



ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2021 ТОМ
VOLUME 104 ВЫПУСК
ISSUE 3



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

КОНТАМИНАЦИЯ ЗЕРНА В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ ГРИБАМИ *ALTERNARIA* И ИХ МИКОТОКСИНАМИ

А.С. Орина^{1*}, О.П. Гаврилова¹, Т.Ю. Гагкаева¹, Н.Н. Гогина²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Сергиев Посад

* ответственный за переписку, e-mail: orina-alex@yandex.ru

Впервые, с помощью реал-тайм ПЦР, подтверждена высокая повсеместная встречаемость грибов рода *Alternaria*, относящихся к двум секциям *Alternaria* и *Infectoriae*, в зерне пшеницы, ячменя и овса, выращенных в Западной Сибири в 2018–2019 гг. Содержание ДНК грибов секции *Alternaria* варьировало от 53×10^{-4} до 21731×10^{-4} пг/нг и в среднем превышало содержание ДНК грибов секции *Infectoriae* в 4.5–14.6 раз, в зависимости от вида зерновой культуры и года урожая. В зерне овса количество ДНК грибов обеих секций в среднем было ниже, чем в зерне пшеницы и ячменя. Наиболее инфицированными грибами секции *Alternaria* являлись образцы из Алтайского края. С помощью ВЭЖХ-МС/МС микотоксины альтернариол (АОЛ), монометилвый эфир альтернариола (АМЭ), тентоксин (ТЕН) и тенуазоновая кислота (ТК), продуцируемые грибами рода *Alternaria*, были обнаружены соответственно в 23%, 6%, 85% и 83% проанализированных образцов зерна. Сочетание двух микотоксинов (преимущественно ТЕН и ТК) выявлено в 61% образцов, трех микотоксинов – в 19% образцов, и только один образец содержал все четыре микотоксина. В большинстве случаев, содержание альтернариотоксинов в зерне не превышало 100 мкг/кг, и только для ТК выявлены более высокие количества – от 113 до 14963 мкг/кг. Установлены различия зерновых культур по количеству накапливаемых альтернариотоксинов: в зерне овса обнаружено больше АОЛ, АМЭ, а в зерне ячменя меньше ТЕН. Выявлена высокая достоверная связь между количествами ДНК грибов секции *Alternaria* и ТК, что указывает на роль грибов этой секции как основных продуцентов этого микотоксина в зерне.

Ключевые слова: ДНК, *Alternaria*, *Infectoriae*, реал-тайм ПЦР, ВЭЖХ-МС/МС, микотоксины

Поступила в редакцию: 19.05.2021

Принята к печати: 10.09.2021

Введение

Сибирский федеральный округ входит в число лидеров зернопроизводящих регионов России. Основной зерновой культурой, возделываемой в этом регионе, является яровая пшеница – её посевные площади ежегодно составляют 40–45% от общей посевной площади в стране. Также здесь широко выращивают овес (40% от общей посевной площади) и яровой ячмень (15%) (Федеральная служба государственной статистики, 2020). Качество зерна существенно влияет как на потребление полученного урожая в пищевых и кормовых целях на территории России, так и на объёмы экспорта.

Мониторинг зараженности зерна грибами всегда актуален, поскольку видовой состав микобиоты динамичен из-за влияния природных и антропогенных факторов. Особенное внимание исследователей привлекают грибы, способные образовывать вторичные токсичные метаболиты – микотоксины, негативно влияющие на организм потребителя зерна.

В последние годы, кроме традиционно используемых методов определения зараженности зерна на питательных агаризованных средах или в рулонах фильтровальной бумаги, начали активно применять молекулярные методы анализа (Гагкаева и др., 2017; Kulik et al., 2017; Каракозов и др., 2019; Орина и др., 2020). Метод реал-тайм ПЦР

позволяет быстро и объективно оценить количественное присутствие в зерне различных видов грибов по содержанию их ДНК, исключая ошибки идентификации таксонов, и кардинальным образом меняя многие сложившиеся представления о микобиоте зерна.

Исследования зараженности грибами зерновых культур, выращенных в Западной Сибири, демонстрируют преобладание грибов рода *Alternaria* Nees в микобиоте зерна (Торопова и др., 2015). Точная морфологическая идентификация этих грибов затруднена из-за расплывчатых границ видов и без привлечения молекулярных методов возможна только до уровня секций (Gannibal, 2018). Показано, что в микобиоте зерна преобладают представители секций *Alternaria* Lawrence, Gannibal, Peever & Pryor и *Infectoriae* Woudenb. & Crous (Ганнибал, 2014; Gannibal, 2018; Орина и др., 2020).

Кроме того, потенциал образования вторичных метаболитов у штаммов видов секций *Alternaria* и *Infectoriae* может существенно различаться (Tralamazza et al., 2018; Zwickel et al., 2018; Kononenko et al., 2020; Masiello et al., 2020; Jiang et al., 2021). Многие вторичные метаболиты грибов *Alternaria* являются фитотоксинами, способствующими колонизации растений грибами (Kang et al., 2017), и микотоксинами, оказывающими негативное влияние

на организм человека или животных (Lou et al., 2013; Tralamazza et al., 2018). К наиболее распространенным альтернариотоксинам в зерне относятся альтернариол (АОЛ), монометилвый эфир альтернариола (АМЭ), тентоксин (ТЕН) и тенуазоновая кислота (ТК) (Alexander et al., 2011; Fraeyman et al., 2017). Предполагается, что АОЛ и АМЭ могут оказывать генотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие на людей и животных (Alexander et al., 2011). ТК является ингибитором синтеза белка и более токсична, чем АОЛ и АМЭ (Lou et al., 2013). Неспецифичный для хозяина фитотоксин ТЕН подавляет развитие хлоропластов, вызывая хлороз растений (Lou et al., 2013).

Мониторинговые исследования загрязнения зерновых культур альтернариотоксинами и их продуцентами на территории России начали проводиться сравнительно недавно (Gannibal, 2018; Кононенко и др., 2020; Орина и др., 2020). В первую очередь, это связано с отставанием адекватной приборной базы для проведения молекулярных и

хроматографических исследований, и отсутствием нормативной базы, регламентирующей содержание микотоксинов грибов рода *Alternaria* в зерне. На основе токсикологических исследований в Европейском Союзе было предложено ввести ограничение на содержание ТК в продуктах детского питания – не более 500 мкг/кг (Rychlik et al., 2016). В 2019 г. был выпущен проект рекомендаций комиссии Европейского Союза, предлагающих установить контрольные значения трех микотоксинов грибов *Alternaria* – АОЛ, АМЭ и ТК в пищевых продуктах на основе злаков для младенцев и детей младшего возраста на уровне 5, 5 и 500 мкг/кг, соответственно (Food Chemistry Institute..., 2020).

Целью исследования являлось определение загрязнения зерновых культур, выращиваемых в разных областях Западной Сибири в 2018–2019 гг., грибами *Alternaria* и продуцируемыми ими микотоксинами.

Материалы и методы

Проанализировали 41 образец зерна урожая 2018 г. и 34 образца – 2019 г., собранных в различных областях Западной Сибири (Алтайский край, Кемеровская, Новосибирская, Омская области). Выборка включала 44 образца зерна яровой пшеницы, а также 24 – ячменя и 7 – овса (Приложение 1).

Зерно каждого образца (20 г) размалывали на мельнице Tube Mill Control (КА, Германия). Выделение ДНК из 200 мг зерновой муки проводили с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). Содержание ДНК грибов секций *Alternaria* и *Infectoriae* рода *Alternaria* выявляли методом реал-тайм ПЦР с красителем SYBR Green и специфичными молекулярными праймерами AAF2/AAR3 (Konstantinova et al., 2002) и AinfF3/AinfR4 (Gannibal, Yli-Mattila, 2007), соответственно, по адаптированным методикам (Орина и др., 2020). 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, далее – пг/нг) с нижним пределом обнаружения 5×10^{-4} пг/нг.

Экстракцию микотоксинов из 5 г зерновой муки проводили 20 мл раствора ацетонитрил:вода:уксусная кислота (79:20:1). Детектирование и количественное определение

четырёх микотоксинов, образуемых грибами *Alternaria*: АОЛ, АМЭ, ТЕН, ТК, выполняли методом высокоэффективной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) согласно общепринятым руководствам (Malachová et al., 2014) с применением комплекса оборудования, состоящего из хроматографа Agilent Infinity 1290 (Германия) и масс-спектрометра АВ SCIEX Triple Quad 5500 (США). Для хроматографического разделения применялась колонка, заполненная обращенно-фазовым сорбентом C18 с размером частиц не более 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 4.6 мм. (Gemini, Phenomenex, США). Для построения калибровочных графиков и в качестве внутренних стандартов были использованы стандартные растворы микотоксинов серии Biopure (Romer Labs, Австрия). Лимиты обнаружения АОЛ, АМЭ, ТЕН, и ТК составляли 2.0, 1.5, 2.0 и 6.3 мкг/кг, соответственно.

Расчёт средних значений и доверительного интервала проводили в программе Microsoft Excel 2010. Корреляционный анализ связей между количественными признаками с помощью коэффициента Пирсона (r) и дисперсионный анализ (ANOVA) для определения влияния конкретного фактора на анализируемые параметры рассчитывали в программе STATISTICA 10.0. Достоверность различий и корреляционных связей принимали при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты

Результаты реал-тайм ПЦР показали, что все проанализированные образцы зерна содержали ДНК грибов *Alternaria* секций *Alternaria* и *Infectoriae*. Количество ДНК грибов секции *Alternaria* варьировали от 53×10^{-4} до 21731×10^{-4} пг/нг и значительно превышали количества ДНК грибов секции *Infectoriae* (от 35×10^{-4} до 1472×10^{-4} пг/нг) во всех образцах зерна. Разница средних значений, в зависимости от вида зерновой культуры и года урожая, составляла 4.5–14.6 раз (рис. 1).

Результаты дисперсионного анализа показали достоверные различия между образцами по содержанию

ДНК грибов обеих секций в урожае зерна разных лет – в среднем, в 2019 г. их количества были ниже, чем в 2018 г. Кроме того, выявили существенное влияние факторов «географическое происхождение образца» на контаминацию зерна ДНК грибов секции *Alternaria* – образцы из Алтайского края содержали ДНК этих грибов в количестве $(4265 \pm 849) \times 10^{-4}$ пг/нг, что в 1.7–2.5 раза больше, чем образцы из других областей, – а также «вид зерновой культуры» на контаминацию зерна ДНК грибов секции *Infectoriae* – в зерне овса ДНК грибов этой секции было ниже, чем в зерне двух других культур.

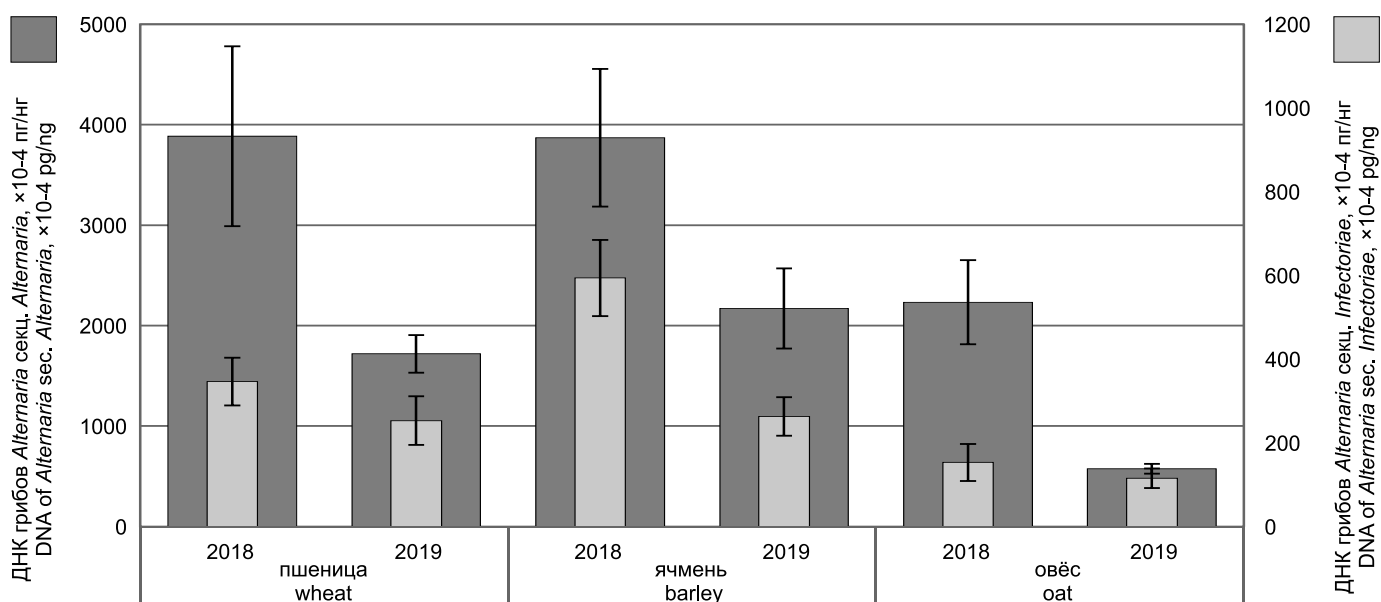


Рисунок 1. Среднее содержание ДНК грибов рода *Alternaria* в образцах зерна из Западной Сибири

Figure 1. The average amount of DNA of *Alternaria* fungi in grain samples from West Siberia

Микотоксины АОЛ, АМЭ, ТЕН и ТК обнаружены соответственно в 23%, 6%, 85% и 83% образцов зерна. Только два образца ячменя из Новосибирской области урожая 2018 г. не были загрязнены ни одним из четырёх анализируемых микотоксинов грибов *Alternaria*. Большинство (61%) образцов содержало в зерне два микотоксина (преимущественно ТЕН и ТК), 19% образцов – три микотоксина и только один образец (овёс из Новосибирской области урожая 2019 г.) – все четыре микотоксина совместно.

Различия между образцами пшеницы, ячменя и овса по встречаемости альтернариотоксинов в зерне представлены на рисунке 2. Наиболее загрязненными являлись образцы овса урожая 2019 г., в их зерне встречаемость АОЛ, ТЕН и ТК составила 100%, а наименее загрязненными оказались образцы зерна ячменя урожая 2018 г., в которых были выявлены только два микотоксина: ТЕН – в 87% образцов, а ТК – в 47%.

Содержание анализируемых альтернариотоксинов в большинстве случаев не превышало 100 мкг/кг зерна. Только ТК выявлена в 31% проанализированных образцов в значительных количествах (табл. 1), в том числе четыре образца из Алтайского края и Новосибирской области (три пшеницы и один овёс) содержали этот микотоксин в зерне в диапазоне 594–14963 мкг/кг.

Установлено, что содержание ТЕН и ТК в зерне варьировало существенно, в зависимости от года урожая и вида зерновой культуры. Для всех культур урожая 2019 г. содержание ТЕН в зерне было ниже, по сравнению с 2018 г. (рис. 3).

Количество АОЛ и АМЭ в зерне овса в среднем были достоверно выше, чем в пшенице и ячмене, а среднее количество ТЕН было достоверно ниже в зерне ячменя. Кроме того, на содержание ТЕН в зерне существенно влиял фактор «географическое происхождение образцов».

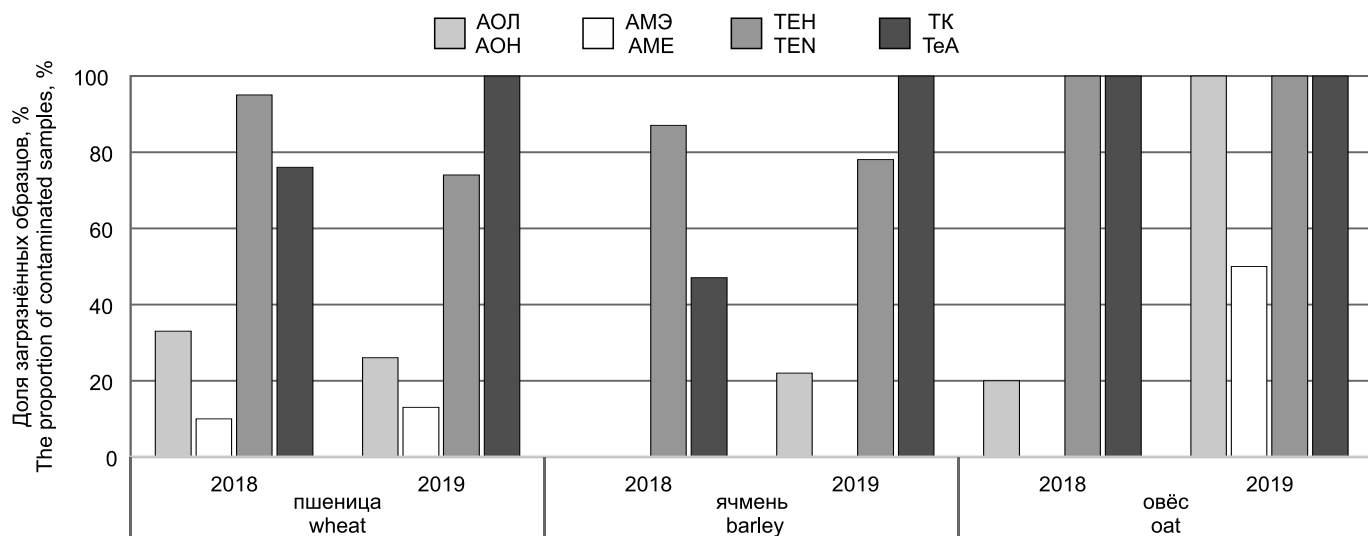


Рисунок 2. Встречаемость микотоксинов грибов рода *Alternaria* в зерне из Западной Сибири. АОЛ – альтернариол, АМЭ – монометилловый эфир альтернариола, ТЕН – тентоксин, ТК – тентуазоновая кислота

Figure 2. The occurrence of *Alternaria* mycotoxins in grain samples from West Siberia. AOH – alternariol, AME – alternariol monoethyl ether, TEN – tentoxin, TeA – tenuazonic acid

Таблица 1. Содержание микотоксинов грибов *Alternaria* в образцах зерна из Западной Сибири

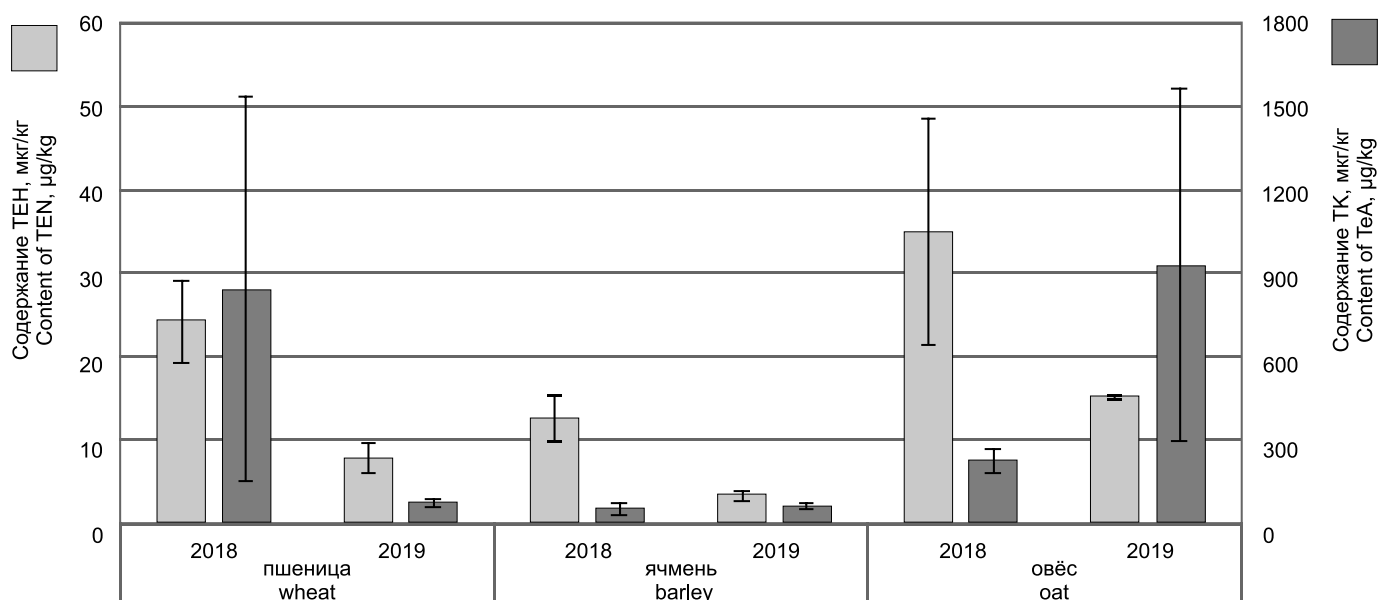
Зерновая культура	Год урожая (число образцов)	Диапазон выявленных количеств микотоксина, мкг/кг			
		АОЛ	АМЭ	ТЕН	ТК
Пшеница	2018 (21)	3–14	3; 4	4–83	34–14963
	2019 (23)	7–17	4–6	3–36	16–241
Ячмень	2018 (15)	0	0	5–38	30–349
	2019 (9)	4; 5	0	3–6	9–113
Овёс	2018 (5)	4	0	13–88	164–405
	2019 (2)	7; 53	0; 22	15; 15	280; 1579

АОЛ – альтернариол, АМЭ – монометиловый эфир альтернариола, ТЕН – тентоксин, ТК – tenuazonовая кислота.

Table 1. The content of *Alternaria* mycotoxins in grain samples from West Siberia

Cereal	Crop year (number of samples)	Range of mycotoxin amounts, µg/kg			
		АОН	АМЕ	TEN	TeA
Wheat	2018 (21)	3–14	3; 4	4–83	34–14963
	2019 (23)	7–17	4–6	3–36	16–241
Barley	2018 (15)	0	0	5–38	30–349
	2019 (9)	4–5	0	3–6	9–113
Oat	2018 (5)	4	0	13–88	164–405
	2019 (2)	7–53	22	15	280–1579

АОН – alternariol, АМЕ – alternariol monoethyl ether, TEN – tentoxin, TeA – tenuazonic acid.

**Рисунок 3.** Загрязненность микотоксинами грибов рода *Alternaria* зерна из Западной Сибири**Figure 3.** The contamination of grain samples from West Siberia by *Alternaria* mycotoxins

В образцах зерна из Алтайского края этот микотоксин встречался в количестве 24 ± 4 мкг/кг – в 2.2–2.4 раза выше, чем в образцах зерна из других областей. Влияние

географического происхождения и вида зерновой культуры на содержание ТК в зерне не установлено.

Обсуждение

Грибы *Alternaria* обильно представлены в микобиоте зерна (Ганнибал, 2014; Kulik et al., 2015; Gannibal, 2018; Орина и др., 2020), в т.ч. выращенного на территории Сибири (Торопова и др., 2015; Казакова и др., 2016). До настоящего времени существовало мнение, что представители секции *Infectoriae* часто встречаются в западной части России, редко – на Урале и в Сибири, и отсутствуют на востоке страны (Ганнибал, 2014). Однако полученные данные показали значительную представленность грибов секции *Infectoriae* в зерне из Западной Сибири, и согласуются с

результатами исследования зерна, выращенного на Урале (Орина и др., 2020).

Выявлено преобладание представителей секции *Alternaria* над представителями секции *Infectoriae* в анализированных образцах зерна: содержание ДНК грибов секции *Alternaria* в среднем составило $2814 \pm 314 \times 10^{-4}$ пг/нг, что оказалось в 8.3 раз больше, чем среднее содержание ДНК грибов секции *Infectoriae* ($338 \pm 34 \times 10^{-4}$ пг/нг). В этой связи интересно отметить, что грибы, относящиеся к секции *Alternaria*, быстрее растут, образуют более плотный

пигментированный воздушный мицелий, и, вероятно, оказываются более конкурентноспособными при колонизации зерна, чем представители секции *Infectoriae*. Между количеством в зерне образцов ДНК грибов, относящихся к двум секциям, выявлена достоверная положительная связь ($r=0.57$). Ранее отмечалось, что зерно пшеницы и ячменя в Западной Сибири более подвержено заражению видами грибов секции *Alternaria*, чем грибами из других секций (Gannibal, 2018), также преобладающее содержание ДНК этих грибов установлено в зерне из Уральского региона (Орина и др., 2020) и из провинции Хубэй в Китае (Jiang et al., 2021). Соотношение представителей секций *Alternaria* и *Infectoriae* в микобиоте зерна может варьировать и, в значительной степени, зависит от климатических условий, а также от растения-хозяина (Kosiak et al., 2004; Gannibal, 2018).

Среди анализированных микотоксинов, в зерне из Западной Сибири ТК и ТЕН встречались в 3.7–14 раз чаще, чем АОЛ и АМЭ, что подтверждает статус ТК и ТЕН как наиболее распространённых микотоксинов в зерне, выращиваемом на территории Азии (Xu et al., 2016; Орина и др., 2020; Jiang et al., 2021).

В среднем за два года наиболее контаминированными были образцы овса, в их зерне встречаемость АОЛ, АМЭ, ТЕН и ТК составила 43%, 14%, 100% и 100%, соответственно. Тогда как наименее контаминированными оказались образцы зерна ячменя, в которых АМЭ не был найден, а АОЛ, ТЕН и ТК были выявлены в 8%, 83% и 67% образцов, соответственно. Сходные закономерности были установлены при анализе 76 образцов зерна из южной части Норвегии: встречаемость ТЕН и ТК в зерне овса была значительно выше, по сравнению с ячменем и пшеницей, хотя выявленные содержания микотоксинов были низкими (Uhlig et al., 2013).

Согласно нашим результатам, содержание анализированных альтернариотоксинов в большинстве случаев не превышало 100 мкг/кг зерна, что согласуется с опубликованной ранее информацией о выявленных уровнях микотоксинов грибов *Alternaria* (Fraeyman et al., 2017). Однако в 31% проанализированных образцов ТК выявлена в более значительных количествах, причем один образец пшеницы из Алтайского края содержал этот микотоксин

в экстремально высоких количествах – 14963 мкг/кг. По нашим сведениям, это максимальная выявленная естественная контаминация зерна ТК, опубликованная в научной литературе. Ранее этот микотоксин выявляли в количествах 4179 мкг/кг в зерне пшеницы в Германии (Müller, Korn, 2013) и 6432 мкг/кг в зерне пшеницы из Китая (Li, Yoshizawa, 2000). Между тем, ТК является остро токсичным веществом со значениями LD50 при пероральном приеме от 81 до 225 мг/кг массы тела для мышей (Cgudo et al., 2019).

Ожидаемо, между АОЛ и АМЭ, являющихся производными одного химического предшественника – дибензопирона, выявлена высокая достоверная положительная связь ($r=0.93$). В нашем исследовании АМЭ встречался только в тех же образцах, где был выявлен АОЛ, но в более низких количествах. Число образцов зерна, где содержание хотя бы одного из этих микотоксинов превышало 5 мкг/кг, составило 15%. Также достоверная слабая положительная связь установлена между количествами АОЛ и ТК ($r=0.26$). Совместная встречаемость пары АОЛ и АМЭ, так же, как и АОЛ и ТК в зерне отмечена неоднократно, и относительное содержание ТК было выше, чем других микотоксинов (Uhlig et al., 2013; Xu et al., 2016; Fraeyman et al., 2017; Jiang et al., 2021). Нельзя исключать синергетические или аддитивные взаимодействия между альтернариотоксинами, которые могут усиливать негативный эффект для здоровья потребителя (Zhao et al., 2015).

Грибы, относящиеся к видам секции *Alternaria*, широко распространённые в зерне пшеницы и ячменя на территории Азии, продуцируют основные альтернариотоксины – АОЛ, АМЭ и ТК (Nguyen et al., 2018; Jiang et al., 2021). В нашей работе выявлена высокая достоверная положительная связь между количествами ТК и ДНК грибов секции *Alternaria* ($r=0.79$), что указывает на роль грибов этой секции как основных продуцентов ТК в зерне. В данном исследовании между содержанием ДНК грибов из секции *Infectoriae* и анализированными микотоксинами достоверные связи в зерне из Западной Сибири не установлены, однако ранее нами обнаружена достоверная связь между содержанием ДНК этих грибов и ТЕН в образцах зерна из Уральского региона (Орина и др., 2020).

Заключение

Проведенные исследования демонстрируют повсеместное присутствие грибов *Alternaria* секций *Alternaria* и *Infectoriae* и продуцируемых ими микотоксинов в зерне пшеницы, ячменя и овса, выращенных на территории Западной Сибири. Установление факторов, оказывающих влияние на численность грибов *Alternaria* и их способность продуцировать вторичные токсичные метаболиты,

требует уточнения. Частая совместная контаминация зерна разными альтернариотоксинами и выявленные экстремально высокие количества ТК в зерне показывают необходимость дальнейших исследований этой проблемы, а также разработки мер контроля встречаемости этих микотоксинов и стратегий для снижения риска, связанного с загрязнением ими зерна.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 19-76-30005).

Библиографический список (References)

- Гаргаева ТЮ, Гаврилова ОП, Орина АС, Казарцев ИА и др (2017) Сравнение методов выявления в зерне токсипродуцирующих грибов рода *Fusarium*. *Микология и фитопатология* 51(5):292–298
- Ганнибал ФБ (2014) Альтернариоз зерна – современный взгляд на проблему. *Защита и карантин растений* (6):11–15
- Казакова ОА, Торопова ЕЮ, Воробьева ИГ (2016) Взаимоотношения фитопатогенов семян ячменя в Западной Сибири. *АПК России* 23(5):931–934

- Каракотов СД, Аршава НВ, Башкатова МБ (2019) Мониторинг и контроль заболеваний пшеницы в Южном Зауралье. *Защита и карантин растений* (7):18–25
- Кононенко ГП, Буркин АА, Зотова ЕВ (2020) Микотоксикологический мониторинг. Сообщение 2. Зерно пшеницы, ячменя, овса, кукурузы. *Ветеринария сегодня* 2(33):139–145. <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145>
- Орина АС, Гаврилова ОП, Гагкаева ТЮ, Ганнибал ФБ (2020) Микромицеты *Alternaria* spp. и *Bipolaris sorokiniana* и микотоксины в зерне, выращенном в Уральском Федеральном Округе. *Микология и фитопатология* 54(5):365–377. <http://doi.org/10.31857/S0026364820050086>
- Торопова ЕЮ, Кириченко АА, Казакова ОА, Порсев ИН (2015) Альтернариоз зерна яровой пшеницы и ячменя в Западной Сибири и Восточном Зауралье. *Защита и карантин растений* (1):20–22
- Федеральная служба государственной статистики. Бюллетени о состоянии сельского хозяйства (электронные версии). <https://www.gks.ru/compendium/document/13277> (17.05.2021)
- Alexander J, Benford D, Boobis A, Ceccatelli S et al (2011) Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9(10):2407–2504. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- Crudo F, Varga E, Aichinger G, Galaverna G et al (2019) Co-occurrence and combinatory effects of *Alternaria* mycotoxins and other xenobiotics of food origin: current scenario and future perspectives. *Toxins* 11(11):640. <http://doi.org/10.3390/toxins11110640>
- Food Chemistry Institute of the Association of the German Confectionery Industry (2020) *Alternaria* toxins: occurrence, toxicity, analytical methods, maximum levels. <https://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/alternaria-toxins-occurrence-toxicity-analytical-methods-maximum-levels> (17.05.2021)
- Fraeyman S, Croubels S, Devreese M, Antonissen G (2017) Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* 9:228. <http://doi.org/10.3390/toxins9070228>
- Gannibal PhB (2018) Factors affecting *Alternaria* appearance in grains in European Russia. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* 53(3):605–615. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.605eng>
- Gannibal PhB, Yli-Mattila T (2007) Morphological and UP-PCR analyses and design of a PCR assay for differentiation of *Alternaria infectoria* species-group. *Mikologiya i fitopatologiya* 41(4):313–322.
- Jiang D, Wei D, Li H, Wang L et al (2021) Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in wheat and potential of reducing associated risks using magnolol. *J Sci Food Agric* 101:3071–3077. <http://doi.org/10.1002/jsfa.10901>
- Kang Y, Feng H, Zhang J, Chen S et al (2017) TeA is a key virulence factor for *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler infection of its host. *Plant Physiol Biochem* 115:73–82. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.002>
- Kononenko GP, Piryazeva EA, Burkin AA (2020) Production of alternariol in the populations of grain feed-associated small spore *Alternaria* species. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* 55(3):628–637. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.628eng>
- Konstantinova P, Bonants PJM, van Gent-Pelzer MPE, van der Zouwen P et al (2002) 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* 106(1):23–33. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.03.021>
- Kosiak B, Torp M, Skjerve E, Andersen B (2004) *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study. *Int J Food Microbiol* 93(1):51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006>
- Kulik T, Treder K, Załuski D (2015) Quantification of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium verrucosum* in conventional and organic grains by qPCR. *J Phytopathol* 163:522–528. <https://doi.org/10.1111/jph.12348>
- Li FQ, Yoshizawa T (2000) *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. *J Agric Food Chem* 48(7):2920–2924. <http://doi.org/10.1021/jf0000171>
- Lou J, Fu L, Peng Y, Zhou L (2013) Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules* 18:5891–5935. <http://doi.org/10.3390/molecules18055891>
- Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F et al (2014) 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* 1362:145–156. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.037>
- Masiello M, Somma S, Susca A, Ghionna V et al (2020) Molecular identification and mycotoxin production by *Alternaria* species occurring on durum wheat, showing black point symptoms. *Toxins* 12(4):275. <https://doi.org/10.3390/toxins12040275>
- Müller ME, Korn U (2013) *Alternaria* mycotoxins in wheat — a 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control* 34:191–197. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.018>
- Nguyen TTT, Kim J, Jeon SJ, Lee CW et al (2018) Mycotoxin production of *Alternaria* strains isolated from Korean barley grains determined by LC-MS/MS. *Int J Food Microbiol* 268:44–52. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.003>
- Rychlik M, Lepper H, Weidner C, Asam S (2016) Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* 68:181–185. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.035>
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, de Oliveira Rocha L (2018) Toxicogenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr Opin Food Sci* 23:57. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.002>
- Uhlig S, Eriksen G, Hofgaard I, Krska R et al (2013) Faces of a changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins* 5:1682–1697. <http://doi.org/10.3390/toxins5101682>
- Xu W, Xiaomin H, Li F, Zhang L (2016) Natural occurrence of *Alternaria* toxins in the 2015 wheat from Anhui province, China. *Toxins* 8:308. <https://doi.org/10.3390/toxins8110308>

- Zhao K, Shao B, Yang D, Li F et al (2015) Natural occurrence of *Alternaria* toxins in wheat based products and their dietary exposure in China. *PLoS ONE* 10:e0132019. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132019>
- Zwickel T, Kahl SM, Rychlik M, Müller MEH (2018) Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi – do multitoxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Front Microbiol* 9:1368. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01368>

Translation of Russian References

- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Orina AS, Kazartsev IA et al (2017) [Comparison of methods for identification of toxin-producing *Fusarium* fungi in the cereal grain] *Mikologiya i Fitopatologiya* 51(5):292–298 (in Russian)
- Gannibal PhB (2014) [*Alternaria* disease of grain – modern view of the problem] *Zashchita i karantin rasteniy* (6):11–15 (in Russian)
- Kazakova OA, Toropova EYu, Vorobyeva IG (2016) [The interrelations between phytopathogens of barley seeds in western Siberia] *APK Rossii* 23(5):931–934 (in Russian)
- Karakotov SD, Arshava NV, Bashkatova MB (2019) [Monitoring and control of wheat diseases in the Southern Trans-Urals] *Zashchita i karantin rasteniy* (7):18–25 (in Russian)
- Kononenko GP, Burkin AA, Zotova EV (2020) [Mycotoxological monitoring. Part 2. Wheat, barley, oat and maize grain] *Veterinariya segodnya* 2(33):139–145 (in Russian) <http://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145>
- Orina AS, Gavrilova OP, Gagkaeva TYu, Gannibal PhB (2020) [Micromycetes *Alternaria* spp. and *Bipolaris sorokiniana* and mycotoxins in the grain from the Ural region] *Mikologiya i Fitopatologiya* 54(5):365–377 (in Russian) <http://doi.org/10.31857/S0026364820050086>
- Toropova EYu, Kirichenko AA, Kazakova OA, Porsev IN (2015) [*Alternaria* disease of grain of spring wheat and barley in Western Siberia and Eastern Trans-Urals] *Zashchita i karantin rasteniy* (1):20–22 (in Russian)
- Federal State Statistics Service. Bulletins on the state of agriculture (electronic versions). <https://www.gks.ru/compendium/document/13277> (17.05.2021) (in Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(3), p. 153–162

OECD+WoS: 1.06+RQ (Mycology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-3-15019>

Full-text article

CONTAMINATION OF GRAIN IN WEST SIBERIA BY *ALTERNARIA* FUNGI AND THEIR MYCOTOXINS

A.S. Orina^{1*}, O.P. Gavrilova¹, T.Yu. Gagkaeva¹, N.N. Gogina²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²All-Russian Poultry Institute, Sergiev Posad, Russia

*corresponding author; e-mail: orina-alex@yandex.ru

The ubiquitous occurrence of *Alternaria* fungi belonging to sections *Alternaria* and *Infectoriae* was confirmed using real-time PCR in wheat, barley and oat grain grown in West Siberia in 2018–2019. The DNA amount of *Alternaria* section *Alternaria* fungi varied from 53×10^{-4} to 21731×10^{-4} pg/ng and on average exceeded the DNA amount of *Alternaria* section *Infectoriae* fungi by 4.5–14.6 times, depending on the crop and harvest year. The average DNA amount of *Alternaria* fungi belonging to both sections in the oat grain was lower than in wheat and barley grain. The grain samples from Altay region were the most infected with *Alternaria* fungi. The alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), tentoxin (TEN), and tenuazonic acid (TeA) mycotoxins produced by *Alternaria* fungi were detected by HPLC-MS/MS in 23%, 6%, 85%, and 83% of analyzed grain samples, respectively. The majority (61%) of the samples contained two *Alternaria* mycotoxins in the grain (mainly TEN and TeA), 19% of the samples three mycotoxins, and only one sample all four together. In the most of samples the content of *Alternaria* mycotoxins did not exceed 100 µg/kg, and only TeA content was higher (from 113 to 14963 µg/kg) than others. The significant differences in grain crops by the *Alternaria* mycotoxins content were revealed: more amounts of AOH, AME, and less amount of TEN were found in oat grain than in barley grain. A high positive significant correlation between the DNA amount of *Alternaria* section *Alternaria* fungi and TeA was established that indicates the role of these fungi as the main producers of TeA in the grain.

Keywords: DNA, *Alternaria*, *Infectoriae*, real-time PCR, HPLC-MS/MS, mycotoxins

Submitted: 19.05.2021

Accepted: 10.09.2021

Приложение 1. Образцы зерна, включенные в исследование

Регион	Год урожая	Культура	Содержание ДНК грибов рода <i>Alternaria</i> , $\times 10^{-4}$ пг/пг		Содержание микотоксинов, мкг/кг			
			Секц. <i>Alternaria</i>	Секц. <i>Infectoriae</i>	АОЛ	АМЕ	ТЕН	ТК
Алтайский край	2018	пшеница	1809	210	0	0	12	99
Алтайский край	2018	пшеница	3009	170	0	0	18	0
Алтайский край	2018	пшеница	3361	292	0	0	22	68
Алтайский край	2018	пшеница	3113	208	0	0	16	0
Алтайский край	2018	пшеница	2495	91	3	0	13	84
Алтайский край	2018	пшеница	4445	300	0	0	50	215
Алтайский край	2018	пшеница	3583	232	0	0	18	92
Алтайский край	2018	пшеница	3196	267	0	0	15	55
Алтайский край	2018	пшеница	2080	217	0	0	4	47
Алтайский край	2018	пшеница	21731	817	14	3	0	14963
Алтайский край	2018	пшеница	3472	310	0	0	46	594
Алтайский край	2018	пшеница	3415	278	0	0	78	165
Алтайский край	2018	овес	905	113	4	0	88	405
Алтайский край	2018	овес	1997	134	0	0	34	184
Алтайский край	2018	овес	2036	112	0	0	20	187
Алтайский край	2018	овес	3472	79	0	0	13	164
Алтайский край	2018	овес	2752	327	0	0	19	188
Алтайский край	2018	ячмень	3722	346	0	0	38	349
Алтайский край	2018	ячмень	10526	1176	0	0	18	90
Алтайский край	2018	ячмень	4359	706	0	0	5	0
Алтайский край	2018	ячмень	6696	551	0	0	22	48
Алтайский край	2018	ячмень	2349	452	0	0	6	0
Алтайский край	2018	ячмень	1161	262	0	0	6	0
Алтайский край	2018	ячмень	6667	810	0	0	19	38
Кемеровская обл.	2018	пшеница	3030	652	0	0	20	48
Кемеровская обл.	2018	пшеница	2861	349	0	0	19	50
Кемеровская обл.	2018	пшеница	2234	184	3	0	83	37
Кемеровская обл.	2018	ячмень	4802	1472	0	0	8	30
Кемеровская обл.	2018	ячмень	2260	281	0	0	14	0
Кемеровская обл.	2018	ячмень	3780	423	0	0	29	0
Новосибирская обл.	2018	пшеница	2106	278	12	0	10	0
Новосибирская обл.	2018	пшеница	1213	111	10	4	6	0
Новосибирская обл.	2018	пшеница	3652	627	4	0	4	0
Новосибирская обл.	2018	пшеница	5177	1187	0	0	6	801
Новосибирская обл.	2018	пшеница	3193	296	4	0	27	135
Новосибирская обл.	2018	пшеница	2404	183	0	0	42	222
Новосибирская обл.	2018	ячмень	2429	454	0	0	0	0
Новосибирская обл.	2018	ячмень	1285	366	0	0	0	0
Новосибирская обл.	2018	ячмень	2246	444	0	0	5	127
Омская обл.	2018	ячмень	53	252	0	0	8	83
Омская обл.	2018	ячмень	5731	923	0	0	9	0
Кемеровская обл.	2019	пшеница	915	137	7	0	0	26
Кемеровская обл.	2019	пшеница	1517	117	9	0	10	16
Кемеровская обл.	2019	пшеница	1655	124	0	0	6	59
Кемеровская обл.	2019	пшеница	1609	159	0	0	6	20
Кемеровская обл.	2019	пшеница	3323	394	0	0	3	21
Кемеровская обл.	2019	пшеница	2588	399	0	0	4	23
Кемеровская обл.	2019	пшеница	1859	152	11	0	3	185
Кемеровская обл.	2019	пшеница	2256	251	14	5	0	60
Кемеровская обл.	2019	пшеница	1809	191	17	4	0	47
Кемеровская обл.	2019	пшеница	2225	236	16	6	0	40
Кемеровская обл.	2019	овес	624	139	7	0	15	280
Кемеровская обл.	2019	ячмень	1662	318	0	0	3	59
Кемеровская обл.	2019	ячмень	2340	535	4	0	5	80
Кемеровская обл.	2019	ячмень	2146	333	0	0	6	66
Кемеровская обл.	2019	ячмень	2855	153	0	0	3	9
Кемеровская обл.	2019	ячмень	4776	388	5	0	5	43

Продолжение приложения 1

Регион	Год урожая	Культура	Содержание ДНК грибов рода <i>Alternaria</i> , ×10 ⁻⁴ пг/нг		Содержание микотоксинов, мкг/кг			
			Секц. <i>Alternaria</i>	Секц. <i>Infectoriae</i>	АОЛ	АМЕ	ТЕН	ТК
Новосибирская обл.	2019	пшеница	1081	68	0	0	9	98
Новосибирская обл.	2019	пшеница	958	97	0	0	36	178
Новосибирская обл.	2019	пшеница	957	73	0	0	13	147
Новосибирская обл.	2019	пшеница	973	214	0	0	0	25
Новосибирская обл.	2019	пшеница	956	144	0	0	5	31
Новосибирская обл.	2019	пшеница	1724	217	0	0	12	30
Новосибирская обл.	2019	пшеница	2164	35	0	0	20	241
Новосибирская обл.	2019	пшеница	523	130	0	0	0	48
Новосибирская обл.	2019	пшеница	1023	86	0	0	3	129
Новосибирская обл.	2019	овес	526	91	53	22	15	1579
Новосибирская обл.	2019	ячмень	1052	133	0	0	0	60
Новосибирская обл.	2019	ячмень	1165	103	0	0	3	113
Новосибирская обл.	2019	ячмень	820	176	0	0	0	54
Омская обл.	2019	пшеница	3851	968	0	0	24	60
Омская обл.	2019	пшеница	1700	312	0	0	6	30
Омская обл.	2019	пшеница	426	116	0	0	3	113
Омская обл.	2019	пшеница	3454	1204	0	0	16	30
Омская обл.	2019	ячмень	2733	231	0	0	5	71

АОЛ – альтернариол, АМЕ – монометилловый эфир альтернариола, ТЕН – тентоксин, ТК – тенуазоновая кислота

Appendix 1. Grain samples analyzed in the present study

Region	Crop year	Cereal	Content of DNA of <i>Alternaria</i> spp., ×10 ⁻⁴ pg/ng		Content of mycotoxins, µg/kg			
			sect. <i>Alternaria</i>	sect. <i>Infectoriae</i>	AOH	AME	TEN	TeA
Altay region	2018	wheat	1809	210	0	0	12	99
Altay region	2018	wheat	3009	170	0	0	18	0
Altay region	2018	wheat	3361	292	0	0	22	68
Altay region	2018	wheat	3113	208	0	0	16	0
Altay region	2018	wheat	2495	91	3	0	13	84
Altay region	2018	wheat	4445	300	0	0	50	215
Altay region	2018	wheat	3583	232	0	0	18	92
Altay region	2018	wheat	3196	267	0	0	15	55
Altay region	2018	wheat	2080	217	0	0	4	47
Altay region	2018	wheat	21731	817	14	3	0	14963
Altay region	2018	wheat	3472	310	0	0	46	594
Altay region	2018	wheat	3415	278	0	0	78	165
Altay region	2018	oat	905	113	4	0	88	405
Altay region	2018	oat	1997	134	0	0	34	184
Altay region	2018	oat	2036	112	0	0	20	187
Altay region	2018	oat	3472	79	0	0	13	164
Altay region	2018	oat	2752	327	0	0	19	188
Altay region	2018	barley	3722	346	0	0	38	349
Altay region	2018	barley	10526	1176	0	0	18	90
Altay region	2018	barley	4359	706	0	0	5	0
Altay region	2018	barley	6696	551	0	0	22	48
Altay region	2018	barley	2349	452	0	0	6	0
Altay region	2018	barley	1161	262	0	0	6	0
Altay region	2018	barley	6667	810	0	0	19	38
Kemerovo region	2018	wheat	3030	652	0	0	20	48
Kemerovo region	2018	wheat	2861	349	0	0	19	50
Kemerovo region	2018	wheat	2234	184	3	0	83	37
Kemerovo region	2018	barley	4802	1472	0	0	8	30
Kemerovo region	2018	barley	2260	281	0	0	14	0
Kemerovo region	2018	barley	3780	423	0	0	29	0
Novosibirsk region	2018	wheat	2106	278	12	0	10	0
Novosibirsk region	2018	wheat	1213	111	10	4	6	0

Appendix 1 continued

Region	Crop year	Cereal	Content of DNA of <i>Alternaria</i> spp., ×10 ⁻⁴ pg/ng		Content of mycotoxins, µg/kg			
			<i>sect. Alternaria</i>	<i>sect. Infectoriae</i>	AOH	AME	TEN	TeA
Novosibirsk region	2018	wheat	3652	627	4	0	4	0
Novosibirsk region	2018	wheat	5177	1187	0	0	6	801
Novosibirsk region	2018	wheat	3193	296	4	0	27	135
Novosibirsk region	2018	wheat	2404	183	0	0	42	222
Novosibirsk region	2018	barley	2429	454	0	0	0	0
Novosibirsk region	2018	barley	1285	366	0	0	0	0
Novosibirsk region	2018	barley	2246	444	0	0	5	127
Omsk region	2018	barley	53	252	0	0	8	83
Omsk region	2018	barley	5731	923	0	0	9	0
Kemerovo region	2019	wheat	915	137	7	0	0	26
Kemerovo region	2019	wheat	1517	117	9	0	10	16
Kemerovo region	2019	wheat	1655	124	0	0	6	59
Kemerovo region	2019	wheat	1609	159	0	0	6	20
Kemerovo region	2019	wheat	3323	394	0	0	3	21
Kemerovo region	2019	wheat	2588	399	0	0	4	23
Kemerovo region	2019	wheat	1859	152	11	0	3	185
Kemerovo region	2019	wheat	2256	251	14	5	0	60
Kemerovo region	2019	wheat	1809	191	17	4	0	47
Kemerovo region	2019	wheat	2225	236	16	6	0	40
Kemerovo region	2019	oat	624	139	7	0	15	280
Kemerovo region	2019	barley	1662	318	0	0	3	59
Kemerovo region	2019	barley	2340	535	4	0	5	80
Kemerovo region	2019	barley	2146	333	0	0	6	66
Kemerovo region	2019	barley	2855	153	0	0	3	9
Kemerovo region	2019	barley	4776	388	5	0	5	43
Novosibirsk region	2019	wheat	1081	68	0	0	9	98
Novosibirsk region	2019	wheat	958	97	0	0	36	178
Novosibirsk region	2019	wheat	957	73	0	0	13	147
Novosibirsk region	2019	wheat	973	214	0	0	0	25
Novosibirsk region	2019	wheat	956	144	0	0	5	31
Novosibirsk region	2019	wheat	1724	217	0	0	12	30
Novosibirsk region	2019	wheat	2164	35	0	0	20	241
Novosibirsk region	2019	wheat	523	130	0	0	0	48
Novosibirsk region	2019	wheat	1023	86	0	0	3	129
Novosibirsk region	2019	oat	526	91	53	22	15	1579
Novosibirsk region	2019	barley	1052	133	0	0	0	60
Novosibirsk region	2019	barley	1165	103	0	0	3	113
Novosibirsk region	2019	barley	820	176	0	0	0	54
Omsk region	2019	wheat	3851	968	0	0	24	60
Omsk region	2019	wheat	1700	312	0	0	6	30
Omsk region	2019	wheat	426	116	0	0	3	113
Omsk region	2019	wheat	3454	1204	0	0	16	30
Omsk region	2019	barley	2733	231	0	0	5	71

AOH – alternariol, AME – alternariol monoethyl ether, TEN – tentoxin, TeA – tenuazonic acid.