

## ПОТЕНЦИАЛ ТОКСИНООБРАЗОВАНИЯ МЕЛКОСПОРОВЫХ ВИДОВ *Alternaria* ИЗ ЗЕРНА ОВСА, КОНТАМИНИРОВАННОГО АЛЬТЕРНАРИОЛОМ

Г.П. КОНОНЕНКО<sup>✉</sup>, Е.А. ПИРЯЗЕВА, А.А. БУРКИН

В течение многих лет проблема пораженности зерна токсинообразующими грибами *Alternaria* находится под пристальным вниманием специалистов (S.M. Tralamazza с соавт., 2018). Выполнены обширные исследования пшеницы (M.T. Amatulli с соавт., 2013; M.E. Müller с соавт., 2013) и ячменя (V. Sanchis с соавт., 1993; T.T.T. Nguyen с соавт., 2018). При этом зерно овса изучено гораздо меньше, и до сих пор остается неясным, какие виды грибов этого рода и в какой мере ответственны за накопление в нем токсина альтернариола (АОЛ). В нашей стране получены данные по зараженности грибами *Alternaria* зерна овса из ряда областей (О.П. Гаврилова с соавт., 2016; Ю.И. Варгач с соавт., 2019), а также образцов селекционных сортов и линий из коллекции ВИР в полевом опыте (А.С. Орина с соавт., 2017), однако частота встречаемости токсина оценена суммарно по нескольким региональным выборкам (А.А. Буркин с соавт., 2015; Г.П. Кононенко с соавт., 2020). В настоящем исследовании впервые установлено, что в контаминации зерна овса может участвовать вид *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire, известный как активный продуцент, и в меньшей степени представители *A. arborescens* E.G. Simmons и комплекса '*A. infectoria*'. Целью работы стало изучение видовой принадлежности и токсинообразующей способности грибов *Alternaria*, выделенных из зерна овса с естественной контаминацией альтернариолом. Объектом микологического исследования был образец зерна овса посевного (*Avena sativa* L.) сорта Яков, полученный в октябре 2020 года от агропредприятия, расположенного в Московской области (Одинцовский р-н). По данным иммуноферментного анализа образец был контаминирован АОЛ в количестве 630 мкг/кг и Т-2 токсином в количестве 5 мкг/кг. Выделение чистых культур грибов проводили после поверхностной стерилизации зерна и его посева на агар Чапека-Докса, содержащего желчь и антибиотики. Описание цвета, структуры колоний, скорости роста культур выполняли на сахарозном агаре с дрожжевым экстрактом (yeast extract sucrose agar, YES) и картофельно-морковном агаре (potato-carrot agar, PCA) на 8-е сут. Для оценки их токсинообразования использовали зерно овса и панель из четырех микологических сред — PCA, солодовый агар (malt extract agar, MEA), сенной агар (hay infusion agar, HAY) и аналог овощного агара (V-8). После культивирования (7 сут, 25 °С, без освещения) и экстракции смесью ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 выполняли определение АОЛ методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (А.А. Буркин, Г.П. Кононенко, 2011) с пределом детектирования 0,01 мкг/г. В субэпидермальной микобиоте исследованного образца преобладали представители рода *Alternaria*: степень зараженности составила 36,0 %, им сопутствовали грибы *Fusarium* spp. (14,7 %) и *Epicoccum* spp. (2,7 %). После проведения микологических процедур по выделению и идентификации культуры *Alternaria* были отнесены к видам *A. tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire (7 штаммов), *A. arborescens* E.G. Simmons (2 штамма) и к комплексу видов '*A. infectoria*' (4 изолята). На зерновом субстрате все штаммы *A. tenuissima*, *A. arborescens* и три изолята '*A. infectoria*' продуцировали АОЛ в количествах 370, 5 и 0,8 мкг/г. При тестировании культур в тех же условиях на агаровых средах интенсивность накопления АОЛ у *A. tenuissima* была наибольшей на HAY и MEA (56 и 23 мкг/г), у *A. arborescens* и '*A. infectoria*' — на PCA и MEA. Учитывая это, для *in vitro* оценки биосинтетического потенциала грибов и их причастности к контаминации зерна АОЛ в расширенном формате рекомендованы коммерческий субстрат MEA и зерна овса. В сравнительном аспекте обсуждаются культурально-морфологические особенности отдельных культур *A. arborescens*, '*A. infectoria*' и их способность к биосинтезу АОЛ.

Ключевые слова: зерно овса, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria arborescens*, '*Alternaria infectoria*', альтернариол, иммуноферментный анализ.

В последние годы в мировой научной литературе активно обсуждается проблема пораженности зерна токсинообразующими грибами рода *Alternaria*, главным образом пшеницы (1-3) и ячменя (4, 5). Зерно овса, которое в виде дерти (крупного помола) широко используется в кормлении молочных коров, овец, свиней, кроликов, птицы и незаметно в диетическом отношении для лошадей (6) изучено гораздо меньше (7). Среди токсинов грибов *Alternaria* особую обеспокоенность специалистов вызывает альтернариол (АОЛ) — метаболит дибензо- $\alpha$ -пиронового ряда, для которого подтверждено генотоксическое действие (8, 9).

О признаках интоксикации животных при кормлении инфицированным овсом, содержащим АОЛ, сообщалось еще в конце прошлого столетия (10). Однако в последующих работах использовали либо микологический, либо токсикологический анализы. Так, в образце овса из Греции были выявлены потенциальные продуценты *A. alternata*, но поиск токсина не проводили (11), а оценку встречаемости АОЛ в зерне из Швеции (12), южной части Норвегии (13), Канады (14), Ирландии (15) и Словении (16) не сопровождали микологическим анализом.

В нашей стране видовой состав грибов *Alternaria* был изучен на зерне из ряда областей (17, 18), а также на образцах селекционных сортов и линий из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), полученных в полевых опытах (19, 20), но данные по степени контаминации токсином представлены суммарно по нескольким региональным выборкам (21, 22). Недавно попытки сопоставления контаминации токсином и соотношения количеств ДНК грибов секций *Alternaria* и *Infectoriae* предприняты на нескольких образцах из Уральского региона (23) и Западной Сибири (24). Какие виды *Alternaria* ответственны за накопление этого токсина в зерне, до сих пор остается неясным.

В настоящей работе впервые установлено, что в контаминации зерна овса может участвовать вид *Alternaria tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire, известный как активный продуцент, и в меньшей степени представители *A. arborescens* E.G. Simmons и комплекса '*A. infectoria*'.

Цель работы — изучение видовой принадлежности и токсинообразующей способности грибов *Alternaria*, выделенных из зерна овса с естественной контаминацией альтернариолом.

**Методика.** Объектом микологического исследования был образец зерна овса посевного (*Avena sativa* L.) сорта Яков, полученный в октябре 2020 года от агропредприятия, расположенного в Московской области (Одинцовский р-н). По данным иммуноферментного анализа образец был контаминирован АОЛ в количестве 630 мкг/кг и Т-2 токсином в количестве 5 мкг/кг, остальные микотоксины (дезоксиниваленол, зеараленон, фумонизины группы В, афлатоксин В<sub>1</sub>, стеригматоцистин, охратоксин А, цитринин, циклопиазоновая кислота, микофеноловая кислота, эмодин, эргоалкалоиды, роридин А, РR-токсин) отсутствовали.

Зерна поверхностно дезинфицировали 3 % раствором формалина в течение 1,5 мин с последующей двукратной обработкой водным раствором аммиака, приготовленным посредством добавления 4 мл 5 % раствора аммиака к 1 л стерильной дистиллированной воды. Затем зерна раскладывали в чашки Петри на поверхность агара Чапека-Докса, содержащего желчь и антибиотики (25). Через 7 сут культивирования при 25 °С альтернарии отсеивали в чашки Петри и после подтверждения чистоты — на косяки с агаром. Видовую идентификацию выделенных культур проводили с использованием пособий (26, 27), моноконидиальные штаммы получали как описано ранее (28). Описание цвета, структуры колоний, скорости роста культур выполняли на сахарозном агаре с дрожжевым экстрактом (yeast extract sucrose agar, YES) и картофельно-морковном агаре (potato-carrot agar, PCA) на 8-е сут.

Для экспресс-оценки способности культур продуцировать АОЛ в качестве ростовых сред использовали зерновой субстрат (овсяные хлопья), PCA, солодовый агар (malt extract agar, MEA; «Liofilchem®», Италия), сенной агар (hay infusion agar, HAY), аналог агара V-8 из овощного сока (ООО «Южная соковая компания», Краснодарский край, г. Белореченск, Россия),

приготовленные по соответствующей рецептуре (29). Инокулюм (10-суточные культуры на агаре Чапека-Докса) в трех повторностях помещали во флаконы вместимостью 10 мл с диаметром дна около 18 мм, каждый из которых содержал по 1,5 мл агаровых сред или по 1,0 г овсяных хлопьев с добавлением 1,0 мл воды перед стерилизацией. Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками и обертывали слоем лабораторной пленки (Parafilm "M"® PM-996, «Pechiney Plastic Packaging», США). После инкубирования в темноте в течение 7 сут при 25 °С в каждый флакон добавляли по 1,5 или 3,0 мл (для зернового субстрата) смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 84:16 и интенсивно встряхивали в начале и конце стационарной 14-часовой экстракции. Анализ экстрактов выполняли с помощью тест-системы для иммуноферментного определения АОЛ (30), предел детектирования токсина составил 0,01 мкг/г.

Данные обрабатывали с помощью описательной статистики в программе Microsoft Excel 2013, результаты выражали как средние арифметические полученных значений ( $M$ ) с ошибкой выборочной средней ( $\pm SEM$ ).

**Результаты.** В субэпидермальной микобиоте исследованного образца преобладали представители рода *Alternaria*: степень зараженности составила 36,0 %, им сопутствовали грибы *Fusarium* spp. (14,7 %) и *Epicoccum* spp. (2,7 %). Интенсивное инфицирование грибами *Alternaria* вполне согласовывалось со значительной контаминацией зерна АОЛ (630 мкг/кг), а обнаружение грибов *Fusarium* объясняло присутствие в нем Т-2 токсина.

**1. Продуцирование альтернариола (АОЛ) представителями рода *Alternaria*, выделенными из зерна овса (*Avena sativa* L.) сорта Яков, на зерновом субстрате (овсяные хлопья; 7 сут, 25 °С, без освещения) ( $n = 3$ ,  $M \pm SEM$ )**

| Регистрационный № штамма | Количество АОЛ, мкг/г субстрата |          |
|--------------------------|---------------------------------|----------|
|                          | <i>A. tenuissima</i>            |          |
| 1                        |                                 | 140±30   |
| 2                        |                                 | 290±70   |
| 7                        |                                 | 370±70   |
| 9                        |                                 | 460±90   |
| 11                       |                                 | 115±20   |
| 12                       |                                 | 1200±70  |
| 15                       |                                 | 11±1     |
|                          | <i>A. arborescens</i>           |          |
| 5                        |                                 | 4±1      |
| 8                        |                                 | 6±1      |
|                          | <i>'A. infectoria'</i>          |          |
| 6                        |                                 | —        |
| 13                       |                                 | 1,5±0,40 |
| 14                       |                                 | 0,7±0,15 |
| 16                       |                                 | 0,2±0,04 |

Примечание. Прочерк означает, что АОЛ не обнаружен.

После проведения микологических процедур по выделению и идентификации культуры *Alternaria* были отнесены к видам *A. tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire (7 штаммов), *A. arborescens* E.G. Simmons (2 штамма) и к комплексу видов '*A. infectoria*' (4 изолята). Ранее для зерна из пяти областей Северо-Западного региона по итогам морфологической идентификации было также показано доминирование *A. tenuissima* при меньшей встречаемости *A. arborescens* и '*A. infectoria*' (17). Для 5 образцов зерна из двух областей Уральского федерального округа, исследованных методом количественной ПЦР, сообщалось о большей зараженности грибами секции *Alternaria* (40,8±5,6 %) в сравнении с представителями секции *Infectoriae* (2,0±1,1 %) (23). То же соотношение наблюдалось и для исследованного образца. Следует отметить, что традиционный подход к определению видовой принадлежности грибов в настоящее время признается

вполне приемлемым, несмотря на все более широкое использование молекулярных методов, основанных на выявлении ДНК, таких как ПЦР в реальном времени и количественная цифровая ПЦР (31).

В эксперименте с краткосрочным выращиванием грибов на зерновом субстрате все культуры, кроме одной ('*A. infectoria*' № 6), продуцировали АОЛ (табл. 1). Для штаммов *A. tenuissima* среднее по выборке количество составило 370 мкг/г, что указывает на высокий потенциал токсинообразования. У *A. arborescens* и '*A. infectoria*' накопление было значительно меньшим — соответственно 5 и 1 мкг/г (см. табл. 1).

Данные, полученные для изолятов грибов *Alternaria* из образца, определенно указывали на то, что *A. tenuissima* вносили преимущественный вклад в его контаминацию токсином при совместном участии представителей *A. arborescens* и '*A. infectoria*'. Безусловно, этот результат не может быть экстраполирован на ситуацию в целом. Для установления состава продуцентов, ответственных за контаминацию зерна овса, необходимо расширенное обследование популяции грибов, ассоциированных с этим биообъектом, организованное по принципу «один изолят—одна проба». Недавно при реализации такого формата для объемной выборки из 58 образцов была не только установлена причастность *A. alternata*, *A. tenuissima* и *A. arborescens* к контаминации кормовой зернопродукции, но и, что особенно важно, продемонстрирована возможность использования микологических сред для тестирования грибов, а также положено начало наблюдениям за признаками соответствия между токсинообразованием и цветом, структурой колоний и скоростью роста (28). Развитие этого подхода было продолжено и в настоящем исследовании.

Результаты тестирования культур *A. tenuissima*, *A. arborescens* и '*A. infectoria*' на способность продуцировать АОЛ на панели из четырех агаровых сред РСА, НАУ, МЕА, аналог V-8, рекомендованных для видовой идентификации (26, 27), представлены в таблице 2.

## 2. Продуцирование альтерналиола (АОЛ) представителями рода *Alternaria*, выделенными из зерна овса (*Avena sativa* L.) сорта Яков, на микологических агаровых средах (7 сут, 25 °С, без освещения) ( $n = 3$ , $M \pm SEM$ )

| Регистрационный № штамма | Количество АОЛ, мкг/г субстрата |            |            |            |
|--------------------------|---------------------------------|------------|------------|------------|
|                          | РСА                             | НАУ        | МЕА        | аналог V-8 |
|                          | <i>A. tenuissima</i>            |            |            |            |
| 1                        | 0,06±0,020                      | 2,9±0,50   | 40±9       | 0,8±0,05   |
| 2                        | 0,9±0,05                        | 77±8       | 18±2       | 9±3        |
| 7                        | 0,7±0,10                        | 36±8       | 11±1       | 5±2        |
| 9                        | 0,9±0,30                        | 98±1       | 21±3       | 13±3       |
| 11                       | 15±5                            | 16±1       | 38±11      | 2,0±0,20   |
| 12                       | 2,5±0,30                        | 107±27     | 7±1        | 16±5       |
| 15                       | —                               | —          | —          | —          |
|                          | <i>A. arborescens</i>           |            |            |            |
| 5                        | 0,4±0,20                        | 0,09±0,020 | 0,2±0,02   | 0,1±0,02   |
| 8                        | 0,1±0,03                        | —          | 0,03±0,010 | —          |
|                          | <i>'A. infectoria'</i>          |            |            |            |
| 6                        | —                               | —          | —          | —          |
| 13                       | —                               | —          | —          | —          |
| 14                       | 1,3±0,90                        | 0,08±0,030 | 0,1±0,02   | 0,03±0,006 |
| 16                       | 0,08±0,020                      | —          | 0,03±0,003 | —          |

Примечание. Прочерки означают, что АОЛ не обнаружен.

На всех средах АОЛ продуцировали 6 штаммов *A. tenuissima*. Накопление токсина как между штаммами, так и на разных средах, варьировало от 0,06 до 107 мкг/г. У одного из штаммов (№ 15) токсин детектировать не удалось. О неравномерности биосинтеза АОЛ у *A. tenuissima* сообщалось ранее (28), и эту особенность связывали с внутривидовыми различиями, которые не удавалось выявлять по морфологическим признакам (32). В целом

интенсивность накопления АОЛ у *A. tenuissima* оказалась наибольшей на средах НАУ и МЕА (56 и 23 мкг/г) и была на 1-2 порядка меньше, чем на зерне (см. табл. 1). Такое же снижение от 300 мкг/г (на зерне) до 26 мкг/г (на МЕА) было отмечено ранее для штамма *A. tenuissima* AI 392, изолированного из овса (33).

Культуры *A. arborescens* продуцировали АОЛ гораздо слабее, чем представители *A. tenuissima*. На НАУ и V-8 его удалось детектировать только у штамма № 8. На средах РСА и МЕА количество токсина варьировало от 0,03 до 0,4 мкг/г (см. табл. 2) и, как и у *A. tenuissima*, значительно уступало значениям в варианте с зерновым субстратом. Ранее у трех штаммов *A. arborescens* из зерна пшеницы и семян подсолнечника было отмечено более интенсивное накопление АОЛ на МЕА — от 3,3 до 36 мкг/г (34), у пяти культур из зерновых кормов и трех коллекционных штаммов — от 2 до 79 мкг/кг (28). К сожалению, из-за малого числа изолятов, доступных для изучения, объем сведений по потенциалу биосинтеза АОЛ у этого вида, остается недостаточным.

Представители комплекса видов '*A. infectoria*' по токсинообразованию на агаровых средах различались попарно (№ 6, № 13 и № 14, № 16) — первые два не образовывали токсин, у других он был обнаружен. У обоих изолятов способность к продуцированию была выявлена только на РСА и МЕА в сопоставимых количествах соответственно 0,08-1,3 и 0,03-0,1 мкг/г.

Обобщение этих данных показывает, что из всех испытанных микологических сред коммерческая среда МЕА обеспечивала устойчивый положительный метаболический ответ для культур *A. tenuissima*, *A. arborescens* и '*A. infectoria*', поэтому может быть рекомендована, наряду с зерновым субстратом, для оценки *in vitro* их биосинтетического потенциала в расширенном формате.

По морфологическим характеристикам все штаммы *A. tenuissima* были типичными: имели неразветвленные цепочки, состоящие из 5-10 шиловидных конидий с удлинённой шейкой, плотно-бархатистые колонии темно-серого цвета с черной обратной стороной и умеренную скорость роста на РСА и YES. Каких-либо особенностей по цвету, структуре колоний и скорости роста у единственного непродуцирующего штамма № 15 выявлено не было. Учитывая обнаружение АОЛ при его культивировании на зерновом субстрате, хоть и в наименьшем количестве (см. табл. 1), можно допустить его биосинтез и на агаровых средах, но в концентрациях ниже 0,01 мкг/кг, то есть за пределом определения метода.

Описание культурально-морфологических признаков штаммов *A. arborescens* со слабым спороношением и изолятов '*A. infectoria*', у которых спороношения добиться не удалось, приведено в таблице 3.

### 3. Культурально-морфологические признаки штаммов *Alternaria arborescens* и изолятов комплекса видов '*A. infectoria*', выделенных из зерна овса (*Avena sativa* L.) сорта Яков, на двух агаровых средах на 8-е сут выращивания

| Регистрационный № штамма | Структура, цвет и диаметр (d) колоний           |  |
|--------------------------|---|--|
|                          | РСА   | YES  |
| <i>A. arborescens</i>    |   |  |
| 5                        | Бархатистая, темно-серая                        | Плотно-бархатистая с отчетливыми концентрическими кругами, серая, обратная сторона почти черная, d = 47 мм |
| 8                        | Бархатистая, светло-серая, в центре темно-серая | Плотно-бархатистая, серая, обратная сторона почти черная, d = 39 мм  |
| <i>'A. infectoria'</i>   |   |  |
| 6                        | Рыхло-пушистая, темно-серая                     | Слабопушистая, розово-бело-серая, обратная сторона почти черная, d = 55 мм                                 |
| 13                       | Рыхлая, тяжистая, светло-серая                  | Рыхло-пушистая, бело-розовая, обратная сторона серая, d = 39 мм  |

|    |  |  |
|----|--|--|
| 14 | Войлокоподобная, темно-серая                           | Плотная, бархатистая, бело-розовая со слабо выраженными концентрическими кругами, обратная сторона коричневая, d = 40 мм |
| 16 | Войлокоподобная, светло-серая в центре, серая по краям | Плотная, бархатистая, бело-розовая, обратная сторона коричневая, d = 50 мм   |

П р и м е ч а н и е. Описание условий культивирования см. в разделе «Методика».

Колонии *A. arborescens* на РСА и YES практически не различались по размерам и внешнему виду, но у штамма № 5, который, в отличие от № 8, продуцировал токсин на всех четырех средах (см. табл. 2), на YES были хорошо заметны концентрические круги. У представителей '*A. infectoria*' колонии также были примерно одинаковыми (с диаметрами 39–55 мм), но попарно различались по плотности (№ 6, № 13 и № 14, № 16) (см. табл. 3) и по способности к токсинообразованию (см. табл. 2). Изолят № 6, резко отличающийся от всех остальных окраской воздушного мицелия и реверса на YES, не образовывал токсин на агаровых средах (см. табл. 2) и на зерновом субстрате (см. табл. 1). У парного с ним изолята № 13, который не продуцировал АОЛ на агаровых средах, но синтезировал его на зерне, признаков культурального сходства с продуцентами № 14, № 16 было больше. Максимальное накопление АОЛ (1,3 мкг/г, РСА) обеспечивал изолят № 14, на плотной бархатистой колонии которого наблюдались концентрические круги (см. табл. 3).

О способности продуцировать АОЛ изолятами '*A. infectoria*' из зерна овса сообщается впервые. Известно о продуцирующей способности грибов этого комплекса из зерна пшеницы, но нет подробного описания их макроморфологических признаков. Так, для штамма российского происхождения показано образование АОЛ в количестве 2,01 мкг/г (35), для 12 штаммов из Италии — в диапазоне от 0,3 до 20 мкг/г со средним значением 4 мкг/г (36), для 98 % изолятов в Аргентине — в количестве от 1,8 до 433,3 мкг/г со средним содержанием 62,2 мкг/г (37). О морфотипах '*A. infectoria*', различающихся характером пигментации, впервые сообщалось в работе В. Kosiak с соавт. (38). Недавно для атипичного изолята '*A. infectoria*' из семян подсолнечника с особенностями в структуре колонии и повышенной скоростью роста было показано продуцирование АОЛ на агаровых средах в количествах от 2 до 220 мкг/г (28). Продолжение изучения токсинообразования и культуральных свойств грибов этой систематически сложной группы остается актуальным и важным для уточнения ряда таксономических аспектов (39, 40).

Таким образом, для ряда штаммов *Alternaria arborescens* и изолятов комплекса '*A. infectoria*', выделенных из зерна овса сорта Яков, описаны соответствия между макроморфологическими характеристиками и способностью продуцировать альтернариол. При сравнительном изучении интенсивности биосинтеза альтернариола грибами *A. tenuissima*, *A. arborescens* и '*A. infectoria*' на панели агаровых сред, рекомендованных для видовой идентификации, показано, что для расширенных форматов токсикологического мониторинга целесообразно использовать коммерческий солодовый агар, наряду с твердым зерновым субстратом. Установлено, что преимущественный вклад в контаминацию образца зерна альтернариолом вносит вид *A. tenuissima*, в меньшей степени — представители *A. arborescens* и комплекса '*A. infectoria*'. В дальнейшем целесообразно предпринять развернутую оценку популяций мелкоспоровых видов *Alternaria*, ассоциированных с зерном овса, по аналогичной комплексной методической схеме, включающей микологический и токсикологический анализ.

## TOXIN-PRODUCING SMALL-SPORE *Alternaria* SPECIES FROM OAT GRAIN CONTAMINATED WITH ALTERNARIOL

G.P. Kononenko✉, E.A. Piryazeva, A.A. Burkin

All-Russian Research Institute of Sanitary, Hygiene and Ecology — Branch of FSC Skryabin and Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 5/1, Zvenigorodskoe sh., Moscow, 123022 Russia, e-mail kononenkorp@mail.ru (✉ corresponding author), piryazeva01@yandex.ru, aaburkin@mail.ru

ORCID:

Kononenko G.P. orcid.org/0000-0002-9144-615X

Burkin A.A. orcid.org/0000-0002-5674-2818

Piryazeva E.A. orcid.org/0000-0001-5443-3213

The authors declare no conflict of interests

Final revision received March 18, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2023.3.567eng

Accepted April 07, 2023

### Abstract

For many years, the problem of grain infestation with toxin-forming fungi *Alternaria* has been under the close attention (S.M. Tralamazza et al., 2018). Extensive studies have been carried out on wheat (M.T. Amatulli et al., 2013; M.E. Müller, U. Korn, 2013) and barley (V. Sanchis et al., 1993; T.T.T. Nguyen et al., 2018). The grain of oats has been studied much less, and it is still unclear which species of fungi of this genus and to what extent are responsible for the accumulation of the toxin alternariol (AOL). In our country, data have been obtained on the infection with *Alternaria* fungi of oat grains from a number of regions (O.P. Gavrilova et al., 2016; Yu.I. Vargach et al., 2019), as well as grain samples of varieties and lines from the VIR collection detected in field tests (A.S. Orina et al., 2017), however, the frequency of occurrence of the toxin was estimated for several regional lots in total (A.A. Burkin et al., 2015; G.P. Kononenko et al., 2020). In this study, it was established for the first time that the species *A. tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire, which is known as an active AOL producer, and to a lesser extent representatives of *A. arborescens* E.G. Simmons and the '*A. infectoria*' complex can participate in the contamination of oat grains. The aim of the work was to study the species affiliation and toxin-forming ability of *Alternaria* fungi isolated from oat grain with natural AOL contamination. The object of the study was a sample obtained in October 2020 from an agricultural enterprise of the Moscow Province (Odintsovo District) containing AOL in the amount of 630 ppb. Isolation of pure fungal cultures was carried out after surface sterilization of grain and its sowing on Chapek-Dox agar containing bile and antibiotics. Color, structure, and growth rate of colonies were described on yeast extract sucrose agar (YES) and potato-carrot (PCA) on day 8. To assess their toxin formation, oat grain and a panel of four mycological media were used — PCA, malt extract agar (MEA), hay infusion agar (HAY) and an analog of vegetable agar (V-8). After cultivation (7 days, 25 °C, without lighting) and extraction of biomass samples with a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 84:16, AOL was determined by ELISA test (A.A. Burkin, G.P. Kononenko, 2011) with a detection limit of 0.01 µg/g. In the subepidermal mycobiota of the studied sample, representatives of the genus *Alternaria* were predominant, the degree of infection was 36.0 %, and they were accompanied by fungi *Fusarium* spp. (14.7 %) and *Epicoccum* spp. (2.7 %). After carrying out mycological procedures for the isolation and identification of *Alternaria* cultures, they were assigned to the species *A. tenuissima* (Nees et T. Nees:Fries) Wiltshire (7 strains), *A. arborescens* E.G. Simmons (2 strains) and to the species complex '*A. infectoria*' (4 isolates). On the grain substrate, all strains of *A. tenuissima*, *A. arborescens* and three isolates of '*A. infectoria*' produced AOL in amounts of 370, 5 and 0.8 µg/g. When testing cultures under the same conditions on agar media, the intensity of AOL accumulation in *A. tenuissima* was highest on HAY and MEA (56 and 23 µg/g), in *A. arborescens* and '*A. infectoria*' — on PCA and MEA. Taking this into account, commercial substrate MEA and oat grains are recommended for in vitro evaluation of the biosynthetic potential of fungi and their involvement in contamination of AOL grains in an expanded format. The cultural and morphological features of several cultures of *A. arborescens* and '*A. infectoria*' and their ability to AOL biosynthesis are discussed in a comparative aspect.

Keywords: oat grain, *Alternaria tenuissima*, *A. arborescens*, '*A. infectoria*', alternariol, ELISA.

## REFERENCES

1. Amatulli M.T., Fanelli F., Moretti A., Mule G., Logrieco A.F. *Alternaria* species and mycotoxins associated to black point of cereals. *Mycotoxins*, 2013, 63(1): 39-46.
2. Müller M.E., Korn U. *Alternaria* mycotoxins in wheat — a 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 2013, 34(1): 191-197 (doi: 10.1016/j.foodcont.2013.04.018).
3. Tralamazza S.M., Piacentini K.C., Iwase C.H.T., De Oliveira Rocha L. Toxicogenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 23: 57-63 (doi: 10.1016/j.cofs.2018.05.002).
4. Sanchis V., Sanclemente A., Usall J., Viñas I. Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. *Journal of Food Protection*, 1993, 56(3): 246-248 (doi: 10.4315/0362-028X-56.3.246).
5. Nguyen T.T.T., Kim J., Jeon S.J., Lee C.W., Magan N., Lee H.B. Mycotoxin production of *Alternaria* strains isolated from Korean barley grains determined by LC-MS/MS. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 268: 44-52 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.003).
6. *Fodder oats: a world overview*. J.M. Suttie, S.G. Reynolds (eds.). Plant Production and Protection Series No. 33. FAO, Rome, 2004.
7. Sacchi C., González H.H.L., Broggi L.E., Pacin A., Resnik S.L., Cano G., Taglieri D. Fungal contamination and mycotoxin natural occurrence in oats for race horses feeding in Argentina. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 152(3-4): 330-335 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.04.008).
8. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 2011, 9(10): 2407-2505 (doi: 10.2903/j.efsa.2011.2407).
9. Lee H.B., Patriarca A., Magan N. *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and Toxicology. *Mycobiology*, 2015, 43(2): 93-106 (doi: 10.5941/MYCO.2015.43.2.93).
10. Gruber-Schley S., Thalmann A. The occurrence of *Alternaria* spp. and their toxins in grain and possible connections with illness in farm animals. *Landwirtschaftliche Forschung*, 1988, 41(1-2): 11-29.
11. Logrieco A., Bottalico A., Solfrizzo M., Mule G. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*, 1990, 82(4): 501-505 (doi: 10.1080/00275514.1990.12025914).
12. Häggblom P., Stepinska A., Solyakov A. *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. *Proc. 29<sup>th</sup> Mycotoxin-Workshop*. Gesellschaft für Mykotoxin Forschung, Stuttgart-Fellbachm, 2007: 35.
13. Uhlig S., Sundstøl Eriksen G., Skow Hofgaard I., Krška R., Beltrán E., Sulyok M. Faces of changing climate: semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins*, 2013, 5(10): 1682-1697 (doi: 10.3390/toxins5101682).
14. Tittlemier S.A., Blagden R., Chan J., Roscoe M., Pleskach K. A multi-year survey of mycotoxins and ergosterol in Canadian oats. *Mycotoxin Research*, 2020, 36: 103-114 (doi: 10.1007/s12550-019-00373-9).
15. De Colli L., De Ruyck K., Abdallah M.F., Finnan J., Mullins E., Kildea S., Spink J., Elliott Ch., Danaher M. Natural co-occurrence of multiple mycotoxins in unprocessed oats grown in Ireland with various production systems. *Toxins*, 2021, 13(3): 188 (doi: 10.3390/toxins13030188).
16. Babič J., Tavčar-Kalcher G., Celar F.A., Kos K., Knific T., Jakovac-Strajn B. Occurrence of *Alternaria* and other toxins in cereal grains intended for animal feeding collected in Slovenia: A three-year study. *Toxins*, 2021, 13(5): 304 (doi: 10.3390/toxins13050304).
17. Gavrilova O.P., Gannibal F.B., Gagkaeva T.Yu. *Fusarium* and *Alternaria* fungi in grain of oats grown in the North-Western Russia regarding cultivar specificity. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(1): 111-118 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.111eng).
18. Vargach Yu.I., Golovin S.E., Loskutov I.G. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii*, 2019, 180(3): 96-105 (doi: 10.30901/2227-8834-2019-3-96-105) (in Russ.).
19. Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Loskutov I.G. Symbiotic relationships between aggressive *Fusarium* and *Alternaria* fungi colonizing oat grain. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(5): 986-994 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.986eng).
20. Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Markova A.S., Kabashov A.D., Loskutov I.G. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii*, 2020, 181(2): 134-144 (doi: 10.30901/2227-8834-2020-2-134-144) (in Russ.).
21. Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu. *Sovremennaya mikologiya v Rossii*, 2015, 5(5): 221-223 (in Russ.).
22. Kononenko G.P., Burkin A.A., Zotova E.V. *Veterinariya segodnya*, 2020, 2(33): 139-145 (doi: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-139-145) (in Russ.).
23. Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Gannibal F.B. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2020, 54(5): 365-377 (doi: 10.31857/S0026364820050086) (in Russ.).



24. Orina A.S., Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Gogina N.N. *Vestnik zashchity rasteniy*, 2021, 104(3): 153-162 (doi: 10.31993/2308-6459-2021-104-3-15019) (in Russ.).
25. *Metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu i kolichestvennomu uchetu mikroskopicheskikh gribov v zerne* [Methodological recommendations for the isolation and quantitative accounting of microscopic fungi in grain]. Moscow, 2006 (in Russ.).
26. Simmons E.G. *Alternaria. An identification manual*. Utrecht, CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007.
27. Gannibal F.B. *Monitoring al'ternariozov sel'skokhozyaystvennykh kul'tur i identifikatsiya gribov roda Alternaria. Metodicheskoe posobie* [Monitoring of Alternariosis of agricultural crops and identification of fungi of the genus *Alternaria*. Methodical manual]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.).
28. Kononenko G.P., Piryazeva E.A., Burkin A.A. Production of alternariol in the populations of grain feed-associated small spore *Alternaria* species. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, 55(3): 628-637 (doi: 10.15389/agrobiolgy.2020.3.628eng).
29. *Introduction to food- and airborne fungi*. R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad, O. Filtenborg (eds.). CBS, Utrecht, 2000.
30. Burkin A.A., Kononenko G.P. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2011, 47(1): 79-83 (in Russ.).
31. Gagkaeva T.Yu., Gavrilova O.P., Orina A.S., Kazartsev I.A., Gannibal F.B. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2017, 51(5): 292-298 (in Russ.).
32. Piryazeva E.A., Kononenko G.P. *Sovremennaya mikologiya v Rossii*, 2017, 7: 175-177 (in Russ.).
33. Ustyuzhanina M.I., Burkin A.A., Kononenko G.P., Piryazeva E.A., Zotova E.V. Alternative assay media for alternariol production by *Alternaria* species. *Proc. VIII Int. Conf. on Environmental, Industrial and Applied Microbiology — BioMicroWorld2018 «Global progress in applied microbiology: a multidisciplinary approach»*. A. Méndez-Vilas (ed.). Badajoz, Formatex Research Center, 2018: 1-5.
34. Kononenko G.P., Ustyuzhanina M.I., Orina A.S. Multi-substrate screening the ability to produce alternariol among *Alternaria arborescens* strains. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 2019, 10: 41-42.
35. Zwickel T., Kahr S.M., Rychlik M., Müller E.H. Chemotaxonomy of mycotoxigenic small-spored *Alternaria* fungi – Do multitoxin mixtures act as an indicator for species differentiation? *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1368 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01368).
36. Ramires F.A., Masiello M., Somma S., Villani A., Susca A., Logrieco A.F., Luz C., Meca G., Moretti A. Phylogeny and mycotoxin characterization of *Alternaria* species isolated from wheat grown in Tuscany, Italy. *Toxins*, 2018, 10(11): 472 (doi: 10.3390/toxins10110472).
37. Oviedo M.S., Sturm M.E., Reynoso M.M., Chulze S.N., Ramirez M.L. Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(2): 447-455 (doi: 10.1590/S1517-83822013000200017).
38. Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Andersen B. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality — a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 93(1): 51-62 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.006).
39. Kelman M.J., Renaut J.B., Seifert K.A., Mack J., Yeung K. K.-C., Sumareh M.W. Chemotaxonomic profiling of Canadian *Alternaria* populations using high-resolution mass-spectrometry. *Metabolites*, 2020, 10(6): 238 (doi: 10.3390/metabo10060238).
40. Patriarca A., da Cruz Cabral L., Pavicich M.A., Nielsen K.F., Andersen B. Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 291: 135-143 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.022).