

## TOKSĪNUS VEIDOJOŠO SĒŅU SASTOPAMĪBA UN SUGU IDENTIFICĒŠANA AUZU DĪGSTOS UN SKARĀS

### OCCURRENCE AND IDENTIFICATION OF TOXINS PRODUCING FUNGI IN OAT SEEDLINGS AND SEED-HEADS

Līga Feodorova-Fedotova<sup>1</sup>, Inta Jakobija<sup>1</sup>, Inga Moročko-Bičevska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>LLU Augu aizsardzības zinātniskais institūts "Agrihorts", <sup>2</sup>APP "Dārzkopības institūts"  
liga.feodorova-fedotova@llu.lv

**Abstract.** In Latvia, the sown areas of oats (*Avena sativa*) have significantly increased during the last decade. Favourable climate conditions, varieties with high yield potential and effective disease control are necessary for obtaining high yields. The information regarding oat diseases in Latvia is incomplete. The identification of oat pathogens was carried out in this study. The main focus was on mycotoxins producing fungi in seed heads. Twenty oat fields with integrated and organic farming systems and one field from State Stende Cereals Breeding Institute were surveyed. In order to identify fungal species and assess their prevalence during the vegetation season of 2020, 10 seedlings with disease symptoms from ten places in the field were collected at the beginning of vegetation; similarly, 10 panicles with disease symptoms were collected shortly before harvesting. Plant parts were surface sterilised, and fungi were isolated on potato dextrose agar. Pure cultures of fungal isolates were grouped and presumptively identified based on colony and spore morphology. The pure culture collection was established for further studies. ITS1/5.8S/ITS2 region was sequenced for 44 isolates that included typical representatives of dominating fungal groups. *Alternaria*, *Pyrenophora* and *Fusarium* species dominated among the isolated fungi. In oat grains, toxins producing species such as *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum* were identified. More detailed research and analysis of obtained data are in progress.

**Key words:** *Avena sativa*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pyrenophora* spp.

#### Ievads

Sējas auzu *Avena sativa* platības Latvijā pēdējā desmitgadē ievērojami palielinājušās, 2020. gadā sasniedzot 97.5 tūkst. ha, kas veido 13% no kopējās graudaugu sējplatības<sup>9</sup>. Latvijas klimatiskie apstākļi ir piemēroti auzu audzēšanai. Tās labi aug reģionos ar mērenu, mitru klimatu, un, salīdzinot ar kviešiem, auzām ir nepieciešams mazāks mēslojuma – N, P, K – daudzums (Forsberg, Reeves, 1995). Mazprasīgums saistībā ar mēslošanu un augšanas vietu padara auzas par piemērotām audzēšanai bioloģiskajās saimniecībās.

Auzas tiek uzskatītas par augstvērtīgu pārtikas produktu, tās satur dzīvības procesiem nozīmīgas aminoskābes, šķiedrvielas ( $\beta$ -glikānu), minerālvielas, vitamīnus, antioksidantus (Rasane et al., 2015). Ilgstoši iekļaujot uzturā auzu produktus, vērojami veselības uzlabojumi, tiek noregulēta lipīdu vielmaiņa, samazinās ateroskleroze, hipertensija, cukura līmenis asinīs, uzlabojas ādas stāvoklis (Sangwan et al., 2014). Auzas nesatur glutēnu, tāpēc ir droši lietojamas uzturā celiakijas pacientiem. Augstās uzturvērtības dēļ pieprasījums pēc auzām arvien palielinās.

Auzu ražību un graudu kvalitāti būtiski ietekmē patogēnu izplatība un radītie bojājumi. Atkarībā no audzēšanas reģiona auzām kā nozīmīgas zināmas šādas slimības – auzu vainagrūsa (ieros. *Puccinia coronata*), auzu lapu brūnplankumainība (ieros. *Pyrenophora chaetomioides*), auzu lapu pelēkplankumainība (ieros. *Parastagonospora avenae*), stiebru rūsa (ieros. *Puccinia graminis*), graudzāļu miltrasa (ieros. *Blumeria graminis*), vārpu fuzarioze (*Fusarium* spp.).

*Fusarium* ģints sēnes izraisa dīgstu, sakņu un vārpu slimības. Daļa no šīs ģints patogēniem, piemēram, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. langsethiae*, veido sekundāros metabolītus – mikotoksīnus, kas samazina graudu kvalitāti un, pārsniedzot atļauto normu, rada kaitējumu patērētājiem. Plašāk pētītie *Fusarium* spp. ražotie mikotoksīni ir deoksivalenols, nivalenols, zeralenols, T-2 toksīns, fumonizīns B1 (Ji et al., 2019). Arī *Alternaria* spp. veido cilvēku un dzīvnieku veselībai kaitīgus

<sup>9</sup> Lauksaimniecības kultūru sējumu platība, Centrālā statistikas pārvalde (2020) [Tiešsaiste] [skatīts: 2021. g. 11. febr.]. Pieejams: [http://data.csb.gov.lv/pxweb/lv/lauks/lauks\\_03Augk\\_ikgad/LAG020.px/table/tableViewLayout1/?rxid=ce8aac91-f2b0-4f13-a25d-29f57b1468fb](http://data.csb.gov.lv/pxweb/lv/lauks/lauks_03Augk_ikgad/LAG020.px/table/tableViewLayout1/?rxid=ce8aac91-f2b0-4f13-a25d-29f57b1468fb).

toksīnus, piemēram, tenuazonskābes, alternariolus, alvertoksīnus (Logrieco et al., 2009). *P. chaetomioides* sekundārie metabolīti ir pirenoforoli, pirenoforīni, dihidropirenoforīni (Kastanias, Chrysayi–Tokousbalides, 2000), kā arī antrakīnonu atvasinājumi (Cegieļko et al., 2011), taču to kaitīgums cilvēkiem nav zināms.

Latvijā ir veikti pētījumi par auzu šķirņu graudu ķīmisko sastāvu, noteikta dažādu faktoru – meteoroloģisko apstākļu, mēslojuma daudzuma un augu audzēšanas sistēmu – ietekme uz ražību (Sterna et al., 2015; Zute et al., 2015), taču informācija par auzu slimībām un patogēniem ir ierobežota. Lapu slimību izplatības analīze uz lauka atkarībā no šķirnes ir uzsākta projekta "Graudaugu šķirņu izturības izvērtējums pret slimībām Latvijas agroklimatiskajos apstākļos, novērtējot šķirņu saimnieciskās īpašības" ietvaros.

Pētījuma mērķis ir identificēt uz auzām sastopamās patogēnās sēnes, galveno uzmanību pievēršot toksīnus veidojošām un graudu kvalitāti ietekmējošām sugām.

### **Materiāli un metodes**

Latvijas teritorijā 2020. gadā apsekoti 17 integrētās un 3 bioloģiskās audzēšanas auzu sējumi, kā arī AREI Stendes Pētniecības centra auzu selekcijas lauks. Auzu veģetācijas sākumā (BBCH 11–15) katra sējuma 10 vietās ievākti 10 dīgsti ar saknēm, kurām ir vizuāli redzamas slimības pazīmes, pēc identiskas metodikas veģetācijas beigās (BBCH 81–85) ievāktas auzu skaras. Noskaidrota informācija par sējumos audzēto auzu šķirni, sēklas izcelsmi, izsējas normu, sējas dziļumu, priekšaugiem, augsni un tās apstrādes veidiem, lietotajiem mēslošanas un augu aizsardzības līdzekļiem, t. sk. sēklas kodināšanu, kā arī veikta slimību simptomu dokumentācija.

Ievāktie paraugi laboratorijā sadalīti daļās un analizēti atsevišķi. Dīgstiem atsevišķi analizēti sakņu kakls ar stublāja apakšējo daļu, stublājs un lapas ar slimības pazīmēm. Skarām atsevišķi analizētas plēksnes, grauds bez plēksnes un stublāja augšējā daļa ar slimību pazīmēm. Augu daļas laboratorijā noskalotas ūdenī, sterilizētas 1.25% nātrija hipohlorīda šķīdumā un trīs reizes skalotas destilētā, sterilizētā ūdenī, pēcāk nosusinātas uz sterila filtrpapīra. Augu daļas sagrieztas ~5 mm lielās daļās, aptverot gan bojātos, gan veselos audus, un novietotas Petri platē uz kartupeļu dekstrozes agara barotnes. Plates inkubētas istabas temperatūrā, pēc 3 dienām veikta plašu šķirošana un patogēnu koloniju pārsēšana tīrkultūrā. Pārsētās plates regulāri novērotas, pēc 14 dienām veikta izolātu grupēšana pēc koloniju morfoloģijas, to aprakstīšana un sākotnējā identifikācija. Atsevišķiem paraugiem veikta mikroskopēšana. No katras grupas izvēlēti raksturīgākie izolāti, tie saglabāti *Bijou* pudelītēs ūdenī un uz kartupeļu dekstrozes agara turpmākiem pētījumiem un identifikācijai sugu līmenī. Tīrkultūru kolekcija uzglabāta ledusskapī +5 °C temperatūrā.

Lai apstiprinātu sākotnējo sēņu identifikāciju, izlases veidā tipiskākajiem katras grupas pārstāvjiem veikta ITS reģiona PCR amplifikācija un sekvencēšana. Sterilos apstākļos no aktīvi augošas kultūras savākts sēnes micēlijs, kas sasmalcināts šķidrā slāpekļī. DNS izdalīšana veikta, izmantojot *Qiagen DNeasy Plant Mini kit* DNS izdalīšanas reaģentu komplektu, sekojot ražotāja instrukcijām. Veikta pilna garuma ITS1/5.8S/ITS2 reģiona PCR amplifikācija, izmantojot *DreamTaq PCR Green master mix* reaģentu komplektu un ITS1F un ITS4 praimerus (Gardes, Bruns 1993; White et al. 1990). PCR produkti attīrīti, izmantojot *QIAquick PCR Purification kit (Qiagen)* reaģentu komplektu, sekojot ražotāja instrukcijām. PCR produktu koncentrācijas un tīrības pakāpes noteiktas, izmantojot *Nanodrop 1000* iekārtu. Sekvencēšana veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā kā ārpakalpojums ar praimeriem ITS1-F un ITS4. Sekvenču kvalitātes pārbaude un analīze veikta, izmantojot datorprogrammu paketi *Lasergene 14*. Iegūtās sekvences salīdzinātas ar *NCBI* datu bāzē pieejamām sekvencēm, lai noteiktu sugu.

### **Rezultāti un diskusijas**

Apsekojot sējumus, veģetācijas sākumā novēroti brūni, novājināti vai atmiruši dīgsti (skat. 1. att.), tumši plankumi uz stiebra pamata, kā arī konstatēta auzu lapu brūnplankumainība. Uz auzu graudiem, plēksnēm novēroti daudzveidīgi slimības simptomi (skat. 2. att.) – tumša apsarme, brūngani plankumi ar oranžu nokrāsu, uz atsevišķiem graudiem tumši plankumi dīgļa rajonā, tāpat novērota auzu vainagrūsa. Apsekojumu laikā no audzētajiem ievāktā informācija par auzu šķirni, sēklas izcelsmi, izsējas normu, sējas dziļumu, augsnes tipu, pH un organisko vienu saturu, augsnes apstrādes veidu,

priekšaugu, lietotajiem augu aizsardzības līdzekļiem, t. sk. kodnēm, kā arī mēslojumu pašlaik tiek analizēta kontekstā ar izdalītajām patogēnajām sēnēm un novērotajiem slimību simptomiem.



1. att. Auzu dīgsti ar slimības simptomiem.  
Fig. 1. Oat seedlings with disease symptoms.

No 2020. gadā ievāktajiem auzu dīgšiem izdalīti 1134 sēņu izolāti, no kuriem kolekcijā saglabāti 418 gab. (1. tab.). No auzu skarām izdalīti 2998 sēņu izolāti, kolekcijā saglabāts 781 izolāts (2. tab.). Veicot sākotnējo identifikāciju pēc micēlija krāsas, struktūras, kolonijas formas un malas, micēlija veida, augšanas ātruma un barotnes otras puses krāsojuma, izdalītas 22 morfoloģiski atšķirīgas grupas. Gan dīgstu, gan skaru paraugos dominēja *Alternaria*, *Pyrenophora* un *Fusarium* ģinšu dažādas sugas.



2. att. Auzu graudi un plēksnes ar slimības simptomiem.  
Fig. 2. Oat grains and glumes with disease symptoms.

Pēdējos gados auzu graudu kvalitātei un toksīnus veidojošo sēņu identifikācijai ir pievērsta zinātnieku uzmanība arī citās valstīs, kas apliecina šādu pētījumu aktualitāti. Krievijā (Gavrilova et al., 2016) no auzu graudiem izdalīja *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp. un *Penicillium* spp. ģints sēnes. Analizētajos paraugos izplatītākās bija *Fusarium* (89%) un *Alternaria* (91%) ģints sēnes. No *Fusarium* sugām biežāk izdalīja *F. poae*, *F. sporotrichioides* un *F. langsethiae*. Savukārt Lietuvā veiktajā pētījumā (Kochiieru et. al. 2020) auzās dominējošās sugas bija *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* un *F. avenaceum*.

1. tabula / Table 1

**No simptomātiskiem auzu dīgstiem izdalītās sēnes un sākotnējā to identifikācija pēc koloniju morfoloģijas**

*Isolated fungi from symptomatic oat seedlings and initial identification by colony morphology*

Sākotnējās identifikācijas grupas Nr. / <i>Initial identification group number</i>	Iespējamā ģints, suga / <i>Possible genus, species</i>	Saimniecības, skaits / <i>Farms, number</i>	Paraugu skaits / <i>Number of samples</i>	Izolāti, skaits / <i>Isolates, number</i>		
				izdalīts/ <i>isolated, number</i>	% no kopskaita / <i>% from total number</i>	saglabāti kolekcijā / <i>preserved in collection</i>
11	<i>Pyrenophora</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	21	291	655	57.76	194
7	<i>Fusarium</i> sp. 1	18	123	188	16.58	85
15	<i>Fusarium</i> sp. 2	16	53	76	6.70	32
17	<i>Fusarium poae</i>	10	32	46	4.06	30
18	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i>	6	28	45	3.97	24
3	<i>Fusarium equiseti</i>	12	26	43	3.79	15
1	<i>Fusarium cerealis</i>	2	18	30	2.65	13
5	–	7	20	26	2.29	6
14	<i>Fusarium oxysporum</i>	3	10	11	0.97	9
16	–	5	10	11	0.97	7
2	<i>Fusarium langsethiae</i>	2	3	3	0.26	3
Kopā/Total			614	1134	–	418

2. tabula / Table 2

**No simptomātiskām auzu skarām izdalītās sēnes un sākotnējā to identifikācija pēc koloniju morfoloģijas**

*Isolated fungi from symptomatic oat grain samples and initial identification by colony morphology*

Sākotnējās identifikācijas grupas Nr. / <i>Initial identification group number</i>	Iespējamā ģints, suga / <i>Possible genus, species</i>	Saimniecības, skaits / <i>Farms, number</i>	Paraugu skaits / <i>number of samples</i>	Izolāti, skaits/ <i>Isolates, number</i>		
				Izdalīts, skaits / <i>isolated, number</i>	% no kopskaita / <i>% from total number</i>	saglabāti kolekcijā / <i>preserved in collection</i>
11	<i>Pyrenophora</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	21	461	1511	50.40	364
19	<i>Phoma</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	13	158	405	13.51	53
7	<i>Fusarium</i> sp. 1	21	189	392	13.07	164
20	–	11	132	279	9.31	69
21	<i>Epicoccum</i> spp.	9	116	271	9.04	53
18	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i>	15	54	85	2.84	49
15	<i>Fusarium</i> sp. 2	10	17	24	0.80	14
17	<i>Fusarium poae</i>	7	13	18	0.60	12
22	–	1	7	12	0.40	3
1	<i>Fusarium cerealis</i>	1	1	1	0.03	0
Kopā/Total			1148	2998	–	781

Sugu līmenī identificēti 44 izolāti, sekvencējot ITS1/5.8S/ITS2 reģionu, kā arī veicot detalizētu sēņu morfoloģijas izpēti mikroskopā. 14 no sekvencētajiem izolātiem iegūti no auzu dīgstiem, 30 no auzu skarām. Auzu dīgstos un skarās noteiktas dažādas patogēno sēņu sugas, no kurām vairākas zināmas arī kā toksīnus veidojošas sugas. Dīgstos identificētas šādas sugas – *F. graminearum*, *F. redolens*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *P. chaetomioides*, savukārt skarās – *P. chaetomioides*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*. Starp izdalītajām sēnēm no graudiem nozīmīgu daļu veidoja *Alternaria* dažādas sugas, kuru klātbūtne graudos nav vēlama producēto toksīnu dēļ (Logrieco et al., 2009), to nozīme būtu jāturpina pētīt. Turpmāk uzmanība būtu jāpievērš arī auzu brūnplankumainībai un tās ierosinātajam *P. chaetomioides*, jo, mainoties audzēšanas tehnoloģijām, slimības postīgums varētu palielināties.

### Secinājumi

Auzu graudos Latvijā sastopamas vairākas toksīnus veidojošas *Fusarium* sugas – *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* –, no kurām daļa zināmas kā vārpu fuzariozes ierosinātāji citiem graudaugiem. Daļa no noteiktajām sugām sastopamas jau auzu dīgstu fāzē. Par šo slimību izplatību, nozīmi un ierosinātajiem ir nepieciešami papildu pētījumi un jau iegūto datu padziļināta analīze.

**Pateicība.** Pētījums veikts LR Zemkopības ministrijas finansētā zinātniskā projekta "Dzeltenās rūsas (ieros. *Puccinia striiformis*, Wes.) izplatība Latvijā un pasākumi tās postīguma ierobežošanai" ietvaros.

### Izmantotā literatūra

1. Cegiello M., Kiecana I., Kachlicki P., Wakuliński W. (2011). Pathogenicity of *Drechslera avenae* for leaves of selected oat genotypes and its ability to produce antraquinone compounds. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, Vol. 10. No. 2, p. 11–22.
2. Forsberg R. A., Reeves D. L. (1995). *The Oat Crop. Production and Utilization*. London: Chapman & Hall, p. 584.
3. Gardes M., Bruns T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, Vol. 2, p. 113–118.
4. Gavrilova O. P., Gannibal Ph. B., Gagkaeva T. Y. (2016). *Fusarium* and *Alternaria* fungi in grain of oats grown in the north-western Russia regarding cultivar specificity. *Agricultural biology*, Vol. 51, No. 1, p. 111–118.
5. Ji F., He D., Olaniran A. O., Mokoena M. P., Xu J., Shi J. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, Vol. 1, No. 6, p. 1–14.
6. Kastanias M. A., Chrysai-Tokousbalides M. (2000). Herbicidal potential of pyrenophorol isolated from *Drechslera avenae* pathotype. *Pest Management science*, Vol. 56, p. 227–232.
7. Kochiieru Y., Mankeviciene A., Ceseviciene J., Semaskiene R., Dabkevicius Z., Janaviciene S. (2020). The influence of harvesting time and meteorological conditions on the occurrence of *Fusarium* species and mycotoxin contamination of spring cereals. *J. Sci. Food. Agric.*, Vol. 100, p. 2999–3006.
8. Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, Vol. 2, No. 2, p. 129–140.
9. Rasane P., Jha A., Sabikhi L., Kumar A., Unnikrishnan V. S. (2015). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods – a review. *J. Food Sci. Technol.*, Vol. 52, No. 2, p. 662–675.
10. Sangwan S., Singh R., Tomar S. K. (2014). Nutritional and functional properties of oats: An update. *Journal of Innovative Biology*, Vol. 1, Issue 1, p. 3–14.
11. Sterna V., Zute S., Jansone I., Brunava L., Kantane I. (2015). The chemical composition of new oat varieties and breeding lines created in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, Vol. 15, No. 2, p. 367–373.
12. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, New York: Academic Press, p. 315–322.
13. Zute S., Brunava L., Jansone I., Tamm Y. (2015). Influence of farming system, nitrogen rates and meteorological conditions on naked oats in Latvia. *Agriculture & Forestry*, Vol. 61, No. 1, p. 15–25.