

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 58.002

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЫЛЬЦЫ ЗЛАКОВ В АЭРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ МЕТАШТРИХКОДИРОВАНИЯ

Елена Эростовна Северова¹, Анастасия Александровна Креницына²,
Денис Олегович Омельченко³, Артем Сергеевич Касьянов⁴

¹⁻² Биологический факультет, Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова

³⁻⁴ Институт проблем передачи информации

Автор, ответственный за переписку: Северова Елена Эростовна,
elena.severova@mail.ru

Аннотация. Пыльца злаков – основной аэроаллерген средней полосы России в летний период. Исследована возможность идентификации пыльцы злаков до уровня рода в образцах воздуха методом меташтрихкодирования. Отбор образцов воздуха проводился в июне 2021 года при помощи ловушки циклонного типа. Для метагеномного анализа были использованы ядерные маркеры ITS1, ITS2, и 5'-ETS, результаты анализа были сопоставлены с фенологическими наблюдениями. Анализ результатов секвенирования показал, что все маркерные последовательности показывают хорошее разрешение пыльцы злаков до рода и позволяют проводить качественную оценку состава образца. Наилучшие результаты чаще всего отмечались для маркеров ITS1 и ITS2, и, в меньшей степени, для 5'-ETS. Обсуждены несоответствия и их возможные причины между результатами метагеномного анализа и фенологическими наблюдениями. Показано, что использование пыльцевых ловушек с ограниченным временем отбора проб для решения задач мониторинга нецелесообразно.

Ключевые слова: пыльца, злаки, аллергены, меташтрихкодирование, фенология, циклонная ловушка

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-05-50035 Микромир).

Для цитирования: Северова Е.Э., Креницына А.А., Омельченко Д.О., Касьянов А.С. Идентификация пыльцы злаков в аэробиологических образцах методом меташтрихкодирования // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2022. Т. 127. Вып. 5. С. 34–45.

ORIGINAL ARTICLE

IDENTIFICATION OF GRASS POLLEN IN AEROBIOLOGICAL SAMPLES BY METABARCODING

Elena E. Severova¹, Anastasiya A. Krinitsina², Denis O. Omelchenko³, Artem S. Kasianov³

¹⁻² Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow

³⁻⁴ Institute for Information Transmission Problems, Moscow

Corresponding author: Elena E. Severova, elena.severova@mail.ru

Abstract. Poaceae pollen is the main aeroallergen in central Russia in the summer. The main goal of this study was to test the metabarcoding method to identify grass pollen to the level of genus in the air samples. Air sampling was carried out in June 2021 using a cyclone-type trap. For metagenomic analysis, nuclear markers ITS1, ITS2, and

5'-ETS were used, and the results of the analysis were compared with phenological observations. All marker sequences show good resolution of grass pollen to the genus level and allow to determine a qualitative composition of a sample. The best results were noted for the ITS1 and ITS2, and, to a lesser extent, for 5'-ETS. Discrepancies between the results of metagenomic analysis and phenological observations and their possible causes were discussed. It is shown that the use of pollen traps with a limited sampling time for grass monitoring seems to be inappropriate.

Keywords: pollen, grass, aeroallergenes, metabarcoding, phenology, cyclone trap

Financial Support. The work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-05-50035).

For citation: Severova E.E., Krinitsina A.A., Omelchenko D.O., Kasianov A.S. Identification of grass pollen in aerobiological samples by metabarcoding // Byul. MOIP. Otd. biol. 2022. T. 127. Vyp. 5. S. 34–45.

Пыльца растений – одна из основных причин аллергических заболеваний, от которых, по данным ВОЗ, страдает более 20% населения земного шара, в первую очередь, жители мегаполисов экономически развитых стран (D'Amato et al., 2007; Linneberg, 2016; Traidl-Hoffmann, 2017). Особая роль в развитии поллинозов принадлежит пыльце представителей семейства Poaceae (García-Mozo, 2017), что связано с таксономическим разнообразием, широким распространением и высокой пыльцевой продукцией злаков. Данные о частоте сенсибилизации к аллергенам пыльцы злаков получены в основном для Европы и США. Так, около 20% населения США страдает аллергией на пыльцу, а 15% чувствительны к пыльце злаков (García-Mozo, 2017). В Европе уровень сенсибилизации к пыльце злаков варьирует от 10% (Польша) до 30% (южная Швеция, Германия) (Newson et al., 2014).

Обязательным элементом комплекса противоаллергических мероприятий является аэробиологический мониторинг, позволяющий отслеживать и прогнозировать динамику концентрации основных аллергенов в атмосфере, корректировать терапию и образ жизни больных поллинозами. Чаще всего при проведении мониторинга используют волюметрические пыльцеуловители Хирст-типа (Galán et al., 2014), идентификация и подсчет пыльцы в образцах воздуха проводится методом световой микроскопии. Этот метод обладает рядом ограничений, одно из наиболее существенных – невозможность проводить видовую идентификацию. Особенно остро эта проблема встает при анализе пыления злаков, пыльца которых относится к единому палиморфологическому типу и при рутинном анализе диагностируется только до уровня семейства.

На территории европейской части России отмечено около 100 видов злаков (Маевский, 2014), аллергенность пыльцы которых оценивается от умеренной до очень высокой (pollenlibrary.com), а периоды цветения часто пересекаются. Пыление злаков в центральных районах европейской части страны продолжается в среднем более двух месяцев и характеризуется несколькими периодами высокой концентрации (Volkova, Severova, 2019). Детализация кривых пыления, полученных в результате аэробиологического мониторинга, может быть проведена при сопоставлении аэробиологических и фенологических наблюдений или при использовании молекулярно-генетических методов идентификации организмов.

В последние годы появился ряд работ, продемонстрировавших перспективность использования методов анализа ДНК из образцов воздуха для определения динамики состава пыльцевого спектра (Keller et al., 2015; Kraaijeveld et al., 2015; Núñez et al., 2016; Leontidou et al., 2018; Brennan et al., 2019; Banchi et al., 2020). Longhi et al. (2009) показали возможность замены рутинного анализа методами световой микроскопии на количественный анализ ПЦР, но не протестировали метод на данных реального мониторинга. Mohanty, Buchheim & Levetin (2017), Leontidou et al. (2017) и Ghitarrini et al. (2018) предложили протоколы качественной оценки содержания пыльцы в аэробиологических образцах с помощью видоспецифичной ПЦР на известные пластидные гены. Хотя ПЦР-подход отличается хорошей разрешающей способностью, он позволяет проанализировать состав образца только исходя из предположений о наличии того или иного вида в его составе и не дает возможности оценить количественно и ка-

качественно полный состав пыльцевого спектра. В качестве альтернативного подхода Kraaijeveld et al. (2015) была предложена идентификация систематической принадлежности пыльцы на основании анализа фрагмента хлоропластного гена *trnL*, полученного методом параллельного высокопроизводительного секвенирования, что в некоторых случаях позволило добиться определения родовой принадлежности пыльцы. Polling et al. (2022) показали, что меташтрихкодирование ДНК имеет очень высокий потенциал повышения таксономического разрешения, однако до настоящего времени остается неясным, можно ли использовать этот метод для количественной оценки содержания пыльцы. На примере анализа аэробιοлогических образцов из Нидерландов Polling et al. (2022) показали, что меташтрихкодирование ДНК с использованием регионов *trnL* и *ITS2* существенно улучшает таксономическое разрешение, причем предпочтительным маркером выбора для молекулярного мониторинга пыльцы в воздухе по мнению авторов должен быть *ITS2*.

Попытки использовать метод меташтрихкодирования для идентификации пыльцы злаков крайне редки. Brennan et al. (2019) использовали пыльцевые ловушки циклонного типа и маркерные последовательности *gbcL* и *ITS2* для оценки пространственно-временного распределения пыльцы злаков в течение одного вегетационного сезона на территории Великобритании и показали, что метод хорошо работает на родовом уровне, позволяя не только определять качественный состав спектра, но и давать количественную оценку встречаемости пыльцы. Campbell et al. (2020) проанализировали сезонный пыльцевой спектр, используя маркерную последовательность *gbcL*, и на качественном уровне смогли определить основные группы злаков, отвечающие за пики концентрации пыльцы, определяемые стандартными методами мониторинга.

В настоящем исследовании была поставлена цель определить качественный состав пыльцы злаков в образцах воздуха методом меташтрихкодирования с использованием маркерных последовательностей *ITS1*, *ITS2*, *5'-ETS* и сопоставить его с результатами фенологических наблюдений.

Материалы и методы

Исследования проводили с 18 по 25 июня 2021 г. на территории Московского государствен-

ного университета имени М.В. Ломоносова. Период наблюдений, соответствующий максимальной концентрации пыльцы злаков в атмосфере, был выбран на основе данных аэробιοлогического мониторинга, полученных по стандартной международной методике с помощью волюметрических пыльцеуловителей Хирст-типа Lanzoni 2000 (Galán et al., 2014).

Образцы для молекулярно-генетических исследований были получены с помощью циклонной (вихревой) пыльцевой ловушки Coriolis® (Bertin Technologies), в которой поток воздуха направляется в стерильную воду. Скорость всасывания составляла 300 л/мин, время непрерывной работы ловушки – 6 ч (с 10 до 16 ч дня). Объем образца после каждого 6-часового цикла работы ловушки составлял от 15 до 40 мл в зависимости от температуры окружающего воздуха. После фильтрации (удаление насекомых и иных крупных частиц) образцы центрифугировали в течение 10 минут при ускорении 10 000 g, полученный осадок замораживали. Выделение ДНК проводили с использованием оптимизированного нами протокола выделения с дополнительной очисткой препаратов ДНК путем адсорбции на магнитных силика-частицах (Omelchenko et al., 2022). В результате были получены 8 образцов ДНК с концентрацией от 5 до 12 нг/мкл, каждый из которых соответствовал 1 запуску ловушки. Эти образцы использовали в качестве матрицы для амплификации маркерных последовательностей. В реакционную смесь кроме Q5 HF ДНК-полимеразы и соответствующего буфера (NEB) были добавлены праймеры, комплементарные участкам маркерных последовательностей *ITS1*, *ITS2*, *5'-ETS*. Эти праймеры в своем составе содержат дополнительные адаптеры, которые позволяют проводить пробоподготовку по разработанному ранее протоколу секвенирования маркеров ДНК в растительных смесях на платформе Illumina (Speranskaya et al. 2018; Omelchenko et al., 2019). Секвенирование проводили на приборе «Illumina MiSeq» с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit v3, 600 циклов («Illumina»).

Перед проведением анализа, для каждого из наборов чтений был проведен тримминг с использованием программы Trimmomatic версии 0.38 (Bolger et al., 2014). Поскольку качество данных было достаточно высоким, для тримминга использовали мягкие критерии. Параметры тримминга: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:10 MINLEN:40. Была также проведена процедура

удаления адаптерных последовательностей. Метагеномный анализ проводили с использованием программного обеспечения, разработанного в ходе проекта в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» проекта № 14.609.21.0101, с подготовленной специальной базой данных маркерных последовательностей. Создание базы референсных последовательностей и анализ результатов проводили по использованному нами ранее алгоритму (Speranskaya et al. 2018; Omelchenko et al., 2019) с тем отличием, что порог по E-value для поиска BLAST был поднят до 1E-2 и была установлена степень идентичности в 99%.

Для фенологических наблюдений в окрестностях точки отбора проб воздуха были заложены 6 пробных площадок, для каждой из которых был определен видовой состав злаков. При оценке фенологического состояния использованы описания фенофаз шкалы ВВСН (Meier, 1997). Фенофазы определяли для 25 растений каждого вида (табл. 1).

Результаты

Результаты исследования представлены в табл. 2. Во всех образцах воздуха были выявлены маркерные последовательности, соответствующие 6 родам злаков: *Phleum*, *Calamagrostis*, *Festuca*, *Lolium*, *Poa*, *Dactylis*. Маркерные последовательности *Bromopsis*, *Elymus*, *Alopecurus*, *Arrhenatherum* обнаружены лишь в некоторых образцах. Так, все три маркерные последовательности *Alopecurus* в небольшом количестве были выявлены 18 и 19 июня, в образцах за 22, 24 и 25 июня фиксировали наличие только ITS2 или всех трех

маркеров (24 июня), но доля прочтений ITS1 оказалась ниже порогового уровня. Похожую картину наблюдали и для *Arrhenatherum*: представленность всех маркерных последовательностей не превышала 5%, в некоторых образцах (18, 20 и 23 июня) представленность ITS1 была менее 1%, в образцах от 22, 24 и 25 июня маркерных последовательностей этого вида выявлено не было. Маркерные последовательности *Elymus* и *Bromus* в образцах не были обнаружены. Исключения составляли единичные прочтения *Elymus* 18 июня (ITS2 – 0,8%, ETS – 0,6%), 19 июня (ETS – 0,7%) и *Bromus* в образце 22 июня (ITS1 – 0,3%, ETS – 0,3%).

Сопоставление результатов секвенирования с фенологическими наблюдениями выявило ряд несоответствий: ДНК *Calamagrostis epigeios* и *Alopecurus pratensis* определялась в образцах вне периода цветения этих злаков, а ДНК *Elymus repens* и *Bromus inermis* в период их интенсивного цветения в образцах воздуха не была выявлена.

Обсуждение результатов

Анализ результатов секвенирования показал, что все маркерные последовательности показывают хорошее разрешение пыльцы злаков до рода и позволяют проводить качественную оценку состава образца. Наилучшие результаты чаще всего отмечались для маркеров ITS1, ITS2 и, в меньшей степени, для 5'-ETS. Несовпадение между результатами метагеномного анализа и фенологическими наблюдениями можно объяснить несколькими причинами.

1. Обнаружение пыльцы отдельных видов вне периодов локального цветения может быть связано с региональным характером пыльцевого спектра и переносом пыльцы. Как было

Таблица 1

Описание фенофаз

Описание фенофазы	Код фенофазы по ВВСН (Meier, 1997)
Соцветия частично или полностью появились, но тычинки не видны	55–59
Тычинки частично видны (цветет не более 25% растений на пробной площадке)	60–62
Полное цветение (цветет 25–75% растений)	63–65
Часть тычинок засохла (цветет не более 25%, остальные цветение закончили)	66–68
Все тычинки засохли (цветение завершено)	69–70

Т а б л и ц а 2

Сопоставление результатов метагеномного анализа с данными фенологических наблюдений

Дата	Концентрация пылицы злаков, пз/м ³	Таксон (род)	Доля прочтений ITS1, %	Доля прочтений ITS2, %	Доля прочтений ETS, %	Таксон (вид)	Код фенофазы
18.VI.2021	70	<i>Festuca</i>	38,4	23,4	53,3	<i>Festuca pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Poa</i>	30,6	39,4	35,9	<i>Poa pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Alopecurus</i>	3,2	4,8	4,4	<i>Alopecurus pratensis</i>	69-70
		<i>Dactylis</i>	13	13,2	3,8	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68
		<i>Lolium</i>	12,6	15,8	2,6	<i>Lolium perenne</i>	63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
19.VI.2021	50	<i>Poa</i>	39,2	48,9	45,4	<i>Poa pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Festuca</i>	24,7	15	35,1	<i>Festuca pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Lolium</i>	20,1	19,5	9,9	<i>Lolium perenne</i>	63-65
		<i>Alopecurus</i>	2,5	0	3,9	<i>Alopecurus pratensis</i>	69-70
		<i>Dactylis</i>	8,2	8,2	2,7	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68
		<i>Arrhenatherum</i>	5,2	8,5	1,9	<i>Arrhenatherum elatius</i>	66-68/ 69-70
20.VI.2021	37	<i>Elymus</i>	0	0	1,1	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
		<i>Festuca</i>	25,7	17,3	35,5	<i>Festuca pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Poa</i>	32,3	44,7	34,3	<i>Poa pratensis</i>	63-65/66-68
		<i>Lolium</i>	27,4	38	27,8	<i>Lolium perenne</i>	63-65
		<i>Dactylis</i>	8,1	0	2,4	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68
<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65		
<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65		

Продолжение табл. 2

Дата	Концентрация пыльцы злаков, пз/м ³	Таксон (род)	Доля прочтений ITS1, %	Доля прочтений ITS2, %	Доля прочтений ETS, %	Таксон (вид)	Код фенофазы
21. VI 2021	37	<i>Festuca</i>	44,6	29,8	69,4	<i>Festuca pratensis</i>	66-68
		<i>Poa</i>	20,5	28,1	22,7	<i>Poa pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Arrhenatherum</i>	8,9	13,3	3	<i>Arrhenatherum elatius</i>	66-68/ 69-70
		<i>Dactylis</i>	10,5	10	3	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68
		<i>Calamagrostis</i>	0	0	1,8	<i>Calamagrostis epigeous</i>	55-59
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
		<i>Festuca</i>	18,8	0	45	<i>Festuca pratensis</i>	66-68
		<i>Poa</i>	15,8	20	23,5	<i>Poa pratensis</i>	66-68/ 69-70
		<i>Lolium</i>	65,4	80	23,3	<i>Lolium perenne</i>	63-65
22. VI 2021	30	<i>Phleum</i>	0	0	4,9	<i>Phleum pratense</i>	63-65
		<i>Dactylis</i>	0	0	3,3	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68/ 69-70
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
		<i>Festuca</i>	16,3	0	37,7	<i>Festuca pratensis</i>	66-68
		<i>Phleum</i>	13,5	31	36,3	<i>Phleum pratense</i>	63-65
		<i>Poa</i>	13,7	0	19,8	<i>Poa pratensis</i>	66-68/ 69-70
		<i>Arrhenatherum</i>	0	0	3,2	<i>Arrhenatherum elatius</i>	66-68/ 69-70
		<i>Lolium</i>	56,6	69	3	<i>Lolium perenne</i>	63-65/ 66-68
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65		
23. VI 2021	31	<i>Festuca</i>	44,6	29,8	69,4	<i>Festuca pratensis</i>	66-68
		<i>Poa</i>	20,5	28,1	22,7	<i>Poa pratensis</i>	63-65/ 66-68
		<i>Arrhenatherum</i>	8,9	13,3	3	<i>Arrhenatherum elatius</i>	66-68/ 69-70
		<i>Dactylis</i>	10,5	10	3	<i>Dactylis glomerata</i>	66-68
		<i>Calamagrostis</i>	0	0	1,8	<i>Calamagrostis epigeous</i>	55-59
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
		<i>Festuca</i>	18,8	0	45	<i>Festuca pratensis</i>	66-68
		<i>Poa</i>	15,8	20	23,5	<i>Poa pratensis</i>	66-68/ 69-70
		<i>Lolium</i>	65,4	80	23,3	<i>Lolium perenne</i>	63-65

Окончание табл. 2

Дата	Концентрация пылицы злаков, пз/м ³	Таксон (род)	Доля прочтений ITS1, %	Доля прочтений ITS2, %	Доля прочтений ETS, %	Таксон (вид)	Код фенофазы
24.VI.2021	67	<i>Festuca</i>	33,5	19,7	44,8	<i>Festuca pratensis</i>	66-68/ 69-70
		<i>Phleum</i>	14,6	21,8	31,5	<i>Phleum pratense</i>	63-65/ 66-68
		<i>Poa</i>	5,7	8,2	9,7	<i>Poa pratensis</i>	66-68/ 69-70
		<i>Lolium</i>	40,3	42,8	7,2	<i>Lolium perenne</i>	66-68/ 69-70
		<i>Calamagrostis</i>	0	0	6,7	<i>Calamagrostis epigeous</i>	55-59
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65
		<i>Festuca</i>	34,4	0	43,8	<i>Festuca pratensis</i>	69-70
		<i>Phleum</i>	18,5	0	27,9	<i>Phleum pratense</i>	63-65/ 66-68
		<i>Poa</i>	18,2	0	13,9	<i>Poa pratensis</i>	69-70
25.VI.2021	46	<i>Lolium</i>	28,9	0	8,4	<i>Lolium perenne</i>	69-70
		<i>Dactylis</i>	0	0	3,2	<i>Dactylis glomerata</i>	69-70
		<i>Calamagrostis</i>	0	0	2,9	<i>Calamagrostis epigeous</i>	55-59
		<i>Elymus</i>	0	0	0	<i>Elymus repens</i>	60-62/63-65
		<i>Bromopsis</i>	0	0	0	<i>Bromopsis inermis</i>	63-65

Примечание. Жирным шрифтом выделены таксоны, для которых выявлено несоответствие между результатами метагеномного анализа и фенологическими наблюдениями.

показано ранее (Severova, Volkova, 2018), в условиях среднерусской равнины пылевая ловушка, установленная на высоте 10–12 м, может отражать пыление на территории радиусом не менее 50 км. Фенологические наблюдения, проведенные в одной точке даже на нескольких пробных площадях, не отражают цветения на такой большой территории. Появление в составе спектра пыльцы растений, уже закончивших свое цветение в городе, можно объяснить также «эффектом мегаполиса». Согласно данным монографии «Климат Москвы» (1969), прохождение растениями определенных фенофаз в городе существенно (в среднем на семь–десять дней) опережает прохождение этих же фенофаз за пределами мегаполиса, что связано с более высокой среднесуточной температурой из-за затрудненного отвода тепла и большого числа каменных сооружений и асфальтовых покрытий (Климат Москвы, 1969).

2. Обнаружение в составе образцов ДНК растений, уже завершивших свое пыление, может отражать вторичный подъем пыльцы в атмосферу. Это явление хорошо известно в аэробологии, особенно часто его отмечают при анализе пыления раннецветущих деревьев. Так, период пыления березы в средней полосе России приходится на конец апреля – первую половину мая, а единичные пылевые зерна этого растения регистрируются в составе пылевого спектра до конца августа (Severova, Volkova, 2017). Вторичным подъемом пыльцы в атмосферу и/или региональным переносом пыльцы можно объяснить появление в образцах воздуха ДНК *Alopecurus* и *Arrhenatherum*.

3. Отсутствие пыльцы активно цветущих видов в составе образцов может быть связано с несовершенством методики отбора проб воздуха. Максимально возможное время непрерывного отбора образцов с помощью вихревой ловушки составляет 6 ч. В нашем исследовании отбор проб проводили с 10 до 16 ч дня. Большинство злаков средней полосы имеет четкий суточный ритм цветения, пик пыления обычно

приходится на раннее утро или на первую половину дня, однако может существенно сдвигаться в зависимости от погодных условий. Так, *Phleum pratense* относится к группе раннеутренних злаков, ее цветение начинается в 3 утра и длится 6–7 ч (Банникова, 1980). Начало пыления *Festuca pratensis*, как правило, регистрируется в 4–6 ч утра, продолжительность пыления составляет 5–6 ч (Пономарев, 1954; Николаевская, Каичева, 1980). *Poa pratensis* относится к утренним злакам (Егорова, 1996), а для *Dactylis glomerata* характерно двухразовое цветение (Банникова, 1975), однако вечернее цветение часто очень слабое или вообще не выражено. Обычное время начала утреннего, наиболее интенсивного, цветения – 5–6 ч утра, его продолжительность составляет 6–7 ч (Банникова, 1975). *Bromus inermis* и *Elymus repens* отличаются цветением, приуроченным ко второй половине дня (Пономарев, 1954; Black, 1957). По наблюдениям Пономарева, пыление *Bromus inermis* и *Elymus repens* происходит порционно между 16 и 19 ч, продолжаясь 15–20 минут. Несовпадение времени отбора проб с ритмом пыления, вероятно, отразилось на результатах метагеномного анализа. Дальнейшие исследования целесообразно проводить при непрерывном способе отбора проб, в частности, с помощью волюметрических пылевых ловушек. Это способ существенно усложняет получение образцов ДНК и требует оптимизации методики, однако позволяет избежать ошибок, связанных с выбором временных интервалов отбора проб.

Таким образом, использование меташтрихкодирования для анализа пыльцы злаков из образцов воздуха позволяет в большинстве случаев достаточно точно определять качественный состав пылевого спектра, однако методика отбора образцов воздуха и получения ДНК требует модификации и оптимизации. Использование пылевых ловушек с ограниченным временем отбора проб для решения задач мониторинга представляется нам нецелесообразным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова В.А. Цветение и опыление ежи сборной. В: Экология опыления: межвуз сб. науч.тр. Пермь, 1975. С. 117–125.
- Банникова В.А. Цветение и опыление тимopheевки луговой В: Экология опыления: межвуз сб. науч.тр. Пермь, 1980. С. 81–86.
- Егорова В.Н. Мятлик луговой / Биологическая флора Московской области. 1996. Вып. 12. С. 22–38.
- Климат Москвы (особенности климата большого города / Ред. Дмитриев А.А., Бессонова Н.П. Л., 1969. 324 с.
- Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. М.: КМК, 2014. 635 с.

- Николаевская Т.С., Каичева Т.Н. Особенности цветения и опыления овсяницы луговой под влиянием селекции. В: Экология опыления: межвуз сб. науч. тр. Пермь, 1980. С. 56–65.
- Пономарев А. П. Экология цветения и опыления злаков и люцерны // Ботанический журнал. 1954. Т. 39. № 5. С. 706–720.
- Banchi E., Ametrano C. G., Tordoni E., Stanković D., Ongaro S., Tretiach M., & Lazzarin S. Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 738. P. 140249.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. 2114–2120.
- Brennan G.L., Potter C., De Vere N., Griffith G.W., Skjøth C.A., Osborne N.J., & Creer S. Temperate airborne grass pollen defined by spatio-temporal shifts in community composition // *Nature Ecology & Evolution*. 2019. Vol. 3. N 5. P. 750–754.
- Campbell B. C., Al Kouba J., Timbrell V., Noor M. J., Massel K., Gilding E. K., ... & Davies, J. M. Tracking seasonal changes in diversity of pollen allergen exposure: targeted metabarcoding of a subtropical aerobiome // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 747. 141189.
- D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., Cauwenberge P.V. Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe // *Allergy*. 2007. Vol. 62. P. 976–990.
- Galán C., Smith M., Thibaudon M., Frenguelli G., Oteros J., Gehrig R., Berger U., Clot B., Brandao R., EAS QC working group. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis // *Aerobiologia*. 2014. Vol. 30. P. 385–395.
- García-Mozo H. Poaceae pollen as the leading aeroallergen worldwide: A review // *Allergy*. 2017. Vol. 72. N 12. P. 1849–1858.
- Ghitarrini S., Galán C., Frenguelli G., Tedeschini E. Phenological analysis of grasses (Poaceae) as a support for the dissection of their pollen season in Perugia (Central Italy) // *Aerobiologia*. 2017. Vol. 33. P. 1–11.
- Ghitarrini S., Pierboni E., Rondini C., Tedeschini E., Tovo G.R., Frenguelli G., Albertini E. New Biomolecular Tools for Aerobiological Monitoring: Identification of Major Allergenic Poaceae Species through Fast Real-Time PCR. *Ecol. Evol.* 2018, 8, 3996–4010.
- Keller A., Danner N., Grimmer G., Ankenbrand M., von der Ohe K., von der Ohe W., Steffan-Dewenter I. Evaluating multiplexed nextgeneration sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples // *Plant Biol*. 2015. Vol. 17. P. 558–566.
- Kraaijeveld K.; de Weger L.A.; García M.V., Buermans H.; Frank J.; Hiemstra P.S.; Dunnen J.T. Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. Vol. 15. P. 8–16.
- Leontidou K.; Vernesi C., De Groeve J., Cristofolini F., Vokou D., Cristofori A. DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples // *Aerobiologia*. 2018. Vol. 34. P. 63–74.
- Linneberg A., Dam Petersen K., Hahn-Pedersen J., Hammerby E., Serup-Hansen N., Boxall N. Burden of allergic respiratory disease: a systematic review // *Clinical and Molecular Allergy*. 2016. Vol. 14. P. 1–14.
- Longhi S., Cristofori A., Gatto P., Cristofolini F., Grandi M.S., Gottardini E. Biomolecular identification of allergenic pollen: a new perspective for aerobiological monitoring? // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2009. Vol. 103. N 6. P. 508–514.
- Marcello A. Nuovi criteri per le osservazioni fenologiche // *Nuovo Giornale Botanico Italiano*. 1953. Vol. 42. P. 543–556.
- Meier U. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. *BBCH Monograph*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1997. 204 p.
- Mohanty R. P., Buchheim M. A., Anderson J., Levetin E. Molecular analysis confirms the long-distance transport of *Juniperus ashei* pollen // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. N 3. e0173465.
- Newson R.B., van Ree R., Forsberg B., Janson C., Lötvall J., Dahlen S.-E., Toskala E.M., Bælum J., Brozek G.M., Kasper L., Kowalski M.L., Howarth P.H., Fokkens W.J., Bachert C., Keil T., Krämer U., Bislimovska J., Gjomarkaj M., Loureiro C., Burney P.G.J., Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of sensitization to common aeroallergens in adults: the GA2LEN survey // *Allergy*. 2014. Vol. 69. P. 643–651.
- Núñez A., Amo de Paz G., Rastrojo A., García A.M., Alcamí A., Gutiérrez-Bustillo A.M., Moreno D.A. Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere. Part 2: Metagenomics applied to urban environments // *International Microbiology*. 2016. Vol. 19. P. 69–80.
- Omelchenko D.O., Krinitsina A.A., Kasianov A.S., Speranskaya A.S., Chesnokova O.V., Polevova S.V., Severova E.E. Assessment of ITS1, ITS2, 5'-ETS, and trnL-F DNA barcodes for metabarcoding of Poaceae pollen // *Diversity*. 2022. Vol. 14. P. 191.
- Omelchenko D.O., Speranskaya A.S., Ayginin A.A., Khafizov K., Krinitsina A.A., Fedotova A.V., Pozdyshev D.V., Shtratnikova V.Y., Kupriyanova E.V., Shipulin G.A. et al. Improved protocols of ITS1-based metabarcoding and their application in the analysis of plant-containing products // *Genes*. 2019. Vol. 10. 122.
- PollenLibrary.com – Allergen and Botanic Reference Library. URL: <https://www.pollenlibrary.com>
- Polling M., Sin M., de Weger L.A., Speksnijder A.G., Koenders M.J., de Boer H., Gravendeel B. DNA metabarcoding using nrITS2 provides highly qualitative and quantitative results for airborne pollen monitoring // *Science of the Total Environment*. 2022. Vol. 806. P. 150468.

- Severova E., Volkova O. Sampling height in aerobiological monitoring // 11th International Congress on Aerobiology. Programme & Abstract book. 2018. P. 74.
- Severova E., Volkova O. Variations and trends of Betula pollen seasons in Moscow (Russia) in relation to meteorological parameters // *Aerobiologia*. 2017. Vol. 33. N 2. P. 253–264.
- Speranskaya A.S., Khafizov K., Ayginin A.A., Krinitsina A.A., Omelchenko D.O., Nilova M.V., Severova E.E., Samokhina E.N., Shipulin G.A., Logacheva M.D. Comparative analysis of Illumina and ion torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas // *Food Control*. 2018. Vol. 93. P. 315–324.
- Traidl-Hoffmann C. Allergy - an environmental disease // *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2017. Vol. 60. P. 584–591.
- Volkova O., Severova E. Poaceae pollen season and associations with meteorological parameters in Moscow, Russia, 1994–2016 // *Aerobiologia*. 2019. Vol. 35. P. 73–84.

REFERENCES

- Bannikova V. A. Tsvetenie i opylenie ezhi sbornoi. V: *Ekologiya opyleniya: mezhvuz sb. nauch.tr. Perm'*, 1975. S. 117–125.
- Bannikova V. A. Tsvetenie i opylenie timofeevki lugovoi V: *Ekologiya opyleniya: mezhvuz sb. nauch.tr. Perm'*, 1980. S. 81–86.
- Egorova V. N. Myatlik lugovoi / *Biologicheskaya flora Moskovskoi oblasti*, 1996. Vyp. 12. S. 22–38.
- Klimat Moskvy (osobnosti klimata bol'shogo goroda / Red. A.A. Dmitriev, N.P. Bessonova Leningrad, 1969. 324 s.
- Maevskii P. F. Flora srednei polosy evropeiskoi chasti Rossii. 11-e izd. M., 2014. 635 s.
- Nikolaevskaya T. S., Kaicheva T. N. Osobnosti tsveteniya i opyleniya ovsyantitsy lugovoi pod vliyaniem selektsii. V: *Ekologiya opyleniya: mezhvuz sb. nauch.tr. Perm'*, 1980. S. 56–65.
- Ponomarev A. P. *Ekologiya tsveteniya i opyleniya zlakov i lyutserny* // *Botanicheskii zhurnal*. 1954. T. 39. № 5. S.706–720.
- Banchi E., Ametrano C. G., Tordoni E., Stanković D., Ongaro S., Tretiach, M., ... & Lazzarin S. Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 738. P. 140249.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. P. 2114–2120.
- Brennan G.L., Potter C., De Vere N., Griffith G.W., Skjøth C.A., Osborne N.J., ... & Creer S. Temperate airborne grass pollen defined by spatio-temporal shifts in community composition // *Nature Ecology & Evolution*. 2019. Vol. 3. N 5. P. 750–754.
- Campbell B. C., Al Kouba J., Timbrell V., Noor M. J., Masael K., Gilding E. K., ... & Davies, J. M. Tracking seasonal changes in diversity of pollen allergen exposure: targeted metabarcoding of a subtropical aerobiome // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 747. P. 141189.
- D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., Cauwenberge P.V. Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe // *Allergy*. 2007. Vol. 62. P. 976–990.
- Galán C., Smith M., Thibaudon M., Frenguelli G., Oteros J., Gehrig R., Berger U., Clot B., Brandao R., EAS QC working group. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis // *Aerobiologia*. 2014. Vol. 30. P. 385–395.
- García-Mozo H. Poaceae pollen as the leading aeroallergen worldwide: A review // *Allergy*. 2017. Vol. 72. N 12. P. 1849–1858.
- Ghitarrini S., Galán C., Frenguelli G., Tedeschini E. Phenological analysis of grasses (Poaceae) as a support for the dissection of their pollen season in Perugia (Central Italy) // *Aerobiologia*. 2017. Vol. 33. P. 1–11.
- Ghitarrini S., Pierboni E., Rondini C., Tedeschini E., Tovo G.R., Frenguelli G., Albertini E. New Biomolecular Tools for Aerobiological Monitoring: Identification of Major Allergenic Poaceae Species through Fast Real-Time PCR. *Ecol. Evol.* 2018. 8, 3996–4010.
- Keller A., Danner N., Grimmer G., Ankenbrand M., von der Ohe K., von der Ohe W., Steffan-Dewenter I. Evaluating multiplexed nextgeneration sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples // *Plant Biol*. 2015. Vol. 17. P. 558–566.
- Kraaijeveld K.; de Weger L.A.; García M.V., Buermans H.; Frank J.; Hiemstra P.S.; Dunnen J.T. Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. Vol. 15. P. 8–16.
- Leontidou K.; Vernesi C., De Groeve J., Cristofolini F., Vokou D., Cristofori A. DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples // *Aerobiologia*. 2018. Vol. 34. P. 63–74.
- Linneberg A., Dam Petersen K., Hahn-Pedersen J., Hammerby E., Serup-Hansen N., Boxall N. Burden of allergic respiratory disease: a systematic review // *Clinical and Molecular Allergy*. 2016. Vol. 14. P. 1–14.
- Longhi S., Cristofori A., Gatto P., Cristofolini F., Grando M.S., Gottardini E. Biomolecular identification of allergenic pollen: a new perspective for aerobiological monitoring? // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2009. Vol. 103. N 6. P. 508–514.
- Marcello A. Nuovi criteri per le osservazioni fenologiche //

- Nuovo Giornale Botanico Italiano. 1953. Vol. 42. P. 543–556.
- Meier U. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1997. 204 p.
- Mohanty R. P., Buchheim M. A., Anderson J., Levetin E. Molecular analysis confirms the long-distance transport of *Juniperus ashei* pollen // PLoS One. 2017. Vol. 12. N 3. e0173465.
- Newson RB, van Ree R, Forsberg B, Janson C, Lötvall J, Dahlen S-E, Toskala EM, Bælum J, Brozek GM, Kasper L, Kowalski ML, Howarth PH, Fokkens WJ, Bachert C, Keil T, Krämer U, Bislimovska J, Gjomarkaj M, Loureiro C, Burney PGJ, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of sensitization to common aeroallergens in adults: the GA2LEN survey // Allergy. 2014. Vol. 69. P. 643–651.
- Núñez A., Amo de Paz G., Rastrojo A., García A. M., Alcamí A., Gutiérrez-Bustillo A. M., Moreno D. A. Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere. Part 2: Metagenomics applied to urban environments // International Microbiology. 2016. Vol. 19. P. 69–80.
- Omelchenko D. O., Krinitsina A. A., Kasianov A. S., Speranskaya A. S., Chesnokova O. V., Polevova S. V., Severova E. E. Assessment of ITS1, ITS2, 5'-ETS, and trnL-F DNA barcodes for metabarcoding of Poaceae pollen // Diversity. 2022. Vol. 14. 191.
- Omelchenko D.O., Speranskaya A.S., Ayginin A.A., Khafizov K., Krinitsina A.A., Fedotova A.V., Pozdyshev D.V., Shtratnikova V.Y., Kupriyanova E.V., Shipulin G.A. et al. Improved protocols of ITS1-based metabarcoding and their application in the analysis of plant-containing products // Genes. 2019. Vol. 10. 122.
- PollenLibrary.com – Allergen and Botanic Reference Library. URL: <https://www.pollenlibrary.com>
- Polling M., Sin M., de Weger L. A., Speksnijder A. G., Konders M. J., de Boer H., Gravendeel B. DNA metabarcoding using nrITS2 provides highly qualitative and quantitative results for airborne pollen monitoring // Science of the Total Environment. 2022. Vol. 806. P. 150468.
- Severova E., Volkova O. Sampling height in aerobiological monitoring // 11th International Congress on Aerobiology. Programme & Abstract book. 2018. P. 74.
- Severova E., Volkova O. Variations and trends of *Betula* pollen seasons in Moscow (Russia) in relation to meteorological parameters // Aerobiologia. 2017. Vol. 33. N 2. P. 253–264.
- Speranskaya A.S., Khafizov K., Ayginin A.A., Krinitsina A.A., Omelchenko D.O., Nilova M.V., Severova E.E., Samokhina E.N., Shipulin G.A., Logacheva M.D. Comparative analysis of Illumina and ion torrent high-throughput sequencing platforms for identification of plant components in herbal teas // Food Control. 2018. Vol. 93. P. 315–324.
- Traidl-Hoffmann C. Allergy – an environmental disease // Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz. 2017. Vol. 60. P. 584–591.
- Volkova O., Severova E. Poaceae pollen season and associations with meteorological parameters in Moscow, Russia, 1994–2016 // Aerobiologia. 2019. Vol. 35. P. 73–84.

Сведения об авторах

Северова Елена Эрастовна – вед. науч. сотр. биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (elena.severova@mail.ru);

Криницына Анастасия Александровна – вед. науч. сотр. биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (krinitsina@mail.ru);

Омельченко Денис Олегович – науч. сотр. ИППИ РАН, канд. биол. наук (omdeno@gmail.com);

Касьянов Артем Сергеевич – ст. науч. сотр. ИППИ РАН, канд. физ.-матем. наук (artem.kasianov@gmail.com).

Information about the authors

Severova Elena Erasovna – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Dept. of Higher Plants, Biology Faculty of Lomonosov Moscow State University; 1, building 12, Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia (elena.severova@mail.ru);

Krinitsina Anastasia Alexandrovna – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Dept. of Higher Plants, Biology Faculty of Lomonosov Moscow State University; 1, building 12, Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia (krinitsina@mail.ru);

Omelchenko Denis Olegovich – Candidate of Biological Sciences, Scientific Researcher, Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (omdeno@gmail.com);

Kasianov Artem Sergeevich – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher, Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (artem.kasianov@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 02.08.2022; одобрена после рецензирования 17.10.2022; принята к публикации 07.11.2022.

The article was submitted 02.08.2022; approved after reviewing 17.10.2022; accepted for publication 07.11.2022.