

УДК 582.288.45:576.8.097.29

БИОСИНТЕЗ 4,15-ДИАЦЕТИЛНИВАЛЕНОЛА

Fusarium sambucinum var. *minus*

© 2011 г. Г. Д. Соколова*, В. Н. Вознесенский**

*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Россельхозакадемии,
Московская обл., Большие Вяземы 143050
e-mail: makeev@vniif.rosmail.com

**Институт химической физики РАН, Москва, 119991

Поступила в редакцию 19.10.2009 г.

Изолят *Fusarium sambucinum* Fuckel var. *minus* продуцировал нетипичный для вида *Fusarium sambucinum* Fuckel трихотеченовый метаболит — 4,15-диацетилниваленол (9 мг/л) в условиях глубинного культивирования на среде Миро. Вещество идентифицировано с использованием методов ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ и ¹H-ЯМР-спектроскопии. Из других трихотеченов обнаружены 4-ацетилниваленол (3 мг/мл) и ниваленол (1 мг/л). Предполагается, что такая особенность изученного изолята связана с наличием дополнительного гена, кодирующего цитохром P450-оксигеназы, которые катализируют введение кето-группы в положение С-8 и гидроксильной группы в положение С-7 трихотеченовой структуры.

Fusarium sambucinum Fuckel — распространенный почвенный сапрофит, являющийся для ряда растений фитопатогеном, нередко обнаруживается в составе фузариозных фитопатогенных комплексов, сопряженных с гнилью проростков и фузариозом колоса зерновых культур [1, 2]. Он известен, как один из основных возбудителей сухой гнили клубней картофеля. В инфицированной *F. sambucinum* сельскохозяйственной продукции могут накапливаться опасные для здоровья потребителей микотоксины.

В литературе отмечена способность изолятов *F. sambucinum* продуцировать трихотеченовые микотоксины типа А, в большинстве случаев неоксигенированный в С-7- и С-8-положениях 4,15-диацетоксисцирпенол (4,15-диацетокси-3 α -гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен; ДАС) [3], иногда Т-2-токсин, неосоланиол и др. (рис. 1), содержащие в положении С-8 замещенную или незамещенную гидроксигруппу [4]. Случаи обнаружения среди метаболитов *F. sambucinum* трихотеченов типа В (8-кетотрихотеченов) весьма редки [5, 6] (рис. 1).

При отборе лабораторной коллекции изолятов *F. sambucinum* на способность продуцировать трихотеченовые микотоксины нами был обнаружен изолят *F. sambucinum* var. *minus*, в культуре которого по предварительным данным присутствовали трихотечены типа В.

Цель работы — идентификация метаболитов, продуцируемых изолятом *F. sambucinum* var. *minus*.

МЕТОДИКА

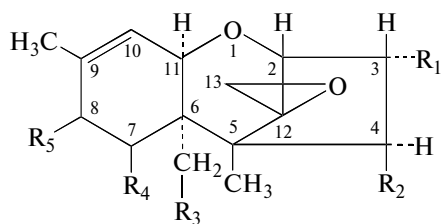
Изолят гриба был выделен Л.Л. Дорофеевой из листьев яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на

опытном поле ВНИИ фитопатологии (Раменка, Московской обл.) и идентифицирован как *Fusarium sambucinum* Fuckel 1869 var. *minus* [7]. Гриб хранили в лабораторной коллекции при 4°C в пробирках на косяках с агаром Чапека с добавкой (1% по массе) кукурузного экстракта и поддерживали путем ежегодного пересева.

Для опытов культуру гриба пересевали в пробирки на косяки с агаризованной средой Чапека и выращивали 7–10 сут в термостате при 26°C. Смывом с пробирок засевали в качалочные колбы (750 мл), содержащие 100 мл жидкой питательной среды состава (г/л): сахароза — 20, пептон — 3, КН₂РО₄ — 0.5, MgSO₄ — 0.2, и перемешивали на ротационной качалке при 220 об/мин в течение 1сут при 26°C.

Полученную культуру использовали в качестве посевной для инокуляции среды (колбы 750 мл) с питательной средой Миро (100 мл) состава (г/л): сахароза — 40, глицерин — 10, (NH₄)₂НРО₄ — 1, КН₂РО₄ — 3, MgSO₄ — 2, NaCl — 5. Изолят гриба культивировали при перемешивании на качалке при 220 об/мин в течение 7 сут при 26°C в темноте. По окончании инкубации биомассу гриба отфильтровывали и взвешивали после сушки до постоянного веса в термостате при 90°C.

Культуральный фильтрат (рН 2.5) из 4 качалочных колб объединяли и экстрагировали метаболиты гриба этилацетатом. Экстракт сушили над Na₂SO₄, этилацетат отгоняли в вакууме роторного испарителя при температуре бани не выше 65°C, остаток растворяли в 10 мл смеси ацетонитрил–вода (84 : 16) и с целью очистки пропускали через колонку с 0.2 г активированного угля ОУ-А, 0.2 г целита 545 (80–100 меш) и 1.2 г нейтрального Al₂O₃. Колонку промывали 10 мл той же смеси. Объединенный элюат



Вещество	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Тип А					
ДАС	ОН	OC(O)CH ₃	OC(O)CH ₃	Н	Н
Неосоланиол	ОН	OC(O)CH ₃	OC(O)CH ₃	Н	ОН
Т-2-токсин	ОН	OC(O)CH ₃	OC(O)CH ₃	Н	OC(O)CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Тип В					
НИВ	ОН	ОН	ОН	ОН	=O
4-АсНИВ	ОН	OC(O)CH ₃	ОН	ОН	=O
4,15-диАсНИВ	ОН	OC(O)CH ₃	OC(O)CH ₃	ОН	=O
ДОН	ОН	Н	ОН	ОН	=O
15-АсДОН	ОН	Н	OC(O)CH ₃	ОН	=O

Рис. 1. Структура трихотеценовых микотоксинов.

фильтровали через бумажный фильтр и отгоняли растворитель досуха.

Остаток растворяли в 0.5 мл метанола, и полученный раствор использовали для анализа на трихотеценовые микотоксины с применением методов ТСХ, ГЖХ и ВЭЖХ. В качестве стандартов использовали образцы 4-дезоксиниваленола (ДОН), 15-ацетилдезоксиниваленола (15-АсДОН), ниваленола (НИВ), 4-ацетилниваленола (4-АсНИВ, фузаренон-Х) и ДАС фирмы “Sigma” (США).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (“Kavalier”, Чехия) без флуоресцирующей добавки. Вещества проявляли путем опрыскивания хроматограмм 10%-ным раствором AlCl₃ в этаноле с последующим прогреванием при 95°C в течение 8 мин в термостате, или обработкой 10%-ным раствором H₂SO₄ в этаноле с 2-минутным нагреванием при 95°C. Хроматограммы просматривали в УФ-свете (254 и 365 нм).

Для ГЖХ использовали хроматограф Tracor 570 (США) с набивной колонкой (3% SE-30 на Gas-Chrom W-HP, 0.125–0.150 мм) и детектором акцептора электронов. Температуру колонки программировали: 170°C – 1 мин, далее повышали температуру со скоростью 10°C/мин до 220°C, при которой выдерживали 1 мин, затем повышали температуру со скоростью 20°C/мин до 260°C и выдерживали 2 мин. Анализируемый образец перед введением в хроматограф трансформировали гептафторбутирилимидазолом [8].

ВЭЖХ проводили на хроматографе системы Waters 1525 Breeze (США) с детектором Waters 2487, колонкой Waters Symmetry C18 (5 мкм; 4.6 × 150 мм) при 25°C. Подвижная фаза – ацетонитрил–вода (1 : 2.2 по

объему), скорость потока – 0.5 мл/мин, объем инъекционной иглы 5 мкл. Детектирование проводили при 224 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Трихотецены типа А, в отличие от трихотеценов типа В, не образуют комплексов с AlCl₃ и поэтому не проявляются на тонкослойных хроматограммах при обработке спиртовым раствором AlCl₃. Они обычно обнаруживаются опрыскиванием хроматограмм раствором H₂SO₄. При ТСХ исследуемого раствора в смеси: этилацетат–гексан–метанол (6 : 4 : 1) обработка хроматограмм H₂SO₄ не выявила наличия трихотеценов типа А. При проявлении AlCl₃ в УФ-свете (365 нм) обнаружены 3 голубых пятна. По хроматографической подвижности (R_f) в сравнении со стандартами одно пятно совпадало с НИВ (R_f 0.15), другое – с 4-АсНИВ (R_f 0.40), а третье, наиболее интенсивное, было примерно на уровне 15-АсДОН (R_f 0.55). ТСХ в смеси: этилацетат–гексан (3 : 1) позволила более четко установить неидентичность этого пятна (R_f 0.6) со стандартом 15-АсДОН (R_f 0.5).

Используя препаративный вариант ТСХ, вещества были выделены в хроматографически чистом виде. Анализ методами ГЖХ и ВЭЖХ показал совпадение двух веществ со стандартными образцами НИВ и 4-АсНИВ, что подтвердило результаты ТСХ. Поведение третьего вещества отличалось от использованного набора стандартов. Предположительно, это могло быть одно из диацетильных производных ДОН или НИВ.

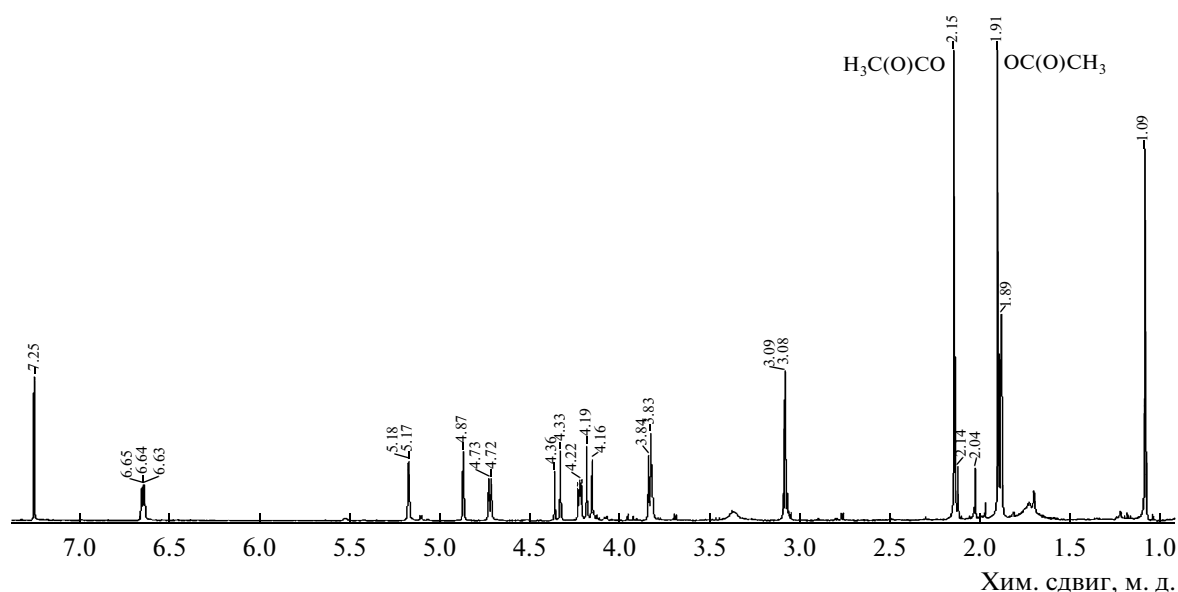


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр 4,15-диацетилниваленола. Цифрами у пиков указаны значения химических сдвигов.

Для получения дополнительной информации вещество гидролизовали в 0.05 н. растворе КОН в смеси метанол–вода (9 : 1) при комнатной температуре в течение 15 мин. Продукты гидролиза подвергали ТСХ в смеси хлороформ–метанол (5 : 1) и в смеси гексан–изопропанол–вода (10 : 10 : 1). Анализ хроматограмм показал, что продуктом гидролиза является НИВ. ГЖХ- и ВЭЖХ-анализ подтвердил наличие НИВ. Остался открытым вопрос о количестве ацетильных групп и месте их расположения в исходной молекуле.

Повторная ферментация позволила выделить и очистить с помощью ТСХ 13 мг твердого белого вещества, кристаллизующегося из метанола в виде длинных игл. Протонный ЯМР-спектр вещества в растворе CDCl_3 δ (м.д. относительно тетраметилсилана): 1.09 (3H, CH_3 -14), 1.89 (3H, CH_3 -16), 1.91 (3H, CH_3 -15 Ac), 2.16 (3H, CH_3 -4 Ac), 3.08 (2H, H-13), 3.4 (1H, 3-OH), 3.83 (1H, 7-OH), 3.84 (1H, H-2, $J = 4.9$ Гц), 4.18 и 4.36 (2H, H-15, $J = 12.2$ Гц), 4.23 (1H, H-3, $J = 4.9$ Гц, $J = 3.1$ Гц), 4.73 (1H, H-11, $J = 5.8$ Гц), 4.88 (1H, H-7), 5.18 (1H, H-4, $J = 3.1$ Гц), 6.65 (1H, H-10, $J = 5.8$ Гц) подтвердил предположение о наличии двух ацетильных групп в молекуле (рис. 2). При этом сигнал водорода при С-4 (H-4) более сдвинут в область слабого поля, чем сигнал H-3, что свидетельствовало о наличии ацетильной группы в положении при С-4 и ее отсутствие при С-3. Кроме того, полученный спектр оказался идентичен спектру 4,15-диацетильного производного ниваленола (**4,15-диАсНИВ**), приведенному в работе [9].

Таким образом было показано, что исследуемый изолят *F. sambucinum* var. *minus* продуцировал 4,15-диАсНИВ в качестве основного трихотеценового метаболита (9 мг/л или 2 мг/г сухой биомассы гри-

ба), с примесью 4-АсНИВ (3 мг/л) и НИВ (1 мг/л) в условиях глубинного культивирования на среде Миро.

По своей структуре 4,15-диАсНИВ отличается от ДАС – типичного метаболита *F. sambucinum* наличием кето-группы в положении С-8 и гидроксильной группы в положении С-7 (рис. 1). Оксигенирование указанных положений требует наличия специфических цитохром Р450-оксигеназ [10]. Можно предположить, что продуцент 4,15-диАсНИВ содержит дополнительный ген, кодирующий необходимые оксигеназы. Вероятно, этот ген будет иметь более высокую гомологию с геном *LH1* (*FgTri1*), выделенным из изолята *F. graminearum* – продуцента 15-АсДОН [10], чем с геном *FsTri1*, выделенным из изолята *F. sporotrichioides* – продуцента Т-2-токсина [11].

Следует отметить, что обнаруженный нами изолят *F. sambucinum* var. *minus* – один из немногих, описанных в литературе [9] изолятов грибов рода *Fusarium*, образующих 4,15-диАсНИВ в качестве доминанты, хотя в качестве минорного метаболита это вещество, вероятно, может присутствовать среди метаболитов ряда грибов-продуцентов НИВ [12].

Острая летальная токсичность для мышей (LD_{50} внутрибрюшинно) 4,15-диАсНИВ (от 1.21 до 9.6 мг/кг) и НИВ (7.4 мг/кг) выше, чем ДОН (70 мг/кг). Несмотря на то, что 4,15-диАсНИВ в урожае зерновых культур обнаруживают реже, чем ДОН или НИВ [13], необходимо оценивать вероятность присутствия этого метаболита в зерне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иващенко В.Г., Шупилова Н.П., Кирицели И.Ю. // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31. № 2. С. 64–69.
2. Иващенко В.Г., Шупилова Н.П., Нефедова Л.И., Гагкаева Т.Ю., Назаровская Л.А., Хлопунова Л.Б. // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31. № 2. С. 58–63.
3. Desjardins A.E., Plattner R.D. // J. Agric. Food Chem. 1989. V. 37. № 2. P. 388–392.
4. Altomare C., Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Evidente A. // Mycopathologia. 1995. V. 129. № 3. P. 177–181.
5. El-Banna A.A., Scott P.M., Lau P.-Y., Sakuma T., Platt H.W., Campbell V. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 47. № 5. P. 1169–1171.
6. Bosch U., Mirocha C.J., Abbas H.K., Menna M. // Mycopathologia. 1989. V. 108. № 2. P. 73–79.
7. Билай В.И. Фузариин. Киев: Наукова Думка, 1977. С. 190.
8. Scott P.M., Lau P.-Y., Kanhere S.S. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981. V. 64. № 6. P. 1364–1371.
9. Lauren D.R., Ashley A., Blackwell B.A., Greenhalgh R., Miller J.D., Neish G.A. // J. Agric. Food Chem. 1987. V. 35. № 6. P. 884–889.
10. McCormick S.P., Harris L.J., Alexander N.J., Ouellet T., Saparno A., Allard S., Desjardins A.E. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2044–2051.
11. Meek I.B., Peplow A.W., Ake C.Jr., Phillips T.D., Beremand M.N. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 7. P. 1607–1613.
12. Moss M.O., Thrane U. // Toxicol. Lett. 2004. V. 153. P. 23–28.
13. Kim J.-C., Kang H.-J., Lee D.-H., Lee Y.-W., Yoshizawa T. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3798–3802.

Production of 4,15-Diacetylnivalenol by *Fusarium Sambucinum* Fuckel var. *minus*

G. D. Sokolova^a and V. N. Voznesenskii^b

^a All-Russia Research Institute of Phytopathology, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Moscow region, Bolshie Vyazemy, 143050 Russia
e-mail: makeev@vniif.rosmail.com

^b Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

Received October 19, 2009

Abstract—*Fusarium sambucinum* Fuckel var. *minus* isolate produced unusual for *F. sambucinum* Fuckel trichothecene metabolite 4,15-diacetylnivalenol (9 mg/l) in conditions of deep cultivation on Myro medium. This compound was identified by TLC, GLC, HPLC, and ¹NMR spectroscopy. Other trichothecenes, 4-acetylnivalenol (3 mg/l) and nivalenol (1 mg/l), were also found in the culture. The observed feature of the studied isolate is assumed to be due to the presence of an additional gene, which encodes cytochrome P450 oxygenase responsible for the introduction of keto group at C8 and hydroxyl group at C7 of the trichothecene structure.