

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ / PHYSICO-CHEMICAL AND GENERAL BIOLOGY

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.26

DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-44-53

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБОВ *FUSARIUM TRICINCTUM*

© Х. Мохамед*, А.М. Петерсон*, В. Ебрагем**, П. Прокш**

*Саратовский государственный национальный исследовательский университет,
Российская Федерация, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

**Университет Генриха Гейне,
Германия, 40225, г. Дюсельдорф.

Грибы рода *Fusarium*, паразитирующие на растениях, известны как продуценты разнообразных метаболитов с широкой биологической активностью. Метаболиты *F. tricinctum* ранее изучались на штаммах, изолированных преимущественно с пшеницы и кукурузы. Проведено исследование вторичных метаболитов *F. tricinctum*, изолированного из внутренних тканей побегов яблонь. Видовая принадлежность штамма подтверждена анализом последовательностей генов 18S рРНК. С помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) обнаружено шесть вторичных метаболитов: энниатины (А, В, G, H), гибепирон В и ауреонитол. Идентификация данных соединений была проведена при помощи метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (LC-MS). Выявлено, что неочищенный грибковый экстракт проявляет слабую антибактериальную активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: *Fusarium tricinctum*, вторичные метаболиты, энниатины, биологическая активность.

Формат цитирования: Мохамед Х., Петерсон А.М., Ебрагем В., Прокш П. Идентификация и характеристика основных вторичных метаболитов грибов *Fusarium tricinctum* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, N. 2. Р. 43–53. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-43-53

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MAJOR SECONDARY METABOLITES FROM THE FUNGUS *FUSARIUM TRICINCTUM*

© H. Mohamed*, A.M. Peterson*, W. Ebrahimc**, P. Proksch**

*Department of Microbiology and Plant Physiology, Faculty of Biology, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya Street, 410012 Saratov, Russia

**Heinrich-Heine University,
40225 Dusseldorf, Germany

Enniatins (ENs) are secondary fungal metabolites with hexadepsipeptidic chemical structure and they possess a number of potent biological activities and they are known to act as antifungal, anti yeast and antibacterial and to possess anti insecticidal and phytotoxic properties. ENs are produced by several *Fusarium* strains including *Fusarium tricinctum*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. The endophyte *F. tricinctum* (F106) was isolated from the apple shoots in Volga region, Saratov, Russia. Molecular characterization performed by internal transcribed spacer (ITS1,4), rRNA gene sequence analysis and it was confirmed as *F. tricinctum*, accession number (KR184140). High-performance liquid chromatography (HPLC), investigation of the Ethyl acetate (EtOAc), crude extract of *F. tricinctum* which was grown on solid rice medium yielded six secondary metabolites, including Enniatins (A, B, G, H), in addition to other metabolites Gibepyrone B and Aureonitol. Fungal crude extract were found to potentiate activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus*. All these structures were determined on the basis of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

Key words: *Fusarium tricinctum*, secondary metabolites, Enniatins, biological activity, HPLC

For citation: Mohamed H., Peterson A.M., Ebrahim W., Proksch P. Identification and characterization of major secondary metabolites from the fungus *Fusarium tricinctum*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* [Proceedings of Universities, Applied Chemistry and Biotechnology]. 2017, vol. 7, no. 2, pp. 43–53. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-44-53

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Fusarium* в первую очередь известны как возбудители болезней растений. Симптоматика фузариозов различна и может проявляться в виде корневых, стеблевых, плодовых гнилей, гнили семян, болезней листьев, рака, увядания [1–3]. Некоторые *Fusarium* могут вызывать острые или хронические заболевания у людей и домашних животных [4, 5]. Такое разнообразие биологического действия связано со способностью грибов *Fusarium* продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, среди которых основное место занимают энниатины. Энниатины (ENs) – вторичные метаболиты грибов, относящиеся к группе циклических гексадецепептидов, которые обычно состоят из трех остатков D-α-гидроксиизовалериановой кислоты, связанных поочередно с тремя остатками L-N-метил-аминокислоты, образуя 18-членный циклический остов [6]. Эти соединения обладают антимикробной, противогрибковой, инсектицидной активностью, фитотоксическими свойствами [7–10]. Одной из основных причин токсичности энниатинов считают их ионофорные и мембраномодифицирующие свойства. Энниатины могут инкорпорироваться в клеточные мембраны и формировать катионселективные поры или каналы. Изменение проницаемости мембран приводит к изменению внутриклеточной концентрации соответствующих ионов и нарушению ионного гомеостаза [11]. Высокая токсичность энниатинов открывает широкие перспективы их использования в медицине и биотехнологии [12, 13]. Помимо энниатинов *Fusarium* способны синтезировать и многие другие метаболиты с разнообразными биологическими активностями: боверицин, дезоксиниваленон, ниваленон, зеараленон, монилиформин, фузарин С, фумонизины, токсин Т2 и другие [14–16].

F. tricinctum считается слабым патогеном растений, хотя есть данные о его способности активно размножаться на зерновых, что приводит к накоплению в них микотоксинов [17]. *F. tricinctum* указывается также как возбудитель розовой гнили лука [18], загнивания корней лотоса [19]. Предыдущие работы, посвященные выявлению вторичных метаболитов представителей этого вида, проводились преимущественно на штаммах, изолированных с пшеницы и кукурузы [20]. В данной работе объектом исследования послужил штамм *F. tricinctum*,

изолированный из внутренних тканей побегов яблонь с признаками поражения микозом (растрескиванием и почернением коры).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и идентификация грибов.

Выделение грибов с поверхности и из внутренних тканей побегов яблонь проводили в июне 2014 года в окрестностях г. Саратов, Россия по методике, описанной ранее [21]. Исследовали побеги яблонь сортов Уэлси, Беркутовское, Голден Делишес с растрескиванием и почернением коры. Идентификацию грибов проводили путем секвенирования 18S рРНК и области, включающей ITS1-ITS2, с последующим поиском в базе данных BlastN [22].

Выращивание грибов. Культивирование грибов осуществляли на солодовом агаре (рис. 1). Для выделения и идентификации вторичных метаболитов культивирование проводили в колбах Эрленмейера 1 л на рисовой среде (100 г риса добавляли к 110 мл дистиллированной воды и выдерживали в течение ночи перед автоклавированием) при комнатной температуре в статических условиях в течение 30 дней.

Экстрагирование и выделение вторичных метаболитов. После инкубации в колбу добавляли 250 мл этилацетата и оставляли на ночь с последующей фильтрацией. Этилацетатный экстракт высушивали. Сухой остаток после добавления экстрагирующего растворителя состава *n*-гексан : метанол (MeOH), 1:9 (об./об.) распределялся между *n*-гексаном и MeOH. Фракцию с MeOH (1,54 г) подвергали вакуумной жидкостной хроматографии (VLC) на силикагеле с использованием ступенчатого градиента смеси гексан/этилацетат и дихлорметан/метанол с получением двенадцати фракций, обозначенных нами от А до L. Фракцию С (160 мг) подвергали объемной вытеснительной колоночной хроматографии на носителе Sephadex LH-20 элюированием смесью MeOH с получением более чем шести субфракций С1-С6.

Определение химической структуры метаболитов. Спектры, полученные методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (MS-ESI) и высокоразрешающей MS-ESI (HRMS-ESI), регистрировали с помощью масс-спектрометра Finnigan LCQ Deca и масс-спектрометра FT-HRMS-Orbitrap (Thermo-Finnigan) соответственно. Растворители очищ

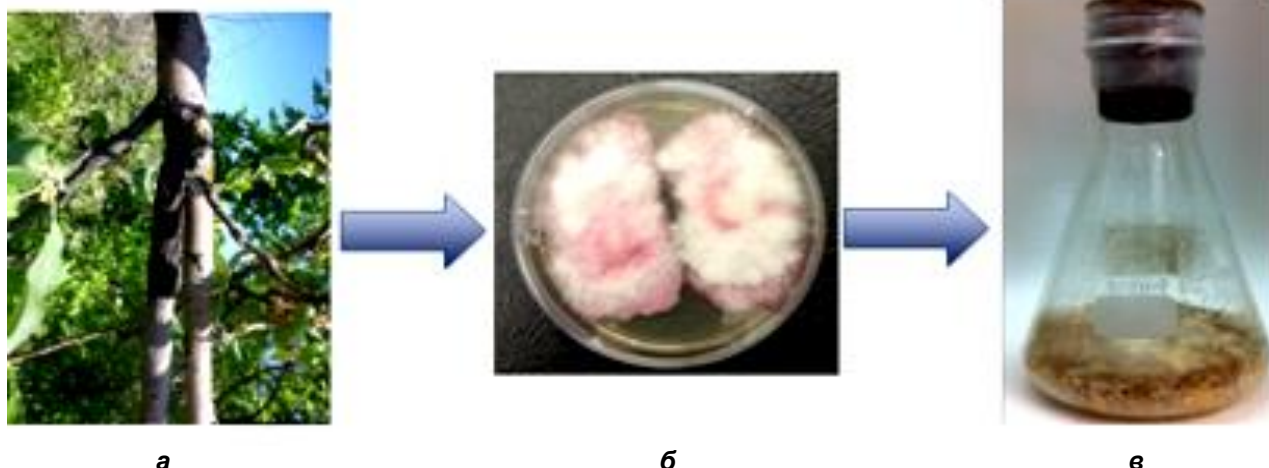


Рис. 1. Культивирование *F. tricinctum*, выделенного из растительного материала: а – пораженный побег яблони; б – чистый грибковый штамм; в – культивирование на твердой рисовой среде в чашках с солодовым агаром

щали перед использованием, и для спектроскопических измерений использовали спектральные градиентные растворители. ВЭЖХ-анализ проводили с помощью Dionex UltiMate3400 SD с насосом LPG-3400SD, соединенным с фотодиодно-матричным детектором (DAD3000RS). Обнаружение проводили при 235, 254, 280 и 340 нм. Разделительную колонку (125 x 4 мм) предварительно заполняли Eurosphere-100 C18 (Knauer, Германия), в экспериментах использовали следующий градиент (MeOH, 0,02% H₃PO₄ в H₂O): 0 мин. (10% MeOH), 5 мин. (10% MeOH), 35 мин. (100% MeOH), 45 мин. (100% MeOH). Полупрепаративную ВЭЖХ проводили с использованием системы Merck Hitachi ВЭЖХ (УФ-детектор L-7400; насос L-7100; Eurosphere-100 C18, 300 x 8 мм, Кнауэр, Германия). Для колоночной хроматографии применяли LH-20 Sephadex и 60 М Мерк MN силикагель (0,04-0,063 мм). Пластины для тонкослойной хроматографии (TLC) с силикагелем F254 (Merck, Darmstadt, Германия) были использованы для наблюдения за фракцией (смесь CH₂Cl₂/MeOH в качестве подвижной фазы); детектирование происходило под УФ при 254 и 366 нм либо путем распыления реагента – анисового альдегида – на пластины.

Тест на биологическую активность. Бактериальный неочищенный экстракт (0,5 мг экстракта/50 мкл ДМСО) исследовали на активность в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 и *Mycobacterium tuberculosis* (клинический штамм). Данные штаммы были выбраны в качестве тест-объектов, т. к. обладали высокой антибиотикоустойчивостью. Несколько колоний (от 3 до 10) тестируемых микроорганизмов пересеивали в триптозо-соевый буль-

он (4 мл) и инкубировали от 2-х до 5 ч. Суспензию разбавляли стерильным физиологическим раствором. Стандарты готовили добавлением 0,5 мл 1%-го BaCl₂ к 99,5 мл 1%-го H₂SO₄ (0,36 N). Приготовленный бактериальный бульон засеивали на чашки с агаром Мюллера-Хинтона и диспергировали с помощью стерильных бусинок. На стерильные диски из бумажных фильтров наносили 500 мкг подготовленного неочищенного экстракта *F. tricinctum*. Пропитанные диски помещали на чашки с агаром, предварительно засеянные выбранными тестируемыми организмами. В качестве контроля использовали диски без культуры, пропитанные только растворителем. Подготовленные таким образом чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Антимикробную активность регистрировали по наличию прозрачных зон отсутствия роста вокруг дисков с экстрактом *F. tricinctum*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распространение *F. tricinctum* на побегах яблони. Наши исследования показали, что *F. tricinctum* часто выделяется как с поверхности, так и из внутренних тканей побегов яблони с признаками поражения микозами – растрескиванием и почернением коры. При микробиологических исследованиях 120 проб пораженных побегов яблони в Саратовской области индекс встречаемости этого вида на поверхности побегов составил 40,3%, во внутренних тканях побегов – 6,8 %. Однако в некоторых садах в начале июня его встречаемость на поверхности побегов достигала 83,4%. Количественное содержание грибов этого вида на поверхности побегов варьировало от 10³ до 10⁵

КОЕ/см², во внутренней среде – от 10² до 10⁴ КОЕ/г. Несмотря на то, что учет количества КОЕ грибов дает лишь ориентировочное представление об их присутствии в исследуемых субстратах, многие авторы используют его для оценки количественных показателей содержания *Fusarium* на растениях [23, 24]. Для дальнейших исследований был выбран штамм *F. tricinctum* F106 выделенный из внутренних тканей побега яблони сорта Уэлси. Результаты молекулярного анализа его генома показали, что он имеет 99% гомологии последовательностей с *F. tricinctum*.

Идентификация вторичных метаболитов *F. tricinctum*. Идентификацию продуктов метаболизма проводили с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Величины времени удерживания для пиков ВЭЖХ-хроматограмм совпадали с этими величинами для пиков эталонных соединений, имеющимися в базе данных УФ-видимой области спектра (рис. 2). Соединения были идентифицированы как энниатины А, В, G, H, гибепирон В и ауреонитол.

Для подтверждения полученных результатов была проведена масс-спектрометрия выделенных соединений, которая выявила количественные характеристики содержания в них псевдомолекулярных ионов [M + H]⁺ (рис. 3). Сравнение полученных значений с литературными данными [25] также позволило идентифицировать выделенные продукты метаболизма (табл. 1).

После обобщения данных, полученных с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии, были сделаны окончательные выводы о природе исследованных продуктов метаболизма (табл. 2) и их химической структуре (табл. 3 и рис. 4).

Биологические активности выделенных соединений уже достаточно хорошо изучены. Так, энниатины (особенно А и В) обладают цитотоксическим, антибактериальным, фунгицидным, фитотоксическим действием [33, 34, 35, 36], у гибепирона В выявлена антибактериальная и фунгицидная активности [37], у ауреонитола – антибактериальная активность [38].

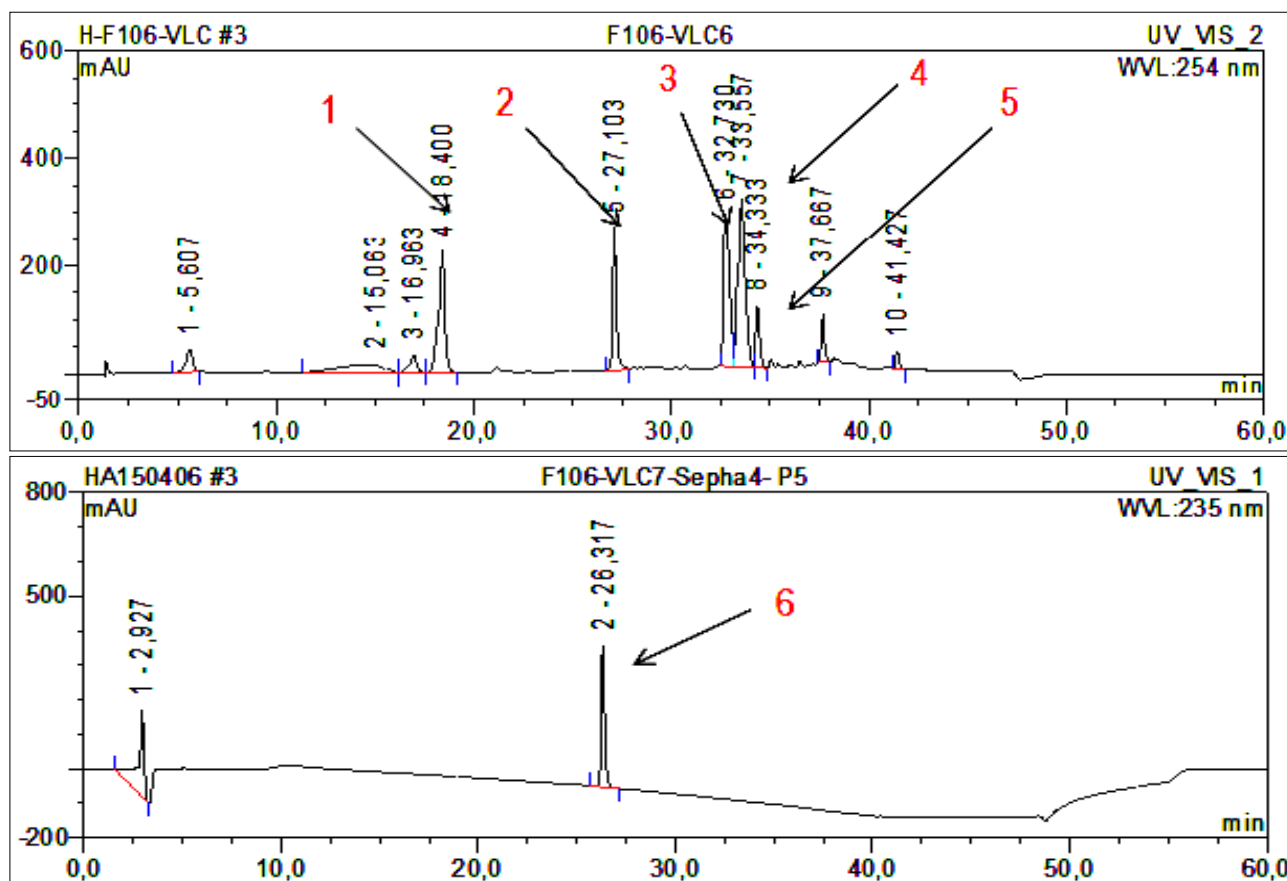


Рис. 2. ВЭЖХ хроматограмма метаболитов из неочищенного экстракта *F. tricinctum*:
1 – энниатин А; 2 – энниатин В; 3 – энниатин G; 4 – энниатин H;
5 – гибепирон В; 6 – ауреонитол

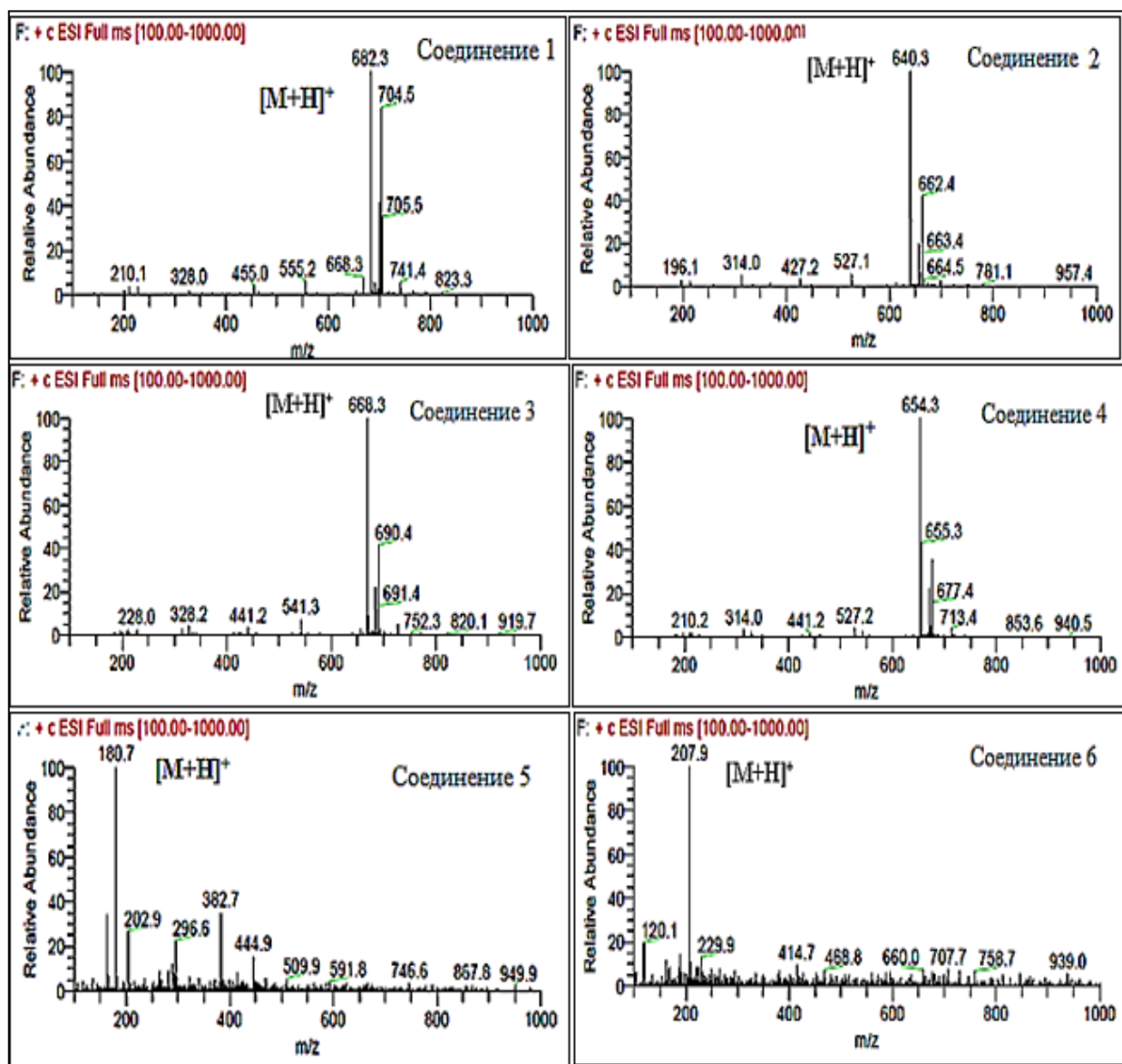


Рис. 3. Масс-спектры выделенных соединений

Соответствие показателя $[M+H]^+$ известным продуктам метаболизма грибов

Таблица 1

№ соединения	$[M+H]^+$	Метаболиты
1	682,3	Энниатин А, А ₂ С
2	640,3	Энниатин В
3	668,3	Энниатин G, Е А ₁ О ₁ О ₂ О ₃
4	654,3	Энниатин Н, В ₄
5	180,7	Гибепирон В
6	207,9	Ауреонитол

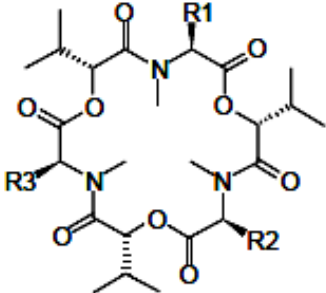
Таблица 2

Идентификация выделенных продуктов метаболизма *F. tricinctum*

№ соединения	Идентифицированный метаболит	Молекулярная формула
1	Энниатин А.	$C_{36}H_{63}N_3O_9$ [26, 27]
2	Энниатин В	$C_{33}H_{57}N_3O_9$ [26, 28]
3	Энниатин G	$C_{35}H_{61}N_3O_9$, [29]
4	Энниатин Н.	$C_{34}H_{59}N_3O_9$, [27, 30]
5	Гибепирон В	$C_{10}H_{12}O_3$. [31]
6	Ауреонитол	$C_{13}H_{18}O_2$, [32]

Таблица 3

Особенности химической структуры выявленных энниатинов *F. Tricinctum*

Основная формула	Энниатины	Радикалы		
		R1	R2	R3
	A	$CH(CH_3)CH_2CH_3$	$CH(CH_3)CH_2CH_3$	$CH(CH_3)CH_2CH_3$
	B	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)_2$
	G	$CH(CH_3)CH_2CH_3$	$CH(CH_3)CH_2CH_3$	$CH(CH_3)_2$
	H	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)CH_2CH_3$

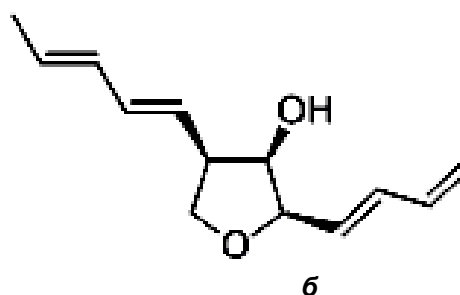
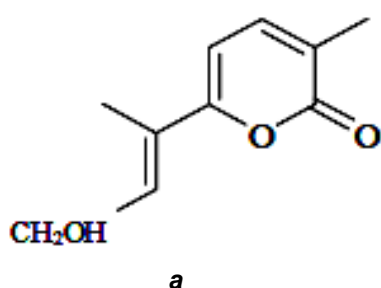


Рис. 4. Химическая структура гибепирона В (а) и ауреонитола Гибепирон В Ауреонитола (б)

Известно, что любые биологические активности смесей, содержащих несколько метаболитов, всегда выше, чем активность каждого из них в отдельности [39]. Таким образом, большое разнообразие метаболитов *F. tricinctum* будет усиливать его воздействие как на само растение, так и на компоненты его нормальной микрофлоры.

Роль выявленных метаболитов в развитии патологических процессов, наблюдаемых на побегах яблонь, требует дальнейшего изуче-

ния. Ряд авторов считает, что энниатины не являются обязательным фактором фитопатогенности [40]. В других исследованиях [41] было показано, что разрушение генов, кодирующих синтез энниатинов, существенно снижало вирулентность фитопатогенов.

Биоактивность неочищенного экстракта *F. tricinctum*.

В связи с тем, что ряд авторов указывает на возможность использования продуктов метаболизма *Fusarium* в медицинской практике,

было проведено исследование антимикробной активности *F. tricinctum* по отношению к некоторым патогенным бактериям. Неочищенный экстракт *F. tricinctum* показал слабую антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 (подавление роста *S. aureus* происходило при воздействии неочищенного грибного экстракта в концентрации 25 мкг/мл), и был не активен в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (100 мкг/мл). Следует отметить, что в исследованиях [42] смесь очищенных энниатинов *Fusarium* sp. также проявила незначительную активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (LC50 3.12-6.25 мг/мл). Таким образом, антимикробная активность неочищенного экстракта *F. tricinctum* по отношению к тестируемым возбудителям болезни человека и животных оказалась низкой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

F. tricinctum широко распространен на поверхности и во внутренних тканях побегов яб-

лонь с растрескиванием и почернением коры в Саратовской области. Попадая в эту экологическую нишу *F. tricinctum* сталкивается с представителями нормальной микрофлоры побегов яблонь, а также с целым комплексом фитопатогенных грибов [21]. Для успешного существования в этом сложном биоценозе микроорганизму необходимо иметь определенные средства конкурентной борьбы. Способность *F. tricinctum* продуцировать целый ряд биологически активных метаболитов, обладающих антибактериальным, фунгицидным, фитотоксическим действием, свидетельствует о возможности его влияния как на нормальную микрофлору побегов, так и на само растение. Роль *F. tricinctum* и продуктов его метаболизма в формировании наблюдаемых повреждений побегов яблонь требует дальнейшего изучения. Использование метаболитов *F. tricinctum* против протестированных патогенных микроорганизмов оказалось малоэффективным.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность профессору, доктору Peter Proksch – руководителю Института фармацевтической биологии и биотехнологии в Университете Генриха Гейне (Дюссельдорф, Германия) за поддержку, предоставление необходимого оборудования и содействие в экспериментах.

ACKNOWLEDGEMENT

Special thanks to Professor Dr. Peter Proksch project Manager, Institute of pharmaceutical research biology and biotechnology at the Heinrich Heine University (Dusseldorf, Germany) for their support, provision of necessary equipment and assistance in the experiments.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Leslie J.F., Summerell B.A. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. P. 428–433.
2. Trkulja V. Zaštita uskladištenog voća od bolesti. Protection of stored fruit from disease, in Serbian. In: Kljajić P, editor. Zaštita uskladištenih biljnih proizvoda od štetnih organizama. Beograd // Institut za pesticide i zaštitu životne sredine. 2008. P. 193–213.
3. Snowdon A.L. Pome fruits. In a color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1. General introduction and fruits. London: Wolfe Scientific Ltd, 1990. P. 170–218.
4. Martino P., Gastaldi R., Racciah R., Girmenia C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immune compromised patients // *Journal of Infection*. 1994. Vol. 28, N 1. P. 7–15.
5. Rebell G. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine / In: Nelson P.E., Tousoun T.A. Cook R.J. (editors). *Fusarium* diseases, biology and taxonomy. University Park (PA) // Pennsylvania State University Press. 1981. P. 210–220.
6. Жухлистова Н.Е., Тищенко Г.Н., Толстых И.В., Зенкова В.А. Рентгеновский кристаллическая структура комплекса энниатин В с KNCS // *Журнал кристаллография*. 1999. Т. 44. С. 8–12.
7. Desjardins A.E., Proctor R.H., Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins // *International Journal Food Microbiology*. 2007. V. 119, N 1. P. 47–50.
8. Wätjen W., Debbab A., Hohlfeld A., Chovolou Y., Kampkötter A., Edrada R.A., Ebel R., Hakiki A., Mosaddak M., Totzke F., Kubbutat M.G., Proksch, P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation // *Journal of Molecular Nutrition Food Research*. 2009. V. 53. P. 431–440.
9. Dornetshuber R., Heffeter P., Kamyar M.R., Peterbauer T., Berger W. Lemmens-Gruber, R. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells // *Journal Chemical Research in Toxicology*. 2007. V. 20. P. 465–473.
10. Hiraga K., Yamamoto S., Fukuda H., Hamanaka N., Oda K. Enniatin has a new function as an inhibitor of the Pdr5p, one of the ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae* // *Jour-*

nal of Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005. V. 25. N 4. P. 1119–1125.

11. Jestoi M. Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin // *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008. V. 48. P. 21–49.

12. Föllmann W., Behm C., Degen G.H. The emerging Fusarium toxin enniatin B: in vitro studies on its genotoxic potential and cytotoxicity in V79 cells in relation to other mycotoxins // *Journal of Mycotoxin Research*. 2009. V. 25. P. 11–19.

13. Behm C., Degen G.H., Föllmann W. The Fusarium toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro // *Journal of Molecular Nutrition Food Research*. 2009. V. 53. P. 423–430.

14. Medentsev A.G., Akimenko V.K. Naphthoquinone metabolites of the fungi // *Journal of Phytochemistry*. 1998. V. 47. P. 935–959.

15. Desjardins A.E. Gibberella from A (venaceae) to Z (eae) // *Annual review of Journal of Phytopathology*. 2003. V. 41. P. 177–98.

16. Trenholm H.L., Charmley L.L., Prelusky D.B., Warner R.M. Two physical methods for the decontamination of four cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991. V. 39. P. 356–360.

17. Bottalico A., Perrone G. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe // *European Journal of Plant Pathology*. 2002. V. 108. P. 611–624.

18. Carrieri R., Raimo F., Pentangelo A., Lahoz E. Fusarium proliferatum and Fusarium tricinctum as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field // *Journal of Crop Protection*. 2013. V. 43, N 1. P. 31–37.

19. Li H., Zheng L., Yan S.L., Wang Q.Z. First Report of Lotus Root Disease Caused by Fusarium tricinctum in China // *APS Journals*. 2016. V. 100, N 8. P. 1784.

20. Yli-Mattila T. Ecology and evolution of toxigenic Fusarium species in cereals in northern Europe and Asia // *Journal of Plant Pathology*. 2010. V. 92. N 1. P. 7–18.

21. Мохамед Х., Петерсон А. М., Козлова А. В. Ассоциативные микроорганизмы побегов яблонь (*Malus P. Mill*, 1754) в Саратовской области // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Сер.: Химия. Биология. Экология*. 2015. Вып. 3. С. 80–84.

22. Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch, P. Methods for isolation of marine derived endophytic fungi and their bioactive secondary products // *Journal of Natural Products*. 2010. V. 5. P. 479–490.

23. Narayanasamy P. Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis // Springer

Science Business Media B.V. *Journal of Fungal Pathogens*. 2011. V. 1. P. 1–291.

24. Sriram S., Savitha M.J. Enumeration of colony forming units of Trichoderma in formulations – precautions to be taken to avoid errors during serial dilution // *Journal of Biological Control*. 2011. V. 25, N 1. P. 64–67.

25. Wim W., Abdessamad D., Anke H., Yvonni C., Andreas K., Ru Angelie E., Rainer E., Abdelhak H., Mahjouba M., Frank T., Michael H.G., Peter P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of Fusarium tricinctum induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation // *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*. 2009. V. 53, N 4. P. 431–440.

26. Plattner P.A., Nager U. Welkstoffe und Antibiotika. Mitteilu ngber die Konstitution von Enniatin B // *Journal of Helvetica Chimica Acta*. 1948. V. 31. P. 665–671.

27. Nilanonta C., Isaka M., Chanphen R., Thongorn N., Tanticharoen M., Thebtaranonth, Y. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor directed biosynthesis // *Journal of Tetrahedron*. 2003. V. 59. P. 1015–1020.

28. Audhya T.K., Russell, D.W. Natural enniatin A, a mixture of optical isomers containing both erythro- and threo-N-methyl-l-isooleucine residues // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1974. V. 1. P. 743–746.

29. Jayasinghe L., Abbas H.K., Jacob M.R., Herath W.H., Nanayakkara, N.P. N-Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone analogues from Fusarium oxysporum // *Journal of Natural Products*. 2006. V. 6. P. 439–442.

30. Vongvilai P., Isaka M., Kittakoop P., Srikitkulchai P., Kongsaree P., Prabpai, S., Thebtaranonth Y. Isolation and structure elucidation of enniatins L, M1, M2, and N: novel hydroxy analogs // *Journal of Helvetica Chimica Acta*. 2004. V. 87. P. 2066–2073.

31. Till F., Biosynthesis of α -pyrones // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2016. V. 12. P. 571–588.

32. Aly A.H., Debbab A., Kjer J., Proksch, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products // *Journal of Fungal Diversity*. 2010. V. 41. P. 1–16.

33. Tsantrizos Y.S., Xu X.J., Sauriol F., Hynes R.C. Novel quinazolinones and enniatins from Fusarium lateritium Nees // *Canadian Journal of Chemistry*. 1993. V. 71. P. 1362–1367.

34. Kamyar M.R., Rawnduzi P., Studenik C.R., Kouri K., Lemmens-Gruber R. Investigation of the electrophysiological properties of enniatins // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004. V. 429. P. 215–223.

35. Kamyar M.R., Kouri K., Rawnduzi P.,

Studenik C.R., Lemmens-Gruber R. Effects of moniliformin in presence of cyclohexadepsipeptides on isolated mammalian tissue and cells // *Journal of Toxicology. Vitro*. 2006. V. 20. P. 1284–1291.

36. Pohanka A., Capieau K., Broberg A., Stenlid J., Stenstorm E., Kenne L. Enniatins of *Fusarium* spp. strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination // *Journal of Amino Acids*. 2006. V. 26. P. 283–289.

37. Barrero A.F., Oltra J.E., Herrador M.M., Cabrera E., Sanchez J.F., Quilez J.F., Rojas F.J., Reyes J.F. Gibberones: α -Pyrones from *Gibberella fujikuroi* // *Journal of Tetrahedron*. 1993. V. 49. P. 141–150.

38. Marwah S., Khan M.M.R., Chaudhary A., Gupta S., Negi S.S., Soan A., Nundy S. Two hundred and forty-one consecutive liver resections: an experience from India // *HPB (Oxford)*. 2007. V. 9. P. 29–36.

39. Hershshorn J., Park S.H., Stierle A., Strobel G.A. *Fusarium avenaceum* as a novel

pathogen of spotted knapweed and its phytotoxins, acetamido-butenolide and enniatin B // *Journal of Plant Science*. 1992. V. 86. P. 155–160.

40. Herrmann M., Zocher R., Haese A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue // *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 1996b. V. 62. P. 393–398.

41. Hornbogen T., Glinski M., Zocher R. Biothynsesis of desipeptide mycotoxins in *Fusarium* // *European Journal of Plant Pathology*. 2002. V. 108, N 7. P. 713–718.

42. Wim W., Abdessamad D., Anke H., Yvonne C., Andreas K., Ru Angelie E., Rainer E., Abdelhak H., Mahjoub M., Frank T., Michael H.G., Peter P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation // *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*. 2009. V. 53, N 4. P. 431–440.

REFERENCES

1. Leslie J.F., Summerell B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames (IA). *Blackwell Publishing*. 2006, pp. 428–433.

2. Trkulja V. Protection of stored fruit from disease. In: *Zaštita uskladištenih biljnih proizvoda od štetnih organizama*. Under the editorship of P. Kljajić. Beograd. Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, 2008, pp. 193–213. (in Serbian)

3. Snowdon A.L. *Pome fruits in a color atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruits*. London, Wolfe Scientific Ltd., 1990, pp. 170–218.

4. Martino P., Gastaldi R., Raccach R., Girmenia C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immune compromised patients. *Journal of Infection*. 1994, vol. 28, no. 1, pp. 7–15.

5. Rebell G. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine. In: *Fusarium diseases, biology and taxonomy*. Under the editorship of P.E. Nelson, T.A. Toussoun, R.J. Cook. University Park (PA), Pennsylvania State University Press, 1981, pp. 210–220.

6. Zhukhlistova N.E., Tishchenko G.N., Tolstykh I.V., Zenkova V.A. X-ray crystal structure of the complex of enniatin B with KNCS. *Journal of Crystallography report*. 1999, vol. 44, pp. 8–12.

7. Desjardins A.E., Proctor R.H., Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal Food Microbiology*. 2007, vol. 119, no. 1, pp. 47–50.

8. Wätjen W., Debbab A., Hohlfield A., Chovolou Y., Kampkötter A., Edrada R.A., Ebel R., Hakiki A., Mosaddak M., Totzke F., Kubbutat M.G., Proksch, P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce

apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Journal of Molecular Nutrition Food Research*. 2009, vol. 53, pp. 431–440.

9. Dornetshuber R., Heffeter P., Kamyar M.R., Peterbauer T., Berger W. Lemmens-Gruber, R. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. *Journal Chemical Research in Toxicology*. 2007, vol. 20, pp. 465–473.

10. Hiraga K., Yamamoto S., Fukuda H., Hamanaka N., Oda K. Enniatin has a new function as an inhibitor of the Pdr5p, one of the ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, vol. 25, no. 4, pp. 1119–1125.

11. Jestoi M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, vol. 48, pp. 21–49.

12. Föllmann W., Behm C., Degen G.H. The emerging *Fusarium* toxin enniatin B: *in vitro* studies on its genotoxic potential and cytotoxicity in V79 cells in relation to other mycotoxins. // *Journal of Mycotoxin Research*. 2009, vol. 25, pp. 11–19.

13. Behm C., Degen G.H., Föllmann W. The *Fusarium* toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity *in vitro*. *Journal of Molecular Nutrition Food Research*. 2009, vol. 53, pp. 423–430.

14. Medentsev A.G., Akimenko V.K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Journal of Phytochemistry*. 1998, vol. 47, pp. 935–959.

15. Desjardins A.E. *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annual review of Journal of Phytopathology*. 2003, vol. 41, pp. 177–98.

16. Trenholm H.L., Charmley L.L., Prelusky D.B., Warner R.M. Two physical methods for the decontamination of four cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991, vol. 39, pp. 356–360.
17. Bottalico A., Perrone G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 2002, vol. 108, pp. 611–624.
18. Carrieri R., Raimo F., Pentangelo A., Lahoz E. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Journal of Crop Protection*. 2013, vol. 43, no. 1, pp. 31–37.
19. Li H., Zheng L., Yan S.L., Wang Q.Z. First Report of Lotus Root Disease Caused by *Fusarium tricinctum* in China. *APS Journals*. 2016, vol. 100, no. 8, p. 1784.
20. Yli-Mattila T. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*. 2010, vol. 92, no. 1, pp. 7–18.
21. Mohamed. H., Peterson A.M., Kozlova A.V. Associative Microorganisms Shoots Apple Tree (*Malus P. Mill*, 1754) in Saratov Region. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Ser. Khimiya. Biologiya. Ekologiya* [Izvestiya of Saratov State University. New series: Chemistry, Biology, Ecology]. 2015, vol. 3, pp. 80-84.
22. Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch, P. Methods for isolation of marine derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Journal of Natural Products*. 2010, vol. 5, pp. 479–490.
23. Narayanasamy P. Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis. Springer Science Business Media B.V. *Journal of Fungal Pathogens*. 2011, vol. 1, pp. 1–291.
24. Sriram S., Savitha M.J. Enumeration of colony forming units of *Trichoderma* in formulations – precautions to be taken to avoid errors during serial dilution. *Journal of Biological Control*. 2011, vol. 25, no. 1, pp. 64–67.
25. Wim W., Abdessamad D., Anke H., Yvonne C., Andreas K., Ru Angelie E., Rainer E., Abdelhak H., Mahjouba M., Frank T., Michael H.G., Peter P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*. 2009, vol. 53, no. 4, pp. 431–440.
26. Plattner P.A., Nager U. Welkstoffe und Antibiotika. Mitteilun gber die Konstitution von Enniatin B. *Journal of Helvetica Chimica Acta*. 1948, vol. 31, pp. 665–671.
27. Nilanonta C., Isaka M., Chanphen R., Thongorn N., Tanticharoen M., Thebtaranonth, Y. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor directed biosynthesis. *Journal of Tetrahedron*. 2003, vol. 59, pp. 1015–1020.
28. Audhya T.K., Russell, D.W. Natural enniatin A, a mixture of optical isomers containing both erythro- and threo-N-methyl-l-isoleucine residues. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1974, vol. 1, pp. 743–746.
29. Jayasinghe L., Abbas H.K., Jacob M.R., Herath W.H., Nanayakkara, N.P. N-Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone analogues from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*. 2006, vol. 6, pp. 439–442.
30. Vongvilai P., Isaka M., Kittakoop P., Srikitikulchai P., Kongsaree P., Prabpai, S., Thebtaranonth Y. Isolation and structure elucidation of enniatins L, M1, M2, and N: novel hydroxy analogs. *Journal of Helvetica Chimica Acta*. 2004, vol. 87, pp. 2066–2073.
31. Till F., Biosynthesis of α -pyrones. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2016, vol. 12, pp. 571–588.
32. Aly A.H., Debbab A., Kjer J., Proksch, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Journal of Fungal Diversity*. 2010, vol. 41, pp. 1–16.
33. Tsantrizos Y.S., Xu X.J., Sauriol F., Hynes R.C. Novel quinazolinones and enniatins from *Fusarium lateritium* Nees. *Canadian Journal of Chemistry*. 1993, vol. 71, pp. 1362–1367.
34. Kamyar M.R., Rawnduzi P., Studenik C.R., Kouri K., Lemmens-Gruber R. Investigation of the electrophysiological properties of enniatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2004, vol. 429, pp. 215–223.
35. Kamyar M.R., Kouri K., Rawnduzi P., Studenik C.R., Lemmens-Gruber R. Effects of moniliformin in presence of cyclohexadepsipeptides on isolated mammalian tissue and cells. *Journal of Toxicology. Vitro*. 2006, vol. 20, pp. 1284–1291.
36. Pohanka A., Capieau K., Broberg A., Stenlid J., Stenstorm E., Kenne L. Enniatins of *Fusarium spp.* strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination. *Journal of Amino Acids*. 2006, vol. 26, pp. 283–289.
37. Barrero A.F., Oltra J.E., Herrador M.M., Cabrera E., Sanchez J.F., Quilez J.F., Rojas F.J., Reyes J.F. Gibepyrone: α -Pyrone from *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Tetrahedron*. 1993, vol. 49, pp. 141–150.
38. Marwah S., Khan M.M.R., Chaudhary A., Gupta S., Negi S.S., Soin A., Nundy S. Two hundred and forty-one consecutive liver resections: an experience from India. *HPB (Oxford)*. 2007, vol. 9, pp. 29–36.
39. Hershenhorn J., Park S.H., Stierle A.,

Strobel G.A. *Fusarium avenaceum* as a novel pathogen of spotted knapweed and its phytotoxins, acetamido-butenolide and enniatin B. *Journal of Plant Science*. 1992, vol. 86, pp. 155–160.

40. Herrmann M., Zocher R., Haese A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 1996b, vol. 62, pp. 393–398.

41. Hormbogen T., Gliniski M., Zocher R. Biothynthesis of desipeptide mycotoxins in *Fusarium*.

European Journal of Plant Pathology. 2002, vol. 108, no. 7, pp. 713–718.

42. Wim W., Abdessamad D., Anke H., Yvonne C., Andreas K., Ru Angelie E., Rainer E., Abdelhak H., Mahjouba M., Frank T., Michael H.G., Peter P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Journal of Molecular Nutrition and Food Research*. 2009, vol. 53, no. 4, pp. 431–440.

Критерии авторства

Мохамед Х., Петерсон А.М., Ебрагем В., Прокш П. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Мохамед Х., Петерсон А.М., Ебрагем В., Прокш П. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Хассан А. Мохамед

Саратовский государственный национальный исследовательский университет
Аспирант
Hassan_awad37@mail.ru

Александра М. Петерсон

Саратовский государственный национальный исследовательский университет
К.б.н., доцент
alexandra.peterson@yandex.ru

Виаам Е. Ибрагем

Институт фармацевтической биологии и биотехнологии
Докторант
weaamnabil@hotmail.de

Петр Прокш

Институт фармацевтической биологии и биотехнологии
Докторант
proksch@uni-duesseldorf.de

Поступила 15.09.2016

Contribution

Mohamed H., Peterson A.M., Ebrahim W., Proksch P. carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Mohamed H., Peterson A.M., Ebrahim W., Proksch P. have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

AUTHORS' INDEX

Affiliations

Hassan A. Mohamed

Saratov State National Research University
Postgraduate student
Hassan_awad37@mail.ru

Alexandra M. Peterson

Saratov State National Research University
PhD (Microbiology), Associated professor
alexandra.peterson@yandex.ru

Weaam E. Ebrahim

Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology
PhD (Pharmacognosy), Associated professor
weaamnabil@hotmail.de

Peter Proksch

Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology
PhD (Pharmacognosy), Professor
proksch@uni-duesseldorf.de

Received 15.09.2016