

УДК 582.284.51:577.115

АНАЛИЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБА *Bipolaris sorokiniana* РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТР ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. А. О. Берестецкий^{1, *}, А. А. Далинова¹, В. Р. Дубовик¹, Е. Н. Григорьева¹, Д. М. Кочура², И. В. Сендерский¹, С. Н. Смирнов³, Е. А. Степаньчева¹, С. М. Тураева⁴

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

²НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург, 188663 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁴Институт химии растительных веществ АН РУз, Ташкент, 100170 Узбекистан

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

Поступила в редакцию 30.12.2019 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Выделены и охарактеризованы вторичные метаболиты четырех изолятов космополитного гриба *Bipolaris sorokiniana* различного географического происхождения. Анализ экстрактов культуральной жидкости и твердофазных культур методами ТСХ и ВЭЖХ-МС показал высокое сходство качественного состава метаболитов у изученных изолятов *B. sorokiniana*. С использованием колоночной хроматографии и препаративной ВЭЖХ из экстрактов твердофазных культур очищено 14 соединений (терпенов, ксантонов, хинонов и др.), 12 из которых было идентифицировано. Максимальную фитотоксическую активность на листьях пшеницы проявляла хлоромонилининовая кислота В (ХМКВ). Выделенные соединения в различной степени ингибировали рост *Bacillus subtilis*, наиболее сильно — метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат (МГМХК). Впервые у некоторых метаболитов *B. sorokiniana* (ХМКВ, МГМХК) обнаружена инсектицидная активность в отношении злаковой тли. Все выделенные метаболиты (особенно кохлиохиноны и фузапролиферин) были токсичны в отношении культуры клеток Sf9. Изученные вещества не проявляли острой токсичности в отношении инфузории-туфельки. Широкий набор синтезируемых биологически активных метаболитов может определять высокую токсигенность и конкурентоспособность *B. sorokiniana* в различных экологических нишах.

Ключевые слова: *Bipolaris sorokiniana*, химическая экология, вторичные метаболиты

DOI: 10.31857/S0555109920050050

Космополитный гриб *Bipolaris sorokiniana* поражает различные органы травянистых, преимущественно злаковых, растений и способен развиваться эндофитно, эпифитно и в почве. Этот микромицет является широко распространенным возбудителем корневой гнили и листовой пятнистости злаковых культур, нанося значительный экономический урон. Инфицирование зерна злаков этим фитопатогеном приводит к снижению их качества и всхожести, а также накоплению в них микотоксинов (например, стеригматоцистина) [1–4].

Начатые в середине 20 века исследования биологически активных метаболитов *B. sorokiniana* продолжаются до настоящего времени, позволяя обнаруживать все новые и новые соединения. Среди них встречаются вещества различной биологической активности (фитотоксической, антимицробной, нематодцидной, цитотоксической и др.) и

химической структуры (рис. 1, табл. 1). Возможно, метаболиты *B. sorokiniana* могут обладать и инсектицидными свойствами [5].

Исследования по выделению и характеристике метаболитов *B. sorokiniana* проводились рядом научных групп с использованием различных подходов и в разные годы. Это не позволяет представить общую картину разнообразия вторичных метаболитов этого гриба и спектр их биологической активности.

Цель работы — сравнение хроматографических профилей экстрактов из культур различных по географическому происхождению изолятов *B. sorokiniana*, идентификация биологически активных веществ (БАВ) экстрактов гриба и определение спектра биологической активности хроматографических фракций и полученных индивидуальных соединений.

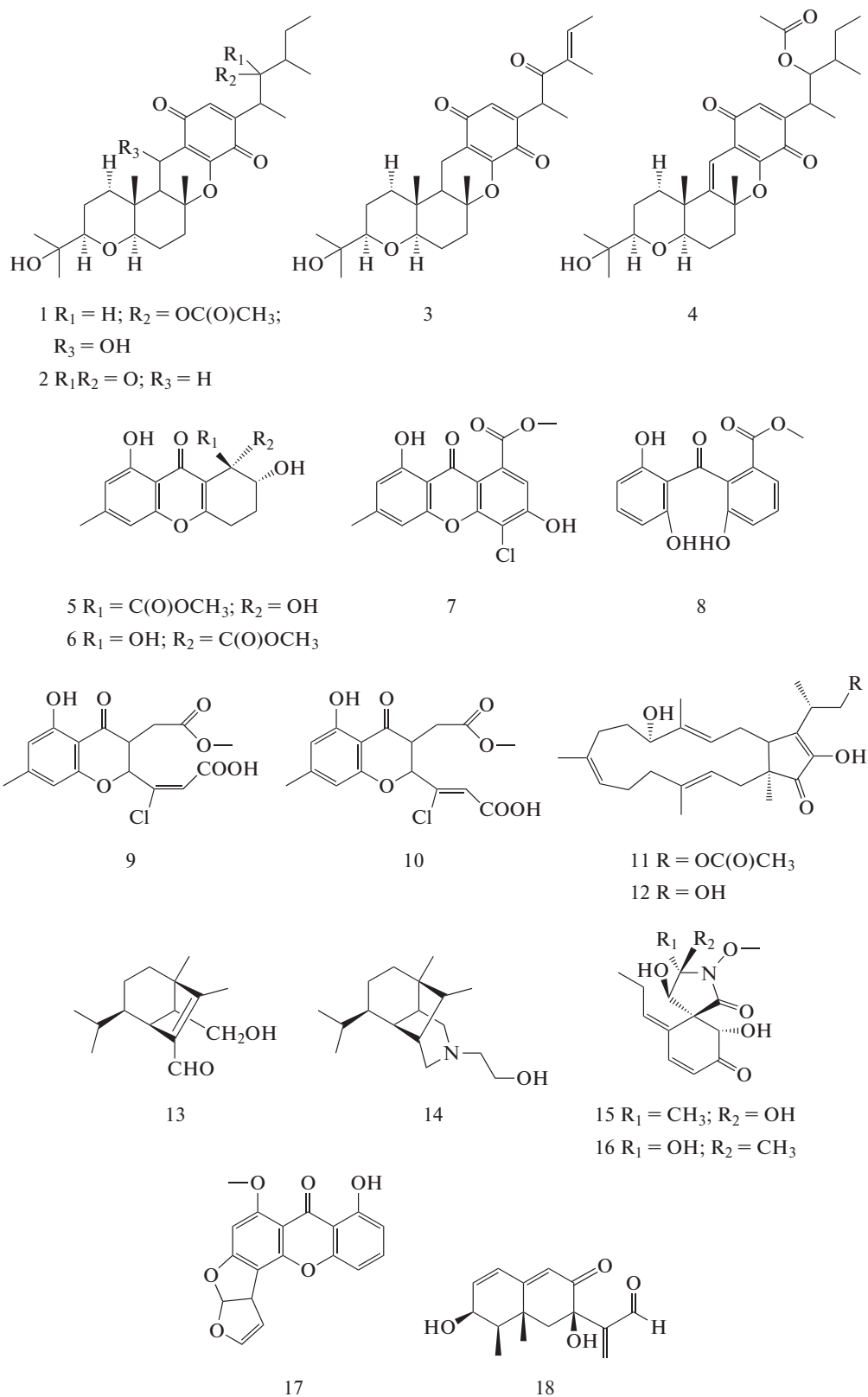


Рис. 1. Вторичные метаболиты, выделенные из *B. sorokiniana*: 1 – кохлиохинон А, 2 – кохлиохинон В, 3 – кохлиохинон D, 4 – ангидрокохлиохинон А, 5,6 – α,β -диверсолоновые эфиры, 7 – метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат, 8 – монифенон, 9 – хлормонилиниковая кислота В, 10 – хлоромонилиниковая кислота D, 11 – фузапролиферин, 12 – терпестацин, 13 – гельминтоспорол, 14 – виクトксинин, 15 – спиросафилотрихин R, 16 – спиросафилотрихин U, 17 – стеригматоцистин, 18 – биполароксин.

Таблица 1. Биологически активные вторичные метаболиты *B. sorokiniana* и их характеристика

Название	М, Да	УФ λ макс, нм	Активность*	Ссылка
Стеригматоцистин	324	240, 282, 321	ЦА	[6, 7]
Хлоромониликовая кислота В	352	205, 247, 333	ФА	[8, 9]
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	334	242, 309, 353	АМ	[9]
Цинодонтин	286	241, 295, 471, 483, 503, 514, 539, 552	АМ	[10]
Гельминтоспорин	270	252, 256, 287, 475, 490, 512, 526	АМ	
Прегельминтоспорол	236	Нет	ФА, АМ	[11]
Виктоксинин	263	Нет	ФА	[12]
Гельминтоспораловая кислота	250	Нет	ФА	[13]
Гельминтоспорол	236	266	ФА	
Гельминтоспорал	234	266	ФА	[14]
Сорокианин	308	Нет	ФА	[15]
Биполароксин	262	216, 279	ФА	[16]
Сорокиниол	374	Нет	ИФ	[17]
VZR котоксин-I	967	Нет	ФА, ИФ	
11-эпитерпестацин (терпестацин, сикканол)	402	264	ФА, АМ	[18, 19]
Кохлиохинон А	532	245, 280, 390, 270, 399	НА, ФА	[20, 21]
Кохлиохинон В	472	260, 395	ЦА, ФА	[22]
Кохлиохинон Н	470	203, 268	ЦА	
Кохлиохинон С	488	240, 280	ЦА, ФА	[23]
Кохлиохинон D	470	260, 400	ЦА	
Кохлиохинон Е	488	257	ЦА, ФА	
Биполарсеринол	302	264, 340	ИФ	[24]

* АМ – антимикробная, НА – нематическая, ИФ – ингибитор ферментов, ЦА – цитотоксическая, ФА – фитотоксическая активность.

МЕТОДИКА

Культивирование грибов и получение экстрактов. Изоляты *B. sorokiniana* были предоставлены сотрудником лаборатории иммунитета растений к болезням Всероссийского института защиты растений А.В. Анисимовой (Россия). Изоляты были выделены из образцов злаков, собранных в различных природно-климатических зонах России и Республики Беларусь: ЛО (листья ячменя, Ленинградская область, Россия), Бр20 (листья пшеницы, Республика Беларусь), К7 (листья пшеницы, Курганская обл., Россия), ПК (листья пшеницы, Приморский край, Россия). Культуры грибов хранили в пробирках на стандартной среде картофельно-глюкозном агаре (КГА) при температуре 5°C.

Экстракты *B. sorokiniana* получали согласно разработанному нами протоколу [5]. Для этого грибы культивировали в культуральных матрацах на 2 л с 400 мл жидкой питательной среды ДМГ, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4, мальтозный экстракт – 10, глюкоза – 10, а также в конических колбах объемом 500 мл на твердой среде, содержащей 60 г перловой крупы и 40 мл воды. Субстраты стерилизовали автоклавированием в течение 20 мин при 121°C. В качестве посевного материала использовали блоки диаметром 5 мм из

края недельных колоний *B. sorokiniana*, полученных на КГА при 24°C. Культуры грибов инкубировали в темноте в течение 3 нед при постоянной температуре 24°C. Для улучшения аэрации и предотвращения комкования твердофазных культур колбы ежедневно тщательно встряхивали. Культивирование грибов выполняли в 4 повторностях.

Метаболиты *B. sorokiniana* экстрагировали из культуральной жидкости (400 мл) этилацетатом (двумя порциями по 200 мл). Для извлечения метаболитов из твердофазных культур *B. sorokiniana* 10 г высушенного и грубоизмельченного биоматериала экстрагировали 50%-ным водным ацетоном (двумя порциями по 100 мл). Из экстракта, полученного 50%-ным ацетоном, упаривали органический растворитель на ротационном испарителе при 40°C, а затем метаболиты гриба переэкстрагировали из оставшейся водной вытяжки этилацетатом (двумя порциями по 50 мл). Остатки воды в этилацетатных экстрактах удаляли с помощью безводного сульфата натрия, после чего растворитель отгоняли на ротационном испарителе при 40°C. Сухой остаток взвешивали.

Биологическая активность. Для оценки фитотоксической и инсектицидной активности сухой остаток экстрактов или хроматографических ком-

понентов растворяли в этаноле и объем раствора доводили водой, чтобы конечная концентрация спирта составляла 5%, а остатков или компонентов – 0.5% (чистых веществ – 0.1%).

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 отрезков, в шести из которых в центре листа при помощи препарировальной 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 измеряли длину некротического пятна.

Лабораторную популяцию обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum*) содержали на проростках пшеницы в термостатированном помещении при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и длительности светового дня 16 ч. Для оценки инсектицидной активности полученными спиртовыми растворами пропитывали диски фильтровальной бумаги (по 250 мкл на диск), которые помещали на дно и крышку чашки Петри диаметром 4 см. Там же размещали отрезок листа пшеницы 2 см (сорт Саратовская 29), смоченный указанными выше спиртовыми растворами, и выпускали на него по 20 особей тли. Смертность насекомых и эффективность обработок учитывали через 1 сут инкубирования при температуре 24°C.

Цитотоксическую активность экстрактов метаболитов изучали по отношению к клеточной линии Sf9 (ECACC 89070101) кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), которая поддерживается в лаборатории микробиологической защиты ВИЗР (Санкт-Петербург, Россия). В лунки 48-луночного планшета вносили по 100 мкл 1%-ного экстракта, разведенного ацетоном, растворитель выпаривали. Сухой остаток растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида, после чего в каждую лунку вносили 880 мкл питательной среды SF900II (“Thermo Fisher Scientific”, США) и 100 мкл суспензии активно растущих клеток (жизнеспособность не ниже 90%) в концентрации 3×10^5 кл./лунку. В результате концентрация экстракта была 100 мкг/мл, растворителя – 2%. 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.

Оценку токсичности экстрактов проводили также и по отношению к клеткам инфузории-туфельки (*Paramecium caudatum*). Культуру инфузории, которая была предоставлена Д.О. Виноходовым (Санкт-Петербургский технологический университет, Россия), поддерживали на среде Лозина-Лозинского. В лунки 24-луночного планшета вносили по

0.5 мл суспензии клеток инфузории (примерно 100 кл./мл). К суспензии добавляли 5 мкл 1%-ного экстракта в ацетоне. Таким образом, конечная концентрация экстракта составила 100 мкг/мл, а ацетона – 1%. Каждый вариант включал 3 повторности. Выживаемость инфузорий анализировали через 3, 30 и 180 мин после начала эксперимента.

Антимикробную активность выделенных соединений определяли методом бумажных дисков (50 мкг/диск) на культуре *Bacillus subtilis* CIAM 106.

Хроматографический анализ экстрактов. *Тонко-слоистая хроматография (ТСХ).* Для анализа экстрактов методом ТСХ использовали нормально-фазовые пластины (TLC Silica gel 60 F254, 20 × 10 см, “Merck”, Германия) и хроматографическую систему (“Camag”, Швейцария), состоящую из автосамплера (ATS4) и УФ/ВИД-детектора (TLC Scanner). Сухой остаток экстрактов растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл и наносили распылением на пластины полосой, шириной 5 мм. Объем анализируемых проб составлял 10 мкл. Элюирование экстрактов осуществляли в камере 22 × 12 × 6 см (“Camag”, Швейцария) в системе растворителей толуол–этилацетат–уксусная кислота (60 : 40 : 1, об./об.). Предварительно были испытаны также системы толуол–этилацетат–уксусная кислота (70 : 30 : 1) и хлористый метиленаметанол (95 : 5). Компоненты экстрактов детектировали тремя способами: 1) с помощью УФ/ВИД-детектора при 200, 254, 270 и 340 нм; 2) визуально с помощью УФ-лампы на 254 нм (“Vilber-Lourmat”, Франция), 3) после дериватизации реагентом (серная кислота : анисовый альдегид : этанол в соотношении 1 : 1 : 8, по объему) с последующим нагреванием до 100°C 5 мин. Оценивали R_f веществ, их количество и площадь пиков или интенсивность полос, а также их окраску после дериватизации.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ-МС). Для растворения сухих остатков экстрактов и хроматографических фракций использовался ацетонитрил. Их анализировали с использованием системы ВЭЖХ Acella с трехкварупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Access™ (“Thermo Scientific”, США). Хроматографию осуществляли на колонке Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 100 мм с зернением 1.7 мкм (“Waters”, США). Разделение экстрактов (объем вводимой пробы – 2 мкл) проводили при потоке элюента 250 мкл/мин при температуре колонки 40°C в системе ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота в градиентном режиме: концентрация ацетонитрила повышалась от 10 до 100% в течение первых 10 мин, 100%-ный ацетонитрил в течение 5 мин, а с 15 до 16 мин концентрация ацетонитрила понижалась до 10% и поддерживалась на этом уровне еще 4 мин. Тип ионизации масс-

детектора — термоэлектрораспыление, диапазон сканирования 50–1000 m/z в режиме положительно заряженных ионов. Детектирование веществ в экстрактах проводили сканированием в диапазоне 200–800 нм. Для сравнения метаболитных профилей экстрактов на хроматограммах анализировали время удерживания и УФ-спектры метаболитов, полученные с помощью диодно-матричного детектора. Хроматограммы анализировали с помощью программы MZmine 2 [25].

Препаративное разделение экстрактов и их анализ. Поскольку метаболитные профили экстрактов различных изолятов *B. sorokiniana* были качественно схожими, экстракты из культур, полученных на одинаковых субстратах, были объединены. Всего при помощи описанной методики извлечения было получено 3.7 г маслянистого экстракта из 1200 г сухого зернового субстрата, колонизированного *B. sorokiniana*. Из 1.6 л фильтрата жидкой культуры *B. sorokiniana* на ДМГ получено 335 мг экстракта. Компоненты экстракта были разделены колоночной хроматографией на силикагеле (диаметр частиц 60–200 мкм, “Merck”, Германия). Стеклообразные колонки с соответствующим содержанием силикагеля (500 и 30 г) уравновесили этилацетатом и гексаном, экстракт наносили на него методом сухой загрузки. Компоненты элюировали следующими системами растворителей: гексан—этилацетат 75 : 25 (элюент А), гексан—этилацетат 60 : 40 (элюент Б), этилацетат (элюент В) и метанол (элюент Г). Собранные фракции анализировали методом ТСХ в системах толуол—этилацетат—уксусная кислота (60 : 40 : 1, об./об.), а также хлористый метилен—метанол (9 : 1). Близкие по метаболитному составу фракции объединяли.

Из экстракта твердофазных культур *B. sorokiniana* получено 11 гомогенных фракций (ПФ 1–11), жидких культур — 6 фракций (ЖФ 1–6). Фракцию ПФ 11, проявившую широкий спектр биологической активности, дополнительно разделяли гелефильтрацией на гидрофобном полимере Sephadex LH-20 (“GE”, США) в метаноле. Собранные фракции анализировали методом ТСХ в системе хлористый метилен—метанол (9 : 1) в результате чего было получено 6 гомогенных субфракций (ПФ 11.1–11.6). Все фракции анализировали при помощи ВЭЖХ-МС, их инсектицидную, цитотоксическую и фитотоксическую активность определяли, как описано выше.

Очистка и идентификация метаболитов. Для предварительной очистки метаболитов *B. sorokiniana* фракции, проявившие биологическую активность, разделяли при помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонке Chromabond C18ec (масса сорбента 10 г, “Macherey—Nagel”, Германия). Сорбент кондиционировали 40 мл метанола и 40 мл воды. Фракции вносили в колонку методом сухой загрузки. Метаболиты элюировали во-

дой, смесями вода—метанол с содержанием метанола 10, 25, 50 и 75% (об./об.), а также метанолом (по 100 мл). Элюаты упаривали на ротационном вакуумном испарителе при 40°C. Индивидуальные соединения из полученных субфракций очищали препаративной ВЭЖХ в системе ацетонитрил—0.1%-ная муравьиная кислота на колонках XBridge Prep C8 10 × 150 мм и Symmetry Shield RP18 19 × 150 мм, обе с зернением 5 мкм (“Waters”, США) в условиях, приведенных в табл. 2. Для этого использовали хроматографическую систему фирмы “Waters” (США), состоящую из насоса (Quaternary Gradient Module 2545), детектора (UV/Visible Detector 2489) и коллектора фракций (Fraction Collector III).

Для идентификации выделенных соединений были получены 1H и ^{13}C спектры ЯМР на спектрометре Bruker AVANCE III 400 Ultrashield Plus (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 400.1 и 100.6 МГц соответственно. Для снятия спектров вещества были растворены в дейтерированном хлороформе ($CDCl_3$). ВЭЖХ-МС индивидуальных соединений проводили в условиях, описанных выше. Соединения идентифицировали на основании УФ- и масс-спектров, 1H - и ^{13}C -спектров ЯМР, известных по литературе, и биологической активности метаболитов, выделенных из культур *B. sorokiniana* (табл. 1) и других видов рода *Bipolaris*. Инсектицидную, цитотоксическую и фитотоксическую активность индивидуальных соединений определяли, как было описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ метаболитных профилей экстрактов. Предварительные исследования с экстрактами из твердофазных культур *B. sorokiniana* позволили подобрать систему растворителей для разделения экстрактов методом ТСХ (толуол—этилацетат—уксусная кислота в соотношении 60 : 40 : 1, об./об.) и способ проявления хроматограмм реактивом на основе анисового альдегида и серной кислоты.

Визуальный анализ полученных хроматограмм показал, что экстракты из твердофазных культур характеризовались более сложным составом компонентов, чем экстракты из культуральной жидкости. При этом в зависимости от происхождения изолята гриба в них при УФ-детектировании было обнаружено от 8 до 11 полос при 254 нм и от 9 до 13 — при окрашивании реагентом. В экстрактах из культуральной жидкости этим методом выявлено всего 2 компонента при 254 нм и существенно больше — от 3 до 9 полос — после окрашивания. На рис. 2 приведена ТСХ-хроматограмма, которая хорошо иллюстрирует общее сходство составов метаболитов экстрактов из культур различных изолятов гриба и влияние на них субстрата.

Таблица 2. Условия очистки и физико-химическая характеристика выделенных метаболитов *Bipolaris sorokiniana*

Вещество	Объем модификатора в подвижной фазе, %	Скорость потока, мл/мин	Колонка*	t_R , мин	λ_{max} , нм	Характеристические ионы в масс-спектрах, m/z	$^1\text{H NMR}$
Сесквитерпен-1	55	6	1	4.3	265.2	237.07 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.78 м, 0.90 м, 1.04 с, 1.05 м, 1.06 с, 1.45 дд, 1.76 м, 1.85 дд, 2.01 с, 3.17 м, 3.78 дд, 4.25 дд, 10.04 с
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	45	24	2	5.4	241.5, 309.3, 353.0	334.93 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 302.91 $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$	2.46 с, 4.04 с, 6.68 с, 6.87 с, 7.03 с, 12.10 с
Андрокохлиохинон А	55	6	1	8.4	275.9, 493.2	515.21 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.89 д, 0.90 т, 1.14 м, 1.16 м, 1.21 с, 1.22 с, 1.37 м, 1.56 с, 1.59 м, 1.60 м, 1.62 м, 1.71 м, 1.73 м, 1.82 м, 2.05 м, 2.06 с, 2.13 м, 2.32 м, 3.20 м, 5.04 дд, 6.33 с, 6.56 с, 6.6 ушс
Гельмингоспорол	45	24	2	6.0	268.8	237.10 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.77 д, 0.88 м, 0.98 ушс, 0.99 м, 1.04 с, 1.08 д, 1.41 м, 1.68 дд, 1.75 м, 2.02 с, 3.19 ушс, 3.33 дд, 3.65 дд, 10.0 с
Фузапролиферин	50	6.6	1	5.2	196.7, 261.7	445.12 $[\text{M} + \text{H}]^+$	1.02 с, 1.33 с, 1.59 м, 1.64 с, 1.66 м, 1.70 м, 1.72 м, 1.80 м, 1.95 м, 2.05 с, 2.04 м, 2.10 м, 2.12 м, 2.29 м, 2.40 м, 2.70 м, 4.08 дд, 4.28 м, 5.15 дд, 5.27 дд, 5.40 т, 5.51 с, 6.53 с
Кохлиохинон В	50	6.6	1	6.2	203.8, 260.5, 402.3	473.21 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 455.21 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$	0.87 т, 0.89 с, 1.15 д, 1.17 с, 1.19 с, 1.20 м, 1.28 с, 1.29 д, 1.39 м, 1.46 дд, 1.50 м, 1.63 м, 1.80 м, 1.90 м, 2.14 дд, 2.18 м, 2.70 секс, 2.54 дд, 3.22 дд, 3.33 дд, 4.10 дкв, 6.50 д
Монилифенон	45	24	2	3.5	199.1, 284.2	303.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$	2.21 с, 3.70 с, 6.21 с, 7.14 д, 7.29 т, 7.48 д
Сесквитерпен-2	45	24	2	5.3	248.6	235.10 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.81 д, 0.99 м, 1.00 с, 1.04 м, 1.05 д, 1.22 м, 1.37 м, 1.66 м, 1.75 м, 2.04 с, 3.19 с, 3.44 м, 3.69 м

Таблица 2. Продолжение

Вещество	Объем модификатора в подвижной фазе, %	Скорость потока, мл/мин	Колонка*	t _R , мин	λ _{max} , нм	Характеристические ионы в масс-спектрах, m/z	¹ Н ЯМР
Кохлиохинон D	55	6	1	4.1	199.1, 233.3, 401.1	471.16 [M + H] ⁺ , 453.09 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.89 с, 1.17 с, 1.19 с, 1.20 м, 1.27 с, 1.27 д, 1.44 дд, 1.48 м, 1.77 ушс, 1.80 м, 1.87 д, 1.92 м, 2.13 м, 2.13 дд, 2.52 дд, 3.12 дд, 3.22 дд, 4.62 кв, 6.51 д, 6.86 кв
Кохлиохинон А	55	6	1	4.9	196.7, 270.0, 397.5	533.13 [M + H] ⁺ , 515.15 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.88 т, 0.89 д, 1.02 с, 1.15 д, 1.18 с, 1.19 с, 1.44 м, 1.56 м, 1.64 м, 1.74 м, 1.80 м, 1.92 м, 1.99 с, 2.09 м, 3.19 м, 3.27 м, 3.80 ушс, 5.00 м, 5.06 дд, 6.59 с
Диверсолонные эфиры	30	22	2	7.7	239.2, 327.2	320.94 [M + H] ⁺ , 302.94 [M + H - H ₂ O] ⁺ , 270.94 [M + H - H ₂ O - CH ₃ OH] ⁺	2.18 м, 2.39 с, 2.84 м, 2.94 м, 3.78 д, 4.01 м, 6.58 с, 6.75 д
Терлестацин	40	6.6	1	7.6	190.9, 262.9	403.18 [M + H] ⁺ , 385.18 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.99 с, 1.29 с, 1.57 с, 1.64 с, 1.63 с, 1.70 м, 1.72 м, 1.78 м, 1.92 м, 2.00 м, 2.09 м, 2.16 м, 2.26 м, 2.27 м, 2.37 м, 2.44 м, 2.68 м, 2.70 м, 3.80 дд, 3.89 дд, 4.06 дд, 5.13 м, 5.24 дд, 5.40 м, 6.90 ушс
Хлоромониликовая кислота В	40	20	2	10.6	205.0, 247.4, 333.2	352.93 [M + H] ⁺ , 320.91 [M + H - CH ₃ OH] ⁺	2.42 с, 3.52 с, 3.69 с, 6.66 с, 6.71 с, 6.82 с
Хлоромониликовая кислота D	40	20	2	11.4	203.8, 261.7, 335.5	352.91 [M + H] ⁺ , 320.90 [M + H - CH ₃ OH] ⁺	2.44 с, 3.65 с, 3.75 с, 6.68 с, 6.78 с, 6.86 с

* Колонка 1 – Xbridge Prep C8, колонка 2 – Symmetry Shield RP18 (см. раздел “Методика”).

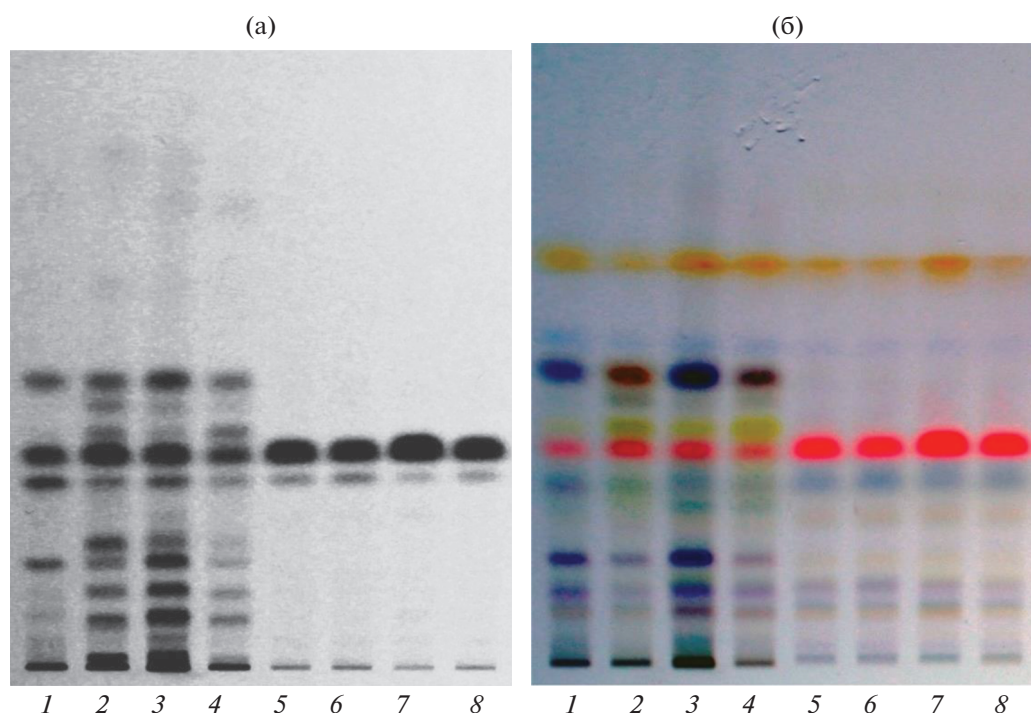


Рис. 2. Нормально-фазовые ТСХ-хроматограммы экстрактов *B. sorokiniana* в зависимости от происхождения изолята и состава субстрата, при использовании различных методик визуализации: а – визуализация при 254 нм, б – окрашивающие реактивом на основе серной кислоты и анисового альдегида: 1 и 5 – изолят ЛО, 2 и 6 – Бр20, 3 и 7 – К7, 4 и 8 – ПК. 1–4 – экстракты из твердофазной культуры, 5–8 – из культуральной жидкости.

Эти же пластины были проанализированы при помощи УФ/ВИД-детектора при 200 нм (для выявления не поглощающих УФ сесквитерпенов) и 270 нм (для обнаружения поглощающих УФ терпенов и кохлиохинонов) (см. табл. 1). Сравнительный анализ полученных хроматограмм позволил дифференцировать экстракты по качественному составу метаболитов, образованных *B. sorokiniana* на жидком и твердом субстратах. В экстрактах из твердофазных культур различных изолятов *B. sorokiniana* при 200 нм было обнаружено до 11 компонентов и при 270 нм – до 9. Это оказалось несколько меньше, чем при визуальной оценке пластины, проявленных неспецифическим реактивом. В экстрактах из культуральной жидкости *B. sorokiniana* на среде ДМГ было детектировано до 7 компонентов при 200 нм и 5 – при 270 нм. При 270 нм мажорным во всех экстрактах было соединение с хроматографической подвижностью R_f 0.50, доминирующих пиков при λ 200 нм не было выявлено (рис. 3). Изучение состава экстрактов при других длинах волн было менее информативным.

Анализ экстрактов из культур различных изолятов *B. sorokiniana*, полученных на одних и тех же субстратах, методом ВЭЖХ-МС, показал их высокое сходство по качественному составу мажорных метаболитов (рис. 4). Так, в экстрактах были обнаружены по 11 мажорных компонентов, кото-

рые различались временем удерживания и массой молекулярных ионов. В экстрактах из культуральной жидкости гриба на ДМГ и твердофазных культур на перловой крупе обнаружено 5 одинаковых компонентов, которые характеризовались временем удерживания (t_R) 5.1 мин (m/z 262 Да), 5.4 мин (m/z 264 Да), 6.5 мин (m/z 235 Да), 7.1 мин (m/z 237 Да) и 8.7 мин (m/z 219 Да).

Мажорным метаболитом в экстрактах из культур гриба оказалось соединение с t_R 7.1 мин, m/z 237 Да (рис. 4) и УФ-спектром с максимумом при 266 нм [26] (табл. 1). По данным работы [27] имеющий такую молекулярную массу, но не поглощающий УФ прегельминтоспорол при ионизации термоэлектрораспылением образует основной пик m/z 219 Да $[M + N - H_2O]^+$, по-видимому, являясь менее стабильным, чем гельминтоспорол. Вещество с m/z 219 Да (t_R 8.7 мин) было также обнаружено как минорный компонент экстрактов из культуральной жидкости (КЖ) гриба на среде ДМГ. Другой мажорный компонент, который можно было предварительно идентифицировать как виктоксинин, характеризовался t_R около 5.4 мин и m/z 264 Да (рис. 4). Это соединение встречается у различных штаммов *B. sorokiniana* и обладает высокой фитотоксической активностью [12, 28].

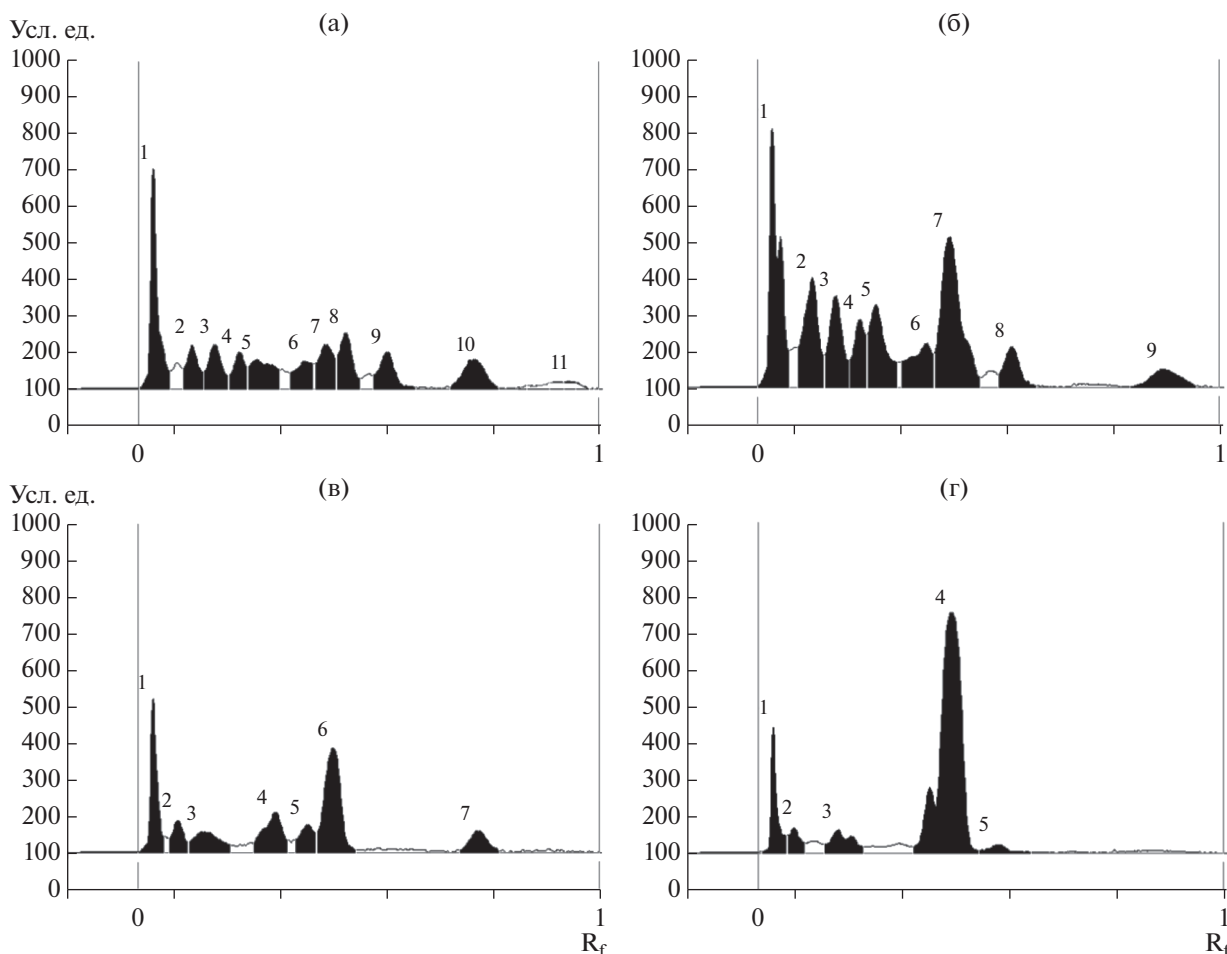


Рис. 3. Хроматограммы экстрактов твердых (а, б, перловая крупа) и жидких (в, г, КЖ, среда ДМГ) культур *B. sorokiniana*, полученные методом нормально-фазовой ТСХ при 200 (а, в) и 270 нм (б, г).

В экстракте КЖ на ДМГ выявлен мажорный компонент с t_R 1.0 мин и несколько минорных компонентов (t_R 3.4 мин и 3.7 мин) с m/z 280 (рис. 4). По литературным данным таким зарядом может обладать осколочный ион $[M + H - H_2O]^+$ некоторых спиростафилотрихинов (например, спиростафилотрихинов R и U) с молекулярной массой 297 Да [29]. Следует отметить, что соединения из группы спиростафилотрихинов ранее не обнаруживались у *B. sorokiniana*. Остальные соединения в экстрактах *B. sorokiniana* идентифицировать не удалось.

Биологическая активность и состав фракций. Из экстракта культуральной жидкости *B. sorokiniana* на ДМГ путем разделения на нормально-фазовой колонке получено 6 гомогенных фракций (ЖФ 1–6). Фитотоксическая активность была обнаружена во фракциях ЖФ 3, ЖФ 4 и ЖФ 6. Под воздействием соединений из фракций ЖФ 3 и 4 развивались поражения не только на поврежденных, но и на неповрежденных листовых отрезках пшеницы.

Относительно слабую цитотоксическую активность продемонстрировали фракции ЖФ 4 и 5 в концентрации 50 мкг/мл. Остальные фракции не проявляли цитотоксическую активность даже при увеличении концентрации до 100 мкг/мл. Умеренную инсектицидную активность продемонстрировали фракции ЖФ 3 и 6 (табл. 2).

Во фракции ЖФ 3 основным метаболитом было не идентифицированное соединение с t_R 5.1 мин и m/z 262 Да, а также три соединения с одной и той же молекулярной массой (m/z 468 Да), но с разными временами удерживания (7.5, 9.1 и 9.8 мин). Предположительно, эти соединения представляли собой кохлиохинон G (молекулярная масса 485 Да) и его изомеры, если осколочный ион 468 Да соответствовал $[M + H - H_2O]^+$. Во фракции ЖФ 4 основным было неизвестное соединение с m/z 332, а во фракции ЖФ 6 – соединение (предположительно виктоксинин) с t_R 5.4 мин (m/z 264). Пять мажорных соединений остались не идентифицированными (табл. 3).

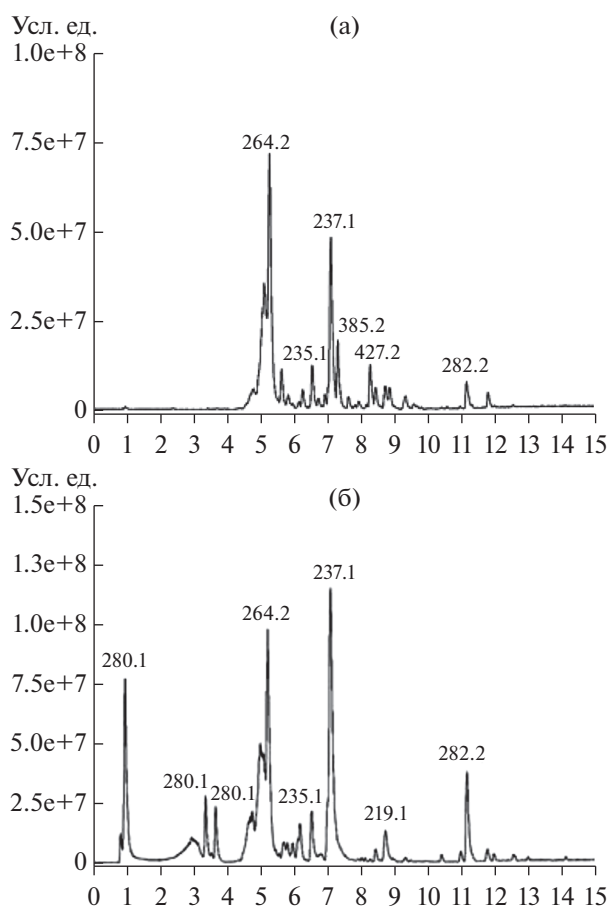


Рис. 4. ВЭЖХ/МС-хроматограммы экстрактов из твердофазной (а) и жидкой (б) культур *B. sorokiniana*.

К фитотоксинам гриба, образующимся на зерновом субстрате, были чувствительны только поврежденные отрезки листьев пшеницы. Наиболее высокой фитотоксичностью на них обладали фракции ПФ 10 и 11.3. Фракции ПФ 6–8 и ПФ 11, а также все субфракции последней продемонстрировали относительно высокий уровень цитотоксической активности при концентрации 10 мкг/мл. Инсектицидную активность проявляли фракции ПФ 5, 7, 8, 10 и ПФ 11, а также ПФ 11.2, 11.3 и 11.6. При этом инсектицидная активность фракций ПФ 5, 9 и 10 не была связана с их цитотоксической активностью, а фракций ПФ 8 – фитотоксической активностью (табл. 3).

Из хроматографических фракций, проявивших заметную биологическую активность, было очищено 14 индивидуальных соединений (табл. 3). Их структура была установлена спектральными методами путем сравнения с данными литературы (табл. 1). Однако значительная часть соединений осталась не идентифицированной. Так, из фракции ПФ 3 были выделены неидентифицированные сесквитерпен-1 (молекулярная масса 236 Да, УФ максимум при 265 нм) и сесквитерпен-2 (молеку-

лярная масса 234 Да, УФ максимум при 249 нм). Во фракциях ПФ 5–8 были обнаружены виктоксинин и гельминтоспорол, однако при этом отмечено высокое содержание соединений с молекулярными массами от 400 до 600 Да, которые предположительно можно было отнести к группе кохлиохинонов. Из них удалось выделить и идентифицировать 4 соединения этой группы. Во фракции ПФ 6 в качестве доминирующего оказалось неизвестное соединение, характеризующееся m/z 731 (табл. 3).

Выделенные и идентифицированные в работе метаболиты *B. sorokiniana* относились к таким группам природных соединений, как сесквитерпены (гельминтоспорол, виктоксинин и родственные им соединения), сестертерпеноиды (фузапролиферин и терпестацин), хиноны (кохлиохиноны А, В и D, ангидрокохлиохинон А), хромоны (диверсолонные эфиры и монилифенон) и хлорированные ксантоны (метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат) и их производные (хлоромонилиниковые кислоты В и D). Следует отметить, что ангидрокохлиохинон А [30], монилифенон [31] и диверсолонные эфиры [32], обнаруженные ранее у *B. oryzae*, *Monilinia fructicola* и *Penicillium diversum* соответственно, были найдены у *B. sorokiniana* впервые.

В результате анализа ВЭЖХ-МС и препаративного разделения экстрактов не удалось обнаружить и выделить биполароксин, который по данным работы [16] является доминирующим фитотоксином в экстрактах *B. sorokiniana*. Можно предположить, что это соединение, как и структурно близкие к нему эремофиланы, является крайне нестабильным и быстро разрушается в воде и на силикагеле [33]. Несмотря на наличие у некоторых компонентов экстрактов характерных для ксантонов УФ-спектров, основной микотоксин этого гриба – стеригматоцистин в анализируемых экстрактах различных изолятов гриба выявлен не был (табл. 2). Можно предположить, что этот микотоксин следует детектировать на начальных фазах роста гриба, как было показано ранее в работе [34].

Спектр биологической активности метаболитов *B. sorokiniana*. Большинство соединений, которые ранее выделялись из *B. sorokiniana*, были оценены по 1 или 2 типам биологической активности, преимущественно, фитотоксической или цитотоксической (табл. 1). В данной работе показано, что все 14 выделенных и идентифицированных соединений показали более широкий спектр действия.

Так, относительно высокой фитотоксической активностью на листьях пшеницы в концентрации 1 мг/мл обладали кохлиохинон А, терпестацин и хлоромонилиниковая кислота В, что подтверждало полученные ранее данные об их высокой фитотоксичности (табл. 1, 3). Фитотоксичными

Таблица 3. Спектр биологической активности хроматографических фракций, полученных из экстрактов *B. sorokiniana*, и обнаруженных в них соединений

Номер фракции	Масса, мг	ЦА ¹	ФА ²		ИА ³	Идентифицированные соединения или <i>m/z</i> мажорных компонентов
			БП	П		
Экстракт из культуральной жидкости культур на ДМГ						
ЖФ3	14	–	+	++	+	262, 468, 468, 468
ЖФ4	5	+	+	++	–	332
ЖФ5	143	–	–	+	–	Гельминтоспорол
ЖФ6	113	+	–	++	+	Виктоксинин
Экстракт из твердофазных культур						
ПФ2	162	–	–	–	–	Не определено
ПФ3	560	–	–	–	–	237
ПФ4	285	–	+	+	–	Не определено
ПФ5	505	–	–	+	++	Ангидрокохлиохинон А, метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат
ПФ6	939	++	–	+	+	Гельминтоспорол, фузапролиферин, кохлиохинон В, 731
ПФ7	410	++	–	+	++	Монилифенон, кохлиохинон А, кохлиохинон D, 335
ПФ8	74	++	–	–	++	
ПФ9	252	–	–	+	+	α,β-диверсолонные эфиры, терпестацин
ПФ10	359	–	–	++	++	
ПФ11	2034	++	–	+	++	Терпестацин, хлоромонилиниковая кислота В, хлоромонилиниковая кислота D
ПФ11.1	302	++	–	+	–	
ПФ11.2	287	++	–	+	+	
ПФ11.3	290	++	–	++	+	
ПФ11.4	360	++	–	+	–	
ПФ11.5	150	++	–	–	–	
ПФ11.6	7	++	–	++	+	

* ЦА – цитотоксическая активность, “–” – от 0 до 25%, “+” – от 25 до 75%, “++” – от 75 до 100% погибших клеток линии Sf9 через 24 ч после обработки 50 мкг/мл экстракта из КЖ или 10 мкг/мл экстракта из твердофазной культуры;

** ФА – фитотоксическая активность, (длина некротического пятна, мм) через 48 ч после обработки, “–” – от 0–1 мм, “+” – от 1–3 мм, “++” от 4–5 мм, БП – отрезки листьев пшеницы без повреждений, П – с повреждением.

*** ИА – инсектицидная активность (% гибели злаковой тли относительно контроля через 24 ч после обработки), “–” – от 0–25%, “+” – от 25–75%, “++” – от 75–100%.

для пшеницы были также гельминтоспорол, не идентифицированный сесквитерпен 2 и фузапролиферин (табл. 3).

Большинство выделенных соединений (исключение составляли лишь хлоромонилиниковые кислоты) в различной степени ингибировало рост грамположительной бактерии *B. subtilis* в концентрации 50 мкг/диск. Подтверждена также относительно высокая антимикробная активность кохлиохинона А и метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилата (МГМХК), а также умеренная – гельминтоспорол (табл. 1) и ангидрокохлиохинона А [35]. Впервые была обнаружена антибактериальная активность у кохлиохинонов В и D, а также диверсолонных эфиров. Оба не идентифицированных сесквитерпена также обладали высокой антибактериальной активностью

(зона лизиса около 8 мм), в связи с этим идентификация их структуры представляет интерес для дальнейших исследований.

Можно предположить, что столь богатый набор веществ, проявляющих антимикробные свойства, одновременно образуемых *B. sorokiniana*, необходим для выживания в почве и на растительных остатках, а также для конкуренции с другим фитопатогенами. Библиотека выделенных веществ может представлять интерес для изучения их аддитивного и синергетического эффектов на широком круге микроорганизмов почвы и филлосферы, а также для определения их экологической роли в развитии *B. sorokiniana*.

В работе впервые изучена инсектицидная активность метаболитов *B. sorokiniana*. Относительно высокую активность при концентрации 1 мг/мл

Таблица 4. Спектр биологической активности метаболитов *Bipolaris sorokiniana*⁶

Метаболит	Активность					
	фитотоксическая ¹	антимикробная ²	инсектицидная ³	цитотоксическая		инфузории ⁴
				50 мкг/мл	5 мкг/мл	
Гельмингоспорол	1.5 ± 0.5	4.3 ± 1.5	8.6 ± 2.4	79.1 ± 13.3	0	—
Сесквитерпен-1	0.7 ± 0.5	8.0 ± 1.0	10.0 ± 1.1	85.9 ± 9.2	0	—
Сесквитерпен-2	1.8 ± 1.0	7.7 ± 1.2	17.2 ± 8.3	52.8 ± 28.4	0	—
Кохлиохинон А	2.0 ± 0.6	7.7 ± 0.6	45.0 ± 20.2	98.7 ± 1.6	100 ± 0	+
Ангидрокохлиохинон А	0	3.7 ± 0.6	26.3 ± 11.0	98.7 ± 0.9	100 ± 0	++
Кохлиохинон В	1.0 ± 0	5.0 ± 0.0	32.3 ± 12.6	100 ± 0	100 ± 0	+
Кохлиохинон D	1.3 ± 0.8	7.3 ± 1.5	27.3 ± 12.1	99.2 ± 0.5	99.6 ± 0.4	+
Фузапролиферин	1.7 ± 0.5	6.0 ± 1.0	17.3 ± 6.3	98.7 ± 0.9	99.3 ± 0.9	—
Терпестацин	2.2 ± 0.4	5.0 ± 0	14.8 ± 5.9	100 ± 0	0	++
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	0.5 ± 0.5	12.0 ± 0	80.0 ± 8.5	100 ± 0	0	++
Монилифенон	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	42.5 ± 23.6	64.2 ± 8.2	0	—
Диверсолонные эфиры	0	6.7 ± 0.6	14.5 ± 9.4	82.3 ± 12.2	0	—
Хлоромонилининовая кислота В	2.8 ± 0.8	0	73.8 ± 9.1	46.3 ± 8.1	0	—
Хлоромонилининовая кислота D	1.2 ± 0.8	0	5.0 ± 4.8	53.0 ± 16.5	0	—

¹Длина некротического пятна на отрезках листьев пшеницы, мм (концентрация тестируемых веществ 1 мг/мл). ²Радиус зоны ингибирования роста *Bacillus subtilis*, мм (50 мкг/диск). ³Смертность злаковой тли относительно контроля, % (1 мг/мл, 0.2 мг/дм²). ⁴“+”, “++”, “+++”, “++++” — гибель инфузорий наступала через 180, 30 и 3 мин соответственно (50 мкг/мл), “—” — клетки не погибли. ⁵Смертность клеток в тестовых лунках относительно контрольных, %. ⁶Указаны средние значения и стандартные отклонения.

(0.2 мг/дм²) по отношению к злаковой тле с эффективностью на уровне 80% показали МГМХК и хлоромонилининовая кислота В. Примерно в 2 раза ниже была инсектицидная активность у кохлиохинонов А и В, а также у монилифенона (табл. 4). По данным работы [36] стеригматоцистин оказывал ларвицидные свойства по отношению к личинкам малярийного комара *Anopheles gambiae* с ЛД₅₀ 100 мкг/мл.

Все выделенные соединения обладали выраженной в различной степени цитотоксической активностью. Высокую цитотоксическую активность либо по отношению к клеткам инфузорий, либо линии клеток Sf9 продемонстрировали соединения из группы кохлиохинонов, фузапролиферин, терпестацин и МГМХК. Остальные соединения продемонстрировали умеренную токсичность для клеток насекомых в относительно высокой концентрации 50 мкг/мл (табл. 4). Высокая цитотоксическая активность кохлиохинонов [22] и терпестацина [37] хорошо известна, и они рассматриваются как перспективные соединения для лечения различных онкологических заболеваний. Фузапролиферин оценивается как микотоксин также и у некоторых грибов рода *Fusarium* [38].

Таким образом, исследование показало высокое сходство состава метаболитов у изученных изолятов *B. sorokiniana* различного географического происхождения. Подтверждена продукция ими широкого спектра вторичных метаболитов различных групп: терпенов, ксантонов, хинонов, алкалоидов и других. При этом, образование в культурах *B. sorokiniana* таких метаболитов, как биполароксин и стеригматоцистин, требуют уточнения с учетом нестабильности первого и времени продукции второго. Биосинтез вторичных метаболитов широкого спектра действия, по-видимому, определяет способность гриба к отличной выживаемости и высокой конкурентоспособности в различных экологических нишах – почве, растениях и семенах. Многие из выявленных метаболитов перспективны для разработки лекарственных средств или пестицидов, поэтому *B. sorokiniana* можно считать их возможным продуцентом для использования в биотехнологии. Продукция грибом таких высокотоксичных веществ, как стеригматоцистин, кохлиохиноны, фузапролиферин, терпестацин и метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат, свидетельствует о необходимости оценки их накопления в пораженном им зерне.

Работа выполнена при финансовой 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 (AAAA-A16-116080510099-8), а

также при частичной поддержке Фонда Ель-Юрт (El-Yurt Umidi Foundation, Узбекистан).

Работа выполнена в Центре коллективного пользования “Инновационные технологии защиты растений” ФГБНУ ВИЗР и ресурсном центре “Магнитно-резонансные методы исследования” научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семьнина Т.В. // Защита и карантин растений. 2008. № 9. С. 24–25.
2. Niessen L. // Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology / Eds. N.A. Bokulich, C.W. Bamforth. Poole (U.K.): Caister Academic Press, 2017. P. 197–244.
3. Cegiełko M., Kiecana I., Mielniczuk E., Waśkiewicz A., Bocianowski J. // Acta Sci. Pol. Hortorum Cultu. 2018. V. 17. № 2. P. 149–166.
4. Gupta P.K., Chand R., Vasistha N.K., Pandey S.P., Kumar U., Mishra V.K., Joshi A.K. // Plant Pathol. 2018. V. 67. № 3. P. 508–531.
5. Берестецкий А.О., Григорьева Е.Н., Петрова М.О., Степаньчева Е.А. // Микол. и фитопатол. 2018. Т. 52. № 6. С. 408–419.
6. Maes C.M., Steyn P.S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. P. 1137–1140.
7. Nieto C.H.D., Granero A.M., Zon M.A., Fernández H. // Food Chem. Toxicol. 2018. V. 118. P. 460–470.
8. Masi M., Meyer S., Clement S., Pescitelli G., Cimmino A., Cristofaro M., Evidente A. // J. Nat. Prod. 2017. V. 80. № 10. P. 2771–2777.
9. Han J., Zhang J., Song Z., Liu M., Hu J., Hou C., Zhu G., Jiang L., Xia X., Quinn R.J., Feng Y., Zhang L., Hsiang T., Liu X. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 13. P. 5167–5181.
10. Engstrom K., Brishammar S., Svensson C., Bengtsson M., Andersson R. // Mycol. Res. 1993. V. 97. № 3. P. 381–384.
11. Åkesson H., Jansson H.-B. Monitoring Antagonistic Fungi Deliberately Released into the Environment. / Eds. D.F. Jensen, H.B. Jansson, A. Tronsmo. Dordrecht: Springer, 1996. P. 99–104.
12. Pena-Rodriguez L.M., Chilton W.S. // J. Nat. Prod. 1989. V. 52. № 4. P. 899–901.
13. Qader M.M., Kumar N.S., Jayasinghe L., Araya H., Fujimoto Y. // Mycology. 2017. V. 8. № 1. P. 17–20.
14. Mayo de P., Spencer E.Y., White R.W. // Can. J. Chem. 1961. V. 39. № 8. P. 1608–1612.
15. Nakajima H., Isomi K., Hamasaki T. // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. № 51. P. 9597–9600.
16. Jahani M., Aggarwal R., Gupta S., Sharma S., Dureja P. // Cereal Res. Comm. 2014. V. 42. № 2. P. 252–261.
17. Ali L., Khan A.L., Hussain J., Al-Harrasi A., Waqas M., Kang S.-M., Al-Rawahi A., Lee I.-J. // BMC Microbiology. 2016. V. 16. Article № 103. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0722-7>
18. Nihashi Y., Lim C.-H., Tanaka C., Miyagawa H., Ueno T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 3. P. 685–688.

19. Cimmino A., Sarrocco S., Masi M., Diquattro S., Evidente M., Vannacci G., Evidente A. // Chemistry & Biodiversity. 2016. V. 13. № 11. P. 1593–1600.
20. Schaeffer J.M., Frazier E.G., Bergstrom A.R., Williamson J.M., Liesch J.M., Goetz M.A. // J. Antibiotics. 1990. V. 43. № 9. P. 1179–1182.
21. Miyagawa H., Nagai S., Tsurushima T., Sato M., Ueno T., Fukami H. // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1994. V. 58. № 6. P. 1143–1145.
22. 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. // Fito-terapia. 2016. V. 110. P. 77–82.
23. Lim C.-H., Miyagawa H., Akamatsu M., Nakagawa Y., Ueno T. // J. Pesticide Sci. 1998. V. 23. № 3. P. 281–288.
24. Khan A. L., Ali L., Hussain J., Rizvi T.S., Al-Harrasi A., Lee I.-J. // Molecules. 2015. V. 20. № 7. P. 12198–12208.
25. Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M. // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. Article № 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
26. Abdel-Lateff A., Okino T., Alarif W.M., Al-Lihaibi S.S. // J. Saudi Chem. Society. 2013. V. 17. № 2. P. 161–165.
27. Carlson H., Nilsson P., Jansson H.-B., Odham G. // J. Microbiol. Methods. 1991. V. 13. № 4. P. 259–269.
28. Pringle R.B. // Can. J. Biochem. 1976. V. 54. № 9. P. 783–787.
29. De Almeida T.T., Ribeiro M.A. dos S., Polonio J.C., Garcia F.P., Nakamura C.V., Meurer E.C., Sarragiotto M.H., Baldoqui D.C., Azevedo J.L., Pamphile J.A. // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32. № 23. P. 2783–2790.
30. Phuwapraisirisan P., Sawanga K., Siripong P., Tip-pyang S. // Tetrahedron Lett. 2007. V. 48. № 30. P. 5193–5195.
31. Kachi H., Sassa T. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. № 6. P. 1669–1671.
32. Holker J.S.E., O'Brien E., Simpson T.J. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1983. № 1. P. 1365–1368.
33. Wang L., Li M., Tang J., Li X. // Molecules. 2016. V. 21. № 4. Article 473. <https://doi.org/10.3390/molecules21040473>
34. Rabie C.J., Lubben A.L., Steyn M. // App. Environ. Microbiol. 1976. V. 32. № 2. P. 206–208.
35. Campos F.F., Ramos J.P., de Oliveira D.M., Alves T.M.A., de Souza-Fagundes E.M., Zani C.L., Sampaio F.C., Converti A., Cota B.B. // J. Biosci. 2017. V. 42. № 4. P. 657–664.
36. Matasyoh J.C., Dittrich B., Schueffler A., Laatsch H. // Parasitol. Res. 2011. V. 108. № 3. P. 561–566.
37. Jung H.J., Shim J.S., Lee J., Song Y.M., Park K.C., Choi S.H., Kim N.D., Yoon J.H., Mungai P.T., Schumacker P.T., Kwon H.J. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 15. P. 11584–11595.
38. Stanković S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. // European J. Plant Pathol. 2007. V. 118. № 2. P. 165–172.

Analysis and Isolation of Secondary Metabolites of *Bipolaris sorokiniana* by Different Chromatography Techniques and the Spectrum of Their Biological Activity

A. O Berestetskiy^{a,*}, A. A. Dalinova^a, V. R. Dubovik^a, E. N. Grigoryeva^a,
D. M. Kochura^b, I. V. Senderskiy^a, S. N. Smirnov^c, E. A. Stepanycheva^a, and S. M. Turaeva^d

^aAll-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, 196608 Russia

^bResearch Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg, 188663 Russia

^cSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^dInstitute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, 100170 Uzbekistan

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

Secondary metabolites were isolated from cultures of four geographically distant isolates of the cosmopolitan fungus, *Bipolaris sorokiniana* for intense biological characterization. Analysis of extracts from their liquid and solid cultures with TLC and HPLC-MS showed high similarity of their composition despite on fungal origin. From the extracts of *B. sorokiniana* 14 metabolites (terpenes, quinones, xanthenes etc.) were isolated using column chromatography and preparative HPLC; among them, 12 known substances were identified. Chloromonilinic acid B (CAB) showed the highest level phytotoxic activity on wheat leaves. The most of isolated compounds inhibited growth of *Bacillus subtilis*, of which methyl-8,3-hydroxy-3-methyl-4-chloroxanthone-1-carboxylate (MMC) demonstrated the strongest activity. Some metabolites of *B. sorokiniana* (CAB and MMC) were shown to have insecticidal activity against common cereal aphid. All the compounds were cytotoxic (especially, cochliquinones and fusaroproliferin) when tested on Sf9 cell line. However, no one was acute toxic for infusoria. Evidently, the production of multiple bioactive compounds makes *B. sorokiniana* a strong competitor in different ecological niches and a dangerous contaminant of grain.

Keywords: *Bipolaris sorokiniana*, chemical ecology, secondary metabolites