

МАРКЕРНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБОВ *ALTERNARIA*, *FUSARIUM* И *MICRODOCHIUM* КАК ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В МИКОБИОТЕ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Галгаева Т. Ю.¹, Гаврилова О. П.¹, Орина А. С.¹,
Аблова И. Б.², Беспалова Л. А.²

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608, Россия;

² ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко», центральная усадьба КНИИСХ, Краснодар, 350012, Россия
t.gagkaeva@mail.ru

Проведен анализ контаминации микромицетами зерна 17 сортов озимой пшеницы, выращенных в Краснодарском крае на естественном фоне инфекции. Кроме традиционной микологической оценки зараженности зерна грибами использовали методы, основанные на количественном выявлении метаболитов грибов, заведомо отсутствующих в растительной ткани. Определяли диапазоны содержания в зерне пшеницы ДНК грибов *Alternaria*, *Microdochium* и *Fusarium*, а также количества образуемых ими микотоксинов. Установлено обильное присутствие грибов *Alternaria* в зерне всех сортов. Впервые в России проведено количественное выявление в зерне видов грибов *Microdochium*. Показано, что содержание ДНК *M. nivale* значительно превышает содержание ДНК *M. majus*. ДНК представителей рода *Fusarium* также выявлено в зерне всех сортов, однако показано, что *F. graminearum* преобладал в комплексе фузариевых грибов по сравнению с другими видами. Установлен значительный разброс содержаний вторичного метаболита *F. graminearum* – дезоксиниваленола (ДОН), – в зерне всех сортов. Максимальное количество этого метаболита выявлено в зерне восприимчивого сорта Бригада, а минимальное – в зерне сортов Адель и Курс, которые обладали высокой относительной устойчивостью к патогенным грибам *Fusarium*. Доля ДНК *F. graminearum* в процентах от ДНК группы *Fusarium*, образующих трихотеценовые микотоксины, составляла от 6,1% до 100,9%. Этот показатель является индикатором устойчивости растений к заражению патогенами: значения выше 30% характерны для восприимчивых сортов. Выявлена достоверная положительная связь между контаминацией грибами *F. sporotrichioides* и *M. nivale*. В то же время, не установлена связь между наиболее обильно присутствующими в зерне грибами *Alternaria* и показателями его контаминации другими анализированными грибами. Результаты исследования показывают существенные различия реакции генотипов пшеницы на внедрение различных гетеротрофных грибов, и возможность использования количественных показателей для оценки устойчивости. Существенная вариабельность в зерне содержания маркерных метаболитов, присутствующих высокоагрессивным видам грибов, и стабильность этих показателей у сапротрофных организмов, может иметь принципиальное значение при выборе объективных количественных показателей оценки устойчивости растений к инфицированию патогенами.

Ключевые слова: микромицеты, зараженность зерна, ДНК, количественная ПЦР, микотоксины, ИФА.

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Галгаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С., Аблова И.Б., Беспалова Л.А. Маркерные метаболиты грибов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium* как инструмент оценки их взаимоотношений в микобиоте зерна пшеницы. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):7-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-7-15

Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Ablova I.B., Bepalova L.A. Distinctive metabolites of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi as a tool for assessing their relationship in micobiota of wheat grain. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):7-15. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-7-15

Distinctive metabolites of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi as a tool for assessing their relationship in micobiota of wheat grain

Gagkaeva T.Yu.¹, Gavrilova O.P.¹, Orina A.S.¹,
Ablova I.B.², Bepalova L.A.²

¹All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), Podbelskogo shosse, 3, St.Petersburg, 196608, Russia

²National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, central farmstead KNIISH, Krasnodar, 350012, Russia
t.gagkaeva@mail.ru

Fungal contamination of 17 winter wheat varieties grown in the Krasnodar region under the natural infections was analyzed. In addition to the traditional mycological analysis of infection with fungi, methods based on the quantitative detection of metabolites inherent in fungi and absent in the host plant were used. For this purpose, the ranges of DNA contents of *Alternaria*, *Fusarium* and *Microdochium* fungi, as well as mycotoxins produced by these fungi were characterized in the grain. Abundant presence of *Alternaria* fungi was detected without a significant difference between the varieties. A quantitative detection of the *Microdochium* fungi in grain was carried out at the first time in Russia and it was shown that the content of *M. nivale* DNA was significantly exceeds the content of *M. majus* DNA. The dominant of *F. graminearum* in the complex of *Fusarium* fungi in comparison to other species and the significant range of the content of the metabolites produced by this pathogen were shown. The high variation of contents of marker metabolites inherent in highly aggressive species of fungi and the stability of these parameters for saprotrophic organisms can be of fundamental importance in the selection of objective for quantitative measurements of plants resistant to patho-gens. The maximum amount of *F. graminearum* metabolites was found in the grains of susceptible Brigada. The minimum content of *Fusarium* metabolites was established in the grain of Adel and Kurs varieties, which are the relatively resistant to pathogenic *Fusarium* fungi. The proportion of *F. graminearum* DNA as a percentage of the DNA of *Fusarium* group forming trichothecene mycotoxins ranged from 6.1% to 100.9%. This value is an indicator of plant resistance to infection by pathogens. According to our observations, values above 30% are characteristic of susceptible varieties. A positive correlation was found between DNA contents of *M. nivale* and *F. sporotrichioides* fungi. Any significant relations between the most abundantly present fungi of *Alternaria* and the parameters of grain contamination by other analyzed fungi have not been revealed. Diversity of the reactions of wheat genotypes to the invasion of various heterotrophic fungi and the possibility of using objective quantitative assessment of resistance were shown.

Keywords: micromycetes, grain infection, DNA, quantitative PCR, mycotoxins, ELISA.

УДК 632.4:633.11

Поступила в редакцию 03.10.2018

Принята к публикации 08.11.2018

Микобиота зерна пшеницы представлена совокупностью различных таксономических групп грибов. Среди них часто встречаются виды, относящиеся к родам *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link, *Microdochium* Syd. & P. Syd. и другие грибы, отличающиеся своими физиолого-биохимическими свойствами. Они могут оказывать разностороннее действие на состояние зерна и развивающегося из него растения. Некоторые из них угнетают прорастание семян и вызывают корневые гнили, другие – стимулируют развитие растений.

Накопление первичных метаболитов (белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот) характеризует скорость образования биомассы грибов и глубину колонизации растения, тогда как образуемые вторичные метаболиты выполняют адаптационную функцию, в том числе преодоление иммунного ответа растений на внедрение, и сдерживание размножения в тканях растения конкурентных видов.

При взаимодействии растений и инфицирующих их грибов возникает каскад метаболических реакций, зависящих от сочетания специфических характеристик организмов и среды их обитания. Заражение зерна пшеницы грибами зависит от условий, складывающихся в период формирования колоса и зерновки, устойчивости сорта, наличия инфекционного фона и др. Разнообразие патогенных свойств гетеротрофных организмов обуславливает различия в защитных реакциях растения-хозяина и, по принципу обратной связи, оказывает влияние на содержание образуемых метаболитов. Анализ содержания в растительной ткани метаболитов грибов позволяет характеризовать взаимодействия растения и патогена, что особенно важно в случаях, когда инфицирование происходит бессимптомно.

Постоянное и длительное существование различающихся по свойствам микроорганизмов на одном субстрате неизменно приводит к установлению определенных связей между ними. Зачастую решающую роль в том, кто из представителей микобиоты получит преимущество, играют складывающиеся в определенный момент условия окружающей среды. Показано, что между грибами *Fusarium* spp. и *Alternaria* spp. существуют различия в стратегии колонизации растений пшеницы: для активного распространения представителей *Fusarium*, которые являются более агрессивными патогенами и способны легко заражать здоровые растения, необходимы более влажные и прохладные условия, в отличие от грибов *Alternaria* (Schiro et al., 2018). Кроме того, доминирование высоко агрессивного патогена *F. graminearum* Schwabe, как правило, имеет обратную связь с выявлением других грибов (Nicolaisen et al., 2014). Результаты исследований, направленных на сравнение конкурентных свойств грибов *F. graminearum*, *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc., *F. poae* (Peck) Wollenw. и *Microdochium* sp. при заражении ими колоса пшеницы показали, что, несмотря на наличие смешанной инфекции, в одном колосе доминирует один вид гриба (Siou et al., 2015).

Современная практика растениеводства требует постоянного совершенствования методов получения результатов, объективно отражающих взаимодействия растения и патогена. Они включают как оценку изменений биохимического состояния самого растений (Smirnova et al., 2018), так и определение присутствия патогенов и их метаболитов в растительных тканях (Orina et al., 2017). Кроме микологического анализа зараженности зерна грибами в настоящее время используют методы, основанные на количественном выявлении метаболитов, заведомо отсутствующих в растительной ткани, но присущих грибам (Gagkaeva et al., 2017). Такой подход позволяет охарактеризовать иммунный ответ сортов зерновых культур по метаболитным маркерам заселяющих их грибов – по количеству ДНК, синтезируемой в процессе накопления биомассы гриба, и содержанию токсичных метаболитов, характерных для конкретного таксона.

Целью данного исследования являлся анализ взаимоотношений грибов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium* в зерне озимой пшеницы различных сортов через содержание метаболитов: ДНК грибов и продуцируемых ими микотоксинов.

Материалы и методы

Образцы зерна

Анализировали 17 сортов озимой пшеницы селекции ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко», выращенных в Краснодарском крае в 2016 году: Адель, Алексеич, Антонина, Баграт, Безостая 100, Бригада, Васса, Велена, ГРОМ, Гурт, Курс, Лебедь, Морозко, Память, Таня, Утриш, Юка. Сорта пшеницы возделывали в условиях естественного инфекционного фона на экспериментальном поле ФГБНУ «НЦЗ им. П. П. Лукьяненко» без применения фунгицидов на делянках площадью 10 кв. м по предшественнику подсолнечник. После уборки урожая пшеницы в оптимальные сроки были отобраны средние образцы зерна каждого сорта, используемые в дальнейшем для лабораторных анализов.

Микологический анализ зараженности зерна

Для оценки внутренней зараженности и выявления видового состава сообщества микромицетов, поверхность зерен каждого образца (не менее 100 шт.) стерилизовали 5% гипохлоритом натрия, затем отмывали стерильной водой. В чашки Петри на поверхность картофельно-сахарозной агаризованной среды (КА), в которую предварительно вносили раствор смеси антибиотиков HyClone™ (GE Healthcare Life Sciences, Австрия) в концентрации 1 мл/л и раствор Triton X-100 (Panreac, Испания) в концентрации 0,4 мкл/л, раскладывали поверхностно стерилизованные зерна и инкубировали их при 24°C в темноте. Через 7 суток проводили учет внутренней зараженности зерна грибами: подсчитывали их численность и определяли видовую принадлежность (Gerlach, Nirenberg, 1982; Ellis, 1971; Samson et al., 2002).

**Таблица 1. Последовательности праймеров и проб,
протоколы амплификации кПЦР, использованные в исследовании**
Table 1. The list of primers and probes and the protocols of quantitative PCR used in this study

Целевой объект	Название праймеров и проб	Нуклеотидные последовательности праймеров и проб (5'→3')	Протоколы амплификации	Литературный источник
Пшеница	Hor1,f	TCCTGCGGTTTGAGGGTGAC	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Nicolaisen et al., 2009
	Hor2,r	GGCCCTTGTACCAGTCAAGGT		
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	PfusF	CCGCGCCCCGTAAAACG	95° - 3 мин; [95° - 10 с; 60° - 10 с; 72° - 20 с]×40	Yli-Mattila et al., 2004
	FspoR	ACTGTGTTTGACACAGATC		
<i>Microdochium majus</i>	Mmajus1f	AACCCCTCCCGGGTCAG	50° - 2 мин; 95° - 10 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Nielsen et al., 2013
	Mmajus1r	GGATAAACGACACTTGAAGACAGAAAA		
<i>Microdochium nivale</i>	Mniv1f	TTGGCTTGACAAACAATACTTTT	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Yli-Mattila et al., 2008
	Mniv1r	AGCACAAACAGGCGTGGATAAG		
<i>Fusarium graminearum</i>	TMFg12,f	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Halstensen et al., 2006
	TMFg12,r	CGAAGCATATCCAGATCATCCA		
	TMFg12,p	FAM-TGAGAATGTCTTGAGGCAATGCGAACTTT-BHQ1		
Tri- <i>Fusarium</i> *	TMTRI,f	CAGCAGMTRCTCAAGGTAGACCC	95° - 3 мин; [95° - 15 с; 60° - 60 с]×40	Pavón et al., 2012
	TMTRI,r	AACGTGTAYACRACCATGCCAAC		
	TMTRI,p	Cy5-AGCTTGGTGTGGGATCTGTCTTACCG-BHQ2		
<i>Alternaria</i>	DirITSAlt	TGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTCCT	95° - 3 мин; [95° - 10 с; 60° - 60 с; 72° - 3 с]×40	
	InvITSAlt	CGACTTGTGCTGCGCTC		
	AltTM	FAM-AACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAAT-TAMRA		

* Tri-*Fusarium* – виды грибов, способные образовывать трихотеценовые микотоксины.

Молекулярно-генетический анализ зараженности зерна

Зерно каждого образца (20 г) гомогенизировали в стерильных размольных стаканах на мельнице Tube Mill Control (IKA, Германия). Выделение общей ДНК из 200 мг полученной муки проводили с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). С помощью этого набора также выделяли ДНК из культур типовых штаммов *A. tenuissima* (Nees et T. Nees: Fr.) Wiltshire (MGP556081), *F. graminearum* (MGF58775), *F. sporotrichioides* Sherb. (MGF163303), *M. majus* (Wollenw.) Glynn & S.G. Edwards (MGF58924), *M. nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett (MGF58876), выращенных на КСА. Типовые штаммы грибов хранятся в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР.

С помощью количественной ПЦР (кПЦР) во всех пробах ДНК, экстрагированных из образцов зерна, определяли содержание ДНК пшеницы, ДНК грибов рода *Alternaria*, ДНК группы видов *Fusarium*, способных к продуцированию трихотеценовых микотоксинов (Tri-*Fusarium*), отдельно ДНК двух видов из этой группы – *F. graminearum*, продуцирующего ДОН, и *F. sporotrichioides*, продуцирующего Т-2 токсин, а также ДНК двух представителей рода *Microdochium* – *M. nivale* и *M. majus* (Табл. 1). Концентрации полученной ДНК из муки и штаммов грибов оценивали, используя флуориметр Qubit 2.0 с набором реагентов Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Исходную концентрацию ДНК штаммов грибов разбавляли до 10 нг/мл и использовали для построения калибровочной кривой в

десятикратных последовательных разведениях от 0,1 до 10⁻⁶ нг/мкл. ДНК, выделенную из зерна, доводили до рабочих концентраций в диапазоне от 2-50 нг/мкл. Все реакции проводили на термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad, США) минимум двукратно, обработку первичных данных – с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 1.6. Содержание ДНК грибов представляли в виде доли от содержания ДНК пшеницы (пг/нг), поскольку такой прием точнее отображает результат взаимодействия растения и грибов.

Анализ микотоксинов в зерне

С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в зерне всех образцов определяли количества ДОН, Т-2 токсина и альтернариол (АОЛ). Микотоксины экстрагировали из 1 г муки, добавляя 5 мл водного раствора ацетонитрила (84:16, v/v), в условиях постоянного перемешивания на шейкере S-3M (ELMI) при 300 об/мин в течение 14 – 16 часов. Анализ выполняли с помощью диагностических тест-систем «Дезоксиниваленол-ИФА», «Т-2 токсин-ИФА» и «Альтернариол-ИФА» (ВНИИВСГЭ). Нижние пределы чувствительности метода составляли 20 мкг/кг для ДОН и 50 мкг/кг для АОЛ, 4 мкг/кг для Т-2 токсина.

Статистическая обработка

Лабораторные анализы выполнены как минимум двукратно. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.0 (ANOVA). Коэффициент вариации (V, %) рассчитывали, как процентное отношение среднеквадратического отклонения к средней арифметической ряда показателей.

Таблица 2. Зараженность грибами и содержание микотоксинов в зерне сортов пшеницы, выращенных на естественном инфекционном фоне (Краснодарский край, 2016)
Table 2. Fungal infection and mycotoxins content in grain of wheat varieties grown under natural infection (Krasnodar region, 2016)

Сорт пшеницы Wheat variety	Зараженность зерна грибами, % Fungal infection of grain, %			Количество микотоксинов, мкг/кг Mycotoxins content, µg/kg	
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Microdochium</i>	ДОН DON	Т-2 токсин T-2 toxin
Адель / Adel	89±5	2±1	0	0	0
Алексейч / Alekseich	81±2	2±1	3±1	0	12±1
Антонина / Antonina	68±7	6±1	2	62±10	0
Баграт / Bagrat	81±5	5,0±0,5	1±0,5	130±25	0
Безостая 100 / Bezostaya 100	93±6	6±1	0	43±13	0
Бригада / Brigada	86±3	11±2	0	421±20	0
Васса / Vassa	83±2	10±1	4±1	134±6	0
Велена / Velenia	91±6	6±1	10±2	166±5	0
ГРОМ / GROM	77±8	8±2	3±1	189±9	5,5±0,5
Гурт / Gurt	92±3	2	5,0±0,5	33±3	6±0
Курс / Kurs	85±5	4±1	4±2	50±23	0
Лебедь / Lebed'	83±8	7±2	2	11±15	5±1
Морозко / Morozko	89±5	6	3±1	54±3	5,5±0,5
Память / Pamyat'	89±6	6±2	2	172±33	0
Таня / Tanya	93±2	4	0	12±17	0
Утриш / Utrish	78±4	15,0±0,5	3±1	162±5	20±3
Юка / Yuka	74±1	3,0±0,5	15±3	24±6	8,5±0,5
V, % ^a	10,4	57,3	115,5	109,1	153,2

^a В таблице приведены средние значения показателей ± доверительный интервал, при уровне значимости $p < 0,05$. ^b V – коэффициент вариации.

Результаты

Зараженность зерна грибами

Наиболее обильно в микобиоте зерна всех анализируемых сортов пшеницы были представлены грибы рода *Alternaria*. Зараженность этой группой грибов колебалась в пределах от 68 до 93 % зерновок (Табл. 2).

Зараженность зерна грибами *Fusarium* также была выявлена у всех сортов и составляла в среднем 6,1 %. Доминирующую долю (34,8 %) от общего числа выявленных фузариевых грибов занимал *F. graminearum*. Реже встречались изоляты видов *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* (Corda) Sacc., *F. incarnatum* (Desm.) Sacc., *F. equiseti* (Corda) Sacc. и *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Выявлена значительная встречаемость грибов рода *Microdochium* – в зерне 13 из 17 анализируемых сортов пшеницы, с максимальной зараженностью 15% зерновок.

Кроме представителей родов *Alternaria*, *Fusarium* и *Microdochium*, которых можно отнести к доминирующим составляющим микобиоты зерна, также были выделены изоляты других грибов, идентифицированных как виды родов *Bipolaris* Shoemaker, *Cladosporium* Link, *Epicoccum* Link, *Penicillium* Link и *Phoma* Sacc.

На основании результатов микологического анализа были выбраны объекты для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Содержание ДНК грибов в зерне

Выявленное количество ДНК грибов *Alternaria* в зерне пшеницы было высоким и в среднем составило 1,5–4,0 пг/нг, при этом в зерне различных сортов не обнаружено существенного варьирования значений этого показателя (Рисунок). Также в зерне обнаружено высокое количество ДНК группы Tri-*Fusarium*, с диапазоном значений 0,14–0,42 пг/нг. Содержание ДНК *F. graminearum* в зерне пшеницы значительно варьировало 0,01–0,43 пг/нг. Такие существенные различия по содержанию ДНК этого патогена позволили распределить все анализируемые сорта на три группы. Первую группу сортов, с низким содержанием ДНК *F. graminearum* (не более 0,03 пг/нг) составили Адель, Таня, Лебедь, Курс, Гурт и Юка. Ко второй группе сортов, с диапазоном выявленных количеств ДНК гриба 0,03–0,10 пг/нг, были отнесены Алексейч, Морозко, ГРОМ, Васса, Баграт и Безостая 100. Третью группу сортов, содержащих наибольшее количество ДНК *F. graminearum* (более 0,10 пг/нг), составили Антонина, Утриш, Память, Велена и Бригада. Количество выявленной во всех образцах зерна ДНК *F. sporotrichioides* было существенно меньше, чем ДНК *F. graminearum*, но также значительно

варьировало в зависимости от сорта. Сорта Память и Курс содержали наименьшие количества ДНК *F. sporotrichioides* – $5,7 \times 10^{-4}$ и $7,8 \times 10^{-4}$ пг/нг, соответственно, а наибольшим значением этого показателя характеризовался сорт Юка – 0,05 пг/нг. С помощью кПЦР выявлено присутствие в зерне пшеницы двух видов *Microdochium*: *M. nivale* и *M. majus*. Количество ДНК гриба *M. nivale* в зерне составило 0,06–0,93 пг/нг и было в среднем в три раза выше, по сравнению с количеством *M. majus* (0,042–0,20 пг/нг).

Содержание микотоксинов в зерне

В зерне сортов пшеницы, выращенных в естественных условиях, ДОН был выявлен во всех сортах, кроме Адель и Алексеич. Максимум этого микотоксина (420 мкг/кг) был выявлен в зерне сорта Бригада. Т-2 токсин, образуемый некоторыми видами грибов *Fusarium*, обнаружен в зерне только шести сортов в незначительных количествах (от 5 до 20 мкг/кг). Микотоксин АОЛ, который является одним из метаболитов, образуемых видами грибов *Alternaria*, не был обнаружен в образцах зерна всех сортов пшеницы.

Обсуждение

Выявленные диапазоны содержания в зерне метаболитов различных видов грибов демонстрируют генетическую детерминированность взаимоотношений растений и заселяющих их гетеротрофных организмов, что является веским основанием для использования количественных показателей в качестве критериев устойчивости растений к патогенам. Создание генотипов с групповой устойчивостью представляет серьезную проблему, особенно если визуальный анализ не позволяет корректно провести сравнительную оценку устойчивости/восприимчивости, поскольку видимые симптомы присутствия патогенов часто не наблюдаются. Совмещение классических и современных методов количественной оценки реакции растений на внедрение грибов даёт возможность приблизиться к пониманию природы механизмов взаимодействия компонентов. Трофические связи нескольких организмов различной патогенности, совместно населяющих растение, и его иммунологический ответ могут коренным образом отличаться от редко встречающихся в естественных биоценозах взаимоотношений конкретного патогена и растения-хозяина, – модели, часто используемой в условиях искусственной инокуляции (Gagkaeva et al., 2018). Для совершенствования создания устойчивых по заданным параметрам генотипов необходимо развитие исследований взаимодействия продуцентов и консументов различных порядков в агробиоценозах и выявление механизмов генетической реакции растений (Vilkova, 2000). Нами установлено, что содержание ДНК грибов *Alternaria*, так же, как и число зараженных ими зерен, были высокими без существенной разницы между сортами. Подтверждением служат коэффициенты вариации (V) этих показателей, которые составили 25,9 и 10,4%, соответственно. Низкие значения данного коэффициента, демонстрирующего однородность показателя изменчивости признака, свидетельствуют об отсутствии специфических реакций растений на проникновение гриба. По всей видимости, поскольку грибы рода *Alternaria* взаимодействуют с растениями

пшеницы как сапротрофы, то их обилие в растительной ткани зависит в основном, от условий среды и не вызывает специфического иммунного ответа растения. Один из наиболее распространенных вторичных метаболитов грибов рода *Alternaria* – АОЛ (Andersen, Frisvad, 2004; Zwickel et al. 2018) в нашем исследовании в зерне всех 17 сортов пшеницы не выявлен. Согласно опубликованным данным, этот микотоксин встречается в зерне пшеницы реже и более низких количествах, по сравнению с другими злаковыми культурами (Burkin, Koponenko, 2011). Тем не менее, обнаружение АОЛ не является чем-то исключительным, например, ранее этот микотоксин был выявлен в зерне 29% анализируемых образцов овса, выращенных на северо-западе России, и его максимальное количество достигало 1545 мкг/кг (Burkin et al., 2015). К видам грибов *Fusarium*, продуцирующим трихотеценовые микотоксины, относятся многие широко встречающиеся виды, среди которых есть как высокоагрессивные патогены *F. graminearum* и *F. sporotrichioides*, так и виды, характеризующиеся как сапротрофы и эндофиты, например, *F. langsethiae* Torp & Nirenberg, продуцирующий Т-2 токсин, или *F. poae* и *F. cerealis* (Cooke) Sacc., образующие ниваленол. По всей видимости, кроме высокоагрессивных патогенов, присутствие которых определяется устойчивостью сорта, возможную нишу в трофических отношениях с растением занимают грибы с сапротрофным типом питания. Коэффициент вариации общего числа всех фузариевых грибов в зерне сортов пшеницы составил 57,3%. Такая же ситуация наблюдалась и в случае оценки содержания ДНК грибов Tri-*Fusarium*, которое имело незначительный разброс по сортам (V=36,0 %). Таким образом, суммарная биомасса грибов Tri-*Fusarium* в зерне сортов пшеницы была достаточно выровненной. В то же время содержания ДНК *F. graminearum* и *F. sporotrichioides* варьировали значительно (V=129,3–133,0 %), показывая существенное различие реакции генотипов на внедрение агрессивных патогенов.

Существует устоявшееся мнение, что устойчивость сорта к одному виду гриба *Fusarium* сохраняется в случае его заражения другими видами грибов этого рода. Ранее это было подтверждено, как минимум, для видов *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichioides* (Mesterhazy, 2002). Однако все эти виды грибов являются относительно агрессивным и реакцию растений на их внедрение оценивали на фоне искусственной инокуляции. Мы же выявляли взаимоотношения различающихся по патогенности видов, естественным образом взаимодействующих с растениями. Выявленная достоверная положительная связь между содержаниями ДНК группы Tri-*Fusarium* и ДНК гриба *F. graminearum* ($r=0,68$, $p < 0,05$) подчеркивает преобладание этого патогена в комплексе трихотеценпродуцирующих фузариевых грибов по сравнению с другими видами (Табл. 3).

Если оценить долю ДНК *F. graminearum* в процентах от ДНК группы Tri-*Fusarium*, то этот показатель по сортам будет колебаться от 6,1 % до 100,9 %. По нашему мнению, если такое соотношение более 30 %, то сорт следует характеризовать как восприимчивый.

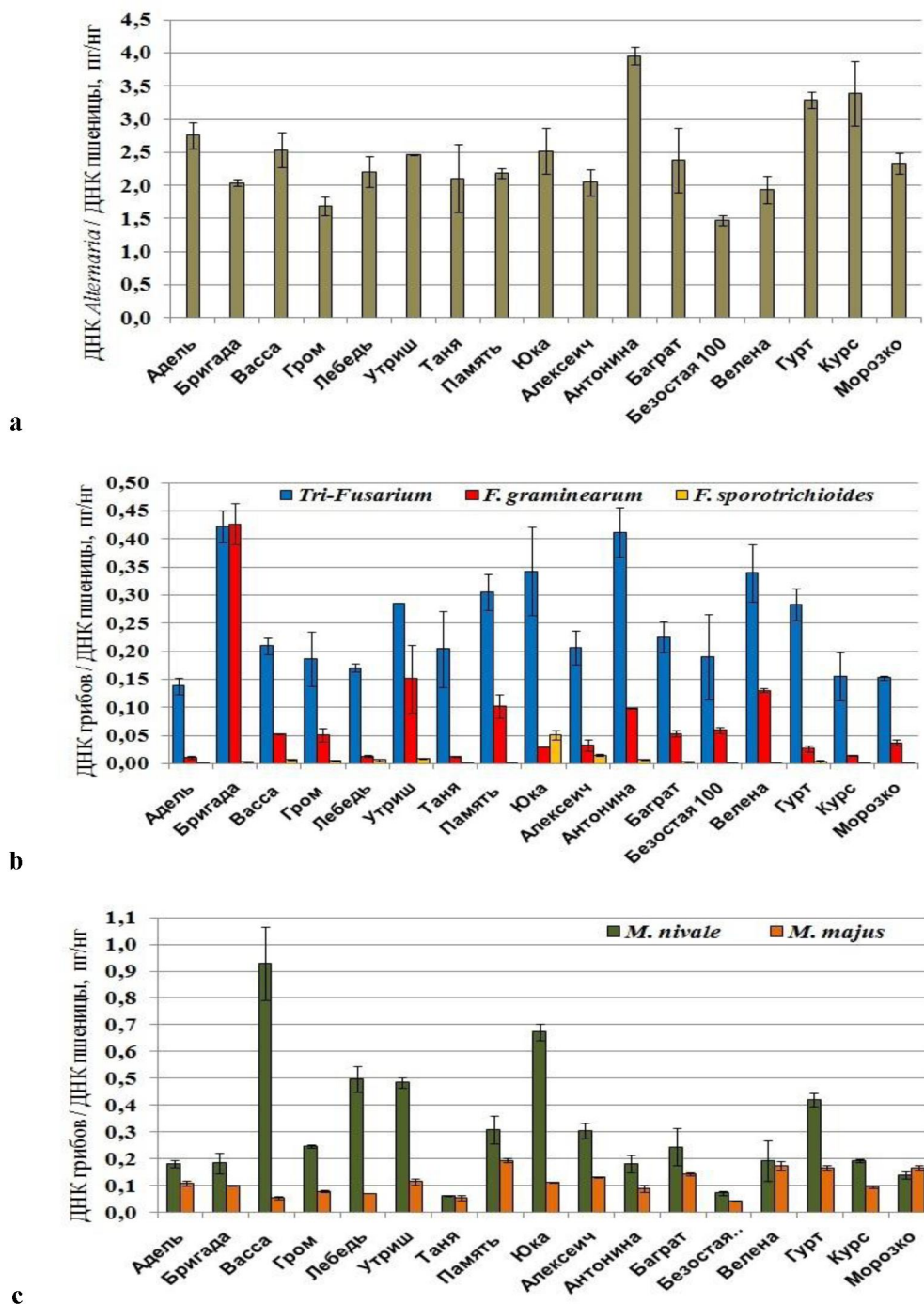


Рисунок. Содержание ДНК грибов (а – *Alternaria*, б – *Fusarium*, в – *Microdochium*) в зерне сортов пшеницы, выращенных на естественном инфекционном фоне (Краснодарский край, 2016)

Figure. The content of fungal DNA (а – *Alternaria*, б – *Fusarium*, в – *Microdochium*) in grain of wheat varieties grown under natural infection (Krasnodar region, 2016)

К таким сортам были отнесены Бригада (100,9 %), Утриш (53,1 %), Велена, Память, Безостая 100 (38,5–31,4%). Чем сорт устойчивее к заражению патогеном, тем меньше доля ДНК *F. graminearum*: сорта Адель, Лебедь, Таня, Юка, Гурт и Курс могут быть охарактеризованы как

относительно устойчивые (6,1–9,4%). Несомненно, факт ингибирования устойчивыми сортами развития высоко-агрессивных патогенов в тканях растений и их «либерализм» в отношении сапротрофов в дальнейшем должен быть изучен с точки зрения механизмов иммунитета. Тем

не менее, в случае выбора объективных количественных методов такой подход может оказать определенную помощь в диагностике устойчивых к фузариозу растений.

Таблица 3. Взаимосвязь показателей контаминации грибами и микотоксинами зерна пшеницы
Table 3. Relationship between measured parameters characterizing contamination of wheat grains by fungi and mycotoxins

Показатели Indicators		Зараженность зерна грибами Fungal infection of grain			ДНК грибов Fungal DNA						ДОН DON
		<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Microdochium</i>	<i>Alternaria</i>	Tri- <i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>M. nivale</i>	<i>M. majus</i>	
Зараженность зерна Fungal infection of grain	<i>Fusarium</i>	–0,31									
	<i>Microdochium</i>	–0,26	–0,18								
ДНК грибов Fungal DNA	<i>Alternaria</i>	0,40	–0,22	0,09							
	Tri- <i>Fusarium</i>	–0,22	0,27	0,31	0,21						
	<i>F. graminearum</i>	–0,13	0,59*	–0,15	–0,17	0,68**					
	<i>F. sporotrichioides</i>	–0,05	–0,33	0,78**	0,17	0,33	–0,18				
	<i>M. nivale</i>	–0,07	0,26	0,46	0,13	0,07	–0,12	0,47			
	<i>M. majus</i>	0,31	–0,21	0,29	0,10	0,25	0,09	0,15	–0,10		
Микотоксины Mycotoxins	ДОН	–0,15	0,66**	–0,13	–0,28	0,55*	0,90**	–0,27	–0,02	0,13	
	T-2 токсин	–0,14	0,30	0,25	–0,07	–0,00	–0,04	0,39	0,33	0,14	–0,11

Коэффициенты корреляции существенны при уровне значимости * $p < 0,05$ и ** $p < 0,001$.

Выявлена высокая достоверная положительная связь между присутствием ДНК *F. graminearum* и содержанием в зерне образуемого им метаболита ДОН ($r=0,90$, $p<0,001$). Максимальное количество ДОН выявлено в зерне сорта Бригада, также содержащего максимальное количество ДНК *F. graminearum*. Кроме того, содержание ДОН было положительно связано с общим числом выявленных в зерне грибов *Fusarium* ($r=0,66$, $p<0,001$) и ДНК Tri-*Fusarium* ($r=0,55$, $p<0,05$). Микотоксин ДОН, являясь фактором патогенности, способствует подавлению представителей сопутствующей микобиоты – конкурентов за субстрат и питательные вещества, необходимые для роста и развития патогенов (Audenaert et al., 2013). С этой точки зрения интересно проследить доли конкурирующих за субстрат грибов *F. graminearum* и *F. sporotrichioides* в группе грибов Tri-*Fusarium*. Минимальные значения доли гриба *F. sporotrichioides* выявлены в зерне сортов, где содержание ДНК *F. graminearum* значительно, за исключением сортов

Адель и Курс, которые, по всей видимости, обладают уникальной устойчивостью к патогенам рода *Fusarium*.

Достоверной связи между содержаниями ДНК *F. sporotrichioides* и ДНК Tri-*Fusarium* не выявлено, что обусловлено низкой зараженностью зерна грибом *F. sporotrichioides*, которая также привела к отсутствию какой-либо связи (при $p<0,05$) между содержанием ДНК этого гриба и его метаболита – Т-2 токсина. Хотя в данном исследовании невозможно ранжировать сорта по содержанию Т-2 токсина, однако максимальное содержание этого микотоксина установлено в зерне двух сортов Гурт и Юка, где также доля ДНК гриба *F. sporotrichioides* была наиболее высокой (11,6 – 15,1%).

Впервые в России проведено количественное выявление в зерне видов грибов рода *Microdochium*. Установлено, что содержание ДНК *M. nivale* значительно превышает содержание ДНК *M. majus*. Этот факт объясняет выявленную достоверную положительную связь ($r=0,46$, $p<0,05$) между числом зараженных зерен грибами

Microdochium и количеством ДНК *M. nivale*. Коэффициент вариации содержания ДНК в зерне пшеницы был выше у гриба *M. nivale* (V=71 %), по сравнению с *M. majus* (V=47 %). Виды *Microdochium* не образуют микотоксины и как эндофиты сопровождают растение на протяжении всего жизненного цикла. Однако в отдельные годы в условиях ослабления растений под действием абиотических и биотических факторов, они приводят к визуально заметным заболеваниям зерновых культур, вызывая снежную плесень на посевах озимых культур в весенний период, а позднее пятнистость листьев, паршу колоса и зерна (Gagkaeva et al., 2017). Своевременное количественное выявление их присутствия в растениях чрезвычайно важно и позволит прогнозировать развитие ситуации во время вегетации. В нашем исследовании выявлена значительная положительная корреляция между зараженностью зерна грибом *M. nivale* и количеством ДНК *F. sporotrichioides* ($r=0,78$, $p<0,001$). Связи между наиболее обильно присутствующими грибами *Alternaria* и показателями зараженности зерна другими анализированными грибами и их микотоксинами не выявлено. На сегодняшний день очень мало сведений о механизмах реакции сортов на инфицирование зерна представителями различных таксономических групп грибов. Очевидно, что иммунологический ответ организма растения может быть различен при заражении зерна грибами, отличающимися по физиологическим характеристикам. Соответствие реакции сортов по устойчивости к различным представителям сообщества гетеротрофных организмов, обитающих на зерне, должно являться темой будущих исследований.

Благодарности: исследование выполнено при поддержке проекта РФФ № 14-26-00067.

References/Туператупа

- Andersen B, Frisvad JC (2004) Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J Agric Food Chem* 52(25): 7507–7513. doi:10.1021/jf048727k
- Audenaert K, Vanheule A, Höfte M, Haesaert G (2013) Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins (Basel)* 6: 1–19. doi:10.3390/toxins6010001
- Burkin AA, Kononenko GP (2011) Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. *Appl Biochem Microbiol* 47(1): 72–76. doi:10.1134/S0003683811010030
- Burkin AA, Kononenko GP, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu (2015) Mycotoxicological inspection of oat grain and its processing products (Mikotoksikologicheskoe obsledovanie zema ovsy i produktov ego pererabotki). *Sovremennaya mikologiya v Rossii – Current mycology in Russia* 5: 221–223 [in Russian] (Буркин А. А., Кононенко Г. П., Гаврилова О. П., Галкаева Т. Ю. Микотоксикологическое обследование зерна овса и продуктов его переработки // Современная микология в России. 2015. Т. 5. С. 221–223).
- Ellis MB (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Orina AS, Blinova EV, Loskutov IG (2017) Response of wild *Avena* species to fungal infection of grain. *The Crop Journal* 5(6): 499–508. doi: 10.1016/j.cj.2017.04.005
- Gagkaeva TYu, Orina AS, Gavrilova OP, Aablova IB, Bepalova LA (2018) Characterization of resistance of winter wheat varieties to *Fusarium* head blight (Harakteristika sortov ozimoy pshenicy po ustojchivosti k fuzariozu zema). *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 22 (6): 685–692 [in Russian] (Галкаева Т. Ю., Орина А. С., Гаврилова О. П., Аблова И. Б., Беспалова Л. А. Характеристика сортов озимой пшеницы по устойчивости к фузариозу зерна // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 6. С. 685–692). doi:10.18699/VJ18.411
- Gambal PhB (2018) Factors affecting *Alternaria* appearance in grains in European Russia (Izuchenie faktorov, vliyayushchih na razvitiye alt'ernarioza zema u zlakov, vozdel'yaemykh v evropejskoj chasti Rossii). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya – Agricultural Biology* 53(3): 605–615 [in Russian] (Гамбал Ф. Б. Изучение факторов, влияющих на развитие альтернариоза зерна у злаков, возделываемых в европейской части России // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 3. С. 605–615). doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.605rus
- Gerlach W, Nirenberg HJ (1982) *The genus Fusarium — a pictorial atlas*. Berlin: Dahlem.
- Halstensen AS, Nordby KC, Eduard W, Klemsdal SS (2006) Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. *J Environ. Monit* 8: 1235–1241. doi: 10.1039/b609840a
- Kahl SM, Ulrich A, Kirichenko AA, Müller ME (2015) Phenotypic and phylogenetic segregation of *Alternaria infectoria* from small-spored *Alternaria* species isolated from wheat in Germany and Russia. *J Appl Microbiol* 119(6): 1637–1650. doi:10.1111/jam.12951
- Lawrence DP, Rotondo F, Gambal PhB (2016) Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycol Prog* 15:3. doi:10.1007/s11557-015-1144-x
- Mesterházy A, Bartók T, Kászonvi G, Varga M, Tóth B, Varga J (2005) Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *Eur J Plant Pathol* 112: 267–281. doi:10.1007/s10658-005-2853-9
- Nicolaisen M, Justesen AF, Knorr K, Wang J, Pimmschmidt HO (2014) Fungal communities in wheat grain show significant co-existence patterns among species. *Fungal Ecol* 11: 145–153. doi: 10.1016/j.funeco.2014.06.002
- Nicolaisen M, Suproniene S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen AF (2009) Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J Microbiol Methods* 76: 234–240. doi: 10.1016/j.mimet.2008.10.016
- Nielsen LK, Justesen AF, Jensen JD, Jørgensen LN (2013) *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop Prot* 43: 192–200. doi: 10.1016/j.cropro.2012.09.002
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu, Loskutov IG (2017) Symbiotic relationships between aggressive *Fusarium* and *Alternaria* fungi colonizing oat grain (Simbioticheskie vzaimootnosheniya gribov roda *Fusarium* i *Alternaria*, koloniziruyushchih zerno ovsy). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya – Agricultural Biology* 52(5): 986–994 [in Russian] (Орина А. С., Гаврилова О. П., Галкаева Т. Ю., Лоскутов И. Г. Симбиотические взаимоотношения грибов рода *Fusarium* и *Alternaria*, колонизирующих зерно овса // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 986–994). doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.986rus
- Pavón MÁ, González I, Martín R, García Lacarra T (2012) ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. *Food Microbiol* 32: 165–171. doi:10.1016/j.fm.2012.05.006
- Rotem J (1994) *The genus Alternaria. Biology, epidemiology and pathogenicity*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002) *Introduction to food- and airborne fungi*. Sixth Ed. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmelcultures.
- Schiro G, Verch G, Grimm V, Müller MEH (2018) *Alternaria* and *Fusarium* fungi: differences in distribution and spore deposition

- in a topographically heterogeneous wheat field. *J Fungi* (Basel) 4: 63. doi:10.3390/jof4020063
- Siou D, Gélisse S, Laval V, Suffert F, Lammou C (2015) Mutual exclusion between fungal species of the *Fusarium* head blight complex in a wheat spike. *Appl Environ Microbiol* 81(14): 4682–4689. doi:10.1128/AEM.00525-15
- Smirnova OG, Shumnyj VK, Kochetov AV (2018) The gene network and the database of gene of resistance of wheat to pathogenic fungi (Gennaya set' i baza dannyh genov ustojchivosti pshenicy k patogennym gribam). *Fiziologiya rastenij – Russian Journal of Plant Physiology* 65(3): 181–195 [in Russian] (Смирнова О. Г., Шумный В. К., Кочетов А. В. Генная сеть и база данных генов устойчивости пшеницы к патогенным грибам // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 3. С. 181–195). doi:10.7868/S0015330318030028
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, de Oliveira Rocha L (2018) Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr Opin Food Sci* 23: 57. doi: 10.1016/j.cofs.2018.05.002
- Vilkova NA (2000) Plant immunity against pest organisms and its role in stabilizing agroecosystems and plant growing (Immunitet rastenij k vrednym organizmam i ego biocenoticheskoe znachenie v stabilizacii agroekosistem i povyshenii ustojchivosti rastenievodstva). *Vestnik zashchity rastenij – Plant Protection News* (2): 3–15. [in Russian] (Вилкова Н. А. Иммуитет растений к вредным организмам и его биоценотическое значение в стабилизации агроэкосистем и повышении устойчивости растениеводства // Вестник защиты растений. 2000. № 2. С. 3–15).
- Yli-Mattila T, Paavananen-Huhtala S, Jestoi M, Parikka P, Hietaniemi V, Gagkaeva T, Sarlin T, Haikara A, Laaksonen S, Rizzo A (2008) Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch Phytopathology Plant Protect* 41: 243–260. doi:10.1080/03235400600680659
- Zwickel Th, Kahl SM, Rychlik M, Müller MEH (2018) Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi – do mult toxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Front Microbiol* 9: 1368. doi:10.3389/fmicb.2018.01368