

**ЦИТОТОКСИЧНА І МУТАГЕННА ДІЯ
ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ *PHOMOPSIS HELIANTHI* M.**

Є. В. СИВОДЕД, провідний спеціаліст, фітопатолог,

Херсонська обласна фітосанітарна лабораторія

E-mail: evgeniyasyvoded@gmail.com

О. В. КОЛЕСНІЧЕНКО, доктор біологічних наук, професор, завідувач
кафедри ландшафтної архітектури та фітодизайну

Національний університет біоресурсів і природокористування України

А. Ф. ЛІХАНОВ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Інститут еволюційної екології НАН України

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2018.06.003>

Анотація. Метою дослідження було вивчення впливу вторинних метаболітів *Phomopsis helianthi* на ядерний апарат і процеси поділу рослинних клітин.

Наведено результати накопичення в живильному середовищі гриба *Phomopsis helianthi* продуктів вторинного метаболізму. Визначено, що динаміка вмісту фенолів у культуральній рідині і її загальна антиоксидантна активність має логнормальну залежність. Найбільшої концентрації фенольні сполуки досягають на 17 добу культивування (0,41 мг/мл). Показано, що антиоксидантна активність культуральної рідини тісно корелює

з вмістом у ній фенольних сполук ($r = 0,96$). Після твердофазної екстракції мало- і неполярні продукти синтезу гриба (v/v – 1/200) викликали підвищення мітотичної активності клітин тест-культури *Allium* сера. При збільшенні вдвічі концентрації екстракту (v/v – 1/100) в ядрах клітин тест-культури порушувався синтез ДНК, спостерігалось тотальне або часткове диспергування хроматину, утворювались мости, з'являлись пікнотичні ядра і мікроядра.

Ключові слова: *Phomopsis helianthi*, культуральна рідина, вторинні метаболіти, *Allium-test*, ядро, ДНК

Phomopsis helianthi (*Diaporthe helianthi*) Munt.-Cvet. et al. – причинний агент некрозу листків та стебла соняшнику (*Helianthus annuus* L.). Найбільш шкодочинне грибокве захворювання соняшнику в багатьох європейських країнах (Югославія, Угорщина, Румунія, Франція і

Австрія), в Аргентині та Бразилії. Однак, в Італії де кліматичні умови придатні для розвитку даної інфекції, хвороба практично відсутня, що пов'язано з генетичною мінливістю патогену. У зв'язку з цим пошук причин патогенної мінливості за допомогою різних методів є

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф. актуальною задачею. У зв'язку з цим передбачається вивчення цитотоксичної та мутагенної дії вторинних метаболітів *Phomopsis helianthi*.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Важливу роль у перебігу процесів патогенезу між рослиною і грибами відіграють мікотоксини [4]. Відомо, що ці низькомолекулярні сполуки мають фітотоксичну дію, прояв якої спостерігається на рівні клітин, тканин і всього організму [12]. Їх шкодо чинна дія підтверджена експериментально при випробуванні фітотоксичних метаболітів, що були виділені з культуральних фільтратів багатьох видів фітопатогенних грибів [11]. Враховуючи, що певні хвороби можуть викликати 70-100 % загибель цінних одно- і багаторічних сільськогосподарських рослин, ідентифікація та вивчення фітотоксичної дії цих вторинних метаболітів є важливою науковою проблемою. Так, *Phomopsis azadirachtae* викликає істотне зниження продуктивності рослин *Azadirachta indica*, повну втрату схожості насіння та некроз калюсних тканин [4]. Існують повідомлення [5, 10, 14] свідчать про виділення, ідентифікацію та аналіз фітотоксичної дії окремих метаболітів різних видів *Phomopsis* spp., але з культурою *Phomopsis helianthi* М. такі дослідження не проводились.

Мета дослідження. Виділення, ідентифікація та аналіз фітотоксичної дії вторинних метаболітів *Phomopsis helianthi* М.

Матеріали і методи дослідження. З метою ізоляції гриба *Phomopsis helianthi* у чисту культуру відбирали стебла соняшнику гібриду із симптомами фомопсису, нарізали їх на фрагменти 5–10 мм, стерилізували в 96° спирті та розміщували в чашки Петрі на поверхню картопляно-глюкозного середовища. Надалі підготовлений матеріал інкубували в термостаті протягом двох тижнів. Виділену чисту культуру гриба вирощували на рідкому картопляно-глюкозному середовищі за температури 25 °С. З метою проведення подальших досліджень відбирали фільтрат *Phomopsis helianthi* на 7, 14, 17 і 21 добу культивування.

Сумарне визначення фенольних сполук провадили за допомогою методу Фоліна-Чікольтеу [15]. 100 мкл культуральної рідини розводили в 450 мкл метанолу, а потім додавали 2,5 мл реагенту Фолін-Чікольтеу та 2,0 мл 7 % карбонату натрію. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом двох годин. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при 765 нм [2].

Концентрація фенольних антиоксидантів у екстрактах визначали спектрофотометрично за Бренд-Вільямсом з використанням вільного стабільного радикалу 2,2-

Сиводед С. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф. дифеніл-1-пікрілгідразила (ДФПГ). Для побудови калібрувального графіка у якості стандарта використовували водорозчинний вітамін Е (Тролокс). Для вихідного розчину 6 мг вітаміну Е ($M_{\text{Тролокс}} = 250,29$) розчиняли у 2,4 мл 80 % етанолу. Реакційна суміш містила 0,25 мл рослинного екстракту, 1,75 мл 80 % етанолу, 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ ($M_{\text{ДФПГ}} = 394,33$). У контрольні зразки до 2 мл 0,2 мМ розчину ДФПГ додавали 2 мл 80 % етанолу. Реакція розпочиналася після додавання розчину ДФПГ. Пробірки інтенсивно струшували і залишали на 30 хв у темряві при кімнатній температурі. Оптичну густину реакційної суміші визначали за довжиною хвилі 517 нм. Інгибування ДФПГ ($I_{\text{ДФПГ}}$) у відсотках розраховували за формулою:

$$I_{\text{ДФПГ}} = 100 (D_k - D_o) / D_k, \text{ де:}$$

D_k – оптична густина у відсутності антиоксидантів (контроль);

D_o – оптична густина за присутності антиоксидантів (для калібрувальної кривої – Trolox у відомих концентраціях).

Антиоксидантну активність рослинних екстрактів виражали в мМ-екв Trolox [7].

Біологічну активність визначали за їх впливом на поділ клітин в апікальних меристемах тест-рослини *Allium cepa* L. сорт «Штутгарт» (*Allium-test*). Гістохімічне виявлення ДНК в клітинах проводили

реактивом Шифа (Merck) за Фьольгеним після мацерації тканин і холодного гідролізу [3]. Морфометрію ядерного апарату, кількість аномалій в його будові та в процесі поділу клітин виконували на мікроскопі Nikon Eclipse E-200.

Фотодокументацію і обробку цифрових зображень виконували в спеціалізованій програмі Image-Pro Premier 9.0. Регресійний аналіз і підбір математичних моделей проводили за допомогою програми SigmaPlot 12.0. Статистичну обробку даних у програмі Statistica 7.0.

Результати дослідження та їх обговорення. *Phomopsis helianthi* в стерильному живильному середовищі (ЖС) накопичується міцелярна біомаса, продукти ферментації і різноманітні екзометаболіти. Зазвичай на перших етапах росту культури в ЖС з'являються продукти його ферментації, вільні амінокислоти, пептиди і білки. У подальшому в живильному середовищі поступово накопичуються продукти вторинного метаболізму гриба. Їх роль у життєдіяльності гриба полягає в забезпеченні потенціальної конкуренції за необхідні харчові ресурси, яка важлива в природних умовах. Водночас, для деяких екзометаболітів характерна фітотоксичність. Динаміка накопичення вторинних метаболітів грибів в умовах їхнього культивування на штучних ЖС

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

залежить від багатьох чинників: активності ферментних систем гриба, складу ЖС, температури, показників рН, режиму оксигенації, тривалості культивування, тощо. За умов оптимальних базових умов головною є тривалість культивування.

Для переважної більшості аскоміцетів накопичення продуктів вторинного метаболізму, у тому числі мікотоксинів, посилюється на другий тиждень культивування. У нашому експерименті найбільша концентрація ароматичних сполук у культуральній рідині була виявлена на 17 добу. Динаміка їх накопичення має логнормальну залежність. Математична модель описується рівнянням (1) з точністю апроксимації $R^2 = 1,00$. Це дозволяє

розглядати можливість її використання в науково-практичних цілях.

$$y = \frac{a}{x} \exp \left[-0,5 \cdot \left(\frac{\ln(x/x_0)}{b} \right)^2 \right] \quad (1)$$

Згідно даної моделі (рис. 1, а) накопичення фенольних сполук у культуральній рідині прискорюється на 8-9 добу і досягає максимуму на 15-17 добу. При більш тривалому культивуванні міцелію кількість фенольних сполук починає поступово зменшуватись. Причина даного явища, можливо, пов'язана з окиснюванням фенолів, їхньою автополімеризацією і трансформацією ароматичних сполук власними ферментними системами.

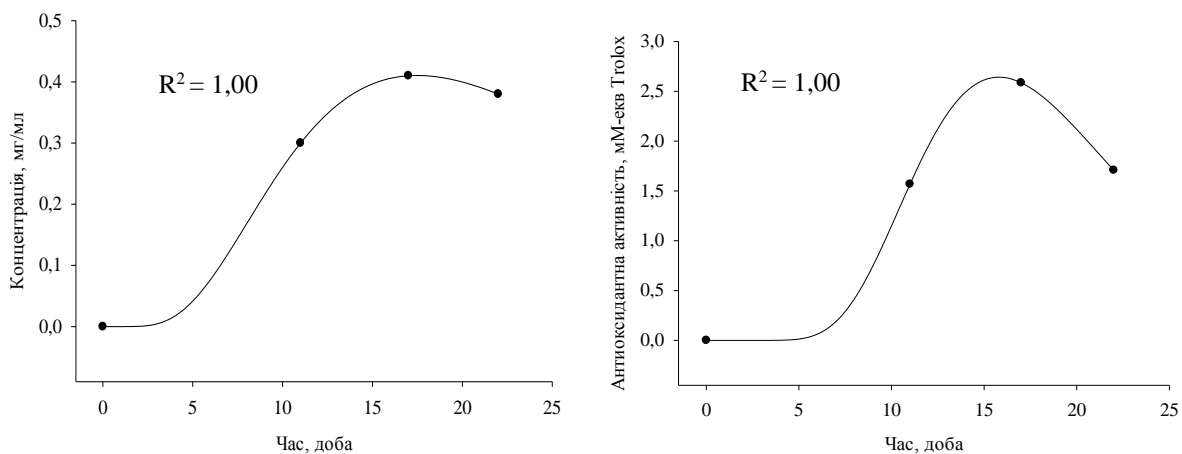


Рис. 1. Динаміка накопичення фенольних сполук (а) і антиоксидантної активності (б) метаболітів у культуральній рідині *Phomopsis helianthi*

Слід також враховувати, що деякі фенольні сполуки грибів володіють вираженими антиоксидантними властивостями.

Визначення антиоксидантної також описується логнормальною функцією, хоча коефіцієнти у рівнянні активності (АОА)

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

культуральної рідини показало, що даний показник тісно корелює з вмістом фенольних сполук ($r = 0,96$).

Динаміка процесу відповідно вирізняються (табл. 1).

1. Коефіцієнти логнормальної моделі динаміки накопичення фенольних сполук (ФС) і антиоксидантної активності (АОА) в культуральній рідині *Phomopsis helianthi*.

Коефіцієнт	ФС	АОА
a	8,5161	44,4453
b	0,5851	0,3545
x_0	24,6208	17,9149
R^2	1,00	1,00

Втім, показник АОА культуральної рідини підвищувався повільніше. За експериментальними даними АОА досягала максимуму на 17 добу, а згідно отриманої математичної моделі – на 15 добу (рис. 1, б). Швидкість зниження антиоксидантного потенціалу метаболітів на останніх етапах культивування гриба була більш вираженою, аніж загальної концентрації фенольних сполук. Даний факт свідчить про збільшення у КР окиснених продуктів, що пов'язано зі зменшенням метаболічної активності гриба, яка зазвичай виникає внаслідок виснаження живильного середовища.

Потенційно найвищої біологічної активності КР набуває на 14-17 добу культивування. Враховуючі, що *Phomopsis helianthi* є фітопатогеном, важливо

з'ясувати, яким чином продукти його вторинного синтезу впливають на ядерний апарат рослинних клітин і зокрема на процеси їхнього поділу.

Для з'ясування цитотоксичних і мутагенних властивостей вторинних метаболітів гриба був використаний метод твердофазної екстракції. Пропускання культуральної рідини через картридж з сорбентом С18 (Chromabond С18, 200 mg) дозволило збільшити концентрацію фенольних сполук у 2,5 рази. При пророщуванні цибулин *Allium cepa* у воді з додаванням збагаченого фенолами метанольного екстракту (v/v – 1/100) в клітинах апікальних меристем коренів спостерігалось збільшення діаметру ядер ($14,7 \pm 0,39$) порівняно з контрольними ($12,7 \pm 0,45$) рослинами на 16 % (рис. 2, а).

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

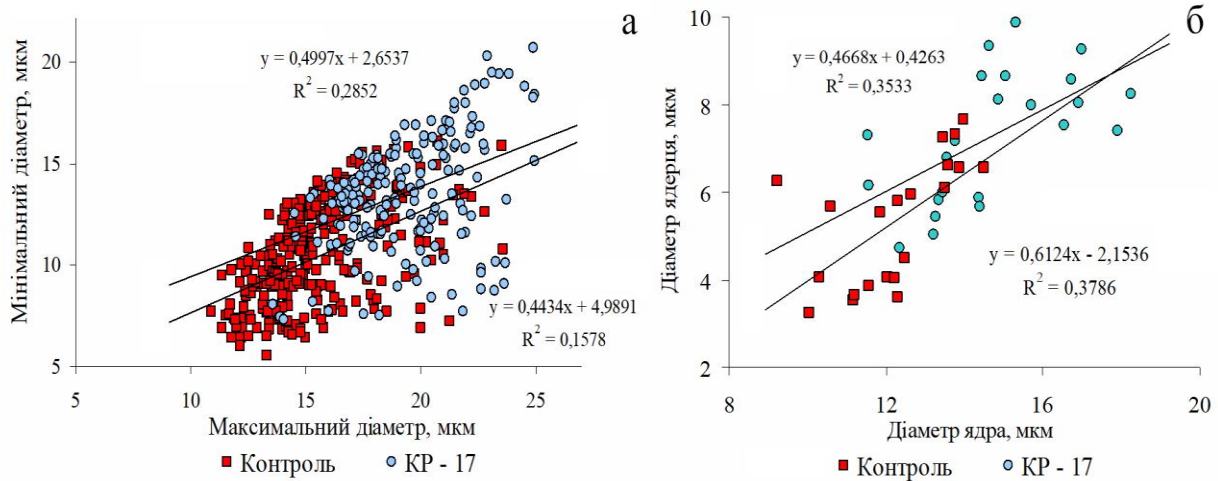


Рис. 2. Вплив культуральної рідини *Phomopsis helianthi* (17 доба) на метричні показники ядер у клітинах апікальної меристеми кореня *Allium cepa* (*Allium-test*)

При цьому діаметр ядерець збільшувався на 32 %. Індекс співвідношення діаметра ядер до діаметра ядерець зменшувався з 2,41 в контролі до 2,07 (рис. 2, б).

У разі обробки корінців *Allium cepa* значно розведеним отриманим екстрактом (1/200) у меристемі підвищувалась мітотична активність клітин (рис. 3, г).

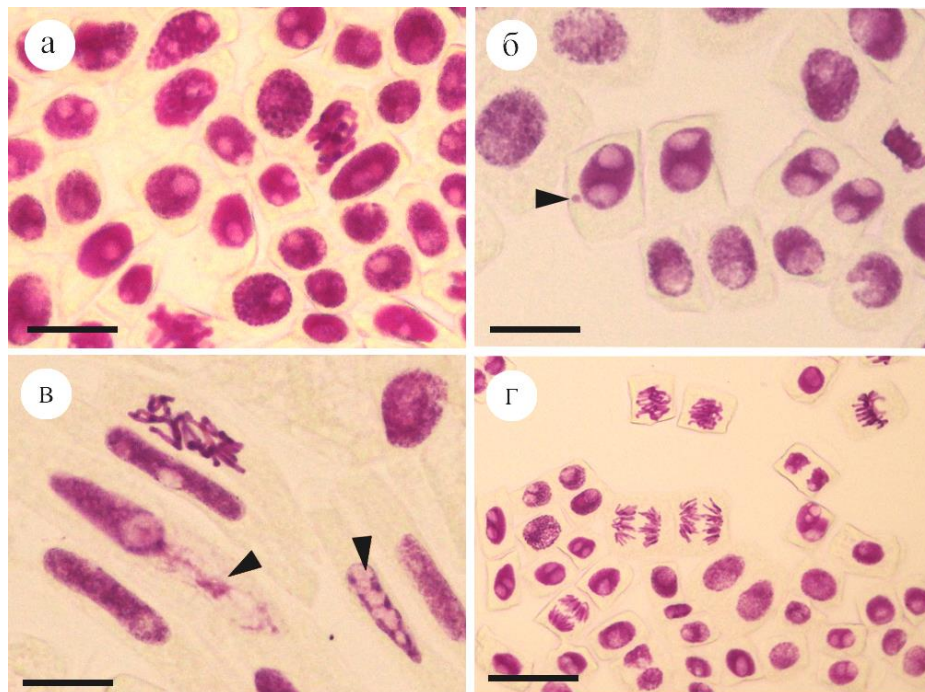


Рис. 3. Стан ядерного апарату в клітинах апікальної меристеми кореня *Allium cepa* за розподілом ДНК (реакція Фольгена): а – контроль, утворення мікроядер (позначено стрілкою) (б) і підвищення мітотичної активності клітин (г) під впливом вторинних метаболітів культуральної рідини *Phomopsis helianthi* (11 діб) після ТФ екстракції (v/v – 1/200) та

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

деградація ДНК в ядрах (в) при підвищенні їхньої концентрації (v/v – 1/100); лінійка а-в – 20 мкм, г – 40 мкм; (*Allium-test*)

Цікавим також було прискорене утворення ядерця вже на початку телофази. Реконструкція ядерця в дочірніх ядрах може свідчити про активну деспіралізацію хромосом, наявність матеріалів попередніх ядерця та/або активного синтезу в дочірніх клітинах рибонуклеопротейдів. На це вказує і абсолютне збільшення розмірів ядерця в клітинах після обробки.

Прискорення процесів поділу клітин свідчить про високу біологічну активність екзаметаболітів *P. helianthi* і їхню здатність проникати у рослинні клітини, долаючи тканинні бар'єри. Втім, їхня стимулююча дія спостерігалася за умов доволі низьких концентрацій. Так, вміст фенольних сполук, як

потенційних агентів впливу, у розчині для пророщування коренів цибулі складала – 1,5 мкг/мл.

За умов збільшення концентрації активних сполук удвічі (1/100) картина їх дії змінювалась. Під впливом екзаметаболітів гриба в ядрах клітин порушувався розподіл ДНК, спостерігалось тотальне або часткове диспергування хроматинового матеріалу (рис. 3, в). В анафазах спостерігалось утворення мостів. Утворювались пікнотичні ядра і мікроядра (рис. 3, б). Останні утворюються з хромосом, або їх

фрагментів внаслідок унеможливлення їхнього розходження до полюсів дочірніх ядер. Як відомо, відставання хромосом часто трапляються внаслідок порушення або зниження функціональної активності кінетохору [1]. Подібні аномалії викликаються мітотичними ядрами, які також призводять до К-мітозів. За нашими спостереженнями екстракт КР з вмістом фенольних сполук 3,0 мкг/мл порушував у окремих клітин формування типової екваторіальної пластинки у окремих клітин, внаслідок чого хромосоми хаотично розсіювались по цитоплазмі. За типом дії даний тип впливу на клітини за типом дії схожий на статмокінетичні отрути, які у токсичних дозах ушкоджують ядерця, плазмалему, комплекс Гольджі і мітохондрії [16].

Враховуючи виникнення аномалій такого типу, а також наявність порушень мітозів з утворенням мікроядер можна стверджувати про наявність у КР *Phomopsis helianthi* мікотоксинів з високою біологічною активністю. Висока цитотоксичність відома також для інших видів *Phomopsis*. Так, культуральні фільтрати *P. Azadirachtae* містять низькополярні сполуки які гальмують проростання насіння, поділ клітин і пригнічують

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

наростання калюсних тканин у модельних культур [10].

Одним з потенційних продуктів фенольного синтезу гриба з фітотоксичними властивостями може бути фомозин ($C_{13}H_{16}O_7 \times H_2O$). За даними Мазарс С. з колегами фомозин (конц. 5 пг) за 24 год викликав побуріння листків соняшника. Втім токсин був малоактивним по відношенню до листків дині, соєвих бобів, кукурудзи, гороху і тютюну, що свідчить про видоспецифічність його дії [13].

Фітотоксичні властивості з характерними симптомами ураження соняшника виявляють також транс- та цис-4,6-дигідроксимелеїни. Дані продукти вторинного метаболізму мають певну структурну подібність з фомозином. Усі вони мають дигідроксиароматичні групи і можуть розглядатися, як похідні орселінової кислоти (2,4-дигідрокси-6-метилбензойна кислота) [5]. Проте істотні відмінності пов'язані з наявністю 6-членного циклічного лактону, які наявні в цих сполуках замість лінійного бічного ланцюга, що є у фомозина. Ці фенольні сполуки викликають розвинення типових бурих некротичних уражень листків у місті проколу [5]. Показано, що мінімальна ефективна доза для транс- та цис-4,6-дигідроксимеллеїну складає 76 і 135 мг відповідно. Вважається, що ці речовини здатні інгібувати цикл Кальвіна або

пов'язані з ним фізіологічні процеси [6]. Мелеїн, або охрацин також уповільнює клітинний цикл через подовження мітозу [9] і має прямий вплив на фотосинтез через пригнічення поглинання CO_2 продихами [7].

Висновки і перспективи. Експериментально підтверджена цитотоксична і мутагенна дії фенольних сполук *P. helianthi*, що мають виражену токсичність по відношенню до процесів мітохондріального дихання і поділу клітин. Найбільша концентрація фенолів встановлена на 17 добу культивування гриба (0,41 мг/мл).

При більш тривалому культивуванні міцелію кількість фенольних сполук починає поступово зменшуватись. Причина даного явища, можливо, пов'язана з окиснюванням фенолів, їхньою автополімеризацією і трансформацією ароматичних сполук власними ферментними системами.

Встановлено, що антиоксидантна активність тісно корелює з вмістом фенольних сполук ($r = 0,96$).

Продукти синтезу гриба після твердофазної екстракції в розведенні 1/100 викликали збільшення діаметру ядер ($14,7 \pm 0,39$) в клітинах апікальних меристем коренів тестової рослини *Allium cepa* у порівнянні з контролем на 16,0 %, а діаметр ядерець збільшувався на 32 %. У разі обробки корінців *Allium*

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

sera екстрактом у концентрації 1:200 мітотична активність клітин меристеми підвищувалась. За такої концентрації фенольних сполук (3 мкг/мл) в ядрах клітин тест-культури порушувався синтез ДНК, спостерігалось тотальне або часткове диспергування хроматину, з'являлись пікнотичні ядра і мікроядра. Встановлено, що

Список використаних джерел

1. Алов И. А. Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с.

2. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений / Г. В. Сибгатуллина, Л. Р. Хаертдинова, Е. А. Гуменова и др. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.

3. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.

4. Amusa N. A. Microbially produced phytotoxins and plant disease management Afr. J. Biotech. 2006. 5(5). P. 405-414.

5. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Phomopsis helianthi* / Avantaggiato G., Solfrizzo M., Tosi L. [et al.] // Nat. Toxins. 1999. V. 7. P. 119–127.

6. Re'examen des modalite's d'action de l'ochracine sur la conductance stomatique des feuilles de plantule de ble', *Triticum aestivum* L., cv 'Etoile de Choisy' / Bethenod O., Bousquet J. F., Laffray D., Louguet P. // Agronomie. 1982. V. 2. P. 99–102.

7. Action de'pressive de l'ochracine, phytotoxine synthe'tise'e

антиоксидантна активність тісно корелює з вмістом фенольних сполук ($r = 0,96$).

З'ясування механізмів стимулювання мітозів і прискорення процесів реконструкції ядерця продуктами вторинного синтезу *P. helianthi* у низьких концентраціях заслуговує на особливу увагу та потребує подальших досліджень.

par le *Septoria nodorum* Berk., sur l'assimilation du CO₂ par des plantules de Ble' / Bousquet J. F., Skajennikoff M., Bethenod O., Chartier P. // Ann Phytopathol. 1977. V. 9. P. 503–510.

8. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – Food Science And Technology. 1995. 28(1). P. 25–30. [http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)

9. Essad S. -F. Bousquet, C. Maunoury Action de l'ochracine, phytotoxine de *Septoria nodorum* Berk., sur le cycle mitotique de *Triticum aestivum* L. Agronomie, EDP Sciences. 1981. V. 1 (8). P. 689–694.

10. Girish K., Shankara B. S., A. Raveesha K. Crude toxin extract from culture filtrate of *Phomopsis azadirachtae* infecting neem and its phytotoxicity // International / K. Girish, // Journal of Integrative Biology 2009. – V. 6. – N. 2. – P. 79–84.

11. Phytotoxic compounds in culture filtrates of *Pyrenophora graminea* / Haegi A., Aragona M., Vannacci G. et al. // Petria. 1994. 4. P. 181–192.

12. Lynch J. M. Effects of microbial colonization of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots on seedling

Сиводед С. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

growth. / J. M. Lynch, S. J. Clark // J. Appl. Microbiol. 1984. 56(1). P. 47–52.

13. Phomozin, a phytotoxin from *phomopsis helianthi*, the causal agent of stem canker of sunflower / Mazars C., Rossignol M., Auriol P., Klæbe A. // Phytochemistry, 1990. V. 29. N. 11. P. 3441–3444.

14. Screening for resistance to *Diaporthe toxica* in lupins by estimation of phomopsins and glucoseamine in individual plants / Shankar M., Cowling W. A., Sweetingham M. W., et al. // Plant Pathol. 1999. 48(3). P. 320–324.

15. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent / V. L. Singleton, J. A. Rossi // Am. J. Enol. Vitic. 1965. V. 16. P. 144–158.

16. Walne L. The effects of colchicine on cellular organization in chlamydomonas. II. Ultrastructure / L. Walne // American Journal of Botany. 1967. V. 54. N. 5. P. 564–577.

References

1. Alov I. A. (1972) Tsitofiziologiya i patologiya mitozu [Cytophysiology and pathology of mitosis], Moscow, Russia, Medicine, 264.

2. Sibgatullina G. V., Khayertdinova L. R., Gumerova Ye. A., Akulov A. N., Kostyukova YU. A., Nikonorova N. A., Rummyantseva N. I. (2011) Metody opredeleniya redoks-statusa kul'tiviruyemykh kletok rasteniy [Methods for determining the redox status of cultured plant cells] Kazan', Russia, Kazan (Volga Region) Federal University, 61.

3. Pausheva Z. P. (1988) Praktikum po tsitologii rasteniy. 4-ye izd., pererab. i dop. [Workshop on plant cytology], Moscow, Russia, 271.

4. Amusa N.A. (2006) Microbially produced phytotoxins and plant disease management. Afr. J. Biotech., 5(5), 405-414.

5. Avantaggiato G., Solfrizzo M., Tosi L., Zizzerini A., Fanizzi F. P., Visconti A. (1999) Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Phomopsis helianthi*, Nat. Toxins, 7, 119–127.

6. Bethenod O., Bousquet J. F., Laffray D., Louguet P. (1982). Re'examen des modalite's d'action de l'ochracine sur la conductance stomatique des feuilles de plantule de ble', *Triticum aestivum* L., cv 'Etoile de Choisy' [Review of ochracine's modalities of action on stomatal conductance of wheat plantlet leaves *Triticum aestivum* L., cv 'Etoile de Choisy'], Agronomie, 2, 99–102.

7. Bousquet J. F., Skajennikoff M., Bethenod O., Chartier P. (1977) Action de'pressive de l'ochracine, phytotoxine synthe'tise'e par le *Septoria nodorum* Berk., sur l'assimilation du CO₂ par des plantules de Ble' [Depressive action of ochracine, phytotoxin synthesized by *Septoria nodorum* Berk., on the assimilation of CO₂ by plantlets of Ble']. Ann Phytopathol., 9, 503–510.

8. Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – Food Science And Technology, 28 (1), 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)

9. Essad S., Bousquet J.-F., Maunoury C. (1981) Action de l'ochracine, phytotoxine de *Septoria nodorum* Berk., sur le cycle mitotique de *Triticum aestivum* L., Agronomie, EDP Sciences, 1 (8), 689–694.

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

10. Girish K., Shankara B. S., Raveesha K. A. (2009) Crude toxin extract from culture filtrate of *Phomopsis azadirachtae* infecting neem and its phytotoxicity, International Journal of Integrative Biology, 6, 2, 79–84.

11. Haegi A., Aragona M., Vannacci G., Delogu G., Porta-Puglia A. (1994) Phytotoxic compounds in culture filtrates of *Pyrenophora graminea*. Petria 4: 181–192.

12. Lynch J.M., Clark S.J. (1984) Effects of microbial colonization of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots on seedling growth, J. Appl. Microbiol., 56(1), 47–52.

13. Mazars C., Rossignol M., Auriol P., Klæbe A. (1990) Phomozin, a phytotoxin from *phomopsis helianthi*,

the causal agent of stem canker of sunflower, Phytochemistry, 29, 11, 3441–3444.

14. Shankar M, Cowling W A, Sweetingham M W, Than K A, Edgar J. A, Michalewicz A. (1999) Screening for resistance to *Diaporthe toxica* in lupins by estimation of phomopsins and glucoseamine in individual plants. Plant Pathol., 48(3), 320–324.

15. Singleton V. L., Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent, Am. J. Enol. Vitic., 16, 144–158.

16. Walne L. (1967) The effects of colchicine on cellular organization in chlamydomonas, II. Ultrastructure, American Journal of Botany, 54, 5, 564–577.

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *PHOMOPSIS HELIANTHI* M.

Є. В. Сиводед, Є. В. Колесніченко, А. Ф. Ліханов,

Аннотация.

Целью исследования было изучение влияния вторичных метаболитов *Phomopsis helianthi* на ядерный аппарат и процессы разделения растительных клеток.

Приведены результаты накопления в питательной среде гриба *Phomopsis helianthi* продуктов вторичного метаболизма. Определено, что динамика содержания фенолов в культуральной жидкости и ее общая антиоксидантная активность имеет логнормального зависимость. Наибольшей концентрации фенольные соединения достигают на

17 сутки культивирования (0,41 мг / мл). Показано, что антиоксидантная активность культуральной жидкости тесно коррелирует с содержанием в ней фенольных соединений ($r = 0,96$). После твердофазной экстракции мало и неполярные продукты синтеза гриба ($v / v - 1/200$) вызвали повышение митотической активности клеток тест-культуры *Allium* сера. При увеличении вдвое концентрации экстракта ($v / v - 1/100$) в ядрах клеток тест-культуры нарушался синтез ДНК, наблюдалось полное или частичное диспергирования хроматина, образовывались мосты, появлялись пикнотичными ядра и микроядра.

Ключевые слова: *Phomopsis helianthi*, культуральная жидкость, вторичные метаболиты, *Allium-test*, ядро, ДНК

Сиводед Є. В., Колесніченко О. В., Ліханов А. Ф.

**CITOTOXIC AND MUTAGEN
ACTION OF SECONDARY
METABOLITES *PHOMOPSIS
HELIANTHI* M.**

**Ye. V. Syvoded, O. V. Kolesnichenko,
A. F. Likhanov**

Abstract. The purpose of study was studying effects of secondary metabolites *Phomopsis helianthi* on nuclear apparatus and plant cells division processes.

The *Phomopsis helianthi* fungi accumulation results in nutrient agar of secondary metabolism are presented. It is determined that dynamics of phenol content in the culture liquid and its total antioxidant activity has lognormal dependence. The highest concentration of phenolic compounds is reached on

*the 17th day of cultivation (0.41 mg / ml). It was shown that the antioxidant activity of culture fluid is closely correlated with content of phenolic compounds ($r = 0.96$). After solid-phase extraction, small and nonpolar fungal synthesis products ($v / v - 1/200$) caused increased mitotic activity of *Allium cepa* test cultures. When extract concentration is doubled ($v / v - 1/100$) in test culture nuclear cells, DNA synthesis was violated, total or partial chromatin dispersion was observed, bridges were formed and picnotial nuclei and micronuclei appeared.*

Keywords: *Phomopsis helianthi*, culture fluid, secondary metabolites, *Allium-test*, nucleus, DNA