*, произраставших на различных хвойных породах, либо (в единичном случае) из древесины поваленного дерева с характерными признаками поражения корневой губкой. Штаммы были изолированы в чистые культуры на селективных питательных средах: мальт-экстракт-агар (МЭА), содержащий 0.5% танина и Норкранс-агар (НРКА) [15, 16]. Хранение культур осуществляли на скошенном МЭА при 6°C.

Морфологические признаки изучали у грибов, выращенных на морковном агаре, МЭА и НРКА при $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Микроструктуры оценивали методами фазово-контрастной и светопольной микроскопии с использованием светового микроскопа Nikon Eclipse Ci с системой фотодокументации (“Nikon”, Япония) и электронного сканирующего микроскопа Hitachi SEM TM-1000 с 10000 кратным

увеличением и разрешением 30 нм (“Hitachi Ltd.”, Япония). Видовую идентификацию штаммов верифицировали молекулярно-генетическими методами. Секвенирование участков генетических маркеров ITS (*internal transcribed spacer*) и TEF-1alpha (*transcription elongation factor 1-alpha*) проводили на секвенаторе Illumina MySeq (“Illumina”, США) с использованием оборудования ЦКП “Инновационные технологии защиты растений” Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург–Пушкин, Россия) и ЦКП “Геномика” (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). ДНК выделяли по методу фенол-хлороформной экстракции [17]. Таксономическое положение штаммов и эволюцию определяли с помощью программного обеспечения MEGA-X [18, 19]. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями известных штаммов из базы NCBI (Information, U.S. National Library of Medicine).

Условия культивирования грибов, выделение, идентификация и количественное определение вторичных метаболитов. При изучении продукции вторичных метаболитов штаммы культивировали в глубинных условиях в колбах (750 мл) со 100 мл среды на шейкере (220 об./мин) в течение 11 сут при 24°C. При скрининге была использована синтетическая среда НРК [16]. Для сравнения биосинтетической способности продуктивных штаммов использовали две органно-минеральные среды. Среда 2 содержала (г/л дистиллированной воды): глюкозу – 5.0, мальт-экстракт – 5.0, KH_2PO_4 – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, pH 5.5 [20]. Среда 3, имела следующий состав (г/л дистиллированной воды): глюкоза – 4.0, дрожжевой экстракт – 4.0, мальт-экстракт – 10.0, pH 5.5 [21]. Среды засеивали 7-суточным мицелием, выращенным глубинно в среде, содержавшей 3% мальт-экстракта.

Вторичные метаболиты экстрагировали из фильтрата культуральной жидкости хлороформом трехкратно при pH 3 и 8. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “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. Метаболиты выделяли с помощью препаративной ТСХ (ПТСХ) на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системах растворителей. Идентификацию выделенных метаболитов осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками [11–13, 22, 23]. 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”, Япо-

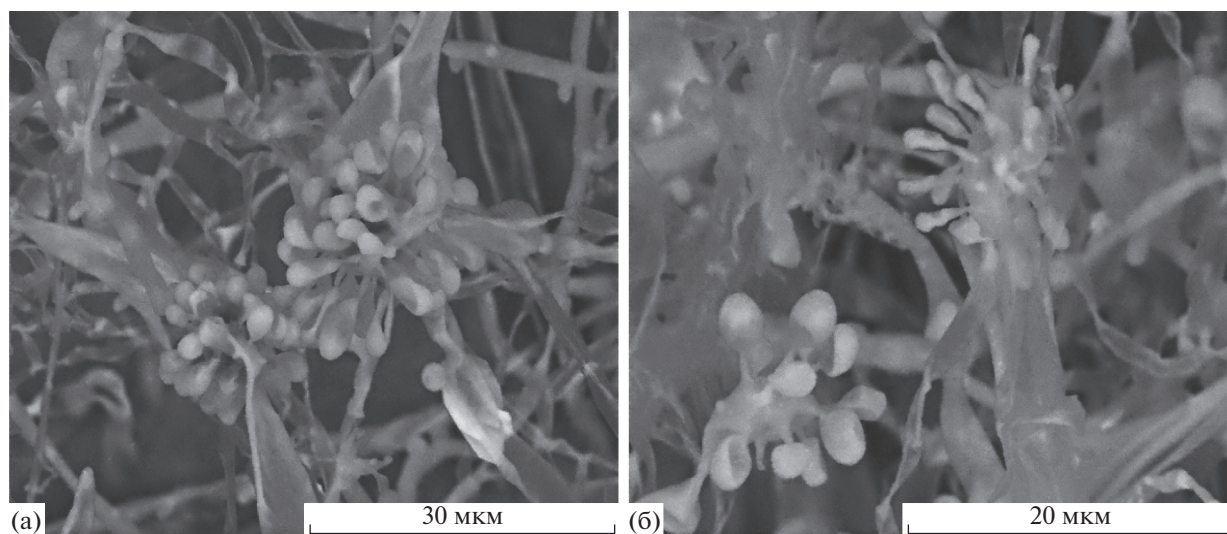


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия вегетативных (мицелий) и репродуктивных (апикальные везикулы с конидиями) структур *H. annosum* s. s. (а, увеличение $\times 2500$) и *H. abietinum* (б, увеличение $\times 4000$).

ния). 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.

Количественное содержание фоманноксина определяли спектрофотометрически после ПТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в метаноле при 280 нм. Расчет проводили, используя калибровочную кривую для фоманноксина.

Исследование фитопатогенной активности штаммов. Фитопатогенность оценивали по модифицированному методу [24] с использованием для культивирования грибов полужидкой питательной среды НРК.

Поверхностно стерилизованные семена *P. sylvestris* проращивали в течение 8–10 сут на поверхности 5%-ного водного агара при 20°C. Проростки перед инфицированием выдерживали при 4°C в течение времени, необходимого для достижения длины корней 1.5–2.5 см, а затем помещали на поверхность 10-суточной культуры гриба так, чтобы их корни были погружены в полужидкую питательную среду НРК. Посевы инкубировали в климатокамере (“Jeio Tech”, Корея) с 12 ч фотопериодом в течение 18 сут при 22°C. По окончании эксперимента оценивали жизнеспособность растений (% от контроля), длину надземной части здоровых проростков (мм), агрессивность штамма грибов (% растений с некрозом от общего количества растений).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование морфолого-культуральных особенностей подтвердило принадлежность изучае-

мых культур к роду *Heterobasidion*, а изучение их микроструктур методами растровой электронной микроскопии не выявило значительных микроморфологических различий. На плотных питательных средах формировался хорошо развитый воздушный мицелий с полупрозрачными, тонкостенными генеративными гифами, имеющими септы. Гифы, ветвящиеся под острым, реже под прямым углом, были шириной 1.5–5.0 мкм. Анастомозы протяженностью от 2 до 40 мкм – умеренные. Редкие и простые пряжки размером 2.0–5.5 мкм располагались на прямой широкой гифе. Конидиофоры с апикальной конидиогенной везикулой – прямостоячие, простые или разветвленные, гиалиновые до 200 мкм в длину и 4–10 мкм в диаметре. Диаметр апикальной везикулы составлял 6–15 мкм, поверхность была с коническими зубцами, на которых располагались многочисленные конидии. Конидии размером 3.5–8.0 \times 2.5–6.5 мкм были одноклеточные, гладкие и гиалиновые, они имели форму от яйцевидной до почти шаровидной (рис. 1).

Видовую идентификацию проводили с использованием молекулярно-генетических методов, включающих секвенирование участков генетических маркеров ITS и TEF-1alpha с последующим биоинформатическим анализом. Филогенетическое дерево (рис. 2) построено по методу попарного внутригруппового невзвешенного среднего [18] и модели [25] с bootstrap тестом [26] в 10000 репликаций. Всего было проанализировано 29 нуклеотидных последовательностей, при этом генетическое расстояние между видами составило не менее 0.015. Филогенетический анализ консервативных регионов ДНК изученных культур грибов позволил установить четыре устойчивых клада, характерных для видового разделения, и определить принадлежность штаммов Н-2, А-На-1, К-На-4,

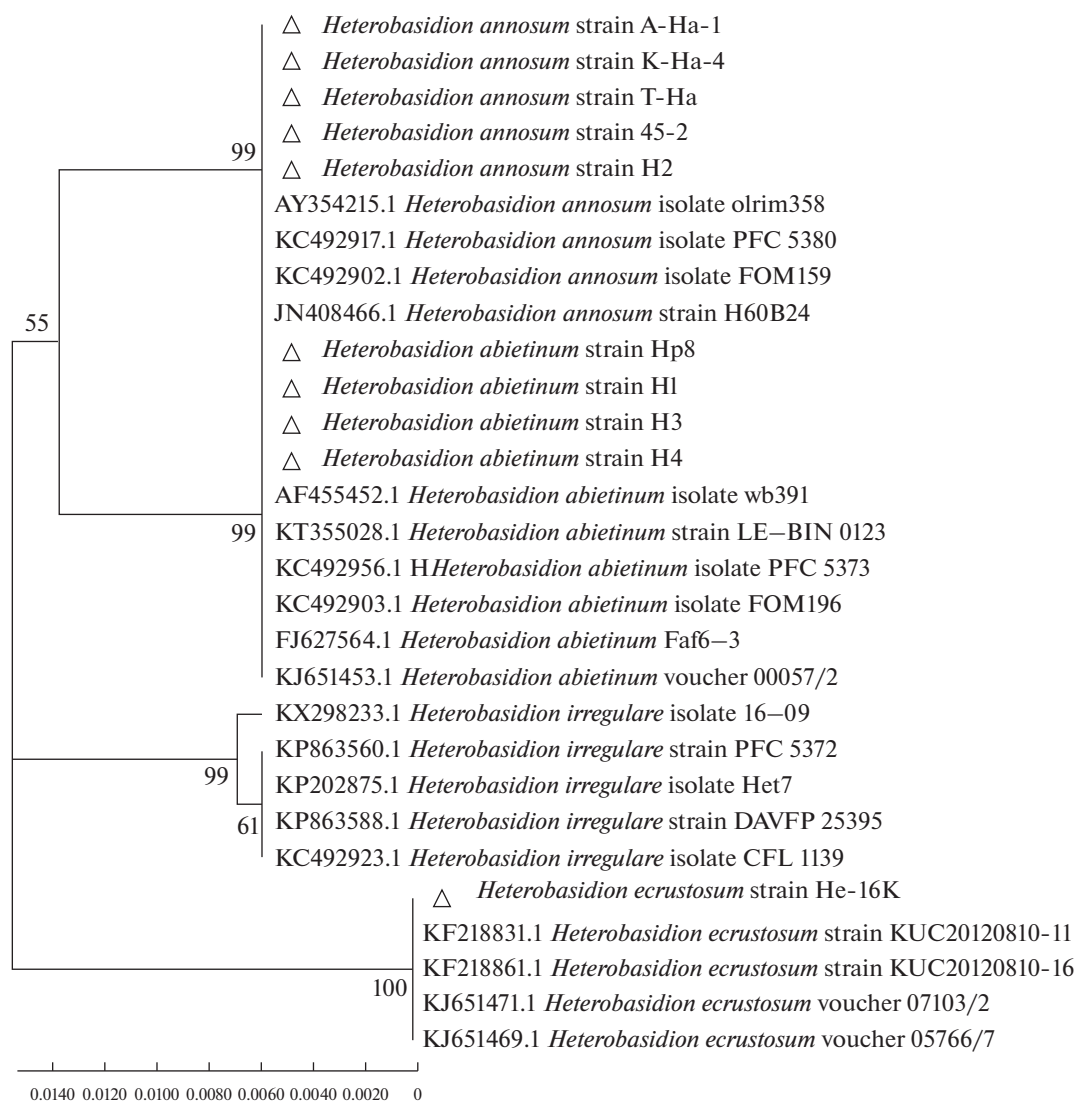


Рис. 2. Филогенетическое дерево грибов *Heterobasidion* sp., составленное на основании сравнительного анализа региона ITS1-ITS2 (△ – обозначены исследуемые штаммы).

T-Ha и 45-2 к виду *H. annosum* s. s. (Fr.) Bref., штаммов Hp-8, H-1, H-3 и H-4 к виду *H. abietinum* Niemelä & Korhonen и штамма He-16K к виду *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Dai.

Вторичные метаболиты у *Heterobasidion* изучали после выращивания штаммов в среде НРК, которая обычно применяется при культивировании базидиомицетов [16]. У всех изученных штаммов видов *H. annosum* s. s. и *H. abietinum* был обнаружен метаболит **1**, мигрирующий при ТСХ с $R_f = 0.29$ (II). УФ-спектр метаболита **1** имел значения полос поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$ 209, 232, 278, 294 нм), близкие фоманноксину, и положительный молекулярный ион 207(M + H)⁺. В МС/МС спектре также наблюдалось отщепление двух карбоксильных фрагментов и гидроксильной группы. На основании полученных данных метаболит был идентифицирован как 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробен-

зофуран-5-карбальдегид. У этих штаммов также был идентифицирован метаболит **2**, который имел молекулярный ион 205(M + H)⁺, характер расщепления которого был аналогичен предыдущему с разницей в две единицы, что могло указывать на появление двойной связи в фурановом кольце, он представлял собой 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид (табл. 1).

У штаммов *H. annosum* T-Ha, 45-2 и H-2 и *H. abietinum* Hp-8, H-1, H-3 и H-4 основным метаболитом было соединение **3**, мигрирующее при ТСХ с $R_f = 0.52$ (II). УФ-спектр выделенного метаболита имел максимальные значения поглощения при 209, 228, 280 (пл.) и 293 нм. Масс-спектр метаболита **3** показал положительный молекулярный ион 189 (M + H)⁺. В МС/МС спектре метаболита наблюдали последовательное отщепление двух карбоксильных и пропенильной групп (табл. 2). На

Таблица 1. Физико-химические свойства выделенных метаболитов грибов рода *Heterobasidion*

№	Метаболит	УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС-спектрах (интенсивность, %)
			[M + H] ⁺
1	2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид	209, 232, 278 (пл.), 294	24/207(96), 189(100), 161(39), 147(10), 135(24), 107(10)
2	2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид	209, 232, 278 (пл.), 294	25/205 (86), 187(60), 159(92), 149(36), 135(100), 107(54)
3	Фоманноксин	209, 228, 280(пл.), 293	25/189(51), 161(100), 133(8), 119(12)
4	1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол	209, 230, 290	25/217 (90), 199(100), 175 (66)
5	Иллудолактон А	256	22/247(86), 229(100), 219(22), 205(29), 201(50)
6	Метиллилудолактон А	259	20/261(69), 247(47), 229(100), 201(7)
7	Фоманнозин	256	22/263(82), 245(100), 227(11)

основании литературных данных этот метаболит был идентифицирован как фоманноксин.

У изучаемых штаммов при ТСХ также был также обнаружен метаболит **4** с $R_f = 0.18$ (II), который имел УФ-спектр с максимальными значениями полос поглощения при 209, 230 и 290 нм и масс-спектр с положительным молекулярным ионом 217 (M + H)⁺. МС/МС спектр метаболита **4** указывал на наличие двух гидроксильных групп. Метаболит **4** был идентифицирован как 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол.

Штамм *H. annosum* 45-2 синтезировал метаболит **5**, мигрирующий с $R_f = 0.47$ при ТСХ (II), который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс}} = 256$ нм, характерный для сесквитерпена фоманнозина. Масс-спектр метаболита **5** характеризовался положительным молекулярным ионом 247 (M + H)⁺ и наличием гидроксильной и карбонильной групп. На основании полученных данных этот метаболит был идентифицирован как иллудолактон А. У данного штамма также был обнаружен метаболит **6**, мигрирующий с $R_f = 0.25$ (II) при ТСХ, который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс}} = 259$ нм и молекулярный ион 261 (M + H)⁺, отличающейся от предыдущего метаболита метильной группой. Этот метаболит не был идентифицирован, но УФ-спектр и фрагментация молекулярного иона, схожие с иллудолактоном А, позволяли предположить, что этот метаболит являлся метильным производным иллудолактона А. В органо-минеральной среде **3** *H. annosum* 45-2 помимо указанных выше метаболитов синтезировал метаболит **7**, который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс}} = 256$ нм и масс-спектр с положительным молекулярным ионом 263 (M + H)⁺. Этот метаболит был идентифицирован как фоманнозин. У штамма *H. ecrustosum* He-16 К вышеуказанные вторичные метаболиты не были идентифицированы.

Установлено, что изопреноидный блок фоманноксина образуется из фарнезилдифосфата, предшественником которого является мевалоновая кислота [11]. Ароматическое кольцо соединения синтезируется по шикиматному пути при последовательном элиминировании пирувата из хоризмовой кислоты с образованием гидроксibenзойной кислоты с последующим восстановлением до альдегида (рис. 3). Далее в биосинтетическом пути наступает ключевая реакция, ведущая к образованию фоманноксина, а именно алкилирование ароматического кольца изопреноидной единицей, которое осуществляется пренилтрансферазой. Дальнейшая окислительная циклизация приводит к образованию бензогидрофуранового скелета и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегида, из которого путем элиминирования воды образуется либо фоманноксин, либо в результате окисления 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид. Из фоманноксина под действием пируватдекарбоксилазы и последующего восстановления образуется 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол. Биосинтез фоманнозина начинается с циклизации универсального предшественника сесквитерпенов фарнезилпирофосфата с образованием Δ^6 -протоиллудена предположительно под действием терпенциклазы [12]. Окисление протоиллудена монооксигеназами и дегидрогеназами с образованием иллудола, иллудолактона А и других промежуточных соединений приводит к образованию фоманнозина.

Таким образом, в спектре всех исследованных штаммов вида *H. abietinum* и трех штаммов *H. annosum* присутствовало 4 метаболита фоманноксинового ряда с преобладанием фоманноксина. Это предполагает функционирование у них двух энзиматических путей, преобразующих 2-(2-гидрокси-

Таблица 2. Вторичные метаболиты штаммов грибов рода *Heterobasidion*, выделенных из хвойных пород деревьев в различных географических регионах

Метаболиты	<i>H. abietinum</i>				<i>H. annosum</i>				<i>H. ecrustosum</i>	
	Нр-8	Н-1	Н-3	Н-4	Н-2	К-На-4	Т-На	45-2	А-На-1	He-16К
	Красноярский край								Алтай	Ю. Корея
	<i>Larix sibirica</i>	<i>Abies sibirica</i>	<i>Pinus koraiensis</i>	<i>Picea obovata</i>	<i>Abies sibirica</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Abies sibirica</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus thunbergii</i>	
Фоманноксин	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–
2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбаль-дегид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-гидробензофуран-5-карбальдегид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2 диол	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–
Иллудолактон А	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Метилллудолактон А	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Фоманнозин	–	–	–	–	–	–	–	+*	–	–

* Среда 3; “–” – метаболиты не обнаружены.

пропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид. Однако у двух штаммов *H. annosum* наблюдался только процесс окисления этого соединения. В то время как у штамма *H. annosum* 45-2 активно функционировали пренилтрансферазы и терпенциклазы, ключевые ферменты, ведущие к образованию метаболитов фоманноксинового и фоманнозинового ряда.

Известно, что филогенетически близкие виды могут синтезировать сходный профиль вторичных метаболитов [13]. Проведенные исследования по установлению связи между видами грибов комплекса *H. annosum* s. l. и спектром вторичных метаболитов показало, что образование фоманноксина явилось определяющим фактором для видов *H. annosum* s. s. и *H. irregulare*. Вид *H. irregulare* отличался биосинтезом сесквитерпена-дезоксифоманнозина А, а характерной особенностью видов *H. abietinum*, *H. occidentale* была продукция эпоксидрименола и его производных. У изученных штаммов фоманноксин преобладал у трех штаммов *H. annosum*, а у двух других были обнаружены метаболиты, близкие ему по структуре. Эти результаты соответствовали предложенным хемотаксономическим критериям для вида *H. annosum* s. s. У фоманноксин-синтезирующего штамма *H. annosum* 45-2 был идентифицирован фоманнозин и его биосинтетические предшественники, ранее обнаруженные у видов *H. irregulare* и *H. occidentale* [11, 12]. У всех изученных штаммов вида *H. abietinum* был найден фоманноксин и близкие ему соединения, в то время как отсутствовал эпоксидрименола, характерный для этого вида по данным [13]. Можно предположить, что образо-

вание фоманноксина у грибов этого комплекса определяется регуляцией генов его биосинтетического пути в зависимости от применяемых условий культивирования.

Изучение фитопатогенности сибирских штаммов *Heterobasidion*, проведенное в условиях *in vitro*, показало, что все штаммы видов *H. annosum* и *H. abietinum* проявляли фитопатогенное действие на сеянцы *P. sylvestris*, вызывая некротическое поражение стеблей и гибель растений. Было обнаружено, что показатели вирулентности штаммов вида *H. annosum* оказались выше, чем у штаммов вида *H. abietinum* (табл. 3). Максимальную вирулентность проявлял *H. annosum* 45-2, выделенный из плодового тела, произраставшего на *A. sibirica* (Красноярский край, Россия) и синтезирующий наиболее широкий спектр вторичных метаболитов. Жизнеспособность сеянцев на 6 сут составила 37% на фоне замедления развития стебля по сравнению с контролем в 3.5 раза и массовых некротических поражений (до 70% от общего количества растений). На 12 сут инкубации была отмечена 100%-ная гибель *P. sylvestris*. На момент завершения эксперимента (18 сут) 100%-ную гибель сеянцев наблюдали при воздействии *H. annosum* А-На-1 и К-На-4, выделенных с плодовых тел, произраставших на *P. sylvestris* (Красноярский край и Алтай соответственно, Россия) (табл. 2). Показатели вирулентности *H. annosum* Т-На и Н2, выделенных с плодового тела, произраставшего на *P. sylvestris*, и пораженной древесины *A. sibirica* (Красноярский край, Россия) были несколько ниже. Жизнеспособность сеянцев на 18 сут составила около 30% на фоне замедления в 2 раза

Таблица 3. Фитопатогенная активность сибирских штаммов *Heterobasidion* по отношению к проросткам *Pinus sylvestris*

Вид, штамм	Продолжительность инкубирования, сут							
	6			12		18		
	жизнеспособность, % от контроля	длина стебля, мм	растения с некрозом, %	жизнеспособность, % от контроля	растения с некрозом, %	жизнеспособность, % от контроля	длина стебля, мм	растения с некрозом, %
<i>H. annosum</i>								
45-2	37.0	14.7	70.0	0.0	100.0			
А-На-1	55.6	20.5	45.3	20.3	85.1	0.0	—	100.0
К-На-4	60.1	22.7	41.3	30.2	81.3	0.0	—	100.0
Т-На	69.4	25.8	34.9	54.1	75.1	32.1	30.1	94.0
Н2	70.4	26.3	32.1	59.3	72.9	36.7	31.8	93.0
<i>H. abietinum</i>								
Н1	76.7	28.9	19.7	66.7	70.0	54.7	34.5	92.0
Н3	100.0	29.8	7.2	100.0	44.4	97.0	35.8	70.3
Нр-8	70.4	29.3	20.1	59.3	72.9	46.7	30.8	97.0
Н4	74.1	32.6	5.3	66.7	77.8	58.8	37.5	91.0
<i>H. ecrustosum</i>								
He-16К	100.0	45.8	0.0	100.0	4.4	100.0	55.8	7.4
Контроль	100.0	51.3	0.0	100.0	0.0	100.0	60.7	1.0

На трех штаммах было изучено влияние двух других по составу питательных сред на продукцию фоманноксина. Обнаружено, что у *H. abietinum* Н-1 концентрация фоманноксина в органо-минеральных средах 2 и 3 была в 2.2 и 4.2 раза ниже по сравнению со средой НРК. Наиболее благоприятной для биосинтеза фоманноксина *H. annosum* 45-2 была среда 3, поскольку содержание фоманноксина в ней было в 2 раза выше по сравнению со средой НРК, при этом наблюдался также биосинтез фоманнозина. В средах 2 и 3 *H. abietinum* Нр-8 не синтезировал фоманноксин, но в них были идентифицированы другие метаболиты фоманноксинового ряда: (2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид и 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-бензофуран-5-карбальдегид.

Таким образом, биосинтез фоманноксина определялся физиолого-биохимическими особенностями исследуемых штаммов, при этом состав среды культивирования оказывал регуляторное влияние на биосинтез вторичных метаболитов фоманноксинового ряда. Отсутствие биосинтеза фоманноксина у *H. abietinum* Нр-8 в органо-минеральных средах подтверждало, что его биосинтез определялся регуляцией генов биосинтетического пути в зависимости от условий культивирования.

Сравнение данных фитопатогенности и продукции фоманноксина штаммами показало, что высоко патогенный *H. annosum* 45-2 характеризовался высокой продукцией фоманноксина (16–32 мкг/мл) и широким спектром синтезированных метаболитов, обладающих фитотоксичными свойствами. У всех штаммов, проявляющих фитопатогенные свойства, были обнаружены вто-

ричные метаболиты фоманноксинового ряда. Различия в степени патогенности и содержания фоманноксина связаны с совокупностью различных факторов, влияющих на эти процессы, например, с отличиями в условиях роста грибов *in vivo* и *in vitro*. Недавно было показано, что в процесс грибной инфекции *Heterobasidion* могут быть также вовлечены небольшие секретируемые белки [28]. Можно предположить, что фитопатогенностью обладают метаболиты, близкие по структуре к фоманноксину, что было показано для штаммов *H. annosum* К-На-4 и А-На-1. Эти метаболиты, так же, как и фоманноксин, содержат в структуре ароматическую карбонильную группу, которая, отвечает в основном за повреждающее действие на растительные клетки [29]. Отсутствие биосинтеза фоманноксина и других соединений этой группы у корейского штамма *H. ecrustosum* He-16К согласовывалось с наблюдениями в работе [30], что этот вид не проявляет патогенные свойства и является сапрофитом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Asiegbu F.O., Adomas A., Stenlid J.* // Mol. Plant Pathol. 2005. V. 6. № 4. P. 395–409.
2. *Garbelotto M., Gonthier P.* // Ann. Review Phytopathol. 2013. V. 51. P. 39–59.
3. *Федоров Н.И.* Корневые гнили хвойных пород. М.: Лесн. пром., 1984. 160 с.
4. *Василяускас А.П.* Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов. Вильнюс: Мокслас, 1989. 175 с.
5. *Стороженко В.Г., Иголкина Т.В.* // Лесное хозяйство. 1991. № 3. С. 47–50.

6. Корхонен К. Грибные сообщества лесных экосистем: материалы координационных исследований. Т. 2. / Ред. В.Г. Стороженко, В.И. Крутова. М.; Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2004. С. 89–113.
7. Павлов И.Н., Барабанова О.А., Кулаков С.С., Юшкова Т.Ю., Агеев А.А., Пашенова Н.В., Тарасов П.А., Шевцов В.В., Иванова Т.Н. // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. 27. № 3–4. С. 263–272.
8. Павлов И.Н., Корхонен К., Губарев П.В., Черепнин В.Л., Барабанова О.А., Миронов А.Г., Агеев А.А. // Хвойные бореальной зоны. 2008. Т. 25. № 1–2. С. 28–36.
9. Pavlov I.N. // Contem. Probl. Ecol. 2015. Т. 8. № 4. С. 440–456.
10. Литовка Ю.А., Павлов И.Н. Грибные сообщества лесных экосистем. Т. 5. / Ред. В.Г. Стороженко, А.В. Руоколайнен, А.В. Кикеева. М.; Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2018. С. 68–76.
11. Hansson D., Menkis A., Olson E., Stenlid J., Broberg A., Karlsson K. // Phytochemistry. 2012. V. 84. P. 31–39.
12. Hansson D., Menkis A., Himmelstrand K., Thelander M., Olson E., Stenlid J., Karlsson M., Broberg A. // Phytochemistry. 2012. V. 82. P. 158–165.
13. Hansson D., Wubshet S., Olson A., Karlsson M., Staerk D., Broberg A. // Phytochemistry. 2014. V. 108. P. 243–251.
14. Gonzales-Ramirez M., Gavilan J., Silva-Grecchi T., Cajas-Madriaga D., Trivino S., Becerra J., Saez-Orellana F., Perez C., Fuentealba J.J. // Alzheimer Disease. 2018. V. 61. № 4. P. 1463–1475.
15. Методы экспериментальной микологии / Ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
16. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
17. Каюмов А.Р., Гимадуудинов О.А. Практикум по молекулярной генетике. Казань: КФУ, 2016. 36 с.
18. Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical Taxonomy: The principles and Methods of Numerical Classification. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. P. 18–24.
19. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
20. Stenlid J. // Can J. Bot. 1985. V. 63. № 12. P. 2268–2273.
21. Horlacher N., Nachtigall J., Schulz D., Sussmuth R.D., Hampp R., Fiedler H.P., Schrey S.D. // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 931–941.
22. Kepler J.A., Wall M.E., Mason J.E., Basset C., McPhail A.T., Sim G.A. // J. Am. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 5. P. 1260–1261.
23. Heslin M.C., Stuart M.R., Murchy P.O., Donnelly D.H.X. // Eur. J. For. Path. 1983. V. 13. № 1. P. 11–13.
24. Olson A., Lind M., Stenlid J. // For. Path. 2005. V. 35. № 5. P. 321–331.
25. Kimura M. // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. № 2. P. 111–120.
26. Felsenstein J. // Evol. 1985. V. 39. № 4. P. 783–791.
27. Hirotsani M., O'Reilly J., Donnelly D.M.X. // Tetrahedron Lett. 1977. V. 18. № 7. P. 651–652.
28. Raffaello T., Asiegbu F.O. // Sci Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 8000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08010-0>
29. Zweimüller M., Antus S., Kovács T. Sonnenbichler J. // Biol. Chem. 1997. V. 378. № 8. P. 915–921.
30. Tokuda S., Hattori T., Dai Y., Ota Y., Buchanan P.K. // Mycoscience. 2009. V. 50. № 3. P. 190e202.

Secondary Metabolites of the Siberian Strains *Heterobasidion annosum sensu lato*

T. V. Antipova^a, V. P. Zhelifonova^a, Yu. A. Litovka^{b, c}, I. N. Pavlov^{b, c},
B. P. Baskunov^a, A. A. Timofeev^{b, d}, and A. G. Kozlovsky^{a, *}

^aG.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, FRC Pushchino Scientific Centre of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

^bSukachev Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

^cReshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, 660049 Russia

^dFRC “Krasnoyarsk Scientific Center” SB RAS, Krasnoyarsk, 660036 Russia

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

Received September 29, 2019; revised October 15, 2019; accepted November 1, 2019

The composition of secondary metabolites of the basidiomycetes of the genus *Heterobasidion*, isolated in Central and Western Siberia, as well as in South Korea were studied. By morphological-cultural and molecular genetic methods, the studied cultures were assigned to the species *H. annosum* (Fr.) Bref. (5 strains), *H. abietinum* Niemelä & Korhonen (4 strains) and *H. ecrustosum* Tokuda, T. Hatt. & Y.C. Give (1 strain). In the metabolome profile of three *H. annosum* strains and all *H. abietinum* strains, fomannoxin prevailed. Two strains of *H. annosum* synthesized fomannoxin related compounds: 2-(2-hydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde and 2-(2-hydroxypropan-2-yl)benzofuran-5-carbaldehyde. Fomannosine and its precursors were identified in *H. annosum* 45-2. It was shown that the composition of the fermentation medium influenced the number and composition of the synthesized metabolites. *In vitro* conditions, all studied strains of *H. annosum* and *H. abietinum* exhibited a phytopathogenic effect against seedlings of *Pinus sylvestris* L., causing necrotic damage to stems of various degrees and death of plants. Higher phytopathogenicity is characteristic of strains of *H. annosum*; maximal aggressiveness was observed in *H. annosum* 45-2 with the greatest diversity of compounds in the metabolome profile and active production of fomannoxin.

Keywords: *Heterobasidion annosum sensu stricto*, *Heterobasidion abietinum*, root rot, phytopathogenicity, fomannoxin, fomannosine