

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 633.1:632.4

МИКРОМИЦЕТЫ *ALTERNARIA* SPP. И *BIPOLARIS SOROKINIANA* И МИКОТОКСИНЫ В ЗЕРНЕ, ВЫРАЩЕННОМ В УРАЛЬСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

© 2020 г. А. С. Орина^{1,*}, О. П. Гаврилова^{1,**}, Т. Ю. Гагкаева^{1,***}, Ф. Б. Ганнибал^{1,****}

¹ Всероссийский НИИ защиты растений, 196608 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: orina-alex@yandex.ru

**e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

***e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

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

Поступила в редакцию 06.03.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

Грибы родов *Alternaria* и *Bipolaris* широко представлены в зерне пшеницы, ячменя и овса, выращенных в Уральском Федеральном округе. Впервые с помощью количественной ПЦР подтверждена высокая повсеместная встречаемость грибов рода *Alternaria*, относящихся к двум секциям *Alternaria* и *Infectoriae*. Зараженность этими грибами оказывала положительное влияние на всхожесть зерна. Высокая инфицированность всех образцов грибами *Alternaria* (зараженность в среднем 74%, содержание ДНК секции *Alternaria* 1999×10^{-4} пг/нг, содержание ДНК секции *Infectoriae* 723×10^{-4} пг/нг) проявилась в загрязнении зерна микотоксинами, из которых тентоксин и тенуазоновая кислота встречались чаще по сравнению с альтернариолом и его метиловым эфиром. В 12.5% образцов были выявлены совместно все четыре изученных микотоксина грибов рода *Alternaria*. Достоверная связь выявлена между зараженностью зерна видами *Alternaria* секции *Infectoriae* и количеством тентоксина. Зараженность грибом *Bipolaris sorokiniana* была значительно ниже, чем грибами рода *Alternaria*, представители этого вида выявлены в 58.9% образцов, в среднем зараженность составила 6.2%. Выявлена более высокая зараженность и содержание биомассы гриба *B. sorokiniana* в зерне ячменя (8.9% и 109×10^{-4} пг/нг, соответственно) по сравнению с зерном пшеницы и овса.

Ключевые слова: всхожесть, грибы, зерновые культуры, количественная ПЦР, Урал

DOI: 10.31857/S0026364820050086

ВВЕДЕНИЕ

В зерне сельскохозяйственных культур встречаются представители микромицетов, относящиеся к различным таксономическим группам, которые успешно выживают и сосуществуют в разнообразных экологических условиях. Среди них грибы семейства *Pleosporaceae* – *Alternaria* Nees и *Bipolaris* Shoemaker – являются наиболее обильными представителями микобиоты зерна.

Уральский Федеральный округ (ФО), включающий Курганскую, Челябинскую, Свердловскую и Тюменскую области, входит в лидеры субъектов РФ по площади посевов зерновых культур (FSSS, 2019). Площади под пшеницей занимают более 2.4 млн га, ячменем – более 700 тыс. га, овсом – около 300 тыс. га. Повышение объемов урожая зерна, наблюдаемое в последние годы, должно сопровождаться улучшением его качества, важнейшими характеристиками которого являются микотоксикологические показатели безопасности.

Ранее проведенный анализ зараженности грибами 42 образцов зерна яровой пшеницы и 59 образцов ячменя, выращенных в Западной Сибири и Восточном Зауралье в 2006–2012 гг., выявил, что только 20–30% образцов были заражены грибами рода *Alternaria*, из которых доминирующим видом являлся *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire (Togorova et al., 2015). В Курганской обл. общая зараженность зерна грибами в среднем за 9 лет составила 56.3%; наибольшую долю от всех выделенных микромицетов занимали грибы рода *Alternaria* со средней зараженностью 30.8% (Nemchenko et al., 2014). Зараженность грибами семян зерновых, полученных из шести районов Курганской обл. и трех районов Тюменской обл., предназначенных для посева в 2018 г., составляла 100%, из которых 50.2% составляли грибы рода *Alternaria* (Karakotov et al., 2019). Виды *Alternaria* сложно идентифицировать, поскольку между некоторыми из них нет четких границ по морфологическим признакам (Gannibal, 2004, 2018).

Частота выявления представителей рода *Bipolaris* в зерне обычно значительно ниже, чем грибов рода *Alternaria* (Nemchenko et al., 2014; Toropova et al., 2015; Karakotov et al., 2019). Таксономия и номенклатура грибов рода *Bipolaris* сложны и в последние годы претерпели многочисленные изменения и уточнения: показаны значительные межвидовые и внутривидовые различия этих грибов (Manamgoda et al., 2012). Гриб *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker является наиболее известным патогеном зерновых, однако род *Bipolaris* включает еще около 47 видов (Ellis, 1971; Zhong, Steffenson, 2001; Manamgoda et al., 2014).

При микологическом анализе растительного материала грибы родов *Alternaria* и *Bipolaris* хорошо заметны, поскольку образуют быстро растущие колонии с темноокрашенным воздушным мицелием и характерное конидиальное спороношение. Однако видовой идентификации этих групп грибов, разнообразие которых довольно велико, в нашей стране уделяется недостаточное внимание. В последние годы для мониторинга зараженности зерна микромицетами стали активно применять молекулярные методы, основанные на выявлении ДНК грибов (Gagkaeva et al., 2017; Oriina et al., 2017, 2018; Karakotov et al., 2019). Они позволяют определить таксономическое разнообразие грибов, зачастую морфологически сходных. Еще одним преимуществом этих методов, в отличие от подсчета процента зараженных зерен, является количественное выявление биомассы грибов через содержание ДНК грибов, что позволяет по одному этому показателю судить не только об инфицированности зерна, но и о возможном загрязнении его микотоксинами (Gagkaeva et al., 2017).

Грибы, обитающие в зерне, могут продуцировать вторичные метаболиты, определяющие их взаимоотношения с растением и с окружающими микроорганизмами. Известно, что грибы родов *Alternaria* и *Bipolaris* продуцируют хозяин-специфичные токсины, которые вызывают гибель растительных клеток, подавляют защитные реакции растения и рассматриваются как факторы патогенности (Kang, Dobinson, 2004; Meena, Samal, 2019). Хорошо известен сесквитерпеновый метаболит прегельминтоспораль и многие другие вторичные метаболиты, образуемые *B. sorokiniana*, и способствующие колонизации растения (Shotwell, Ellis, 1976; Apoga et al., 2002; Phan et al., 2019). Для темноокрашенных микромицетов характерен активный синтез меланинов — пигментов, накапливаемых в клеточных стенках. Известными функциями меланинов являются повышение адаптивности организмов к условиям существования, облегчающее проникновение патогена в ткани растения и подавление ответной реакции хозяина (Belozerskaya et al., 2017). Кроме того, грибы могут продуцировать хозяин-неспецифические фитотоксины, например, грибы рода *Alternaria* проду-

цируют тенуазоновую кислоту (ТК) (Loggiero et al., 2009; Kang et al., 2017), а также тентоксин (ТЕН), который является циклическим тетрапептидом и ингибирует развитие хлоропластов, вызывая хлорозы (Hallowell et al., 1970).

Многие вторичные метаболиты грибов рода *Alternaria* могут оказывать негативное действие на организм человека или животного, то есть характеризоваться как микотоксины (Lou et al., 2013; Tralamazza et al., 2018). К наиболее распространенным в зерне альтернариотоксинам относят альтернариол (АОЛ), его монометиловый эфир (АМЭ), ТЕН и ТК (Fraeyman et al., 2017). Разные виды *Alternaria* демонстрируют различный потенциал токсинообразования: штаммы видов секции *Alternaria* [*A. alternata* (Fr.) Keissl., *A. arborescens* E.G. Simmons, *A. tenuissima* и др.] продуцируют сходные количества основных альтернариотоксинов, тогда как штаммы филогенетически близкие к виду *A. infectoria* E.G. Simmons формируют несколько иной профиль метаболитов, включающий специфичные для этой группы грибов соединения, такие как инфектопирон и новозеландины (Andersen et al., 2002; Oviedo et al., 2013; Kahl et al., 2015; Zwickel et al., 2018).

Токсичность вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* еще детально не прояснена и является предметом постоянных исследований (Ostry, 2008; Lee et al., 2015). Предполагают, что АОЛ и АМЭ могут оказывать генотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие на человека и животных (Moreno et al., 2012). Показано, что ТК более токсична, чем АОЛ и АМЭ (Lou et al., 2013). В настоящее время на основании токсикологических исследований в странах Европейского Союза предлагается ввести ограничение на содержание ТК в продуктах для детского питания на основе сорго/просо — не более 500 мкг/кг, поскольку эти злаки наиболее подвержены контаминации ТК и могут содержать ее в концентрации, достигающей 1200 мкг/кг (Rychlik et al., 2016). В то же время, содержание основных альтернариотоксинов (АОЛ, АМЭ, ТК и ТЕН) в зерне в большинстве случаев не превышает 100 мкг/кг (Fraeyman et al., 2017).

Исследования загрязненности зерновых культур, выращенных в России, микотоксинами грибов *Alternaria* носят единичный характер (Burkin, Koponenko, 2011).

Целью исследования являлось выявление зараженности грибами рода *Alternaria* и *Bipolaris sorokiniana* и загрязнения микотоксинами зерна, выращенного в 2017–2018 гг. в четырех областях Уральского ФО. Для получения объективной информации использовали совокупность результатов микологического анализа, количественной ПЦР (кПЦР) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-МС/МС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований являлись 56 образцов зерна урожая 2017–2018 гг., собранных в различных областях Уральского ФО. Средние образцы зерна были получены из Щучанского района Курганской обл. (2 шт.), Исетского района Тюменской обл. (4 шт.), трех районов (Алапаевский, Белоярский и Пышминский) Свердловской обл. (11 шт.) и 10 районов Челябинской обл. (Варненский, Октябрьский, Чесменский, Еткульский, Кизильский, Красноармейский, Сосновский, Троицкий, Уйский, Чебаркульский) (39 шт.). Яровая пшеница была представлена 36 образцами, тогда как образцов овса и ячменя было 5 и 14 соответственно.

Для оценки зараженности зерна грибами и выявления видового состава микромицетов из каждого образца отбирали 100–200 зерен. Поверхность зерен стерилизовали 5%-м гипохлоритом натрия в течение 3 мин, после их отмывали стерильной водой. В ламинарном боксе зерна раскладывали в чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозной агаризованной среды (КСА), в которую предварительно вносили растворы антибиотиков и детергента.

Через 7 суток инкубирования чашек Петри в темноте при 24°C проводили учет всхожести семян на питательной среде. Оценка всхожести зерна на питательной агаризованной среде не является методом, рекомендованным ГОСТ 12038-84, однако позволяет получить достоверные данные. К всхожим относили те зерна, у которых длина проростка за 7 суток инкубации составляла не менее 1 см.

Количество колоний темноокрашенных микромицетов подсчитывали спустя 8–10 суток инкубации, их принадлежность к грибам родов *Alternaria* и *Bipolaris sorokiniana* устанавливали по сумме макро- и микроморфологических признаков (Ellis, 1971; Simmons, 2007). Зараженность зерна определенным таксоном рассчитывали как число зерен, из которых были выделены грибы данного таксона к общему числу анализируемых зерен, выраженное в процентах.

Для последующей экстракции ДНК и микотоксинов зерно каждого образца (20 г) гомогенизировали в стерильных контейнерах на мельнице Tube Mill Control (IKA, Германия). Размолотую муку хранили при –20°C до последующей экстракции ДНК и микотоксинов.

Экстракцию ДНК из 200 мг зерновой муки, а также из активно растущего мицелия типовых штаммов *Alternaria* spp. и *B. sorokiniana* из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР проводили с помощью набора для выделения геномной ДНК (Thermo Fisher Scientific, Литва) по адаптированному протоколу.

Концентрацию ДНК, выделенной из муки и штаммов, определяли, используя флуориметр Qubit 2.0 с набором реагентов Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). ДНК штаммов грибов разбавляли до концентрации 10 нг/мкл и использовали для построения калибровочной кривой в десятикратных последовательных разведениях от 10^{-1} до 10^{-6} нг/мкл. ДНК из образцов муки разводили до концентрации 10–50 нг/мкл.

Содержание ДНК представителей двух секций грибов рода *Alternaria* — *Alternaria* и *Infectoriae*, а также ДНК *B. sorokiniana* определяли методом кПЦР с красителем SYBR Green. Реакции проводили в объеме 20 мкл, содержащем 4 мкл 5×qPCRmix-HS SYBR мастер-микса (Евроген, Россия), 500 нМ каждого праймера (Евроген, Россия) и 2 мкл раствора ДНК (20–100 нг). Для выявления ДНК грибов секции *Alternaria* использовали праймеры AAF2/AAR3 (Konstantinova et al., 2002) и следующий протокол амплификации: 50°, 2 мин; 95°, 10 мин; 40 циклов [95°, 15 с; 67°, 60 с; 72°, 5 с]. Содержание ДНК грибов секции *Infectoriae* определяли с помощью праймеров AinfF3/AinfR4 (Gannibal, Yli-Mattila, 2007) и протокола амплификации: 50°, 2 мин; 95°, 10 мин; 40 циклов [95°, 15 с; 65°, 60 с; 72°, 3 с]. ДНК гриба *B. sorokiniana* выявляли с использованием праймеров COSA_F/COSA_R и протокола амплификации: 95°, 3 мин; 40 циклов [95°, 10 с; 68°, 20 с; 72°, 45 с] (Matusinsky et al., 2010). Реакции проводили на термоциклере CFX96 Real-Time System (BioRad, США) минимум в двух повторностях, обработку первичных данных — с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6.

Количество ДНК грибов выражали в виде доли от общей ДНК, выделенной из зерновой муки (пг/нг общей ДНК). Нижний достоверный предел выявления содержания ДНК грибов в пробе был установлен на уровне 5×10^{-4} пг/нг.

Экстракцию вторичных метаболитов проводили раствором ацетонитрил:вода:уксусная кислота (79 : 20 : 1). К 5 г навески зерновой муки добавляли 20 мл раствора и встряхивали на роторном шейкере PSU-20 (Biosan, Латвия) в течение 90 мин. Затем экстракт центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин на центрифуге ЦЛн-16 (Поликом, Россия). Без какой-либо очистки 500 мкл полученного экстракта переносили в стеклянные вials и разводили 500 мкл раствора ацетонитрил:вода:уксусная кислота (20 : 79 : 1). Затем вials запечатывали и встряхивали в течение 30 с на Vortex Genius3 (IKA, Германия). Отбор 5 мкл раствора экстракта для анализа проводили автоматическим автосамплером Agilent (Agilent Technologies, Germany).

Детектирование и количественное определение микотоксинов выполняли методом высокоэффективной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на комплексе оборудования, состоящего из масс-спектрометра

Таблица 1. Всхожесть зерна из различных областей Уральского федерального округа

Область, год урожая	Культура (число образцов)	Средняя всхожесть $\pm$ ДИ* (диапазон), %
Курганская, 2018	пшеница (2)	89; 95
Свердловская, 2018	пшеница (3)	62.7 ± 12.2 (41–84)
	овес (4)	55.5 ± 15.4 (20–88)
	ячмень (4)	80.0 ± 6.2 (62–92)
Тюменская, 2017	пшеница (4)	92.5 ± 2.0 (88–96)
Челябинская, 2017	пшеница (9)	91.0 ± 2.8 (74–98)
Челябинская, 2018	пшеница (18)	87.3 ± 2.5 (65–98)
	овес (1)	57
	ячмень (11)	71.1 ± 6.1 (33–92)

Примечание. Условия эксперимента: КСА, 24°C, в темноте, 7 суток. *ДИ — доверительный интервал при уровне значимости $p < 0.05$.

AB SCIEX Triple Quad™ 5500 (Applied Biosystems, USA), оснащенного источником ионизации с электрораспылением TurboV (ESI) и системой ВЭЖХ 1290 Agilent Infinity (Agilent Technologies, Germany). Хроматографическое разделение проводили при 25°C на колонке Gemini® C18, 150 × 4.6 мм (Phenomenex, USA). Валидацию методики для изучения восстановления аналитов при анализе различных матриц (пшеница, ячмень, овес) и количественный анализ содержания микотоксинов проводили согласно общепринятым руководствам (Matuszewski et al., 2003; Sulyok et al., 2006; Malachová et al., 2014). В экстрактах анализировали содержание четырех микотоксинов, образуемых грибами *Alternaria*: АОЛ, АМЭ, ТЕН, ТК, с лимитами обнаружения 2.0, 1.5, 2.0 и 6.3 мкг/кг, соответственно.

Расчет средних значений и доверительного интервала при уровне значимости $p < 0.05$ проводили в программе Microsoft Excel 2010. В программе Statistica 10.0 проводили проверку статистической значимости разницы между средними анализированных показателей с помощью дисперсионного анализа (различия считали достоверными при $p < 0.05$), а также корреляционный анализ связей между количественными признаками — рассчитывали коэффициент Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всхожесть зерна на питательной среде. Всхожесть зерна варьировала от 20 до 98% и не имела достоверной связи с географическим происхождением и культурой, однако образцы пшеницы из Тюменской и Челябинской областей в среднем характеризовались лучшей всхожестью, чем образцы из других регионов (табл. 1). В среднем всхо-

жесть зерна овса составила 55.8%, ячменя — 73.5% и была достоверно ниже, по сравнению с пшеницей — 87.0% ($p = 0.04$), что вероятно обусловлено наличием пленки, которая тормозит набухание зерновки на питательной среде.

Зараженность зерна микромицетами. Основными представителями микобиоты проанализированных образцов зерна являлись грибы рода *Alternaria*, тогда как зараженность грибами *B. sorokiniana* всех образцов была значительно ниже (рис. 1). Грибы других таксономических групп, которые являются типичными представителями микобиоты зерна (*Fusarium* Link, *Epicoccum* Link, *Cladosporium* Link, *Microdochium* Syd. et P. Syd., *Pyrenophora* Fr., *Nigrospora* Zimm., *Arthrinium* Kunze, *Phoma* Sacc. и другие), также были выделены, хотя и с частотой, безусловно, меньшей, чем грибы *Alternaria* и *Bipolaris*.

Микологический анализ показал, что грибы рода *Alternaria* встречаются в 100% образцов. Грибы рода *Alternaria* образуют колонии с обильным воздушным мицелием различных оттенков: от светло-серого до темно-оливкового и черного, с интенсивным спороношением. Зараженность зерна этими грибами варьировала от 14 (ячмень, Челябинская обл., 2018 г.) до 100% (пшеница, Челябинская обл., 2017 г.) и в среднем составляла 74.4%. Наименьшая средняя зараженность зерна в 2018 г. ($36.5 \pm 3.1\%$) выявлена в образцах овса из Свердловской обл., а наибольшая ($92.5 \pm 0.5\%$) — в образцах пшеницы из Курганской обл. В 2017 г. максимальная зараженность этими грибами обнаружена в образцах пшеницы из Челябинской обл. — $95.1 \pm 1.4\%$. Выявлена достоверно более высокая зараженность зерна пшеницы грибами рода *Alternaria* ($80.7 \pm 5.1\%$) по сравнению с овсом и ячменем ($60.2 \pm 7.8\%$ и $63.8 \pm 10.7\%$, соответственно).

Анализ видового состава грибов рода *Alternaria* в образцах урожая 2018 г. показал, что в зерне встречаются представители двух секций: *Alternaria* и *Infectariae*. Частота встречаемости видов секции *Alternaria* составила 93% от всех выделенных изолятов *Alternaria*, а зараженность зерна варьировала в зависимости от области (табл. 2). Средняя зараженность зерна овса представителями секций *Alternaria* и *Infectariae* оказалась достоверно более низкой ($40.8 \pm 5.6\%$ и $2.0 \pm 1.1\%$, соответственно) по сравнению с зерном пшеницы ($72.2 \pm 2.5\%$ и $6.7 \pm 0.9\%$) и ячменя ($65.9 \pm 4.6\%$ и $4.5 \pm 1.1\%$). Установлена слабая положительная связь между зараженностью образцов зерна представителями двух секций *Alternaria* ($r = 0.37$, при $p = 0.02$).

Гриб *B. sorokiniana* образует компактные черные бархатистые колонии с обильным спороношением. Они были выявлены в 58.9% образцов, а зараженность зерна в среднем составила $6.2 \pm 2.2\%$. Наименьший средний показатель отмечен в образцах пшеницы из Курганской, Тюменской, Челябинской областей вне зависимости от вида культуры и

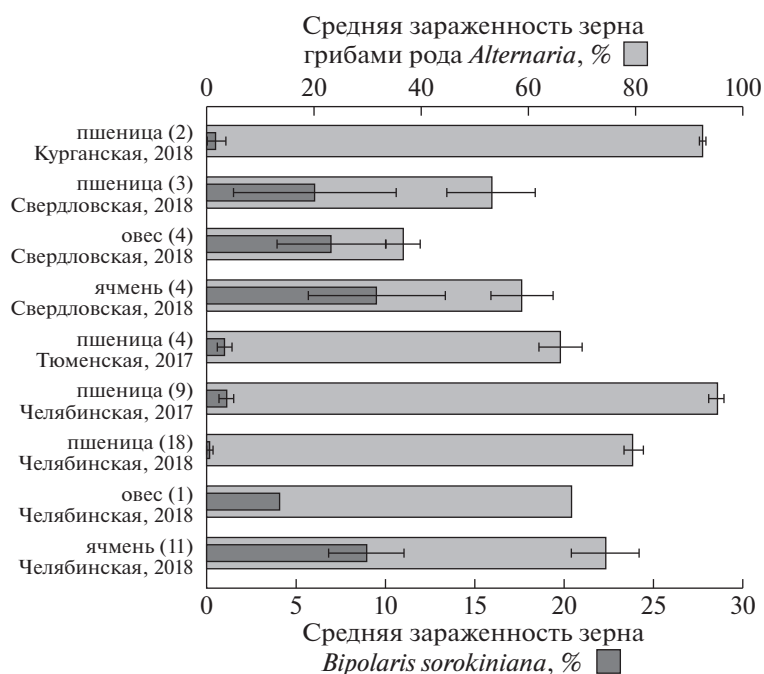


Рис. 1. Средняя зараженность грибами образцов зерна из различных областей Уральского федерального округа, 2017–2018 гг.

года урожая — от $0.2 \pm 0.1\%$ до $1.1 \pm 0.4\%$. Зараженность зерна *B. sorokiniana* отмечена во всех анализированных образцах ячменя и в среднем составляла $8.9 \pm 2.1\%$, что оказалось выше, чем у других культур. В образцах ячменя из Челябинской обл. доля зерен, инфицированных грибами *B. sorokiniana*, достигала 25%. Также, высоко зараженным являлось зерно ячменя из Свердловской обл. — в среднем $9.5 \pm 3.8\%$ (максимум зараженных зерен составлял 21%).

Количество ДНК грибов *Alternaria* в зерне. ДНК грибов рода *Alternaria* секций *Alternaria* и *Infectariae* выявлена во всех образцах (рис. 2), кроме того, установлена достоверная положительная связь ($r = 0.49$, $p = 0.001$) между содержанием их биомассы в зерне. Однако, в среднем содержание ДНК грибов секции *Alternaria* (1999 ± 137) $\times 10^{-4}$ пг/нг превышало содержание ДНК грибов секции *Infectariae* (723 ± 88) $\times 10^{-4}$ пг/нг, а в отдельных образцах это различие достигало 20 раз. В то же время распре-

Таблица 2. Зараженность грибами *Alternaria* spp. и *Bipolaris sorokiniana* образцов зерна из различных областей Уральского федерального округа, 2017–2018 гг.

Область, год урожая	Культура (число образцов)	Доля зараженных образцов / диапазон зараженности, %		
		секции <i>Alternaria</i>		<i>B. sorokiniana</i>
		<i>Alternaria</i>	<i>Infectariae</i>	
Курганская, 2018	пшеница (2)	100/80; 88	100/5; 12	50/1
Свердловская, 2018	пшеница* (3)	67/34; 39	0	67/3–15
	овес* (4)	100/30–43	67/1; 2	75/5–15
	ячмень (4)	100/46–72	50/1–2	100/4–21
	ячмень (4)	100/46–72	50/1–2	100/4–21
Тюменская, 2017	пшеница (4)	н.а.**	н.а.	75/1–2
Челябинская, 2017	пшеница (9)	н.а.	н.а.	67/1–3
Челябинская, 2018	пшеница (18)	100/53–85	100/1–15	11/1–2
	овес (1)	100/62	100/6	100/4
	ячмень (11)	100/14–83	91/2–16	100/1–25

Примечание. *Анализировали зараженность грибами секций *Alternaria* и *Infectariae* зерна двух образцов пшеницы и трех овса урожая 2018 г. из Свердловской области; **н.а. — не анализировали.

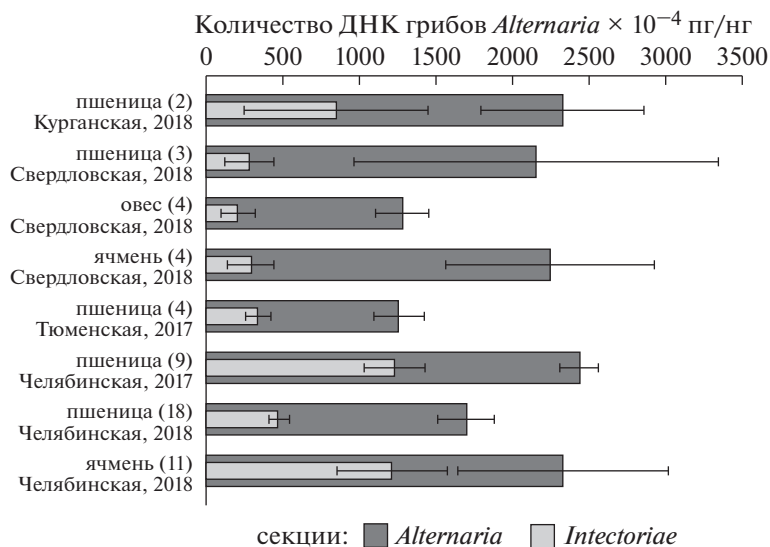


Рис. 2. Содержание биомассы грибов рода *Alternaria* в образцах зерна из различных областей Уральского федерального округа, 2017–2018 гг.

деление содержания ДНК грибов секции *Alternaria* между образцами было более равномерным (коэффициент вариации составил 52.3%), тогда как содержание ДНК грибов секции *Infectoriae* оказалось более неоднородным (коэффициент вариации оказался 93.3%).

Содержание ДНК грибов секции *Alternaria* в зерне образцов пшеницы урожая 2017 г. в среднем составило $(2079 \pm 182) \times 10^{-4}$ пг/нг и достоверно не отличалось от средних показателей, выявленных для образцов зерна пшеницы — $(1811 \pm 476) \times 10^{-4}$ пг/нг, и ячменя — $(2315 \pm 345) \times 10^{-4}$ пг/нг урожая 2018 г., тогда как в зерне овса среднее содержание ДНК грибов этой секции было ниже — $(1272 \pm 176) \times 10^{-4}$ пг/нг. В среднем содержание ДНК грибов секции *Alternaria* было достоверно ниже в зерне пшеницы из Тюменской обл. (2017 г.) — $(1256 \pm 168) \times 10^{-4}$ пг/нг и в зерне овса из Свердловской обл. (2018 г.) — $(1272 \pm 176) \times 10^{-4}$ пг/нг, по сравнению с образцами из других областей.

В зерне пшеницы урожая 2017 г. содержание ДНК грибов секции *Infectoriae* составило в среднем $(957 \pm 181) \times 10^{-4}$ пг/нг за счет высоких количеств, обнаруженных в образцах из Челябинской обл. В 2017 г. средние значения ДНК грибов секции *Infectoriae* для всех образцов зерна из Челябинской обл. составили $(1232 \pm 200) \times 10^{-4}$ пг/нг, а в 2018 г. — $(751 \pm 80) \times 10^{-4}$ пг/нг и были достоверно выше, по сравнению со средними количествами ДНК этих грибов в зерне образцов из других областей, которые варьировали в диапазоне от $(268 \pm 131) \times 10^{-4}$ пг/нг до $(338 \pm 84) \times 10^{-4}$ пг/нг. Сравнение зерновых культур урожая 2018 г. по содержанию ДНК грибов секции *Infectoriae* показало, что в зерне ячменя их количество в среднем было достоверно выше —

$(968 \pm 236) \times 10^{-4}$ пг/нг, чем в зерне пшеницы — $(476 \pm 70) \times 10^{-4}$ пг/нг и овса — $(207 \pm 117) \times 10^{-4}$ пг/нг.

Количество ДНК *B. sorokiniana* в зерне. ДНК гриба *B. sorokiniana* выявлена в 48.2% образцов в количестве от 6×10^{-4} до 381×10^{-4} пг/нг (рис. 3). В зерне 39% образцов пшеницы и 80% образцов ячменя была обнаружена ДНК гриба. В среднем, зерно ячменя содержало ДНК *B. sorokiniana* в количестве $(109 \pm 32) \times 10^{-4}$ пг/нг, что достоверно больше по сравнению с зерном овса — $(4.7 \pm 4.0) \times 10^{-4}$ пг/нг и пшеницы — $(7.4 \pm 2.3) \times 10^{-4}$ пг/нг ($p = 0.000$). Только в зерне одного образца овса из Пышминского р-на Свердловской обл. обнаружена ДНК этого патогена в количестве 23.3×10^{-4} пг/нг. При этом влияние географического происхождения образцов было несущественным. Установлена достоверная положительная связь ($r = 0.43$, $p = 0.006$) между зараженностью грибом *B. sorokiniana* и содержанием его биомассы в зерне, а также между содержанием биомассы гриба *B. sorokiniana* и представителей рода *Alternaria* в зерне: $r = 0.66$ при $p = 0.000$ для секции *Alternaria* и $r = 0.70$ при $p = 0.000$ для секции *Infectoriae*.

Содержание вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* в зерне. Микотоксины грибов рода *Alternaria* не были выявлены только в двух образцах зерна ячменя из Свердловской обл. Одновременно все четыре анализированных микотоксина (АОЛ, АМЭ, ТЕН, ТК) обнаружены в пяти образцах из Челябинской обл. (2018 г.), по два из которых — образцы зерна пшеницы и ячменя из Красноармейского р-на и один — образец овса из Еткульского р-на.

Из четырех анализированных микотоксинов, образуемых грибами *Alternaria*, в образцах зерна

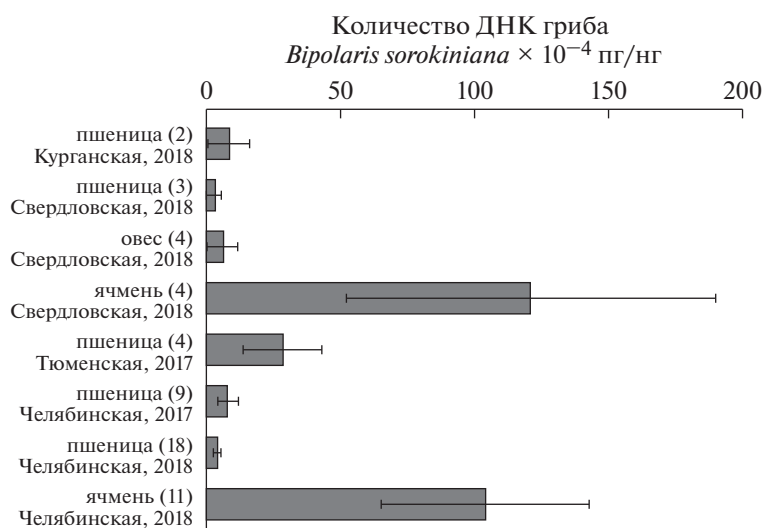


Рис. 3. Содержание биомассы гриба *Bipolaris sorokiniana* в образцах зерна из различных областей Уральского федерального округа, 2017–2018 гг.

чаще выявляли ТЕН и ТК. В 2017 г. этими микотоксинами были загрязнены 100% образцов зерна пшеницы (табл. 3). Выявленные количества ТЕН в среднем составляли 27 ± 4 мкг/кг (диапазон 4–48 мкг/кг), а количества ТК были выше — в среднем 111 ± 19 мкг/кг (15–226 мкг/кг). В зерне пшеницы из Тюменской обл. содержание этих двух микотоксинов было достоверно ниже (ТЕН — 16 ± 7 мкг/кг и ТК — 47 ± 20 мкг/кг), по сравнению с образцами зерна из Челябинской обл. (ТЕН — 31 ± 4 мкг/кг и ТК — 139 ± 20 мкг/кг). В 2018 г. ТЕН был найден в зерне 91% образцов, его количество в среднем составило 23 ± 3 мкг/кг (диапазон 3–82 мкг/кг), а ТК была выявлена в 77% образцов в количествах в среднем 127 ± 21 мкг/кг (диапазон 39–593 мкг/кг). В образцах из Челябинской обл. средние количества ТЕН были достоверно выше (26 ± 4 мкг/кг), по сравнению с образцами зерна

из Свердловской обл. (6 ± 3 мкг/кг), а средние количества ТК в зерне образцов из этих двух областей были сходными и составили 117 ± 48 мкг/кг в Свердловской обл. и 134 ± 24 мкг/кг в Челябинской обл. Между количеством ТЕН и ТК выявлена положительная связь ($r = 0.72$, при $p = 0.001$).

В зерне урожая 2017 и 2018 гг. АОЛ обнаружен соответственно в 15 и 23% образцов, его монометиловый эфир выявлен только в зерне 14% образцов урожая 2018 г. Количества этих двух микотоксинов были существенно ниже, по сравнению с ТЕН и ТК. АМЭ обнаружен, за исключением одного образца, в зерне только тех образцов, где встречался АОЛ (диапазон количеств составил 2.4–25.6 мкг/кг), и по сравнению с исходным метаболитом, его количества всегда были ниже (3.1–5.4 мкг/кг). Между содержанием АОЛ и АМЭ в

Таблица 3. Количество вторичных метаболитов грибов *Alternaria* в образцах зерна из различных областей Уральского федерального округа, 2017–2018 гг.

Область, год урожая	Культура (число образцов)	Процент контаминированных образцов/диапазон количеств, мкг/кг			
		АОЛ	АМЭ	ТЕН	ТК
Курганская, 2018	пшеница (2)	50/0; 3.4	0	100/2.9; 9.7	100/100.2; 39.5
Свердловская, 2018	пшеница (3)	0	0	100/6.0–79.4	100/53.4–388.1
	овес (4)	25/4.9	0	75/6.4–39.9	75/61.4–471.3
	ячмень (4)	0	0	50/5.4; 6.7	25/84.8
Тюменская, 2017	пшеница (4)	75/2.4–4.1	50/0.7; 1.1	100/4.4–35.0	100/14.7–105.1
Челябинская, 2017	пшеница (9)	0	0	100/16.8–48.0	100/56.7–226.5
Челябинская, 2018	пшеница (18)	22/7.5–19.0	18/3.1–5.4	100/13.2–79.9	89/61.8–593.4
	овес (1)	100/4.6	100/4.0	100/82.2	100/257.2
	ячмень (11)	27/3.1–25.6	18/4.6; 5.1	91/4.5–27.9	64/42.6–177.2

зерне установлена достоверная связь ($r = 0.72$, при $p = 0.001$).

Сравнение контаминации зерна разных культур урожая 2018 г. выявило различия по содержанию микотоксинов *Alternaria*. АОЛ, также как и АМЭ, чаще встречался в образцах овса (40% образцов), чем пшеницы (22%) и ячменя (20%), однако без достоверных различий между средним содержанием микотоксинов, которые были низкими — $1.9 \pm 1.1 - 2.5 \pm 1.1$ мкг/кг для АОЛ и $0.5 \pm 0.3 - 0.8 \pm 0.8$ мкг/кг для АМЭ. Распределение ТЕН в зерне разных культур урожая 2018 г. было сходным, выявлена 100%-я встречаемость этого микотоксина в зерне пшеницы и 80% — как в зерне овса, так и ячменя. В то же время, ТК чаще выявляли в зерне пшеницы (91% образцов) и овса (80%), чем ячменя (53%). Средние количества ТЕН и ТК в зерне ячменя были достоверно ниже — соответственно 7 ± 2 мкг/кг и 50 ± 16 мкг/кг, по сравнению с другими культурами. В зерне овса выявлены в среднем 27 ± 15 мкг/кг ТЕН и 180 ± 83 мкг/кг ТК, а в зерне пшеницы количества этих двух микотоксинов составили в среднем 32 ± 4 мкг/кг ТЕН и 165 ± 30 мкг/кг ТК.

Достоверная положительная связь между зараженностью зерна и количеством микотоксина выявлена для секции *Infectoriae* и ТЕН ($r = 0.40$, при $p = 0.012$). В то же время, связи между зараженностью зерна *B. sorokiniana*, а также содержанием биомассы этого патогена и ТЕН оказались отрицательными ($r = -0.42$, при $p = 0.009$ и $r = -0.33$, при $p = 0.04$, соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ урожая зерна позволяет определить его целевое назначение — продовольственное, кормовое или семенное. Если в случае использования зерна в качестве семян одним из определяющих показателей является его всхожесть, то для продовольственного и фуражного зерна на первый план выходит его контаминация микотоксинами.

Полученные результаты выявили существенную разницу изученных образцов трех зерновых культур по всхожести зерна на питательной среде. Выявлена положительная связь между всхожестью зерна и его зараженностью наиболее обильными представителями микобиоты — грибами рода *Alternaria* секции *Alternaria* ($r = 0.65$, при $p = 0.000$) и, в меньшей степени, секции *Infectoriae* ($r = 0.45$, при $p = 0.039$). Достоверная отрицательная связь установлена между всхожестью зерна и его зараженностью *B. sorokiniana* ($r = -0.64$ при $p = 0.000$).

В то же время количественное содержание биомассы (ДНК) грибов из двух разных секций *Alternaria* и *B. sorokiniana* не оказывало достоверного влияния на всхожесть и связей между этими показателями не выявлено. По всей видимости, воз-

действие данных грибов обусловлено, прежде всего, их наличием, а не количественным присутствием.

Если мнение исследователей о негативном влиянии гриба *B. sorokiniana* на проростки единодушно, то дискуссия о влиянии грибов *Alternaria* на семенные качества зерна до сих пор продолжается, и мнения высказываются часто противоположные (Kosiak et al., 2004; Gannibal, 2014; Castañares et al., 2020). Наши многолетние наблюдения показывают, что из зерен, зараженных грибами *Alternaria*, как правило, развиваются здоровые проростки, внешне не отличимые от проростков из неинфицированных семян (Gannibal, 2007, 2014; Gagkaeva et al., 2012).

Большой интерес представляют исследования по выявлению эффекта вторичных метаболитов грибов *Alternaria* на прорастание зерна. Оценка фитотоксического действия культуральной жидкости разных видов *Alternaria* показала, что *Alternaria infectoria* и близкородственные виды в среднем меньше влияли на рост корней и проростков семян пшеницы, чем *A. tenuissima* и *A. alternata* (Gannibal, 2007). В другой работе, при обработке семян культуральной жидкостью штаммов *A. tenuissima*, в 16% случаев отмечался стимулирующий эффект на рост корней и проростков зерновых культур (Тогорова et al., 2015). В нашей работе влияние присутствия какого-либо из четырех альтернариотоксинов на всхожесть зерна не выявлено. По всей видимости, роль способствующего прорастанию фактора могут играть другие вторичные метаболиты грибов *Alternaria*.

Анализ грибов *Alternaria* выявил представителей, относящихся к двум секциям этого рода — *Alternaria* и *Infectoriae*. Общее число изолятов, по микроморфологическим признакам отнесенных к секции *Alternaria*, превышало в 11.5 раза число изолятов, относящихся к секции *Infectoriae*. В результате кПЦР с праймерами, специфичными к этим двум группам грибов, установлено, что средние количества ДНК грибов секции *Alternaria* были выше в 5.1 раза, по сравнению со средними количествами ДНК грибов секции *Infectoriae*. Виды секции *Alternaria* растут и образуют споронии быстрее на питательной среде и, как правило, более пигментированы, чем представители секции *Infectoriae*, которые, в связи с этим, часто остаются незамеченными (Gannibal, 2018). Применение кПЦР в нашем исследовании позволило выявить истинную зараженность зерна видами грибов *Alternaria*, относящимися к разным секциям.

Соотношение видов секций *Alternaria* и *Infectoriae* в микобиоте зерновых культур во многом зависит от погодно-климатических факторов и может существенно варьировать в разные вегетационные сезоны (Kosiak et al., 2004; Gannibal, 2018). Однако влияние конкретных погодных условий (температура, влажность, осадки) в течение веге-

тационного сезона на распространение грибов рода *Alternaria* в посевах зерновых относят к недостаточно изученным факторам (Gannibal, 2018).

Согласно ранее опубликованной информации о распространении *A. infectoria* и близкородственных видов на территории России, эти грибы часто встречаются в западной части страны, редко — на Урале и в Сибири, и отсутствуют на востоке (Gannibal, 2014). В нашем исследовании выявлено массовое распространение представителей секции *Infectoriae* на территории Уральского ФО и установлена достоверная положительная связь между зараженностью ими зерна и количествами ТЕН. Поскольку сведения о токсинопродуцирующей способности грибов секции *Infectoriae* противоречивы (Andersen et al., 2002; Ovideo et al., 2013), то природа выявленной связи требует дальнейшего изучения.

Сообщалось, что зерно разных зерновых культур (пшеницы, овса, ржи и ячменя) заражается грибами рода *Alternaria* секций *Alternaria* и *Infectoriae* почти в равной степени независимо от сорта (Gannibal, 2018). Наши результаты не выявили различий по зараженности грибами двух секций *Alternaria* зерна пшеницы и ячменя, однако зараженность зерна овса была достоверно ниже. Та же ситуация наблюдалась при сравнении зерновых культур по содержанию биомассы грибов секции *Alternaria* — в зерне овса среднее количество их ДНК было достоверно более низким, чем в зерне пшеницы и ячменя, контаминация которых была сходной. В то же время в зерне ячменя среднее количество ДНК грибов секции *Infectoriae* было достоверно выше, по сравнению с зерном пшеницы и особенно овса.

Кроме того, выявлено существенное различие анализируемых образцов по зараженности зерна и содержанию биомассы гриба *Bipolaris sorokiniana* — зерно ячменя было инфицировано интенсивнее и среднее количество ДНК патогена было выше, в сравнении с зерном пшеницы и овса. Наши результаты согласуются с полученной ранее информацией о более высокой зараженности зерна ячменя (Kazakova et al., 2016) и более высоких содержаниях биомассы *B. sorokiniana* в зерне ячменя (Orina et al., 2018) в сравнении с другими зерновыми культурами. Высокая чувствительность этой культуры к поражению *B. sorokiniana* связана с более низким содержанием фенольных соединений в клеточной стенке и активностью некоторых ферментов, отвечающих за первичный иммунный ответ (Bashyal et al., 2011).

Из четырех анализируемых микотоксинов, продуцируемых грибами рода *Alternaria*, в зерне наиболее часто и в большом количестве выявлены ТЕН и ТК, что согласуется с результатами других исследователей (Müller, Korn, 2013; Xu et al., 2016; Tori et al., 2018). Обнаружено достоверное различие между культурами по накоплению этих мико-

токсинов в зерне: при сходной встречаемости в зерне ячменя содержания ТЕН и ТК в среднем были в 4.5 и 2.9 раза меньше, чем в зерне пшеницы и овса. Ранее так же было установлено, что ТЕН и ТК в зерне ячменя встречается с меньшей частотой, чем в зерне пшеницы (Uhlig et al., 2013). Существенное влияние типа зернового субстрата на уровни накопления микотоксинов штаммами *Alternaria alternata* также было показано в лабораторных экспериментах (Li et al., 2001). Недавно было выявлено преобладание АОЛ по частоте обнаружения и накапливаемому количеству в зерне ячменя по сравнению с ТК и АМЭ, однако авторами также отмечалось существенное влияние погодных условий на встречаемость альтернариотоксинов в зерне (Castañares et al., 2020). Между тем, оценка накопления токсинов штаммами *A. alternata*, выделенными из зерна пшеницы, показала, что продуцирование АОЛ при культивировании на зерновых субстратах начиналось раньше, чем других анализируемых микотоксинов: АМЭ, ТК, альтетуена и альтертоксина I (Li et al., 2001). Установлена взаимосвязь между содержанием АОЛ и его метилированным производным АМЭ, как отмечалось ранее — накопление этих двух микотоксинов в субстрате взаимосвязано (Ovideo et al., 2013; Zhao et al., 2015; Xu et al., 2016). Положительная связь между содержанием ТЕН и ТК в зерне также отмечалась другими исследователями (Li et al., 2001; Ovideo et al., 2013; Zhao et al., 2015; Xu et al., 2016) и может указывать на неспецифичное совместное продуцирование этих микотоксинов грибами рода *Alternaria*. Продуцирование разнообразных вторичных метаболитов служит грибам для адаптации в окружающей среде и, несмотря на генетическую детерминированность, способность к их образованию реализуется в зависимости от сложившихся конкретных условий.

Выявлена достоверная отрицательная связь между зараженностью зерна грибами рода *Alternaria*, относящимися к секции *Alternaria*, и *Bipolaris sorokiniana* ($r = -0.51$, при $p = 0.001$), а также между грибами секции *Infectoriae* и *B. sorokiniana* ($r = -0.35$, при $p = 0.027$). В ранних наблюдениях показано негативное влияние присутствия *B. sorokiniana* на зараженность зерна грибами рода *Alternaria* (Gannibal, 2018). В другом исследовании был показан сходный антагонистический характер биотических отношений между *Alternaria* spp. и *B. sorokiniana*, выделенных из зерна ячменя, что, по мнению авторов, является характерным для видов с максимальным перекрытием экологических ниш (Kazakova et al., 2016). В то же время, выявлена достоверная положительная связь между содержанием ДНК гриба *B. sorokiniana* и ДНК представителей двух секций *Alternaria* в зерне, тогда как связь между биомассой *B. sorokiniana* и содержанием ТЕН, продуцируемым грибами *Alternaria*, была достоверно отрицательная. Известно, что

продуцирование микотоксинов грибами *Alternaria* вариабельно и чрезвычайно чувствительно к условиям среды, особую роль среди которых играют взаимодействия с другими организмами, входящими в состав сообщества (Lee et al., 2015; Müller et al., 2015). Нами не найдена информация о взаимодействии грибов *Alternaria* и *B. sorokiniana* в контексте продуцирования вторичных метаболитов. Однако, установление сроков и механизмов заражения растений грибами, а также их взаимоотношения друг с другом и с растениями представляют значительный практический и научный интерес.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что грибы *Alternaria* и *Bipolaris* встречаются повсеместно в зерне, выращенном в Уральском ФО. Впервые с использованием кПЦР выявлено содержание ДНК грибов двух секций рода *Alternaria*, подтверждающее превалирование представителей секций *Alternaria* над грибами секции *Infectoriae* в составе микобиоты, продемонстрированное при микологическом анализе образцов. Показано, что зараженность грибами данных секций рода *Alternaria* не только не снизила всхожесть зерна, но и стимулировала его прорастание. Таким образом, значительная зараженность этими грибами не является ограничением для использования зерна на семенные цели. Использование ВЭЖХ-МС/МС позволило оценить содержание вторичных метаболитов грибов в зерне разных культур. В настоящее время, из-за отсутствия официальных документов, нормирующих содержание микотоксинов грибов *Alternaria* в зерне и продуктах его переработки, даже их значительное количество не является основанием для ограничения использования зерна на пищевые цели. С использованием как микологического анализа, так и кПЦР, нами выявлено значительное распространение *B. sorokiniana* в зерне всех трех анализированных культур. Высокая вредность этого гриба определяет необходимость дальнейшего углубленного изучения видового разнообразия и мониторинга встречаемости грибов, относящихся к роду *Bipolaris*, в регионах выращивания зерновых культур. Чтобы минимизировать риски получения некачественного зерна, необходимы детальные исследования не только таксономического состава грибов, но и спектра микотоксинов, особенно тех, информация о распространении которых до настоящего времени была ограничена.

Авторы благодарят сотрудников компаний ООО “Сингента” и АО “Байер” за предоставленные образцы зерна, а также Н.Н. Гогину (ФНЦ “ВНИТИП” РАН) за анализ микотоксинов. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andersen B., Krøger E., Roberts R.G. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. Mycol. Res. 2002. V. 106. P. 170–182.
<https://doi.org/10.1017/S0953756201005263>
- Apoga D., Åkesson H., Jansson H. et al. Relationship between production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. Eur. J. Plant. Pathol. 2002. V. 108. P. 519–526.
<https://doi.org/10.1023/A:1019976403391>
- Bashyal B.M., Chand R., Chand R. et al. *Bipolaris sorokiniana* of barley: infection behaviour in different members of Poaceae. Indian Phytopathol. 2011. V. 64 (1). P. 28–31.
- Belozerskaya T.A., Gessler N.N., Averyanov A.A. Melanin pigments of fungi. In: Mérillon J.M., Ramawat K. (eds). Fungal metabolites. Reference series in phytochemistry. Springer, 2017. P. 263–291.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29
- Burkin A.A., Kononenko G.P. Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2011. V. 47 (1). P. 72–76.
- Castañares E., Pavicich M., Dinolfo M. et al. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in malting barley grains in the main producing region of Argentina. J. Sci. Food Agri. 2020. V. 100. P. 1004–1011.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10101>
- Ellis M.B. Dematiaceous *Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
- Fraeyman S., Croubels S., Devreese M. et al. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. Toxins. 2017. V. 9 (7). P. E228.
<https://doi.org/10.3390/toxins9070228>
- FSSS. Federal State Statistics Service. Agricultural Bulletins (electronic versions) (in Russ.).
<https://www.gks.ru/compendium/document/13277>
 (available 24.04.2020)
- Gagkaeva T.Yu., Dmitriev A.P., Pavlyushin V.A. Grain microbiota – index of its quality and safety. Zashchita i karantin rasteniy. 2012. N 9. P. 14–18 (in Russ.).
- Gagkaeva T.Yu., Gavrilo O.P., Orina A.S. et al. Comparison of methods for identification of toxin-producing *Fusarium* fungi in the cereal grain. Mikologiya i fitopatologiya. 2017. V. 51 (5). P. 292–298 (in Russ.).
- Gannibal Ph.B. Small-spored species of the genus *Alternaria* on grasses. Mikologiya i fitopatologiya. 2004. V. 38 (3). P. 19–28 (in Russ.).
- Gannibal Ph.B. Toxigenicity and pathogenicity of *Alternaria* fungi for cereals. Vestnik zashchity rastenij. 2007. (S). P. 82–93 (in Russ.).
- Gannibal Ph.B. *Alternaria* disease of grain – modern view of the problem. Zashchita i karantin rasteniy. 2014. N 6. P. 11–15 (in Russ.).
- Gannibal Ph.B. Factors affecting *Alternaria* appearance in grains in European Russia. Selskokhozyaistvennaya biologiya. 2018. V. 53 (3). P. 605–615 (in Russ.).
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.605rus>

- Gannibal Ph.B., Yli-Mattila T. Morphological and UP-PCR analyses and design of a PCR assay for differentiation of *Alternaria infectoria* species-group. Mikologiya i fitopatologiya. 2007. V. 41 (4). P. 313–322.
- Halloin J.M., De Zoeten G.A., Gaard G.R. et al. Effects of tentoxin on chlorophyll synthesis and plastid structure in cucumber and cabbage. Plant Physiol. 1970. V. 45. P. 310–314.
<https://doi.org/10.1104/pp.45.3.310>
- Kahl S.M., Ulrich A., Kirichenko A.A. et al. Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. J. Appl. Microbiol. 2015. V. 119 (6). P. 1637–1650.
<https://doi.org/10.1111/jam.12951>
- Kang S., Dobinson K.F. Molecular and genetic basis of plant-fungal pathogen interactions. Appl. Mycol. Biotechnol. 2004. V. 4. P. 59–97.
[https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80006-6)
- Kang Y., Feng H., Zhang J. et al. TeA is a key virulence factor for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler infection of its host. Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 115. P. 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.002>
- Karakotov S.D., Arshava N.V., Bashkatova M.B. Monitoring and control of wheat diseases in the Southern Trans-Urals. Zashchita i karantin rasteniy. 2019. N 7. P. 18–25 (in Russ.).
- Kazakova O.A., Toropova E.Y., Vorobyeva I.G. The interrelations between phytopathogens of barley seeds in Western Siberia. APK Rossii. 2016. V. 23 (5). P. 931–934 (in Russ.).
- Konstantinova P., Bonants P.J.M., van Gent-Pelzer M.P.E. et al. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycol. Res. 2002. V. 106 (1). P. 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.021>
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E. et al. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study. Int. J. Food Microbiol. 2004. V. 93 (1). P. 51–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006>
- Lee H., Patriarca A., Magan N. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. Mycobiol. 2015. V. 43. P. 93–106.
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>
- Li F.Q., Toyazaki N., Yoshizawa T. Production of alternaria mycotoxins by *Alternaria alternata* isolated from weather-damaged wheat. J. Food Prot. 2001. V. 64 (4). P. 567–571.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.4.567>
- Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. *Alternaria* toxins and plant diseases: and overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin J. 2009. V. 2. P. 129–140.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1145>
- Lou J., Fu L., Peng Y., Zhou L. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. Molecules. 2013. V. 18. P. 5891–5935.
<https://doi.org/10.3390/molecules18055891>
- Malachová A., Sulyok M., Beltrán E. et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. J. Chromatogr. A. 2014. V. 1362. P. 145–156.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>
- Manamgoda D.S., Rossman A.Y., Castlebury L.A. et al. The genus *Bipolaris*. Stud. Mycol. 2014. V. 79. P. 221–288.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Manamgoda D., Cai L., Crous P. et al. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. Fungal Divers. 2012. V. 56. P. 131–144.
<https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>
- Matusinsky P., Frei P., Mikolasova R. et al. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. Crop Protec. 2010. V. 29. P. 1325–1330.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.013>
- Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal. Chem. 2003. N 75. P. 3019–3030.
<https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- Meena M., Samal S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. Toxicol. Rep. 2019. V. 6. P. 745–758.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>
- Moreno M.A.P., Alonso I.G., Martín de Santos R. et al. The role of the genus *Alternaria* in mycotoxin production and human diseases. Nutricion Hospitalaria. 2012. V. 27. P. 1772–1781.
<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
- Müller M., Korn U. *Alternaria* mycotoxins in wheat – A 10 years survey in the Northeast of Germany. Food Control. 2013. V. 34. P. 191–197.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.018>
- Müller M.E., Urban K., Köppen R. et al. Mycotoxins as antagonistic or supporting agents in the interaction between phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* fungi. World Mycotoxin J. 2015. V. 8. P. 311–321.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1747>
- Nemchenko V.V., Kekalo A.Yu., Zargaryan N.Yu. et al. Optimization of the phytosanitary situation of crops in Trans-Ural region. Agrarnyy vestnik Urala. 2014. N 8. P. 10–15 (in Russ.).
- Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. Adaptation of the quantitative PCR method for the detection of the main representatives of cereal grain mycobiota. MIR J. 2018. V. 5 (1). P. 78–83.
<https://doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-78-83>
- Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. et al. Symbiotic relationships between aggressive *Fusarium* and *Alternaria* fungi colonizing oat grain. Selskokhozyaistvennaya biologiya. 2017. V. 52 (5). P. 986–994 (in Russ.).
<https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.5.986rus>
- Ostry V. *Alternaria* mycotoxins. An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin J. 2008. V. 1. P. 175–188.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x013>

- Oviedo M.S., Sturm M.E., Reynoso M.M. et al. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Braz. J. Microbiol.* 2013. V. 44 (2). P. 447–455.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200017>
- Phan C.-S., Li H., Kessler S., Solomon P.S., Piggott A.M., Chooi Y.-H. Bipolenins K–N: New sesquiterpenoids from the fungal plant pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Beilstein J. Org. Chem.* 2019. V. 15. P. 2020–2028.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.15.198>
- Rychlik M., Lepper H., Weidner C. et al. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control.* 2016. V. 68. P. 181–185.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.035>
- Shotwell O.L., Ellis J.J. *Helminthosporium*, *Drechslera* and *Bipolaris* toxins. In: *Rodricks J.V.* (ed.). *Mycotoxins and other fungal related food problems. Advances in chemistry*, ser. 149. Am. Chem. Soc. 1976. P. 318–343.
<https://doi.org/10.1021/ba-1976-0149.ch014>
- Simmons E.G. *Alternaria: an identification manual*. CBS, Utrecht, 2007.
- Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. V. 20. P. 2649–2659.
<https://doi.org/10.1002/rcm.2640>
- Topi D., Tavcar-Kalcher G., Pavšič-Vrtač K. et al. *Alternaria* mycotoxins in grains from Albania: alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and tentoxin. *World Mycotoxin Journal.* 2018. V. 12. P. 1–12.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2342>
- Toropova E.Yu., Kirichenko A.A., Kazakova O.A. et al. *Alternaria* disease of grain of spring wheat and barley in Western Siberia and Eastern Trans-Urals. *Zashchita i karantin rasteniy.* 2015. N 1. P. 20–22 (in Russ.).
- Tralamazza S.M., Piacentini K.C., Iwase C.H.T. et al. Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr. Opin. Food Sci.* 2018. V. 23. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>
- Uhlig S., Eriksen G., Hofgaard I. et al. Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins.* 2013. V. 5. P. 1682–1697.
<https://doi.org/10.3390/toxins5101682>
- Xu W., Xiaomin H., Li F. et al. Natural occurrence of *Alternaria* toxins in the 2015 wheat from Anhui province, China. *Toxins.* 2016. V. 8. P. 308.
<https://doi.org/10.3390/toxins8110308>
- Zhao K., Shao B., Yang D. et al. Natural occurrence of *Alternaria* toxins in wheat based products and their dietary exposure in China. *PLoS ONE.* 2015. V. 10 (6). e0132019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132019>
- Zhong S., Steffenson B.J. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathol.* 2001. V. 91. P. 469–476.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.5.469>
- Zwickel T., Kahl S.M., Rychlik M. et al. Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi – do multitoxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1368.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01368>
- Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С. и др. (Gagkaeva et al.) Сравнение методов выявления в зерне токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 5. С. 292–298.
- Гагкаева Т.Ю., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. (Gagkaeva et al.) Микробиота зерна – показатель его качества и безопасности // Защита и карантин растений. 2012. № 9. С. 14–18.
- Ганнибал Ф.Б. (Gannibal) Альтернариоз зерна – современный взгляд на проблему // Защита и карантин растений. 2014. № 6. С. 11–15.
- Ганнибал Ф.Б. (Gannibal) Изучение факторов, влияющих на развитие альтернариоза зерна у злаков, возделываемых в европейской части России // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 3. С. 605–615.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.605rus>
- Ганнибал Ф.Б. (Gannibal) Мелкоспоровые виды рода *Alternaria* на злаках // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38. № 3. С. 19–28.
- Ганнибал Ф.Б. (Gannibal) Токсигенность и патогенность грибов рода *Alternaria* для злаков // Вестник защиты растений. 2007. № 5. С. 82–93.
- Казакова О.А., Торопова Е.Ю., Воробьева И.Г. (Kazakova et al.) Взаимоотношения фитопатогенов семян ячменя в Западной Сибири // АПК России. 2016. Т. 23. № 5. С. 931–934.
- Каракотов С.Д., Аршава Н.В., Башкатова М.Б. (Karakotov et al.) Мониторинг и контроль заболеваний пшеницы в Южном Зауралье // Защита и карантин растений. 2019. № 7. С. 18–25.
- Немченко В.В., Кекало А.Ю., Заргарян Н.Ю. и др. (Nemchenko et al.) Оптимизация фитосанитарной обстановки посевов зерновых в условиях Зауралья // Аграрный вестник Урала. 2014. № 8. С. 10–15.
- Орина А.С., Гаврилова О.П., Гагкаева Т.Ю. и др. (Orina et al.) Симбиотические взаимоотношения грибов рода *Fusarium* и *Alternaria*, колонизирующих зерно овса // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 986–994.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.986rus>
- Торопова Е.Ю., Кириченко А.А., Казакова О.А. и др. (Toropova et al.) Альтернариоз зерна яровой пшеницы и ячменя в Западной Сибири и Восточном Зауралье // Защита и карантин растений. 2015. № 1. С. 20–22.
- Федеральная служба государственной статистики (FSSS). Бюллетени о состоянии сельского хозяйства (электронные версии)
<https://www.gks.ru/compendium/document/13277>
(дата обращения 24.04.2020).

Micromycetes *Alternaria* spp. and *Bipolaris sorokiniana* and Mycotoxins in the Grain from the Ural Region

A. S. Orina^{a,#}, O. P. Gavrilova^{a,##}, T. Yu. Gagkaeva^{a,###}, and Ph. B. Gannibal^{a,####}

^a All-Russian Institute of Plant Protection, 196608 St. Petersburg, Russia

[#] e-mail: orina-alex@yandex.ru

^{##} e-mail: olgavrilova1@yandex.ru

^{###} e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

^{####} e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

Alternaria and *Bipolaris* fungi are widely represented in the grain of wheat, barley, and oat harvested in the Ural Region. For the first time, the ubiquity of *Alternaria* fungi belonging to sections *Alternaria* and *Infectoriae* was confirmed using quantitative PCR. High *Alternaria* spp. infection (average infection rate 74%, the DNA content of section *Alternaria* 1999×10^{-4} pg/ng, the DNA content of section *Infectoriae* 723×10^{-4} pg/ng) led to contamination of grain with mycotoxins produced by these fungi. Among *Alternaria* mycotoxins tentoxin (up to 82 µg/kg) and tenuazonic acid were detected more often in grain samples compared to alternariol and its monomethyl ether. All analyzed mycotoxins were simultaneously identified in 12.5% of the samples. Alternariol was more frequently detected in the oat grain (40% of all samples; up to 5 µg/kg) than in the grain of wheat (22%; 19 µg/kg) and barley (20%; 26 µg/kg). Whereas, tenuazonic acid significantly more often contaminated samples of wheat (91%; up to 593 µg/kg) and oat (80%; 471 µg/kg) grain than barley (53%; 177 µg/kg). A positive relationship of the *Alternaria* sect. *Infectoriae* infection rate and tentoxin amount was found ($r = 0.40$, $p = 0.01$). The grain infection with *Bipolaris sorokiniana* was detected in 58.9% of samples while average infection rate was 6.4%. The infection rate and biomass content of *B. sorokiniana* in barley grain were significantly higher (8.9% and 109×10^{-4} pg/ng, respectively) than in grain of wheat and oat. Between the grain germination and the percentage of *Alternaria* fungi infection a positive relationship was revealed, and, conversely, a significant negative relationship was established between *B. sorokiniana* infection and the grain germination.

Keywords: fungi, germination, mycotoxins, quantitative PCR, small grain cereals, Ural Region