

УДК 635.21:632.3

O. N. ШЕМШУРА

ВЕЩЕСТВА ФЛАВОНОИДНОЙ ПРИРОДЫ ГРИБА *ASPERGILLUS SP.*, ОБЛАДАЮЩЕГО НЕМАТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(Представлена академиком НАН РК А. Н. Илялетдиновым)

Изучена нематицидная активность экстрактов культуральной жидкости и мицелия гриба *Aspergillus sp.*. Гибель нематод *Ditylenchus sp.* в результате токсического действия экстрактов составила от 50 до 100%. С использованием хроматографических методов исследования в составе экстрактов выявлены вещества флавоноидной природы.

Нематоды поражают все виды сельскохозяйственных растений во всех регионах мира, особенно в странах теплого климата. Ежегодные потери от этих патогенов в мировой экономике составляют десятки миллиардов долларов [1–4].

Применение метаболитов микроорганизмов для защиты растений, ранее не использованных для этих целей весьма актуально, поскольку у вредителей не выработалась к ним устойчивость. К таким метаболитам можно отнести биологически активные вещества флавоноидной природы. Число открытых к настоящему времени флавоноидов очень велико – около 6 000. Они подразделяются на катехины, антоцианы, флавоны, аураны, халконы (и др.).

Флавоноиды относят к группе соединений со структурой $C_6-C_3-C_6$, и большинство из них представляют собой производные 2-фенилбензопирана (флавана) или 2-фенилбензо- γ -пирона (флавона). Классификация их основана на степени окисленности трехуглеродного фрагмента, положении бокового фенильного радикала, величине гетероцикла и других признаках. К производным флавана принадлежат катехины, лейкоантоксианидины и антоцианидины, к производным флавона – флавоны, флаваноны, флаванонолы. К флавоноидам относятся также аураны (производные 2-бензофуранона или 2-бензилиденкумаранона), халконы и дигидрохалконы (соединения с раскрытым пирановым кольцом). Менее распространены в природе изофлавоноиды (с фенильным радикалом у C_3), неофлавоноиды (производные 4-фенилхромона), бифлавоноиды (димерные соединения, состоящие из связанных C–C-связью флавонов, флаванонов и флавон-флаванонов) и фенилпропаноиды.

Природные соединения этого класса давно и широко используются в медицине; так, для ряда флавоноидных соединений показана антимикробная [5–10] и противовирусная активность [11]. Представители группы изофлавоноидов обладают эстрогенным действием [12]. Флавоноиды могут выступать в качестве радиопротекторов [13] и как радиопотенцирующие средства [14, 15]. Флавоноиды оказывают положительное влияние на метаболизм печени, усиливая желчеотделение [16–18] и повышая детоксикационную функцию [19]. Показана анаболизирующая активность некоторых флавоноидных соединений [20], сахароснижающие свойства [21], нейротропное [22], антиатеросклеротическое [23] действия.

К необычным производным изофлавоноидов относятся птерокарпины и ротеноиды, которые содержат дополнительный гетероцикл. Птерокарпины привлекли к себе внимание после того, как было выяснено, что многие из них играют роль фитоалексинов, выполняющих защитные функции против фитопатогенов. Ротенон и близкие к нему соединения токсичны для насекомых, поэтому являются эффективными инсектицидами.

При этом исследования их как потенциальных средств защиты растений от нематод не проводились, хотя на основе этих веществ возможно создание высокоэффективных биологических препаратов для защиты растений от нематодных болезней. Вместе с тем следует отметить, что все флавоноидные вещества, обладающие биологической активностью, выделены из растений, тогда как микроорганизмы в качестве продуцентов этих природных соединений вообще не изучены при том факте, что в отличие от растений микро-

организмы культивируются быстро и не зависят от сезонных и климатических факторов.

Целью работы явилось исследование нематицидной активности экстрактов культуральной жидкости и мицелия микроскопического гриба *Aspergillus sp.* и выявление в их составе веществ флавоноидной природы.

Материалы и методы

Объектами исследования явились экстракты культуральной жидкости и мицелия гриба *Aspergillus sp.* Для их получения штамм гриба засевали в качалочные колбы с 200 мл среды следующего состава (г/л): глюкоза – 50,0; пептон – 10,0; соевая мука – 5,0; KNO_3 – 2,0; MgSO_4 – 0,5; CaCl_2 – 0,1; рН – 6,2.

Культивирования штамма проводили глубинным способом при 28 °C в течение 5 сут. Фильтрацию культуральной жидкости осуществляли с помощью бумажного фильтра. Экстракты гриба получали путем последовательной экстракции с использованием органических растворителей (бензол, хлороформ, этилацетат, бутанол). Полученные экстракты выпаривали, взвешивали на электронных весах и готовили 5%-ные водно-спиртовые суспензии образцов заданной концентрации для тестирования на нематодах.

Тестирование экстрактов на нематодах проводилось *in vitro* на планшетах. Нематоды были изолированы из пораженных клубней картофеля (пинцетом в чашку Петри со стерильной водой).

Для работы использовали как личинки, так и взрослые особи нематод *Ditylenchus sp.* Перед экспериментом проводили поверхностную стерилизацию нематод 0,5% NaOCl в течение 2 мин. Испытуемые растворы были пропущены через стерильные фильтры и внесены по 0,2 мл в ячейки. В ячейку с испытуемым раствором добавляли 10 нематод. В контроле использовали стерильную воду и 5%-ный этанол. Повторность 5-кратная.

За нематодами велись наблюдения под бинокуляром в течение 3 сут. О токсическом эффекте испытуемых растворов судили по изменению морфологии, отсутствию движения у нематод. Если после переноса обездвиженных нематод из испытуемых растворов в воду их активность не восстанавливалась в течение 24 ч, нематоды считались погибшими.

Экстракти гриба, обладающие нематицидной активностью, были взяты для хроматографического анализа на наличие флавоноидов. Хроматографический анализ экстрактов культуральной жидкости и мицелия гриба *Aspergillus sp.* на наличие флавоноидов проводили общедоступными методами [24–26] с использованием следующих систем растворителей:

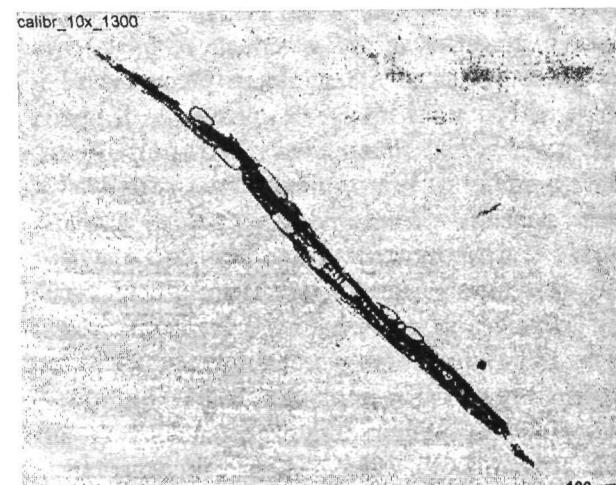
- 1) *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (40:12,5:29);
- 2) 6%-ная уксусная кислота;
- 3) бензол – уксусная кислота – вода (6:7:3; по объему органическая фаза);
- 4) формиат натрия – муравьиная кислота – вода (10:1:200, по объему).

В качестве проявителей использовали:

- 1) УФ-свет;
- 2) пары амиака;
- 3) диазотированный *n*-нитроанилин – реактив Паули (ДзПНА).

Результаты и их обсуждение

Установлена 100%-ная потеря активности нематод после обработки их культуральной жидкостью гриба *Aspergillus sp.* После переноса в воду неактивных нематод активность их не восстанавливалась. Микроскопическое исследование погибших нематод показало, что токсические вещества, содержащиеся в культуральной жидкости, вызвали поражения внутренних органов нематод. Так, на рисунке хорошо видно, что пищевод, средняя кишка, хвостовые железы раз-



Нематицидное действие культуральной жидкости гриба *Aspergillus sp.* на самку нематоды *Ditylenchus sp.*

ложены и представлены скоплениями гранул по всему телу нематоды. Поврежден также кутикулярный покров нематоды в области вульварного аппарата.

В результате экстрагирования органическими растворителями получены образцы для дальнейшего исследования нематицидной активности. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, все полученные образцы обладали нематицидной активностью, которая составила на третьи сутки опыта от 50% (хлороформенный экстракт мицелия) до 100% (этилацетатный экстракт культуральной жидкости).

Дальнейшие исследования были направлены на выявление веществ флавоноидной природы

в активных образцах, полученных из гриба *Aspergillus sp.* Был проведен хроматографический анализ их с использованием общей двумерной бумажной хроматографии. Обнаружение компонентов осуществляется просматриванием их в УФ-свете, при этом гликозидированные формы наблюдаются в виде коричневых пятен, их агликоны – в виде желтых пятен. После просматривания хроматограмм в УФ-свете их обрабатывают парами аммиака или 5%-ным спиртовым раствором AlCl_3 с нагреванием при 105 °C, что позволяет получить зоны с более яркой флуоресценцией, при которой отмечается желтое окрашивание.

Результаты хроматографического анализа экстрактов представлены в табл. 2–5.

Таблица 1. Нематицидная активность образцов, полученных из культуральной жидкости и мицелия гриба *Aspergillus sp.*, в отношении фитопаразитических нематод *Ditylenchus sp.*

№ п/п	Образец	Концентрация, %	Количество неактивных нематод		
			через 24 ч	через 48 ч	через 72 ч
1	КЖ	Исходная	100	100	100
2	ЭКЖ(Х)	10,0	50	55	55
3	ЭМ(Х)	10,0	45	50	50
4	ЭКЖ(ЭА)	10,0	95	100	100
5	ЭМ(Э)	10,0	48	60	60
6	Контроль-1 (вода)	—	0	0	0
7	Контроль-2 (этанол)	5	0	0	0

Примечание. КЖ – культуральная жидкость; ЭКЖ(Х) – хлороформенный экстракт культуральной жидкости; ЭМ(Х) – хлороформенный экстракт мицелия; ЭКЖ(ЭА) – этилацетатный экстракт культуральной жидкости; ЭМ(Э) – этанольный экстракт мицелия.

Таблица 2. Хроматографический анализ хлороформенного экстракта культуральной жидкости ЭКЖ(Х) гриба *Aspergillus sp.*

№ п/п	Rf в системах				Проявители		
	1	2	3	4	УФ-свет	NH_3	ДзПНА/сода
1	0,85	0,00	0,94	0,00	Желтый	Желтый	Красно-желтый
2	0,37	0,00	0,50	0,00	Светится	—	—
3	0,82	0,26	—	—	Светится	—	—
4	0,75	0,70	—	—	Фиолетовый	—	—

Примечание. 1 – зона агликонов флавоноида (окисленной формы), 2–4 – зоны фенолокислот.

Таблица 3. Хроматографический анализ хлороформенного экстракта мицелия ЭМ (Х) гриба *Aspergillus sp.*

№ п/п	Rf в системах				Проявители		
	1	2	3	4	УФ-свет	NH_3	ДзПНА/сода
1	1,2	0,00	1,04	0,00	Желтый	Желтый	Красно-желтый
2	0,73	0,28	—	—	Светится	—	—

Примечание. 1 – зона агликонов флавоноида (окисленной формы).

Таблица 4. Хроматографический анализ этилацетатного ЭКЖ(ЭА) экстракта культуральной жидкости гриба *Aspergillus sp.*

№ п/п	Rf в системах		Проявители		
	1	2	УФ-свет	NH ₃	ДзПНА/сода
1	0,63	0,00	Темный	Желтый	—
2	0,53	0,00	Темный	Желтый	—
3	0,55	0,52	Фиолетовый	—	—

Примечание. 1–2 – зоны агликон флавоноидного характера.

Таким образом, установлено, что все полученные экстракти гриба *Aspergillus sp.*, обладающие нематицидной активностью по отношению к фитопаразитическим нематодам *Ditylenchus spp.*, содержат в своем составе компоненты флавоноидов. Это свидетельствует о перспективности дальнейшего исследования их структуры и возможного использования в качестве новых микробных препаратов для защиты растений от нематод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sijmons P.C., Von Mende N., Grundler F.M.W. *Arabidopsis thaliana. Plant-parasitic nematodes* // Eds. Meyrowitz E., Somerville C. New-York: Cold Spring Harbour Lab. 1999. P. 749-767.
2. Bird D., Bird A.F. // *Parasitic nematodes: Molecular, biology, Biochemistry and Immunology* / Eds. Kennedy M.W., Harnett W. Wallingford: CaBI Publ. 2001. P. 139-166.
3. Atkinson H.J., Urwin P.E., Pherson M.J. Opportunities for Molecular biology in Crop Protection // Ann. Rev. Phytopathology. 2003. V. 41. P. 615-639.
4. Jasmer D.P., Goverse A., Smart G. // Ann. Rev. Phytopathol. 2003. V. 41. P. 245-270.
5. Гоженко А.И., Славина Н.Г. Фенольные пигменты винограда – регуляторы адаптивных функций при нарушениях гомеостаза // Четвертая международная конференция по медицинской ботанике: Тез. докл. Киев, 1997. С. 440-442.
6. Айзенман Б.Е., Дербенцева Н.А. Антимикробные препараты из зверобоя. Киев: Наукова думка, 1976. 172 с.
7. Achenbach H. Alcaloids, flavonoids and phenylpropanoids from westafricans plant *Oximitra velutina* // Phytochemistry. 1991. V. 30, № 4. P. 1265-1267.
8. Колесников М.П., Гинс В.К. Фенольные соединения в лекарственных растениях // Прикладная биохим. и микробиол. 2001. Т. 37, № 4. С. 457-465.
9. Iudich A. Flavonoids Rubia davisiana Doganca S. // Fitoterapia. 1990. V. 61, N 6. P. 552-553.
10. Mossa J.S., Sattar Essam Abdel, Abou-Shoer M., Galal A.M. Free flavonoids from *Rhus retinorrhoe Stend.ex.Olive* // Int. J. Pharmacognosy. 1996. V. 34, N 3. P. 198-201.
11. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. 160 с.
12. Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование. Новосибирск: Наука, 1978. 256 с.
13. Ильченок Т.Ю., Хоменко А.И., Фригидова Л.М., Лепехин В.П., Верховский Ю.Г., Жербин Б.А., Шадурский К.С., Тюкавкина Н.А., Лаптева К.И., Кононова В.В. Фармакологические и радиозащитные свойства некоторых производных γ-пирана // Фармакология и токсикология. 1975. Т. 38, № 5. С. 607-612.
14. Вермичев С.М. Экспериментальное изучение токсичности и противоопухолевой активности синтетических и природных соединений группы пирана // 2-й Всесоюз. симпоз. по фенольным соединениям: Тез. докл. Алма-Ата, 1970. С. 125-126.
15. Вермичев С.М., Кабиев О.К. О противоопухолевой активности флавонолов // 2-й Всесоюз. симпоз. по фенольным соединениям: Тез. докл. Алма-Ата, 1970. С. 127-128.
16. Ажунова Т.Н., Самбуева З.Г., Николаев С.М., Матханов Э.И., Нагаслаева Л.А. Желчегонное действие экстракта толокнянки обыкновенной // Фармация. 1988. Т. 37, № 2. С. 41-43.
17. Николаев С.М. Желчегонное действие экстракта горечавки бородатой // Фармация. 1985. Т. 34, № 3. С. 16-19.
18. Хаджай Я.И., Кузнецова В.Ф. О действии экстракта артишока на печень // Фармакол. и токсикол. 1971. № 6. С. 685-685.
19. Степанова Э.Ф., Василенко Ю.К., Фролова Л.М., Юна Бекеле, Окомлова М.С. Использование высущенных извлечений из травы пастушьей сумки в качестве гепатозащитных средств // Фармация. 1993. Т. 42, № 2. С. 9-10.
20. Соколова В.Е., Васильченко Е.А., Измайлова И.К. Об анаболизирующем действии флавоноидов // Фармакология и токсикология. 1978. Т. 41, № 3. С. 323-326.
21. Ашаева Л.А., Алханова Н.А., Ладыгина Е.Я., Артемова Н.П., Куршакова Л.Н., Анчикова Л.И. Сахароснижающие свойства настоя цветков липы // Фармация. 1985. Т. 34, № 3. С. 57-60.
22. Бахтина С.М., Лесиовская Е.Е., Саканян Е.И., Коноплева Е.В. Психотропное действие полизэкстракта из травы остролодочника остролистного // Четвертая международная конференция по медицинской ботанике: Тез. докл. Киев, 1997. С. 429-430.

Таблица 5. Хроматографический анализ этанольного ЭМ (Э) экстракта мицелия гриба *Aspergillus sp.*

№ п/п	Rf в системах		Проявители		
	1	2	УФ-свет	NH ₃	ДзПНА/сода
1	0,90	0,00	Желтый	Желтый	—
2	0,80	0,00	Светится	Светится	—
3	0,70	0,15	Светится	—	—
4	0,88	0,73	Светится	—	—

Примечание. 1 – зона агликон флавоноидов.

23. *Formica J.V., Regelson W.* Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids // Food.Chem.Toxicol. 1995. V. 33, N 12. P. 1061-1080.

24. *Хайсе И.М., Мацек К.* Хроматография на бумаге. М.: Мир, 1962. 851 с.

25. *Микеш О.* Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. М.: Мир, 1982. 612 с.

26. *Хефтман Э., Кастер Т., Нидервизер А. и др.* Хроматография. Практическое приложение метода. М.: Мир, 1986. С. 130-147.

Резюме

Aspergillus sp. саңырауқұлағының мицелий және өсінді сүйіфіның экстракттарының нематицидтік

белсенділігі зерттелді. Экстракттардың улылық өсерінен *Ditylenchus sp.* нематодының жойылуы 50-ден 100 пайызға дейін жеткені көрсетілді. Осы экстракттар құрамында флаваниод текті заттардың барлығы хроматографиялық өдістер арқылы анықталды.

Summary

Nematicide action of extracts of culture liquide and mycelium of the *Aspergillus sp.* fungus was investigated. As result of toxic action of the extractes, death of nematodes *Ditylenchus sp.* was from 50% to 100%. Substances of the flavonoides nature were discovery with used chromatography methods.

Институт микробиологии
и вирусологии, г. Алматы

Поступила 2.03.06г.