

УДК 582.284.51:577.115

ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА И ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МИЦЕЛИЯ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ ГРИБА *Stagonospora cirsii* ВИЗР 1.41

© 2021 г. Г. М. Фролова¹, Е. Р. Котлова², С. В. Сокорнова¹, С. В. Сеник²,
А. Л. Шаварда², А. Д. Мишарев³, А. О. Берестецкий¹, *

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, 196608 Россия

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376 Россия

³Ресурсный центр “Методы анализа состава вещества” Санкт-Петербургского государственного университета, Петергоф, 198504 Россия

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

Поступила в редакцию 11.09.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Для идентификации маркеров качества потенциального микогербицида против бодяка полевого (*Cirsium arvense*) на основе мицелия гриба *Stagonospora cirsii* ВИЗР 1.41 проанализированы изменения его патогенности и липидного профиля в процессе глубинного культивирования. Определены жирнокислотный состав и молекулярные виды доминирующих липидов. Показано, что липидный состав мицелия в процессе роста *S. cirsii* существенно меняется вместе с изменением его патогенных свойств. Наиболее патогенный мицелий (в фазе экспоненциального роста) характеризовался относительно максимальным содержанием таких структурных липидов, как фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилэтаноламины (ФЭ) и эргостерин. С возрастом культуры и со снижением патогенности мицелия их содержание в биомассе также снижалось. В начале стационарной фазы роста *S. cirsii* наблюдали максимальную концентрацию липидов, среди которых преобладали триацилглицериды. Установлено, что при старении мицелия снижался индекс двойных связей жирных кислот в составе глицеролипидов, а также происходила замена молекулярных форм ФХ (34:2 на 36:4) и ФЭ (36:4 на 34:2). Можно предположить, что маркерами качества мицелия *S. cirsii* могут служить высокий уровень эргостерина, триацилглицеридов, фосфатидилхолинов (в частности, 34:2-форм) и фосфатидилэтаноламинов (36:4-форм).

Ключевые слова: *Stagonospora cirsii*, микогербицид, липиды, молекулярные формы, патогенность

DOI: 10.31857/S0555109921020033

Липидный состав грибов – возбудителей заболеваний различных организмов, может быть связан с их вирулентными свойствами, такими как адгезия, инвазивность, развитие, персистенность [1]. Так, в мицелии и спорах микромицетов (например, фитопатогенных, энтомопатогенных и микоризообразующих) часто встречаются липидные включения [2–4]. Накапливающиеся в них триацилглицериды (ТАГ) служат не только резервным источником энергии для успешной колонизации хозяина, но и обеспечивают молекулярное разнообразие фосфолипидов в процессе ремоделинга [5, 6]. В инфекционный процесс вовлечены мембранные липиды различных классов, обеспечивая взаимодействие патогена и хозяина [1, 7]. Этот процесс также зависит от фосфолипидного гомеостаза в клетках грибного патогена, в частности, концентрации и соотношения фосфатидилхо-

линов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) [8–10], а также содержания эргостерина (ЭС) [11] и сфинголипидов, в особенности, гликоцерамидов (ГлЦер) [12, 13]. Несмотря на то, что липидный состав грибов, включая фитопатогенные виды, изучается достаточно давно [14], его роль во взаимоотношениях микромицетов с растениями исследована недостаточно [15].

В нашей работе [16] было изучено влияние источников азота различной природы на патогенность и липидный состав мицелия гриба *Stagonospora cirsii* J.J. Davis – перспективного для биологической борьбы с бодяком полевым (*Cirsium arvense*). Было сделано предположение, что повышенное содержание в его мицелии стеринов, свободных жирных кислот (ЖК) и определенных ГлЦер в экспоненциальной фазе роста *S. cirsii* может иметь связь с высоким уровнем патогенности этого мик-

ромицета при глубинном культивировании на среде с органическим источником азота [16]. В другой работе [17] было показано, что патогенные свойства мицелия *S. cirsii* существенно зависят также от возраста культуры. Учитывая, что липидный состав грибов меняется с возрастом культуры [14], представляется интересным изучение такой связи и на примере *S. cirsii*, что может быть полезным для выявления биохимических критериев качества микогербицида на его основе.

Цель работы — определение патогенности и липидного профиля мицелия *S. cirsii* в процессе роста глубинной культуры, а также анализ изменений ЖК-состава и молекулярных видов основных липидов.

Объект исследований. В работе использовали штамм ВИЗР 1.41 гриба *S. cirsii* из коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений. Глубинный мицелий *S. cirsii* получали на жидкой сахарозо-соевой среде (СС) по описанной ранее методике [16]. Мицелий собирали в середине экспоненциальной, в начале и конце стационарной фаз роста (на 3, 6 и 9 сут соответственно) и тщательно промывали от остатков питательной среды дистиллированной водой. Прижизненную окраску липидных включений в мицелии *S. cirsii* проводили суданом черным [18]. Препараты исследовали при помощи микроскопа DM2500 с фотокамерой DFC420 (“Leica”, Германия) при 60-кратном увеличении.

Патогенность мицелия *S. cirsii* оценивали по разработанной ранее лабораторной методике [17]. Дополнительно определяли период эпифитного роста инфекционных гиф до момента внедрения в ткань листа через кутикулу. Для этого листовые высежки через 4, 5, 6, 7, 8, 12 и 24 ч после инокуляции мицелием гриба фиксировали в растворе Карнуа, окрашивали анилиновым синим и анализировали под микроскопом при 400-кратном увеличении [18].

Выделение и анализ липидов. Липиды экстрагировали из высушенного при комнатной температуре мицелия стандартным методом Фолча, как описано ранее [16]. В экстракте определяли содержание нейтральных липидов (НЛ), сфинголипидов (СЛ) и фосфолипидов (ФЛ) [16]. Для извлечения полярных липидов (ПЛ) из влажного мицелия и последующего их анализа использовали модифицированный для грибов метод Николса [19].

Липиды анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием оборудования фирмы “Samag” (Швейцария), включающим автоматический аппликатор (Sampler 4), хроматографическую камеру (ADC 2), спектроденситометр (Scanner 4) и программное обеспечение winCATS. Пластины,

размером 20 × 10 см, для ВЭТСХ (HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, “Merck”, Германия) предварительно промывали смесью СНCl₃–MeOH (1 : 1, об./об.) и активировали при 120°C в течение 20 мин. На одной пластине анализировали до 20 проб. Объем наносимого экстракта составлял 10 мкл (при концентрации 2 мг/мл), ширина полос нанесения — 6 мм. Хроматографическое разделение НЛ осуществляли как описано в работе [20] в режиме трех-шагового элюирования в системах: хлороформ–метанол–аммиак–бензол (65 : 30 : 6 : 10, об./об.) — 2 см от старта; гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (70 : 30 : 1, об./об.) — 7 см от старта; гексан–диэтиловый эфир (97 : 3, об./об.) — 8 см от старта. Для разделения ПЛ использовали оптимизированный равномерный 12-ступенчатый градиент метанол–дихлорметан от 65 : 35 до 10 : 90 (об./об.) в атмосфере 1 н NH₄OH [16]. Полученные данные сопоставляли с результатами разделения ПЛ общепринятым методом двухмерной ТСХ на пластинах TLC Silica gel 60 (“Merck”, Германия), размером 10x10 см, в системах растворителей: хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4, об./об.) — в первом направлении; хлороформ–ацетон–метанол–уксусная кислота–вода (50 : 20 : 10 : 10 : 5, об./об.) — во втором направлении [21].

Разделенные методом одномерной ТСХ липиды визуализировали реагентом (20 г CuSO₄, 200 мл метанола, 8 мл H₂SO₄ и 8 мл H₃PO₄) и последующим нагреванием пластин 5 мин при 175°C. Липиды детектировали на спектроденситометре при 550 нм в режиме поглощения. Соотношение липидов определяли по площади пиков в программе winCATS. После проведения двухмерной ТСХ липиды визуализировали обработкой пластин 5%-ым раствором серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием. Количественное определение различных ФЛ и СЛ выполняли с помощью денситометра Денскан и программы DENS-14-12-03 (“Ленхром”, Россия).

Индивидуальные классы липидов определяли по величине R_f после сравнения со стандартными образцами ТАГ, 1,2-диацилглицеринов, 1,3-диацилглицеринов, ЭС, ФЭ, ФХ, ФС, фосфатидилинозитов (ФИ) (“Sigma”, США) и смеси цереброзидов бычьего мозга (“Larodan”, Швеция). Для их идентификации проводили реакции со специфическими реагентами на отдельные функциональные группы, включающие резорцин в метаноле для определения гликолипидов, реактив Васильковского и Латышева для — ФЛ, раствор нингидрина в ацетоне для липидов, содержащих первичные аминогруппы, и реактив Драгендорфа для липидов, имеющих триметиламонийные группы. Концентрации рассчитывали с использованием калибровочных кривых, построенных по внешнему стандарту. Для этого на хроматографи-

ческие пластины, помимо исследуемых образцов, наносили стандартные растворы липидов в двух концентрациях.

Определение жирнокислотного состава. Препаративное выделение НЛ осуществляли на пластине размером 20×10 см (TLC Silica gel 60, "Merk", Германия) в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (70 : 30 : 1 об./об.), ПЛ – методом двумерной ТСХ как было описано выше. Пластины проявляли с помощью паров йода. Состав ЖК индивидуальных глицеролипидов определяли после их гидролиза 2.5%-ной H_2SO_4 в метаноле в течение 2 ч при $70^\circ C$. Отдельные структурные типы стеринов анализировали после дериватизации методом исчерпывающего силилирования. Для этого к растворенному в ацетонитриле сухому остатку общего экстракта липидов добавляли N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамид и растворенный в пиридине трикозан (nC_{23}) в качестве внутреннего стандарта. Смесь встряхивали на вортексе в течение 10 мин, а затем нагревали 15 мин при $100^\circ C$. Полученные производные ЖК и стеринов анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Maestro с масс-селективным детектором 5975C ("Agilent", США). Для анализа метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) использовали капиллярную колонку OmegaWax 250 ("Supelco", США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм, для анализа парастеринов – колонку HP-5MS с аналогичными параметрами. Хроматографическое разделение МЭЖК проводили в режиме линейного изменения температуры термостата от 170 до $220^\circ C$, стеринов – от 70 до $320^\circ C$ со скоростью $6^\circ C/мин$. Скорость газа-носителя (гелия) составляла 1 мл/мин, температура испарителя – $250^\circ C$, температура детектора – $250^\circ C$. Сбор данных проводили с помощью программного обеспечения ChemStation ("Agilent", США). Обработку и интерпретацию масс-спектрометрической информации осуществляли с использованием программы AMDIS (<https://www.amdis.net>) и библиотеки NIST2005 (<https://chemdata.nist.gov>).

Анализ молекулярных видов. Молекулярные виды ФХ и ФЭ определяли с использованием времяпролетного масс-спектрометра MicrOTOF 10223 ("Bruker", Германия). Липиды извлекали с пластин при помощи полуавтоматического экстрактора TLC-MS Interface ("Camag", Швейцария) смесью изопропанол–метанол–вода (5 : 3 : 2, об./об.) в 0.1%-ном аммиаке для детектирования отрицательно заряженных ионов и метанолом в 0.1%-ной муравьиной кислоте для анализа положительно заряженных ионов. Скорость подачи элюентов (70 мкл/мин) контролировали насосом System Gold 125 HPLC ("Beckman Coulter Inc.", США). Спектры записывали при ионизации рас-

пылением в электрическом поле в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне $150\text{--}3000 m/z$, температуре источника ионов $40^\circ C$ и капиллярном напряжении 3.5 кВ.

Молекулярные виды ГлЦер определяли с использованием времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения MX5310 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) с ортогональным вводом и электрораспылительным источником ионов. Образцы растворяли в смеси метанол–ацетонитрил–муравьиная кислота (49 : 49 : 2, об./об.). Объем пробы составлял 10–50 мкл при скорости подачи 1–5 мкл/мин. Распыляющий потенциал на капилляре составлял 3.3 кВ, температура десольвирующего газа $50^\circ C$. Спектры получали в режиме положительных ионов в диапазоне $150\text{--}1500 m/z$.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью программы Statistica 8.0 ("StatSoft", США). Исследование состава и содержания индивидуальных классов липидов, а также анализ их ЖК проводили в 3-кратной биологической повторности. За биологическую повторность принята глубинная культура *S. cirsii*, выращенная в стандартных условиях в одной колбе в одном независимом эксперименте. Данные, полученные после статистической обработки результатов в независимых экспериментах, представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – его стандартное отклонение. Анализ молекулярных видов ФХ и ФЭ проведен в одном независимом эксперименте в 2–3 аналитических повторностях. Достоверность различий в составе и содержании липидов культуры разного возраста оценивали по критерию Стьюдента либо по критерию наименьшей существенной разности (НСР) при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические особенности, патогенность и липидный состав. В глубинной культуре на среде СС гриб *S. cirsii* образовывал мелкие, диаметром ~5 мм розовато-кремовые пеллеты. Меланизация гиф начиналась на 6 сут и достигала максимума на 9 сут роста *S. cirsii*. Как было показано ранее [16, 17] и в табл. 1, на 3 сут культивирования на среде СС гриб находился в фазе экспоненциального роста, начало стационарной фазы наблюдали на 6 сут, а на 9 сут – ее завершение.

Трехсуточный мицелий *S. cirsii* характеризовался наибольшей патогенностью, о чем свидетельствуют короткий период (4 ч) проникновения в ткань листьев бодяка и максимальная площадь их поражения. С увеличением сроков культивирования патогенность мицелия *S. cirsii* снижалась, что выражалось в существенном увеличении длитель-

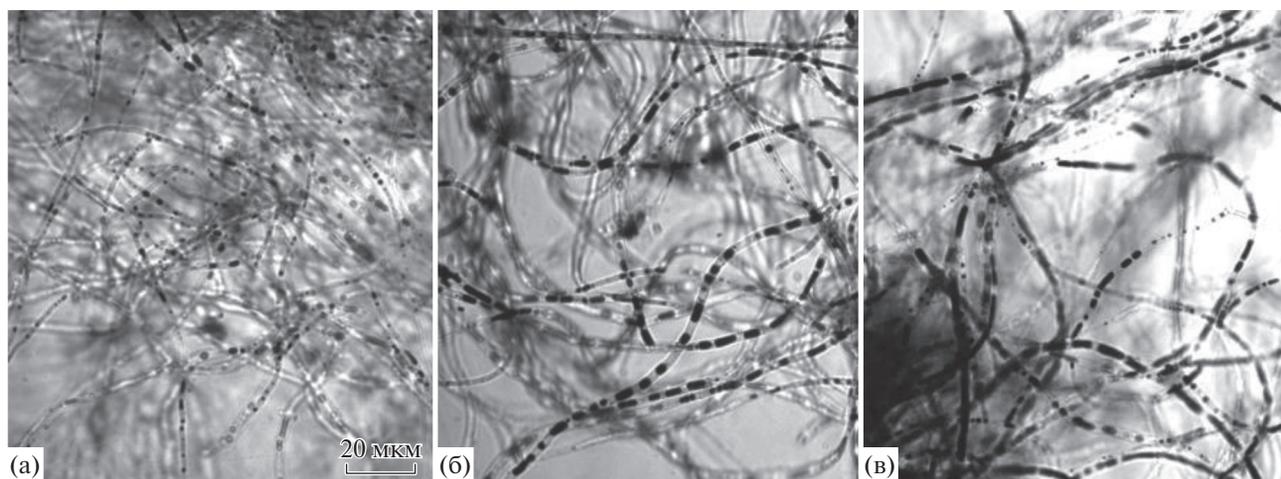


Рис. 1. Липидные включения в глубинном мицелии *S. cirsii* на разных стадиях роста – на 3 (а), 6 (б) и 9 (в) сут.

ности эпифитного роста и уменьшении площади некрозов на листовых дисках (табл. 1).

Липидные включения в мицелии *S. cirsii* окрашивались красителем в сине-черный цвет. Небольшие липидные капли в гифах были отмечены на 3 сут культивирования, а на 6 и 9 сут роста объем липидных включений в мицелии гриба был заметно больше (рис. 1). Микроскопические исследования не выявили каких-либо видоизменений мицелия: аномально утолщенных клеток, хламидоспор и микросклероциев.

Максимальное накопление липидов (6.5% от массы высушенного мицелия) было отмечено в начале стационарной фазы роста *S. cirsii* (табл. 1). Независимо от возраста культуры доминирующими липидами мицелия *S. cirsii* были НЛ, доля которых составляла 55–76% от массы общего липидного экстракта. Максимальное содержание НЛ в мицелии, так же, как и липидных включений отмечено в начале и конце стационарной фазы роста гриба (табл. 1, рис. 1). При этом максимальное содержание ФЛ было обнаружено в 3-суточном мицелии, а СЛ – в 9-суточном. На 9 сут роста доля ФЛ снизилась в 2.5 раза (с 38 до 15% от

суммы липидов), а доля СЛ за время наблюдений незначительно выросла (табл. 1).

Нейтральные липиды. Независимо от возраста мицелия *S. cirsii* основными компонентами фракции НЛ были ацилглицериды, доля которых составляла примерно 80%. Среди них преобладали ТАГ (51–60% от пула НЛ), относительное содержание которых при переходе с фазы активного роста (3 сут) на стационарную фазу (6 сут) увеличилось более чем на 30%, а на 9 сут культивирования незначительно (на 15%) снижалось. Доля моно- и диацилглицеридов с возрастом культуры гриба практически не менялась, находясь на уровне около 18% (рис. 2а).

При варьировании концентрации ТАГ в мицелии *S. cirsii* наблюдали также изменения их молекулярного состава. Молекулярные виды ТАГ, содержащие полиненасыщенные С18:2 и С18:3 кислоты (линолевую и линоленовую кислоты), частично замещались молекулярными видами, этерифицированными насыщенными С16:0 и моноеновыми С16:1 и С18:1 кислотами. Так, в 3-суточном мицелии *S. cirsii* фракция ТАГ содержала

Таблица 1. Выход биомассы, патогенные свойства, содержание и состав липидов мицелия *S. cirsii* на различных сроках глубинного культивирования

Возраст культуры, сут	Выход сухой биомассы, г/л	Период эпифитного роста, ч	Площадь некроза, %	Содержание общих липидов, % от сухой биомассы	Содержание основных классов липидов, % от общих липидов*		
					НЛ	ФЛ	СЛ
3	6.7	4	100	4.2	55 ± 1.6	38 ± 2.0	7 ± 1.8
6	11.9	6	85	6.5	76 ± 2.1	16 ± 1.9	8 ± 1.3
9	10.0	12	50	5.7	75 ± 3.2	15 ± 2.5	10 ± 0.9
НСР	6.0	0.3	12.0	0.7	–	–	–

*НЛ – нейтральные липиды, СЛ – сфинголипиды, ФЛ – фосфолипиды.

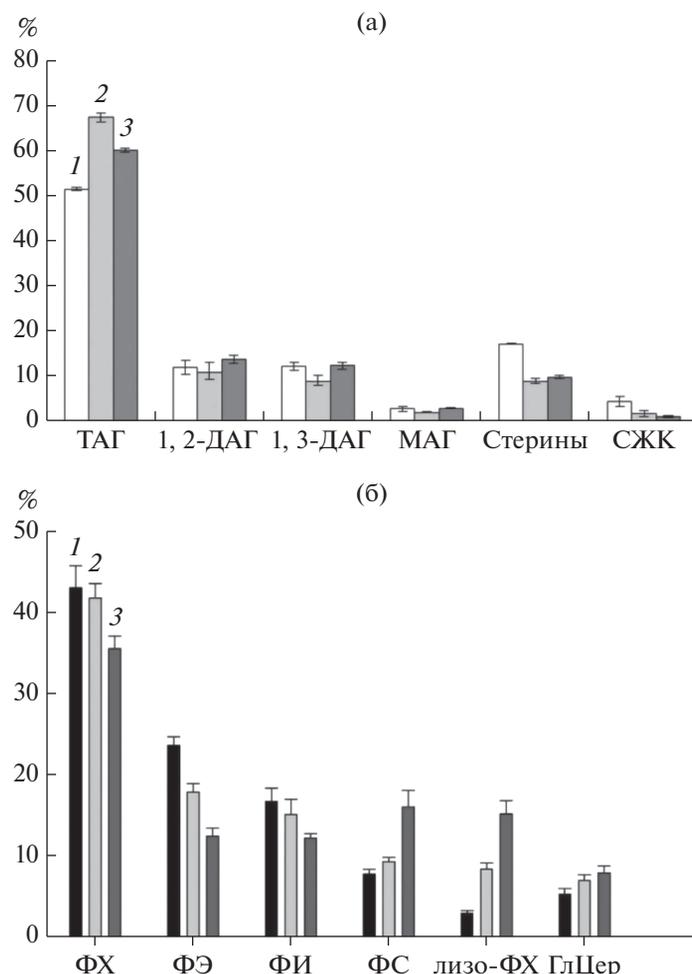


Рис. 2. Изменение относительного содержания нейтральных (а) и полярных липидов (б) на 3 (1), 6 (2) и 9 (3) сут роста глубинной культуры *S. cirsi*.

Таблица 2. Изменения в составе жирных кислот триглицеридов в процессе роста глубинной культуры *S. cirsi* (% от суммы жирных кислот)

ЖК*	ТАГ		
	3 сут	6 сут	9 сут
C _{16:0}	16.4 ± 3.5 ^a	27.1 ± 2.8 ^b	22.5 ± 3.0 ^b
C _{16:1}	2.7 ± 1.1 ^a	11.1 ± 2.0 ^b	9.3 ± 0.8 ^b
C _{18:0}	8.8 ± 2.0	8.7 ± 0.9	8.9 ± 1.0
C _{18:1 Δ9}	25.7 ± 3.4 ^a	34.2 ± 1.4 ^b	37.1 ± 1.6 ^b
C _{18:1 Δ11}	3.0 ± 0.0	4.3 ± 0.6	4.2 ± 0.7
C _{18:2}	38.2 ± 3.2 ^a	11.8 ± 1.1 ^b	14.9 ± 2.7 ^b
C _{18:3}	3.3 ± 0.7 ^a	0.5 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.3 ^b
ΣC _{20–22} **	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2
ИДС***	1.2	0.8	0.8

* Приведены основные ЖК, относительное содержание которых превышало 1%.

** Представлена сумма изомеров полиненасыщенных ЖК C₂₀–C₂₂ ряда.

*** ИДС — индекс двойных связей. (Приведены средние значения 3 независимых экспериментов и их стандартное отклонение; достоверно различающиеся ($P \leq 0.05$) средние значения отмечены разными буквами — а и б).

38% C_{18:2} кислоты, а в стационарной фазе роста — 12–15% (табл. 2).

Содержание стерина в мицелии также заметно изменялось. Максимальное их накопление (17% от суммы НЛ) наблюдалось в фазе экспоненциального роста гриба, а в стационарной фазе их доля снижалась до 8%. Доля свободных ЖК была низкой — 4.8% на 3 сут роста, а на 9 сут культивирования снижалась в 6 раз (рис. 2а). Фракция стерина, независимо от возраста культуры гриба, была представлена в основном ЭС (83–89%). Также в минорных количествах были выявлены: эргоста-5,7,9(11),22-тетраен-3-ол (около 3.5%), 5-дегидро-эргостерин (0.4%) и холестерин (0.3%). В процессе развития культуры *S. cirsi* статистически значимых модификаций состава стерина зарегистрировано не было.

Полярные липиды. Согласно данным, полученным методом ВЭТСХ и многократного элюирования, в экспоненциальной фазе роста доминирующими ПЛ в мицелии *S. cirsi* были ФХ и ФЭ —

43% и 23% от пула ПЛ соответственно. Остальные выявленные ФЛ (ФС, ФИ и лизо-ФХ) присутствовали в меньших количествах – 3–16%. В процессе дальнейшего развития культуры относительное содержание ФХ и ФЭ снижалось. При этом доля ФЭ к 9 сут снижалась в 2 раза, а ФХ – всего лишь в 1.2 раза. В конце стационарной фазы роста в мицелии *S. cirsii* существенно повысилось содержание ФС и лизо-ФХ, в 2 и 5 раз соответственно. Содержание ГлЦер в процессе роста гриба изменялась незначительно, но имело тенденцию к увеличению (рис. 2б).

Количественный анализ доминирующих ФЛ, определенный методом двумерной ТСХ подтвердил существенное снижение концентрации ФЭ (в 2.8 раз) в мицелии, тогда как содержание ФХ снижалось незначительно (в 1.1 раз) при трехкратном увеличении концентрации лизо-ФХ в процессе роста мицелия *S. cirsii* (рис. 3).

Анализ состава ЖК ФХ и ФЭ показал, что переход культуры *S. cirsii* от экспоненциальной к стационарной фазе роста сопровождался снижением относительного содержания С18:2 и С18:3 кислот и увеличением доли С18:1 кислоты. Изменения состава ЖК ФХ и ФЭ оказались схожими, отмечено постепенное снижение индекса двойных связей (табл. 3).

Анализ молекулярных видов. По данным масс-спектрометрии ФХ и ФЭ формировали два основных кластера молекулярных видов с ацильными группами С16/С18 (С34) и С18/18 (С36). Среди них доминировали четыре молекулярных вида С34:2, С36:4, С36:3 и С36:2, которым соответствовали депротонированные $[\text{ФЭ}-\text{H}]^-$ с m/z 714.520, 738.528, 740.543 и 742.557 и катионированные молекулы $[\text{ФХ} + \text{Na}]^+$ с m/z 780.550, 804.552, 806.559

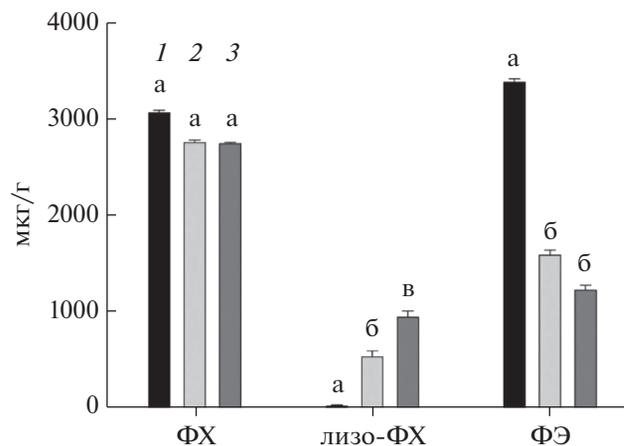


Рис. 3. Динамика содержания основных фосфолипидов в мицелии *S. cirsii* на 3 (1), 6 (2) и 9 (3) сут. Средние значения, отмеченные одной буквой, не различаются на уровне $p = 0.05$.

и 808.572. Согласно данным анализа ЖК эти молекулярные виды преимущественно содержат ацильные группы 16:0/18:2, 18:2/18:2, 18:1/18:2 и 18:1/18:1 (табл. 4). Молекулярные ионы в диапазоне m/z 846–850 и 872–876 в спектрах ФХ соответствовали кластеру аддуктов основных молекулярных видов с формиатом натрия $[\text{ФХ}(\text{С34}) + \text{COONa}]^+$ и $[\text{ФХ}(26) + \text{COONa}]^+$ (рис. 4).

В 3-суточном мицелии *S. cirsii* доминировали С34 молекулярные виды ФХ, относительное содержание которых составляло 56%. В фазе замедленного роста их доля снижалась до 22%, но при этом увеличивалось содержание С36 молекулярных видов ФХ (с 33 до 78%) (рис. 4, табл. 4). Во фракции ФЭ наблюдалась обратная, но менее вы-

Таблица 3. Изменения в составе ЖК доминирующих мембранных липидов в процессе роста глубинной культуры *S. cirsii* (% от суммы жирных кислот)*

ЖК	ФХ			ФЭ		
	3 сут	6 сут	9 сут	3 сут	6 сут	9 сут
C _{16:0}	11.8 ± 1.3	9.8 ± 4.6	10.0 ± 4.3	13.0 ± 0.3	14.3 ± 2.2	12.9 ± 2.7
C _{16:1}	0.8 ± 0.4	2.6 ± 0.9	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.5	3.1 ± 0.8	1.7 ± 0.8
C _{16:1 Δ9}	8.0 ± 3.4	9.1 ± 2.3	6.9 ± 1.2	5.8 ± 1.8	4.8 ± 0.6	4.8 ± 1.0
C _{18:0}	2.1 ± 0.1	3.0 ± 1.7	5.7 ± 1.3	2.4 ± 0.2	4.2 ± 0.7	3.6 ± 0.5
C _{18:1 Δ9}	12.5 ± 1.1 ^a	31.8 ± 3.4 ^б	39.2 ± 3.9 ^б	13.1 ± 2.1 ^a	35.1 ± 3.4 ^б	40.0 ± 5.0 ^б
C _{18:1 Δ11}	8.0 ± 0.6	5.9 ± 0.9	7.5 ± 1.5	6.8 ± 0.5	5.2 ± 0.7	6.2 ± 0.4
C _{18:2}	48.5 ± 5.1 ^a	33.7 ± 2.0 ^б	31.1 ± 1.5 ^б	51.1 ± 4.3 ^a	30.3 ± 1.9 ^б	28.2 ± 3.1 ^б
C _{18:3}	4.5 ± 1.6 ^a	1.0 ± 0.4 ^б	0.7 ± 0.3 ^б	3.3 ± 1.0 ^a	0.7 ± 0.3 ^б	0.5 ± 0.1 ^б
ΣC _{20–22}	2.3	1.5	–	1.9	–	1.0
ИДС	1.4	1.2	1.1	1.4	1.2	1.1

* Обозначения как в табл. 2.

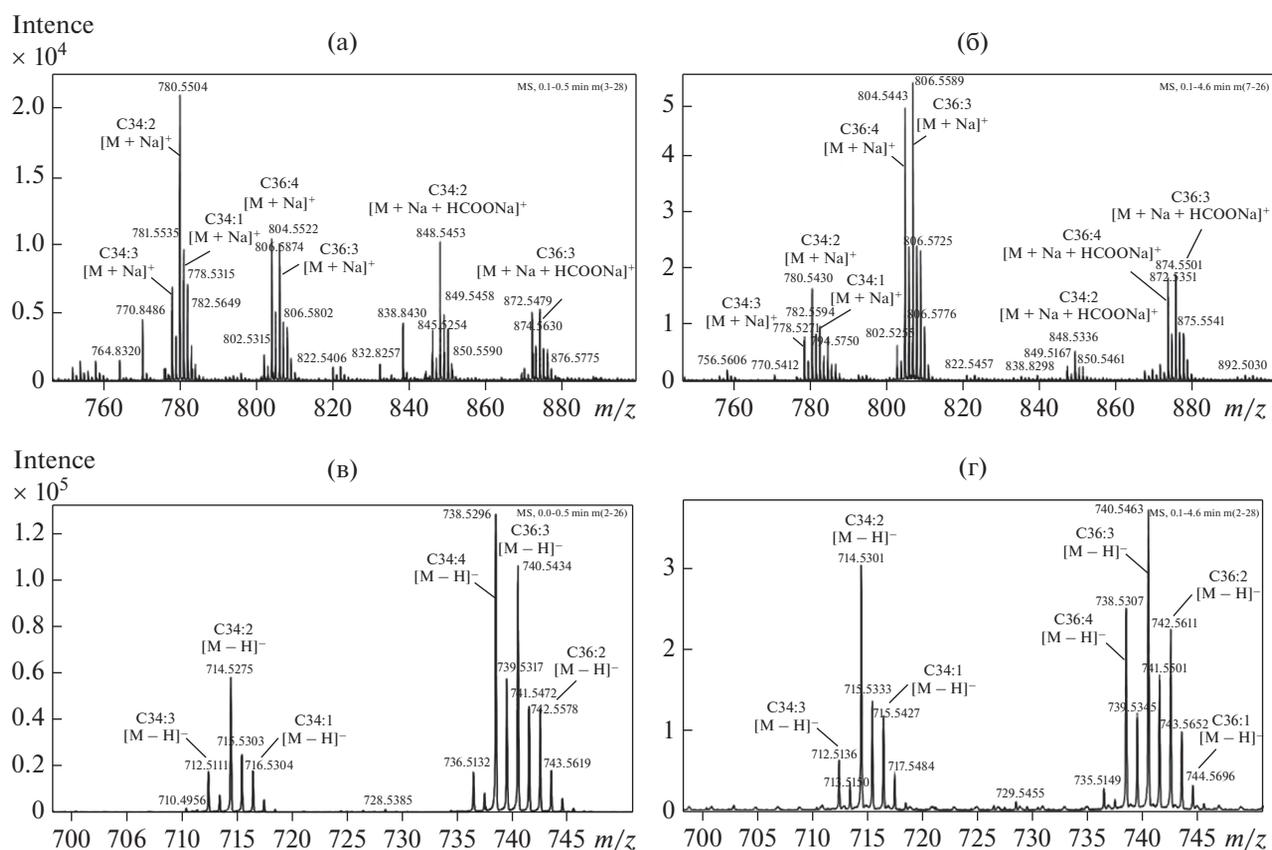


Рис. 4. Масс-спектры молекулярных видов ФХ (а, б) и ФЭ (в, г) мицелля *S. cirsii*, снятые соответственно в положительном и в отрицательном режимах ионизации (на 3 (а, в) и 9 сут (б, г) роста).

раженная закономерность. Так, независимо от возраста доминировали С36 молекулярные виды ФЭ, содержание которых снижалось незначительно с 76 до 66% на 3 и 9 сут соответственно, при этом содержание ФЭ С34 увеличивалось с 24 до 35% (рис. 4, табл. 4).

Во фракции ГлЦер было выявлено 10 молекулярных видов. Сфингоидные основания ГлЦер были представлены преимущественно 9-метил-4,8-сфингадиенином (d18:2^{Δ4,8,9}-Метил). Его окисленная форма d18:1^{Δ8,4}-Эпокси,9-Метил обнаружена в значительно меньшем количестве. Доминирующей

Таблица 4. Изменения в составе основных молекулярных видов ФХ, ФЭ в процессе роста глубинной культуры *S. cirsii*

ФХ				ФЭ			
m/z [M + Na] ⁺	молекулярный вид*	содержание, %**		m/z [M - H] ⁻	молекулярный вид	содержание, %	
		3 сут	9 сут			3 сут	9 сут
778	C34:3	11.4	4.4	712	C34:3	4.6	4.5
780	C34:2	33.5	9.5	714	C34:2	14.8	21.9
782	C34:1	11.5	5.2	716	C34:1	4.2	8.0
784	C34:0	0	3.2	738	C36:4	32.7	18.1
804	C36:4	17.2	24.6	740	C36:3	27.1	26.8
806	C36:3	15.7	31.8	742	C36:2	10.5	16.2
808	C36:2	6.3	13.7	744	C36:1	1.4	2.3

* Показано суммарное количество атомов углерода и двойных связей в ацильной части молекулы фосфолипида; ** % от суммы основных (более 2%) идентифицированных молекулярных видов в классе (приведены средние значения 2–3 аналитических повторностей в одном независимом эксперименте).

Таблица 5. Изменения в составе молекулярных видов ГлЦер [M + Na]⁺ (%) в процессе роста глубинной культуры *S. cirsi**

ЖК	m/z	d18:2 ^{Δ4,8,9} -Метил			m/z	d18:1 ^{Δ8,4} -Эпокси, 9-Метил		
		3 сут	6 сут	9 сут		3 сут	6 сут	9 сут
18:1	760	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	776	—	—	—
18:0	762	5.8 ± 0.2	4.1 ± 1.0	5.2 ± 0.4	778	—	—	—
18:1(ОН)	776	70.7 ± 3.0	75.8 ± 1.5	71.1 ± 5.9	792	3.0 ± 0.6 ^a	8.2 ± 1.7 ^b	9.1 ± 5.9 ^{ab}
22:0(ОН)	834	1.2 ± 0.5	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.6	850	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.1
24:1(ОН)	860	0.3 ± 0.05 ^a	0.4 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^b	876	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
24:0(ОН)	862	0.2 ± 0.02 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.04 ^b	878	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.05	0.3 ± 0.1

* Приведены средние значения двух независимых экспериментов и их стандартное отклонение, достоверно отличающиеся ($P \leq 0.05$) средние значения отмечены разными буквами а и б. “—” — не обнаружено.

ЖК, входящей в состав ГлЦер, была С18:1(ОН) кислота. В значительно меньших количествах обнаружены ГлЦер с С18:0, С18:1 и 22:0(ОН) кислотами, длинноцепочечные гидроксиды-кислоты С24 ряда — в следовых. Среди выявленных молекулярных форм ГлЦер независимо от возраста культуры *S. cirsi*, доминирующим (с долей 70–75% от пула ГлЦер) было соединение с m/z 776 [M + Na]⁺, соответствующее 9-метил-4,8-сфингадиенину, связанному амидной связью с 2-гидрокси-октадекановой кислотой (d18:2^{Δ4,8,9}-Метил/18:1ОН). По мере старения культуры *S. cirsi* относительное содержание его окисленной формы с m/z 792 [M + Na]⁺ увеличивалось в 3 раза (табл. 5).

Штамм *S. cirsi* ВИЗР 1.41 является продуцентом потенциального микогербицида против бодяка полевого, действующим началом которого является мицелий этого гриба [17]. Важно отметить, что помимо высокой биологической эффективности продуценты биопестицидов должны быть высокопродуктивными и устойчивыми к стресс-факторам [22]. При культивировании на среде СС быстрорастущий (находящийся в фазе экспоненциального роста) 3-сут мицелий *S. cirsi* был наиболее патогенным (табл. 1), при этом наибольший выход мицелия наблюдался на 6 сут. Для этого мицелия показано, что он более толерантен к высушиванию, чем 3-суточный [23]. Клетки модельного дрожжевого гриба *Saccharomyces cerevisiae* в фазе стационарного роста также были на несколько порядков более толерантны к высушиванию по сравнению с клетками в фазе экспоненциального роста. При этом в ответ на высушивание изменялся биохимический состав дрожжевых клеток, в том числе состав мембранных липидов [24]. С одной стороны, это свидетельствовало о предпочтительности использования мицелия *S. cirsi* в начале стационарной фазы роста для обработки сорных растений или стабилизации в виде подходящей препаративной формы. С другой стороны, полученные данные показали необходимость поиска биохимических критери-

ев соответствующего качества мицелия *S. cirsi*, поскольку при дальнейшей оптимизации состава жидкой питательной среды продолжительность определенных фаз его роста может меняться.

Анализ общего содержания липидов показал, что глубинный мицелий *S. cirsi* проявлял характерную для большинства мицелиальных грибов тенденцию к их накоплению [25]. Максимальный уровень липидов, среди которых доминировали НЛ, наблюдался в начале стационарной фазы роста, что согласовывалось с их основной ролью резервных или запасных липидов.

Среди НЛ мицелия *S. cirsi* доминирующими оказались ТАГ. Как было показано на примере ряда модельных видов фитопатогенных микромицетов (*Stagonospora nodorum*, *Magnaporthe grisea* и *Zymoseptoria tritici*), способность к накоплению этих резервных липидов может быть одним из факторов вирулентности, увеличивая их толерантность к различным стресс-факторам [26–28]. Высокопатогенный 3-суточный мицелий *S. cirsi* отличался наименьшим относительным содержанием ТАГ, что весьма типично для активно растущих молодых культур микромицетов [25]. Можно предположить, что ТАГ играют определенную роль в патогенности 6-суточного мицелия *S. cirsi*, обеспечивая питание в период эпифитного роста гриба.

В высокопатогенном мицелии в экспоненциальную фазу роста *S. cirsi* наблюдали максимальное содержание стериннов, в частности, ЭС. Накопление ЭС в активно растущем мицелии *S. cirsi* согласовывалось с его важной биологической ролью, связанной с участием в процессах клеточного цикла и поддержания структуры и нормального функционирования мембран [29]. У *Penicillium atrovietum* максимальное содержание ЭС в биомассе также отмечено в фазе экспоненциального роста, а в стационарную фазу наблюдали резкое снижение концентрации этого липида [30]. ЭС рассматривается также как “микроб-ассоциированный молекулярный паттерн” фитопатоген-

ных грибов или элиситор, отвечающий за индукцию растениями неспецифического иммунного ответа [31]. Можно предположить, что *S. cirsi* обладает механизмами, свойственными некоторым некротрофным фитопатогенам (например, *Botrytis cinerea* и *Sclerotinia sclerotiorum*) [32], которые позволяют подавлять защитные реакции растения-хозяина.

Количество и соотношение ФХ и ФЭ имеет большое значение для поддержания функционального состояния мембран. Так, исследования методом компьютерного моделирования выявили существенные изменения латерального давления, электрического поля и дипольного потенциала мембран при различных соотношениях ФХ/ФЭ [33]. Показатель ФХ/ФЭ изменялся в процессе роста и развития грибов. Так, переход глубинной культуры *S. cerevisiae* из логарифмической в стационарную фазу роста сопровождался увеличением соотношения ФХ/ФЭ с 0.9 до 2.2 [34]. В высокопатогенном 3-суточном мицелии *S. cirsi* наблюдали максимальное содержание ФХ и ФЭ, а в процессе роста гриба соотношение ФХ/ФЭ увеличивалось (рис. 26, 3).

Связь содержания и состава мембранных глицерофосфолипидов с патогенными свойствами грибов может быть обусловлена участием их определенных молекулярных видов в формировании необходимых свойств поверхности инфекционных гиф, а также в образовании внеклеточных везикул, обеспечивающих доставку в участки инфекции таких разнообразных факторов вирулентности, как литических ферментов и белков-эффektorов [35]. Практически ничего не известно о влиянии состава ФЛ в инфекционных структурах грибов-возбудителей болезней растений на их патогенные свойства. Однако недавно на примере мутантов *Fusarium graminearum* по некоторым генам, отвечающим за биосинтез ферментов (ФС-декарбоксилазы 2, ФЭ-метилтрансферазы и метилен-ацил-жирной кислоты-ФЛ-синтазы), было показано, что нарушение биосинтеза ФЛ приводит к понижению уровня вегетативного роста и патогенности этого гриба, а также к повышению чувствительности к фунгицидам [10].

Изменения во фракции ФЭ в процессе роста *S. cirsi* включали увеличение относительного содержания видов с m/z 714 (С34:2) и 742 (С36:2) и почти двукратное снижение (с 33 до 18%) уровня видов с m/z 738 (С36:4, преимущественно 18:2/18:2), доминирующего в мицелии *S. cirsi* в фазе активного роста. Предположительно, в ходе развития культуры *S. cirsi*, сопровождающегося снижением патогенности гриба, происходила существенная перестройка жирнокислотного состава доминирующих ФЛ: замена молекулярных видов ФХ16:0/18:2 (С34) на ФХ18:2/18:2 и ФХ18:1/18:2 (С36), а также ФЭ18:2/18:2 (С36) на ФЭ16:0/18:2

(С34). Тенденция, связанная с повышением уровня С34-форм и пониженное содержание С36-форм в составе ФХ, была обнаружена также у мутанта (*Δmr LPAATI*) энтомопатогенного гриба *M. robertsii* по сравнению с вирулентным штаммом дикого типа [9].

С использованием мутантного штамма с нарушенным метаболизмом ГлЦер установлен вклад данного класса липидов в вирулентность возбудителя фузариоза колоса пшеницы *Fusarium graminearum* и выявлена особая роль метильной группы при С-9 сфингоидного основания [13]. У *S. cirsi* во фракции ГлЦер преобладало характерное для грибов соединение (d18:2^{Δ4,8,9}-Метил/18:1 ОН), в котором 9-метил-4,8-сфингадиенин связан амидной связью с 2-гидроксиоктадекановой кислотой. Его окисленная форма была обнаружена в значительной меньшей концентрации, однако в процессе роста наблюдалось постепенное увеличение ее содержания одновременно с меланизацией гиф. Возрастная склеротизация мицелиальных клеток патогена человека *Fonsecaea pedrosoi* также сопровождалась меланизацией клеточных стенок и гидроксильрованием сфингоидных оснований ГлЦер [36].

На примере мутантов *Candida albicans* с нарушенным синтезом сфингоидного основания показано влияние ГлЦер на морфологию и рост этого дрожжевого гриба [37, 38]. При этом биоэффektorные свойства ГлЦер в зависимости от их ЖК-состава практически не изучены. По нашим данным в мицелии *S. cirsi* по мере старения и снижения патогенности наблюдалась тенденция к накоплению форм ГлЦер с удлиненной цепью ЖК. Несмотря на то, что изменения весьма незначительные, они могут быть интересны для дальнейшего изучения.

В заключение следует отметить, что: 1) в процессе роста гриба *S. cirsi* его липидный состав существенно менялся вместе с патогенными свойствами; 2) для высокого выхода биомассы оптимальным является использование мицелия гриба в начале стационарной фазы роста при максимальном уровне накопления липидов; 3) отмечена определенная связь патогенности мицелия с относительно высоким содержанием ЭС и ФЭ; 4) с возрастом мицелия снижался индекс двойных связей жирных кислот в составе глицеролипидов, а также происходила замена молекулярных форм ФХ (34:2 на 36:4) и ФЭ (36:4 на 34:2); 5) разнообразие форм и варьирование относительных концентраций ГлЦер в мицелии *S. cirsi* было низким. Принимая во внимание содержание выявленных липидов в мицелии *S. cirsi*, маркерами его качества, по-видимому, можно считать наличие высокого уровня ЭС, ТАГ (с учетом индекса двойных связей жирных кислот, входящих в их состав), ФЭ (в частности, 36:4-форма) и ФХ (34:2-форма).

Авторы выражают признательность М.З. Мурадымову, М.А. Виноградской (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН) и А.В. Рубижан (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений) за существенную помощь в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00085) с привлечением оборудования Центра коллективного пользования “Инновационные технологии защиты растений” ВИЗР, а также ресурсных центров “Развитие молекулярных и клеточных технологий” и “Методы анализа состава вещества” Санкт-Петербургского государственного университета.

Методическая основа протокола анализа молекулярных видов гликоцерамидов и стерина разработана в ходе выполнения темы “Оценка изменений корреляционной структуры метаболитных сетей в процессе роста и развития грибов и растений с позиции системной биологии” БИН РАН (AAAA-A18-118032390136-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rella A., Farnoud A.M., Del Poeta M. // *Prog. Lipid Res.* 2016. V. 61. P. 63–67.
- Kobae Y., Gutjahr C., Paszkowski U., Kojima T., Fujiwara T., Hata S. // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. № 11. P. 1945–1953.
- Aguilar L.R., Pardo J.P., Lomelí M.M., Bocardo O.I.L., Juárez Oropeza M.A., Guerra Sánchez G. // *Arch. Microbiol.* 2017. V. 199. P. 1195–1209.
- Keyhani N.O. // *Fungal Biol.* 2018. V. 122. № 6. P. 420–429.
- Gao Q., Shang Y., Huang W., Wang C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 24. P. 7646–7653.
- Harayama T., Riezman H. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 5. P. 281–296.
- Siebers M., Brands M., Wewer V., Duan Y., Hölzl G., Dörmann P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1861. № 9. Part B. P. 1379–1395.
- Chen Y.-L., Montedonico A.E., Kauffman S., Dunlap J.R., Menn F.-M., Reynolds T.B. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. № 5. P. 1112–1132.
- Gao Q., Yuzhen L., Hongyan Y., Xu Y.-J., Huang W., Wang C. // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. № 11. P. 3976–3990.
- Wang J., Wang H., Zhang C., Wu T., Ma Z., Chen Y. // *Phytopathol. Res.* 2019. V. 1. № 16. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0023-9>
- Kazan K., Gardiner D.M. // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006297>
- Warnecke D., Heinz E. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. V. 60. № 5. P. 919–941.
- Ramamoorthy V., Cahoon E.B., Thokala M., Kaur J., Li J., Shah D.M. // *Eukaryotic Cell.* 2009. V. 8. № 2. P. 217–229.
- Weete J.D. *Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms.* N.Y.: Plenum Press, 1980. 398 p.
- Beccaccioli M., Reverberi M., Scala V. // *Front. Biosci.* 2019. V. 24. № 1. P. 172–185.
- Фролова Г.М., Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 5. С. 506–512.
- Сокорнова С.В., Берестецкий А.О. // *Сельскохозяйственная биология.* 2018. Т. 53. № 5. С. 1054–1061.
- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. *Справочник по ботанической микротехнике.* М.: Издательство Московского университета, 2004. 312 с.
- Котлова Е.Р., Сенник С.В., Кюхер Т., Шаварда А.Л., Кияшко А.А., Псурцева Н.В., Зубарев Р.А. // *Микробиология.* 2009. Т. 78. № 2. С. 226–235.
- Fuchs B., Suss R., Teuber K., Eibisch M., Schiller J. // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 19. P. 2754–2774.
- Benning C., Huang Z.H., Gage D.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 317. № 1. P. 103–111.
- Berestetskiy A., Sokornova S. *Biological Approaches for Controlling Weeds* / Ed. R. Radhakrishnan. London: IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76936>
- Павлова Н.А., Сокорнова С.В. // *Вестник защиты растений.* 2018. Т. 4. № 98. С. 67–69.
- Skoneczny M., Skoneczna A. *Stress Response Mechanisms in Fungi.* / Ed. M. Skoneczny. Cham: Springer, 2018. P. 35–85.
- Akpinar-Bayizit A. // *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 2014. V. 5. № 5. P. 409–414.
- Solomon P.S., Lee R. C., Wilson T.J., Oliver R. P. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 53. № 4. P. 1065–1073.
- Thines E., Weber R.W.S., Talbot N.J. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. № 9. P. 1703–1718.
- Rudd J. J., Kanyuka K., Hassani-Pak K., Derbyshire M., Andongabo A., Devonshire J. et al. // *Plant Physiol.* 2015. V. 167. № 3. P. 1158–1185.
- Lösel D.M. // *Pestic. Sci.* 1991. V. 32. № 3. P. 353–362.
- Van Etten J., Gottlieb D. // *J. Bacteriol.* 1965. V. 89. № 2. P. 409–414.
- Klemptner R.L., Sherwood J.S., Tugizimana F., Dubery I.A., Piater L.A. // *Mol. Plant Pathol.* 2014. V. 15. № 7. P. 747–761.
- Govrin E. M., Levine A. // *Current Biol.* 2000. V. 10. № 13. P. 751–757.
- Ding W., Palaiokostas M., Wang W., Orsi M. // *J. Phys. Chem.* 2015. V. 119. № 49. P. 15263–15274.
- Janssen M.J., Koorengel M.C., de Kruijff B., de Kroon A.I. // *Yeast.* 2000. V. 16. № 7. P. 641–650.
- Cassilly C.D., Reynolds T.B. // *J. Fungi.* 2018. V. 4. № 28. <https://doi.org/10.3390/jof4010028>
- Nimrichter L., Cerqueira M.D., Leitão E.A., Miranda K., Nakayasu E.S., Almeida S.R., Almeida I.C., Alviano C.S., Barreto-Bergter E., Rodrigues M.L. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. № 12. P. 7860–7868.
- Oura T., Kajiwara S. // *Microbiol.* 2008. V. 154. № 12. P. 3795–3803.
- Oura T., Kajiwara S. // *Microbiol.* 2010. V. 156. № 4. P. 1234–1243.

Pathogenicity and Lipid Composition of Mycelium of the Fungus, *Stagonospora cirsii* VIZR 1.41 in the Process of Submerged Liquid Cultivation

G. M. Frolova^a, E. R. Kotlova^b, S. V. Sokornova^a, S. V. Senik^b, A. L. Shavarda^b,
A. D. Misharev^c, and A. O. Berestetskiy^{a,*}

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

^bBotanical Institute, Saint-Petersburg, 197376 Russia

^cResource Center "Methods for Analysis of the Composition of Substances" at Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 198504 Russia

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

In order to identify quality markers of a potential mycoherbicide against Canada thistle (*Cirsium arvense*) based on the mycelium of the fungus, *Stagonospora cirsii* VIZR 1.41 changes of pathogenicity and lipid profiles during submerged cultivation on liquid sucrose-soybean medium were analyzed. Within this study, fatty acid composition of major lipids and identification of molecular species of structural lipids were determined. The lipid composition during fungal growth was changed together with its pathogenicity. Highly pathogenic mycelium of the fungus (at the log phase of growth) was featured with relatively highest content of structural lipids – phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and ergosterol (ES); in the aging of culture and decreasing of pathogenicity their relative concentration decreased. At the beginning of stationary phase of growth (at maximum biomass yield) of *S. cirsii* the highest yield of lipid was found; triacyl glycerides (TAG) were the most abundant among them. Double bond index of fatty acids in glycerolipids decreased with aging of the culture, the substitution of molecular species of PC (34:2-instead 36:4-species) and PE (36:4-instead 34:2-species) was observed as well. The high level of ES, TAG, PC (in particular, 34:2-species) and PE (36:4-species) were supposed to be quality markers of *S. cirsii* mycelium.

Keywords: *Stagonospora cirsii*, mycoherbicide, pathogenicity, lipids, molecular species, fatty acid composition