

УДК 632.4:636.086.3:633.31/.37

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАРАЖЕННОСТИ ГРИБАМИ ОДНОЛЕТНИХ И МНОГОЛЕТНИХ ТРАВ СЕМЕЙСТВА *LEGUMINOSAE* МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

А.С. Орина, О.П. Гаврилова, Т.Ю. Гагкаева

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Незаменимыми компонентами сбалансированных кормов для животных являются бобовые травы, качество которых зачастую определяется зараженностью растений фитопатогенными грибами. С использованием метода количественной ПЦР проанализировали содержание грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* в 77 образцах 13 видов бобовых трав, собранных в 2015 году в 5 областях Европейской части России. Установлено, что на количество ДНК грибов в растениях достоверное влияние оказывают вид растения, строение его стебля, место и месяц сбора образцов. Наибольшие количества ДНК *Alternaria* накапливали представители рода *Melilotus*, в то же время *Lathyrus* spp. и *Trifolium* spp. содержали больше ДНК *Cladosporium*, наименее контаминирован этими грибами был козлятник восточный. Наибольшие количества *Tri-Fusarium* выявлены в растениях *Lathyrus* spp. Образцы из Псковской области в среднем содержали наибольшие количества ДНК *Alternaria* и *Cladosporium*, тогда как образцы из Смоленской области в среднем были наиболее контаминированы грибами *Tri-Fusarium*. Выявлено неравномерное накопление ДНК грибов в образцах в зависимости от месяца сбора растений: с увеличением срока вегетации возрастала как встречаемость грибов *Tri-Fusarium* и *Cladosporium* в образцах, так и зараженность ими растений. Растения, имеющие стелящийся стебель, в среднем содержали в 3 раза больше ДНК *Cladosporium*, чем растения с прямостоящим стеблем. Многолетние бобовые травы содержали в среднем в 11 раз больше ДНК *Tri-Fusarium*, по сравнению с одно- и двулетними растениями. Количество ДНК *Tri-Fusarium* в немедоносных бобовых травах было в среднем в 12 раз больше, по сравнению с содержанием этих грибов в медоносных травах.

Выявлена достоверная связь между количествами ДНК грибов *Alternaria* и *Cladosporium* во всех образцах растений (коэффициент корреляции +0.31, при $p < 0.05$).

Ключевые слова: бобовые травы; грибы; *Alternaria*; *Cladosporium*; *Fusarium*; ДНК; количественная ПЦР.

Возделывание бобовых трав является важным направлением обеспечения кормопроизводства качественным сырьём. Кормовые бобовые травы богаты белком, что позволяет на их основе получать сбалансированные по протеину корма для животных. Также они обеспечивают сохранение плодородия почвы. Бобовые травы широко используются не только в полевом кормопроизводстве, но и в луговом, при создании культурных пастбищ и сенокосов.

Важной проблемой, влияющей на качество получаемых кормов, являются заболевания, вызываемые фитопатогенными грибами. В результате фитосанитарного мониторинга установлено, что из 15 болезней клевера наиболее распространёнными являются рак, корневые гнили, бурая пятнистость, аскохитоз, антракноз и ржавчина [Пуца и др., 2012]. Исследователями проблемы фузариозных гнилей клевера отмечена встречаемость нескольких видов грибов *Fusarium* Link [Разгуляева, 2012].

Ранее проведенный нами анализ микобиоты (оценка КОЕ микроорганизмов в смывах с растений) позволил идентифицировать свыше пяти родов грибов, встречающихся на бобовых растениях (*Trifolium* spp. и *Medicago* spp.), доминирующими из которых являлись представители *Cladosporium* Link и *Phoma* Sacc., с меньшей частотой встречались виды *Fusarium* и *Alternaria* Nees [Kononenko et al., 2015]. Также грибы родов *Cladosporium*, *Alternaria* и *Fusarium* считаются преобладающими в составе семенной инфекции различных видов клевера и люцерны [Марченко, 2013; Leach, 1955; Kellock et al., 1978; Lager, Johnsson, 2002].

Многие представители грибов выявленных на растениях способны в процессе жизнедеятельности продуцировать токсичные вторичные метаболиты, которые оказывают негативный эффект на здоровье потребителя растительной продукции [Barbetti, Allen, 2005]. В Западной Австралии выявлены случаи отказа овец от употребления кормов, приготовленных на основе *Medicago*, из-за их значительной контаминации грибами *Fusarium* и продуцируемыми ими микотоксинами [Tan et al., 2011].

Метод ПЦР в реальном времени, количественно выявляющий в тканях растений биомассу грибов по содержанию их ДНК, использованный в данном исследовании, уже зарекомендовал себя как наиболее удобный способ быстрой и объективной оценки состояния зараженности сельскохозяйственных культур [Kulik et al., 2015].

Целью исследования являлась оценка количественного присутствия грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* в тканях тринадцати видов растений из семейства *Leguminosae*, собранных в различных регионах Европейской части России.

В биоценозах различные организмы существуют не изолированно, они вступают между собой в разнообразные прямые и косвенные консортивные отношения, направленность которых зависит от многих факторов. Перед нами стояли задачи оценить обильность наиболее многочисленных групп микромицетов, способных оказать негативное воздействие на здоровье млекопитающих, и выявить особенности их распространения среди различных видов бобовых трав.

Материалы и методы

В исследование были включены 77 образцов бобовых трав, относящихся к 13 различным видам шести родов бобовых культур (табл. 1). Для определения систематических групп растений использовали пособия [Губанов и др., 2003; Скворцов, 2004]. Сборы проводили с мая по август 2015 г. в Ленинградской (48 образцов 9 видов растений), Новгородской (5 образцов 5 видов),

Псковской (11 образцов 6 видов), Смоленской (10 образцов 7 видов) областях и Пермском крае (3 образца 2 видов). По срокам отбора образцов весь растительный материал разделили на три группы: растения, собранные в мае-июне (30 образцов 12 видов), в июле (20 образцов 10 видов) и в августе (27 образцов 10 видов). Возраст, габитус растений и характеристику медоносности (ме-

Таблица 1. Характеристика видов бобовых культур, использованных в исследовании

Род	Вид		Число образцов	Форма произрастания стеблей	Продолжительность жизненного цикла растения	Медопродуктивность (кг/га)*
<i>Galega</i> Tourm. ex L.	козлятник восточный	<i>G. orientalis</i> Lam.	5	Прямостоящие	Многолетнее	60
<i>Lathyrus</i> L.	чина луговая	<i>L. pratensis</i> L.	6	Лазающие	Многолетнее	30
	чина лесная	<i>L. sylvestris</i> L.	2	Лазающие	Многолетнее	30
<i>Medicago</i> L.	люцерна посевная	<i>M. sativa</i> L.	5	Прямостоящие	Многолетнее	170
	люцерна серповидная	<i>M. falcata</i> L.	3	Прямостоящие	Многолетнее	170
<i>Melilotus</i> Mill.	донник белый	<i>M. albus</i> Medik.	6	Прямостоящие	Одно- или двулетнее	200
	донник лекарственный	<i>M. officinalis</i> (L.) Pall.	4	Прямостоящие	Двулетнее	200
<i>Trifolium</i> L.	клевер гибридный	<i>T. hybridum</i> L.	9	Стелящиеся	Многолетнее	145
	клевер луговой	<i>T. pratense</i> L.	13	Стелящиеся	Многолетнее	90
	клевер ползучий	<i>T. repens</i> L.	7	Стелящиеся	Многолетнее	120
<i>Vicia</i> L.	горошек заборный	<i>V. sepium</i> L.	3	Прямостоящие / опирающиеся	Многолетнее	9
	горошек мышиный	<i>V. cracca</i> L.	10	Стелящиеся / лазающие	Многолетнее	69
	вика посевная	<i>V. sativa</i> L.	4	Прямостоящие	Одно- или двулетнее	9

*Согласно Клименковой и др. (1981) растения с медопродуктивностью выше 60 кг/га относятся к медоносам, растения с медопродуктивностью ниже 60 кг/га – к немедоносам.

допродуктивность) определяли по Федченко [1948]; Клименкова и др. [1981], Губанов и др. [2003].

Вегетирующие растения срезали на высоте 5 см над уровнем почвы. После сбора образцы высушивали и измельчали в стерильных размольных стаканах на мельнице Tube Mill Control (ИКА).

Выделение ДНК из 200 мг растительной муки и мицелия типовых штаммов грибов проводили с использованием набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. Концентрацию полученной ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 с набором реагентов Quant-iTdsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Пробы ДНК штаммов грибов разбавляли до концентрации 10 нг/мкл и использовали для построения калибровочных кривых. Пробы ДНК, выделенные из растительных образцов, разбавляли до рабочих концентраций от 2 до 50 нг/мкл.

Результаты

Влияние вида растения

Грибы рода *Alternaria* были выявлены в 83% образцов. Встречаемость этих грибов варьировала в широких пределах: от 20% в образцах козлятника восточного до 100% образцов клевера лугового и клевера ползучего. В целом, наибольшие количества ДНК грибов *Alternaria* (1115×10^{-7} нг) накапливали представители рода *Melilotus*. Максимальное содержание ДНК этих грибов выявлено в образце донника лекарственного из Ленинградской области – 3620×10^{-7} нг. Растения, относящиеся к другим родам, были колонизированы грибами *Alternaria* в меньшей степени – от 160×10^{-7} до 396×10^{-7} нг ДНК (рис 1).

Грибы рода *Cladosporium* встречались в 100% образцов. Растения чины (*Lathyrus* spp.) и клеверов (*Trifolium* spp.) характеризовались высокими содержаниями этих грибов – 8680×10^{-7} и 9134×10^{-7} нг ДНК, соответственно. Тогда как растения козлятника восточного оказались менее контаминированными грибами *Cladosporium* – 184×10^{-7} нг ДНК.

Грибы *Tri-Fusarium* выявлены в 52% всех образцов, причем образцы чины лесной и горошка заборного не были контаминированы этими грибами, а встречаемость *Tri-Fusarium* в образцах других видов варьировала от 25% в образцах донника желтого до 89% в образцах клевера лугового. Наибольшие количества ДНК *Tri-Fusarium* выявлены в растениях чины луговой (1998×10^{-7} нг), зараженность растений других родов была значительно ниже – от 14×10^{-7} до 157×10^{-7} нг.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа установили достоверное влияние вида растения (13 видов) на количество ДНК грибов *Alternaria* и *Cladosporium* в растительном материале ($p=0.047$ и $p=0.025$ соответственно). Если сгруппировать образцы по родам (6 групп), то влияние этого фактора на количество ДНК грибов *Alternaria* и *Cladosporium* в растительном материале также является достоверным ($p=0.032$ и $p=0.0042$ соответственно). Достоверного влияния вида и рода растения на количество ДНК грибов *Tri-Fusarium* не выявлено.

Влияние места сбора образцов растений

Количество ДНК грибов всех анализируемых групп грибов различалось в образцах бобовых культур, собранных в различных регионах (табл. 2). Встречаемость грибов *Alternaria* варьировала от 50% (Смоленская область) до 100% (Пермский край). Максимальное количество ДНК грибов *Alternaria* выявлено в образце из Псков-

С помощью кПЦР оценивали содержание ДНК грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и видов *Fusarium*, способных продуцировать трихотеценовые микотоксины (*Tri-Fusarium*) по методике, описанной ранее [Гаврилова и др., 2017], с применением праймеров и проб TaqMan [Zeng et al., 2005; Halstensen et al. 2006; Pavon et al., 2012]. Реакции ПЦР проводили на термоциклере CFX 96 Real-Time System (BioRad) минимум двукратно.

Сравнительный анализ контаминации бобовых трав грибами проводили по числу образцов, в которых была выявлена ДНК целевого объекта (доля встречаемости, %), а также по её содержанию в растительной ткани. Содержание грибной ДНК представляли в виде доли от общей ДНК (нг/нг общей ДНК – нг ДНК). Нижний достоверный предел выявления содержания ДНК грибов в пробе был установлен на уровне 5×10^{-7} нг ДНК.

Полученные результаты обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

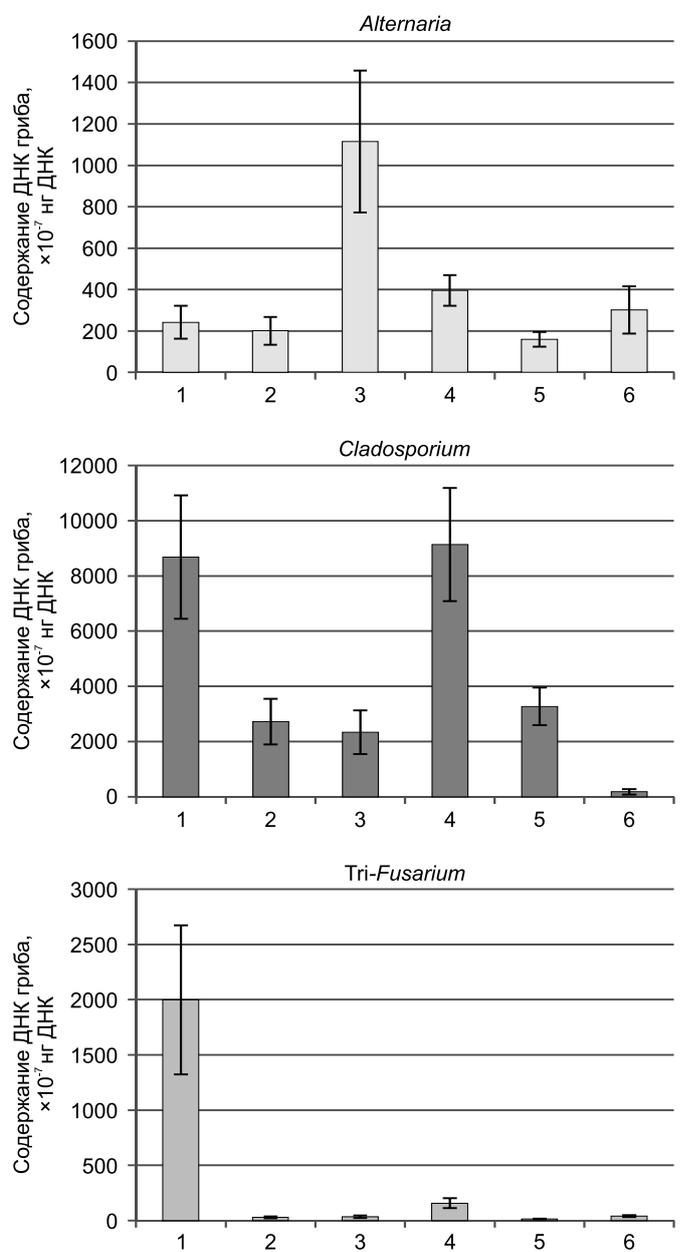


Рисунок 1. Содержание биомассы грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах растений различных видов бобовых культур: 1 – *Lathyrus* spp.; 2 – *Medicago* spp.; 3 – *Melilotus* spp.; 4 – *Trifolium* spp.; 5 – *Vicia* spp.; 6 – *Galega orientalis*

ской области (3619×10^{-7} нг), минимальное – в образце из Ленинградской области (5×10^{-7} нг). Наименьшее и наибольшее количество ДНК грибов *Cladosporium* было выявлено в образцах из Ленинградской области – 7×10^{-7} и 54903×10^{-7} нг соответственно, при встречаемости в 100% всех исследованных образцов.

Таблица 2. Содержание ДНК грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах растений бобовых трав, собранных в разных регионах Европейской части России, 2015 г.

Регион сбора	Среднее количество ДНК в растительных образцах \pm ДИ*, $\times 10^{-7}$ нг ДНК		
	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Tri-Fusarium</i>
Ленинградская область	246 \pm 44	4490 \pm 1350	28 \pm 3
Новгородская область	220 \pm 65	2710 \pm 432	55 \pm 27
Псковская область	1180 \pm 420	10572 \pm 4741	38 \pm 18
Пермский край	1042 \pm 725	833 \pm 414	0
Смоленская область	112 \pm 37	8840 \pm 2919	1499 \pm 619

* ДИ – доверительный интервал при $p < 0.05$.

В образцах из Пермского края грибы *Tri-Fusarium* выявлены не были. Встречаемость их в других регионах составила от 45% (Псковская область) до 60% (Новгородская область). Минимальное количество ДНК грибов *Tri-Fusarium* выявлено в образце из Ленинградской области (5×10^{-7} нг), максимальное – в образце из Смоленской области (4920×10^{-7} нг).

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверно высокое влияние места сбора образцов на количество ДНК анализируемых групп грибов ($p=0.0088$ для *Alternaria*, $p=0.0042$ для *Cladosporium* и $p=0.0028$ для *Tri-Fusarium*).

Влияние времени сбора образцов растений

Выявлено неравномерное накопление ДНК всех анализируемых групп в образцах бобовых культур, в зависимости от месяца сбора растений (табл. 3). Встречаемость грибов рода *Alternaria* возрастала от 87% в образцах, собранных в мае и июне, до 90% в образцах июля, однако затем снижалась до 74% в образцах августа. Аналогичным образом распределялась между сроками сбора встречаемость грибов *Tri-Fusarium* – 47%, 60% и 52% в мае-июне, июле и августе, соответственно.

Таблица 3. Содержание ДНК грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах растений бобовых трав, собранных в разные сроки

Срок сбора	Среднее количество ДНК в растительных образцах \pm ДИ, $\times 10^{-7}$ нг ДНК		
	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Tri-Fusarium</i>
май-июнь	316 \pm 96	332 \pm 67	38 \pm 7
июль	649 \pm 232	8133 \pm 2680	28 \pm 7
август	247 \pm 47	9758 \pm 2340	634 \pm 271

* ДИ – доверительный интервал при $p < 0.05$.

В образцах *Melilotus* spp. и *Trifolium* spp., собранных в мае, содержание ДНК грибов *Alternaria* составляло 1200×10^{-7} и 186×10^{-7} нг ДНК, затем к июлю оно достигало максимума (для донников – 1944×10^{-7} нг ДНК и для клеверов – 743×10^{-7} нг ДНК). В августе количество ДНК этих грибов резко снижалось до 158×10^{-7} нг ДНК в образцах *Melilotus* spp. и до 294×10^{-7} нг ДНК в образцах *Trifolium* spp. В образцах *Lathyrus* spp. количество ДНК

грибов *Alternaria* уменьшалось с увеличением срока вегетации растений (от 332×10^{-7} до 15×10^{-7} нг ДНК). В растительном материале остальных бобовых культур (*Medicago* spp., *Vicia* spp. и *Galega orientalis*) накопление ДНК грибов *Alternaria* было относительно равномерным и не зависело от срока сбора.

Увеличение срока вегетационного периода приводило к нарастанию зараженности растительных образцов грибами *Cladosporium*, независимо от вида бобовой культуры. Особенно резким возрастанием зараженности этими грибами характеризовались *Lathyrus* spp. (от 904×10^{-7} до 16166×10^{-7} нг ДНК) и *Trifolium* spp. (от 260×10^{-7} до 15776×10^{-7} нг ДНК).

Также в августе образцы *Lathyrus* spp. накапливали значительно больше ДНК *Tri-Fusarium* (1998×10^{-7} нг), по сравнению с майскими сборами, в которых этих грибов не обнаружили. Такая же тенденция выявлена в отношении *Trifolium* spp., *Melilotus* spp. и *Galega orientalis*. В образцах *Medicago* spp. и *Vicia* spp. с увеличением срока вегетации происходило незначительное снижение количеств ДНК *Tri-Fusarium* в растительном материале.

Влияние габитуса растения

В образцах растений с прямостоящими стеблями (*V. sativa*, *Melilotus* spp., *G. orientalis*, *Medicago* spp.) по сравнению с образцами растений со стелящимися стеблями (*Lathyrus* spp., *Trifolium* spp., *V. sepium*, *V. cracca*) была отмечена немного более низкая встречаемость грибов *Alternaria* (70% и 91%) и *Tri-Fusarium* (43% и 57%). Однако содержание ДНК этих грибов в образцах растений, имеющих различный габитус, в среднем не имело достоверных различий. В то же время выявлено достоверное влияние характера роста стеблей на накопление ДНК *Cladosporium* ($p=0.003$): растения со стелящимися стеблями в среднем накапливали в 3 раза больше ДНК этих грибов, по сравнению с растениями, имеющими прямостоящие стебли (рис. 2).

Влияние продолжительности жизненного цикла растения

Встречаемость грибов *Alternaria* в образцах одно-/двухлетних растений (*Melilotus* spp., *V. sativa*) и многолетних бобовых трав (*G. orientalis*, *Lathyrus* spp., *Medicago* spp., *Trifolium* spp., *V. sepium*, *V. cracca*) составила 78% и 71% соответственно. В то же время образцы многолетних бобовых растений были в среднем в 3 раза менее контаминированы грибами *Alternaria* по сравнению с одно-/двухлетними травами (табл.4).

Таблица 4. Содержание ДНК грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах одно-/двухлетних и многолетних растений бобовых трав

Продолжительность жизненного цикла растения	Среднее количество ДНК в растительных образцах \pm ДИ, $\times 10^{-7}$ нг ДНК		
	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Tri-Fusarium</i>
одно-/двухлетние	894 \pm 317	2994 \pm 992	26 \pm 12
многолетние	295 \pm 61	6256 \pm 1400	290 \pm 119

* ДИ – доверительный интервал при $p < 0.05$.

Встречаемость грибов *Tri-Fusarium* не зависела от продолжительности жизни растений, они были выявлены в половине каждой из групп анализируемых образцов – 48% и 50% соответственно. Однако растения многолетних бобовых трав содержали в среднем в 11 раз больше

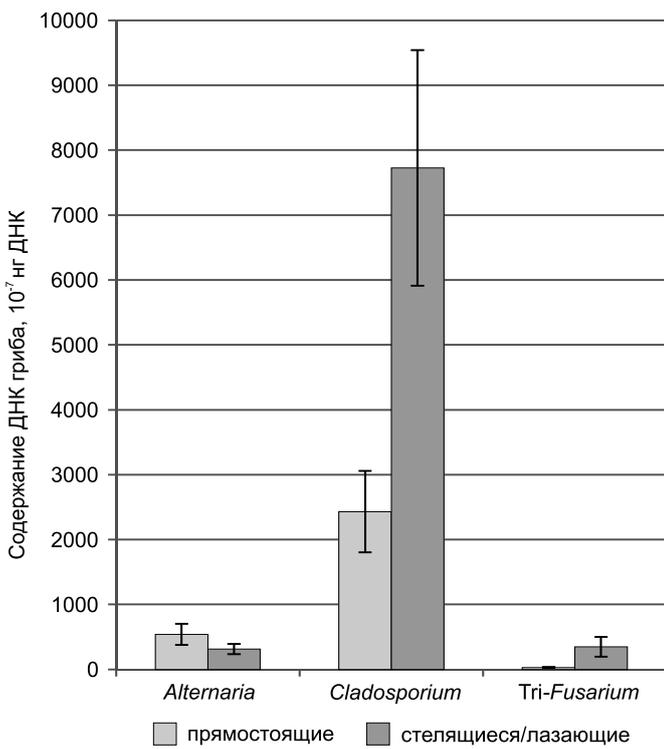


Рисунок 2. Содержание биомассы грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах растений с разной формой произрастания стеблей

Наблюдаемое в последние десятилетия активное внедрение молекулярно-генетических исследований для оценки микробиологического состояния растений в основном касается зерновых культур [Kulik et al., 2015]. Сложный габитус растений, различия в длине жизненных циклов, характерные для бобовых трав, усложняют проведение корректных анализов их микробиологической чистоты. С этой точки зрения возможности кПЦР, когда образец ДНК выделяют из навески гомогенной пробы, полученной при измельчении целых растений, представляют большие преимущества по сравнению с традиционными методами.

По мнению многих исследователей, грибы *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* входят в группу доминирующих представителей микобиоты кормовых бобовых растений [Leach, 1955; Lager, Johnsson, 2002; Kononenko et al., 2015]. Поэтому актуальная информация об их распространении, взаимоотношениях с растениями и другими микроорганизмами представляет высокий научный и практический интерес. Большинство выявляемых видов грибов *Alternaria* и *Cladosporium* характеризуются как сапротрофные организмы, тогда как многие виды *Tri-Fusarium* являются высокоагрессивными патогенами, но также могут вести и сапротрофный образ жизни [Leach, 1955; Kellock et al., 1978].

В нашем исследовании грибы *Cladosporium* являлись наиболее распространенными из трех анализируемых групп грибов, встречались во всех образцах, и содержание их ДНК достоверно зависело от вида бобового растения. Наиболее благоприятным субстратом для грибов *Cladosporium* являлись растения родов *Lathyrus* и *Trifolium*, где было выявлено высокое содержание их биомассы. Содержание ДНК *Cladosporium* в растениях, имеющих стелящиеся стебли, было значительно выше, чем в растениях

ДНК *Tri-Fusarium*, чем одно-/двулетние растения. Не выявлено достоверного влияния продолжительности жизни растений на накопление ДНК *Cladosporium*, эти грибы встречались в 100% образцов.

Влияние медоносности растения

В среднем встречаемость грибов *Alternaria* и *Tri-Fusarium* в образцах медоносных бобовых трав была выше (87% и 56% соответственно), чем в образцах немедоносных растений (67% и 33% соответственно). Тогда как грибы рода *Cladosporium* встречались в 100% образцов. Зараженность медоносных и немедоносных бобовых растений как грибами *Alternaria*, так и грибами *Cladosporium* не имела достоверных различий. В то же время немедоносные бобовые травы были контаминированы грибами *Tri-Fusarium* в среднем в 12 раз сильнее, чем медоносные (табл. 5).

Таблица 5. Содержание ДНК грибов *Alternaria*, *Cladosporium* и *Tri-Fusarium* в образцах медоносных и немедоносных бобовых трав

Медоносность	Среднее количество ДНК в растительных образцах ±ДИ, ×10 ⁻⁷ нг ДНК,		
	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Tri-Fusarium</i>
медоносные	412±91	5480±1359	107±56
немедоносные	259±63	6420±2143	1207±539

* ДИ – доверительный интервал при $p < 0.05$.

Обсуждение

с прямостоящими стеблями. Несмотря на то, что в ранних весенних сборах содержание ДНК *Cladosporium* было значительно ниже, чем в растениях более поздних периодов сбора, достоверного влияния продолжительности жизни растений на количество ДНК *Cladosporium* не выявлено.

Анализ содержания ДНК *Alternaria* в образцах растений выявил, что наибольшие количества биомассы этих грибов встречались в растениях рода *Melilotus*. В целом, встречаемость грибов *Alternaria* в образцах как одно-/двулетних, так и многолетних растений была одинаковой, но последние содержали в несколько раз больше биомассы грибов *Alternaria*. В растениях со стелящимися стеблями встречаемость грибов *Alternaria* была ниже, чем в растениях с прямостоящими стеблями, но количество ДНК грибов в среднем было сходным. Максимум встречаемости грибов рода *Alternaria* в растениях достигал в июле, по сравнению с более ранними и поздними сборами трав. В образцах растений из Смоленской области в среднем содержание этой группы грибов было ниже, чем в образцах из других областей.

Установлено, что грибы *Fusarium*, продуцирующие трихотеценовые микотоксины, встречались во всех анализируемых видах бобовых трав. В среднем значительно большее содержание биомассы этих грибов выявлено в растениях *Lathyrus*. Показано, что в сборах растений, проведенных в августе, значительно больше количество ДНК *Tri-Fusarium*, по сравнению с растениями, собранными в более ранние периоды. Установлено, что продолжительность жизни растений напрямую связана с содержанием фузариевых грибов, поскольку многолетние бобовые травы содержали в среднем в 11 раз больше ДНК *Tri-Fusarium*, по сравнению с одно-/двулетними растениями. Влияние габитуса растений на содержание ДНК

Tri-Fusarium грибов не выявлено. Выявлена чёткая связь между содержанием этих грибов и местом сбора образцов растений. Максимальное содержание ДНК *Tri-Fusarium* выявлено в растениях, собранных в наиболее южном из исследуемых регионов (Смоленская область). В тоже время, в образцах трав из Пермского края ДНК этой группы грибов не выявлена, а её минимальное количество обнаружено в образцах растений из Ленинградской области.

Анализ взаимоотношений между анализируемыми грибами выявил достоверную положительную связь между содержаниями ДНК грибов *Alternaria* и *Cladosporium* в образцах растений (коэффициент корреляции +0.31). При анализе контаминации грибами образцов, сгруппированных по определенному признаку, эта связь была еще значительнее: в растениях со стеляющимися стеблями коэффициент корреляции между содержанием ДНК грибов *Alternaria* и *Cladosporium* составил +0.47, а в образцах многолетних растений этот показатель достигал значения +0.48. Выявленный факт демонстрирует сходство требуемых условий для роста представителей *Alternaria* и *Cladosporium*, особенно в благоприятных обстоятельствах для сапротрофных грибов (близость почвы, ткани стареющего растения). Других достоверных связей между группами анализируемых грибов не выявлено.

Многие представители семейства *Leguminosae* являются ценным природным ресурсом, поскольку являются хорошими медоносными растениями. Согласно небольшому числу публикаций, микробиологический анализ цветочной пыльцы выявил её загрязнённость микромицетами, из которых наиболее представительными группами были грибы *Alternaria*, *Cladosporium* и *Penicillium*. Кроме того, в образцах мёда также чаще всего обнаруживали грибы, относящиеся к родам *Penicillium*, *Cladosporium* и *Alternaria* и различные микотоксины, продуцируемые этими грибами [González et al., 2005; Kačániová et al., 2011]. Упоминание о грибах *Fusarium*, как контаминантах продуктов пчеловодства, нами обнаружено только в работе

бразильских исследователей, согласно которым в анализированных образцах пыльцы были выявлены представители 10 родов микромицетов: *Aspergillus* (в 85% образцов), *Cladosporium* (63%), *Penicillium* (41%), *Alternaria* (19%), *Wallemia* и *Eurotium* (по 11%), *Mucor* (7%), *Curvularia*, *Paecilomyces* и *Fusarium* (4%) [Deveza et al., 2015]. Эти сведения определенным образом подтверждены нашими результатами, показывающими, что содержание грибов *Alternaria* в образцах медоносных бобовых трав было в среднем выше, по сравнению с образцами немедоносных, а различий этих групп по содержанию грибов *Cladosporium* не наблюдалось. Обратная ситуация выявлена в случае грибов *Tri-Fusarium* – немедоносные бобовые травы были контаминированы более высокими количествами ДНК *Tri-Fusarium*, чем медоносные. Выявленный факт требует дальнейшего изучения.

Вопрос о контаминации бобовых трав грибами также важен с точки зрения здоровья людей и животных. Зачастую причинами различных аллергий, возникающих у фермеров и животных, являются корма, зараженные грибами [Żukiewicz-Sobczak et al., 2013]. Показано, что споры грибов *Cladosporium* и *Alternaria* в значительных количествах присутствуют в воздухе и способны вызывать сильные аллергические реакции у людей и животных [Damialis et al., 2017]. Используемые в качестве кормов бобовые травы также могут являться источником спор грибов, присутствующих в тканях растений, поэтому целесообразно использовать быстрый, высокочувствительный метод выявления микромицетов, чтобы прогнозировать их возможную опасность для человека и животных.

Таким образом, показано, что что наиболее контаминированными грибами *Cladosporium* и *Fusarium* являлись растения *Lathyrus*. Представители рода *Trifolium* также содержали значительные количества биомассы грибов *Cladosporium*, а наибольшие количества биомассы *Alternaria* встречались в растениях рода *Melilotus*.

Исследование финансировано за счет проекта РНФ № 14-26-00067 (сбор образцов в Смоленской области) и гос. задания ФГБНУ ВИЗР (лабораторные анализы).

Выражаем глубокую признательность коллегам лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ ВИЗР за помощь в сборе и сохранении образцов трав.

Библиографический список (References)

- Гаврилова О.П. Количественная оценка зараженности видов рода *Trifolium* грибами и контаминации микотоксинами / О.П. Гаврилова, А.С. Орина, Т.Ю. Гагкаева // Агрохимия. 2017. N 11. С. 58–66.
- Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // М.: КМК, 2003. 665 с.
- Клименкова Е.Г. Медоносы и медосбор / Е.Г. Клименкова, Л.Г. Кушнир, А.М. Бачило // Минск: Ураджай, 1981. 87 с.
- Марченко Л.В. Фитосанитарная оценка семян клевера лугового (*Trifolium pratense*) / Л.В. Марченко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2013. N 6. С. 23–27.
- Пуца Н.М. О поражаемости кормовых трав основными грибными болезнями / Н.М. Пуца, Н.В. Разгуляева, Н.Ю. Костенко, Е.Ю. Благовещенская // Кормопроизводство. 2012. N 9. С. 24–25.
- Разгуляева Н.В. Экологическая селекция клевера лугового на устойчивость к основным болезням / Н.В. Разгуляева // Экологическая селекция и семеноводство клевера лугового. Результаты 25-летних исследований творческого объединения ТОС «Клевер». М.: ООО «Эльф ИПР», 2012. С. 192–197.
- Скворцов В.Э. Иллюстрированное руководство для ботанических практик и экскурсий в Средней России / В.Э. Скворцов // М.: КМК, 2004. 506 с.
- Федченко Б.А. *Vicia sativa* L. – горошек посевной / Б.А. Федченко // Флора СССР. Том XIII. М.: Изд-во АН СССР, 1948. С. 460–465.
- Barbetti M.J. Association of *Fusarium* species, with potential for mycotoxicosis, on pods of annual *Medicago* in Western Australia / M.J. Barbetti, J.G. Allen // Aust J Agric Res. 2005. Vol. 56. P. 279–284.
- Damialis A. Estimating the abundance of airborne pollen and fungal spores at variable elevations using an aircraft: how high can they fly? / A. Damialis, E. Kaimakamis, M. Konoglou, I. Akritidis, C. Traidl-Hoffmann, D. Gioulekas // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 44535.
- Deveza M.V. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen / M.V. Deveza, K.M. Keller, M.C.A. Lorenzon, L.M.T. Nunes, É.O. Sales, O.M. Barth // Braz J Microbiol. 2015. Vol. 46. N 4. P. 1171–1176.
- González G. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen / G. González, M.J. Hinojo, R. Mateo, A. Medina, M. Jiménez // Int J Food Microbiol. 2005. Vol. 105, N 1. P. 1–9.
- Halstensen A.S. Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins / A.S.

- Halstensen, K.C. Nordby, W. Eduard, S.S. Klemsdal // J Environ Monit. 2006. Vol. 8. P. 1235–1241.
- Hjelmroos M. Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables: *Cladosporium* and *Alternaria* / M. Hjelmroos // Grana. 1993. Vol. 32, N 1. P. 40–47.
- Kačániová M. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia / M. Kačániová, M. Juráček, R. Chlebo, V. Kňazovická, M. Kadasi-Horáková, S. Kunová, J. Lejková, P. Haščík // J Environ Sci Health. 2011. Vol. 46, N 7. P. 623–629.
- Kellock A.W. Seed-borne *Fusarium* species on subterranean clover and other pasture legumes / A.W. Kellock, L.L. Stubbs, D.G. Parbery // Aust J Agric Res. 1978. Vol. 29, N 5. P. 975–982.
- Kononenko G.P. Fungal species and multiple mycotoxin contamination of cultivated forage grasses / G.P. Kononenko, A.A. Burkin, O.P. Gavrilova, T.Yu. Gagkaeva // Agric Food Sci. 2015. Vol. 24. P. 323–330.
- Kulik T. Quantification of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium verrucosum* in conventional and organic grains by qPCR / T. Kulik, K. Treder, D. Zaluski // J Phytopathol. 2015. Vol. 163. P. 522–528.
- Lager J. Seed-borne fungi affect field emergence in red clover / J. Lager, L. Johnsson // J Plant Dis Protect. 2002. Vol. 109. P. 350–356.
- Leach C.M. Fungi associated with Oregon grown clover seed / C.M. Leach // Corvallis: Oregon state college, 1955. 141 p.
- Pavón M.Á. ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR / M.Á. Pavón, I. González, R. Martín, T. García Lacarra // Food Microbiol. 2012. V. 32, N 1. P. 165–171.
- Tan D.C. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and sheep feed refusal disorders in Western Australia / D.C. Tan, G.R. Flematti, E.L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam, S. Chakraborty // Mycotoxin Res. 2011. Vol. 27. P. 123–135.
- Zeng Q.Y. Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR / Q.Y. Zeng, S.O. Westermarck, A. Rasmuson-Lestander, X.R. Wang // J Environ Monit. 2006. Vol. 8, N 1. P. 153–160.
- Žukiewicz-Sobczak W.A. The role of fungi in allergic diseases / W.A. Żukiewicz-Sobczak // Adv Dermatol Allergol. 2013. Vol. 30, N 1. P. 42–45.

Translation of Russian References

- Gavrilova O.P. Quantitative assessment of fungal infection in *Trifolium* species and mycotoxins contamination / O.P. Gavrilova, A.S. Orina, T.Yu. Gagkaeva // Agricultural Chemistry. 2017. N 11. P. 58–66. (In Russian).
- Gubanov I.A. Illustrated manual of plants in Central Russia. V. 2. Magnoliophyta (dicotyledon: dialypetalous) / I.A. Gubanov, K.V. Kiseleva, V.S. Novikov, V.N. Tihomirov // M.: KMK, 2003. 665 p. (In Russian).
- Klimenkova E.G. Meliferous plants and honeyflow / E.G. Klimenkova, L.G. Kushnir, A.M. Bachilo // Minsk: Uradzhaj, 1981. P. 87. (In Russian).
- Marchenko L.V. Phytosanitary evaluation of red clover (*Trifolium pratense*) / L.V. Marchenko // Siberian herald of agricultural science. 2013. N 6. P. 23–27. (In Russian).
- Putsa N.M. On the susceptibility of forage grass to the main fungal diseases / N.M. Putsa, N.V. Razgulayeva, N.Yu. Kostenko, E.Yu. Blagoveschenskaya // Fodder Production. 2012. N 9. P. 24–25. (In Russian).
- Razgulayeva N.V. Ecological selection of clover meadow for resistance to the diseases / N.V. Razgulayeva // Ecological selection and seed-growing clover meadow. Results of 25-years researches of creative association TOC «Clovers». M.: Ehl'f IPR, 2012. P. 192–197. (In Russian).
- Skvorcov V.Eh. Illustrated guide for botanical practices and excursions in Central Russia / V.Eh. Skvorcov // M.: KMK, 2004. 506 p. (In Russian).
- Fedchenko B.A. *Vicia sativa* L. – common vetch / B.A. Fedchenko // Flora USSR. Volum XIII. M.: Izdatel'stvo AN USSR, 1948. P. 460–465. (In Russian).

Plant Protection News, 2018, 2(96), p. 35–41

ANALYSIS OF CONTAMINATION OF ANNUAL AND PERENNIAL *LEGUMINOSAE* GRASSES WITH FUNGI USING QUANTITATIVE PCR

A.S. Orina, O.P. Gavrilova, T.Yu. Gagkaeva

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

Significant components of feed are *Leguminosae* plants, which are often infected with phytopathogenic fungi. The method of quantitative PCR was used for analysis of the content of DNA of *Alternaria*, *Cladosporium*, and *Fusarium* fungi in 77 samples of 13 legume species harvested in 2015 in 5 regions of the European part of Russia. It has been established that the species of the legumes, the structure of their stems, the place and month of collection of samples effected on the quantity of fungal DNA in plants significantly. The samples *Melilotus* spp. accumulated the highest amounts of *Alternaria* DNA in comparison with other legumes. The samples of *Lathyrus* spp. and *Trifolium* spp. were the most contaminated with *Cladosporium* DNA. The highest amounts of Tri-*Fusarium* DNA were found in plants of *Lathyrus* spp. The prolongation of vegetation time of plants led to the increasing of contamination of the plants with Tri-*Fusarium* and *Cladosporium* fungi. The content of *Alternaria* DNA did not depend on the month of collection. The plants with the creeping stems contained on average 3 times more *Cladosporium* DNA than the plants with the erect stems. Perennial legumes contained an average of 11 times more Tri-*Fusarium* DNA, in compare with annual plants. The amount of Tri-*Fusarium* DNA in non-melliferous plants was 12 times higher than in melliferous grasses. The strong relationship between the contents of *Alternaria* DNA and *Cladosporium* DNA was revealed in all samples of legumes ($r = +0.31$, $p < 0.05$).

Keywords: legumes; fungi; *Alternaria*; *Cladosporium*; *Fusarium*; DNA; quantitative PCR.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
 *Орина Александра Станиславовна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: orina-alex@yandex.ru
 Гаврилова Ольга Павловна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: olgavrilova1@yandex.ru
 Гагкаева Татьяна Юрьевна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo Shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
 *Orina Aleksandra Stanislavovna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: orina-alex@yandex.ru
 Gavrilova Olga Pavlovna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: olgavrilova1@yandex.ru
 Gagkaeva Tatiana Yurevna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: t.gagkaeva@mail.ru

* Ответственный за переписку

* Corresponding author