МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Попкова Екатерина Геннадиевна

КЛАВИЦИПИТАЛЬНЫЕ ЭНДОФИТЫ ЗЛАКОВ МОСКВЫ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Специальность 03.02.12 – Микология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Е.Ю. Благовещенская

Москва – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ ... 4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ... 11
1.1. Эндофитные грибы ... 11
1.2. Таксономическое положение эндофитов злаков ... 14
1.3. Встречаемость клавиципитальных эндофитов ... 18
1.4. Жизненный цикл клавиципитальных эндофитов ... 23
1.5. Алкалоиды эндофитных грибов и их влияние на травоядных ... 26
1.5.1. Концентрация алкалоидов в эндофит-содержащих растениях ... 30
1.5.2. Симптоматика отравлений травоядных животных при потреблении в пищу злаков, колонизированных эндофитами ... 32
1.6. Влияние эндофитов на растение-хозяина ... 38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ... 45
2.1. Изучение встречаемости эндофитных грибов ... 45
2.2. Методы световой микроскопии ... 48
2.2.1. Выявление мицелия эндофитов в растительных тканях ... 48
2.2.2. Изучение культур грибов ... 50
2.3. Методы электронной сканирующей микроскопии ... 51
2.3.1. Исследование растительных тканей ... 51
2.3.2. Изучение стром и культур грибов ... 52
2.4. Методы электронной трансмиссионной микроскопии ... 53
2.5. Культуральные методы ... 55
2.5.1. Выделение чистых культур эндофитных грибов из растительных тканей ... 55
2.5.2. Хранение культур эндофитных грибов ... 57
2.5.3. Использованные питательные среды ... 58
2.6. Молекулярно-генетические методы ... 60
2.6.1. Обнаружение эндофитов в растительном материале методом ПЦР ... 60
2.6.2. Идентификация изолятов молекулярно-генетическими методами ... 63
2.7. Обработка данных ... 66
2.8. Изучение роста изолятов на разных средах ... 67
2.8.1. Сравнение роста эндофитов на естественных и искусственных питательных средах ... 67
2.8.2. Изучение роста эндофитных грибов в зависимости от азотного питания ... 68
2.9. Эксперимент по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов ... 69
2.10. Изучение распределения мицелия эндофитных грибов в растениях ... 71
2.10.1. Изучение распределения мицелия в молодых проростках *in vitro* ... 71
2.10.2. Изучение распределения мицелия во взрослых растениях открытого грунта ... 72
2.11. Изучение влияния дефицита фосфора и/или азота на E+ и E- растения ... 72
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ... 74
3.1. Встречаемость эндофитных грибов ... 74
3.2. Коллекция чистых культур эндофитов ... 81
3.3. Видовой состав полученных изолятов и их характеристика ... 87
3.4. Обнаружение эндофитов в растительном материале методом ПЦР ... 100
3.5. Влияние состава питательной среды на рост культур эндофитов ... 103
3.5.1. Сравнение роста эндофитов на естественных и искусственных питательных средах ... 103
3.5.2. Влияние азотного питания на рост культур эндофитных грибов ... 108
3.6. Распределение мицелия эндофитных грибов в растениях ... 112
3.6.1. Распределение мицелия в молодых проростках *in vitro* ... 112
3.6.2. Распределение мицелия во взрослых растениях открытого грунта ... 116

3.7. Результаты эксперимента по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов 120
3.8. Влияние дефицита фосфора и/или азота на E+ и E- растения 122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 129
Выводы 131
Список литературы..... 132
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Спектр растений-хозяев, показаный для эндофитов злаков..... 151
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Результаты анализа образцов, собранных в Москве и Московской области (2013 г.)..... 158
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Характеристики проростков *Festuca pratensis* на 20-е сут. роста..... 162
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Ростовые характеристики отдельных растений *Festuca gigantea*, выращенных на питательной среде с вариацией минерального состава 163
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Основные таблицы дисперсионного анализа для растений, выращенных на питательной среде с варьированием минерального состава 166

ВВЕДЕНИЕ

Грибы-эндофиты – широко распространенные и весьма разнообразные симбионты, принадлежащие различным таксономическим группам, которые на протяжении всего жизненного цикла или его части живут в растениях, не вызывая при этом проявления внешних признаков наличия инфекции, но оказывая значительное влияние на жизнедеятельность растения-хозяина. Эндофитные грибы принято подразделять на группы в зависимости от различных характеристик образуемого симбиоза. Данная работа посвящена одной из таких групп, а именно – клавиципитальным эндофитам злаков – сильно специализированным биотрофам, вызывающим системную инфекцию злаков (в основном, из подсемейства Pooideae). Эти организмы относятся к семейству Clavicipitaceae (Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota) и в настоящий момент рассматриваются в рамках рода *Epichloë* (ранее – *Acremonium* и *Neotyphodium*). Затрагиваемые в данной работе представители этого рода частично или полностью утратили способность к половому размножению и передаются следующим поколениям злаков через несущие мицелий семена. На протяжении всего жизненного цикла они развиваются в межклеточных пространствах растительных тканей бессимптомно, не образуя специализированных питающих структур, которые бы угнетали клетки растения. Будучи полностью зависимыми от благополучия растения-хозяина, клавиципитальные эндофиты часто оказывают на него положительное влияние, повышая его устойчивость как к ряду биотических, так и абиотических факторов окружающей среды, что имеет важное теоретическое и прикладное значение.

Актуальность темы исследования

Несмотря на то, что первые упоминания ассоциаций между клавиципитальными эндофитами и злаками в литературе встречаются с конца 19-го века, а активное их изучение по всему миру продолжается с конца 70-х годов 20-го века, в России им уделяется крайне мало внимания. Существуют

отрывочные сведения о встречаемости и видовом составе клавициипитальных эндофитов на территории России, отраженные в единичных работах, а также данные по наличию инфекции в семенах из различных коллекций. Следовательно, необходимым представляется расширение сведений о встречаемости и видовом разнообразии эндофитов данной группы.

Взаимоотношения между эндофитными грибами и растениями-хозяевами в зависимости от ряда факторов могут представлять собой целый спектр различных типов: от классического мутуализма до антагонизма, поэтому подобные ассоциации являются удобной моделью для всестороннего изучения симбиозов.

Актуальность изучения данной группы организмов также обусловлена их способностью продуцировать целый ряд биологически активных соединений, в том числе и высокотоксичных алкалоидов, опасных для травоядных животных. Присутствие на пастбищах зараженных кормовых злаков отрицательно влияет на сельскохозяйственных животных, а при высоких степенях зараженности может даже приводить к их массовому падежу, и, следовательно, к значительным экономическим потерям. Кроме того, известны случаи отравлений людей при случайной контаминации злаковых культур зараженными семенами сорных трав.

С другой стороны, системные эндофиты злаков способны в зависимости от различных факторов положительно влиять на ростовые характеристики растения-хозяина, его конкурентоспособность и устойчивость к вредителям и патогенам, что представляется важным как в прикладном аспекте (селекция газонных и кормовых трав), так и для понимания закономерностей функционирования растительных сообществ в естественных условиях.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение биологии клавициипитальных грибов-эндофитов злаков и их влияния на растение-хозяина. Для достижения этой цели были поставлены следующие *задачи*:

1) выявление клавициципитальных эндофитных грибов в тканях растений, создание коллекции чистых культур и идентификация выделенных изолятов;

2) изучение морфолого-культуральных и цитологических характеристик изолятов;

3) изучение закономерностей распределения эндофитного мицелия в растении при росте на гидропонике и в открытом грунте;

4) исследование влияния эндофитной инфекции на ростовые характеристики растения-хозяина при росте на средах с варьированием минерального состава.

Научная новизна

Настоящая работа расширяет данные по видовому разнообразию и встречаемости эндофитных грибов на территории Москвы и Московской области. На территории России впервые обнаружены зараженные популяции *Festuca gigantea* (L.) Vill., *F. arundinacea* Schreb. и *Elymus caninus* (L.) L., из которых получены и идентифицированы изоляты грибов. Впервые отмечены случаи заражения российских злаков эндофитами видов *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel и *Epichloë occultans* (C.D. Moon, B. Scott & M.J. Chr.) Schardl, причем последний является продуцентом ряда опасных для теплокровных животных алкалоидов.

Впервые показана возможность существования водно-воздушных гифомицетов (род *Tricladium*) в виде системных эндофитов злаков, распространяемых вертикально вместе с зараженными семенами.

Изучение цитологических особенностей эндофитов позволило выявить новые структуры и особенности развития мицелиальных грибов как при росте в чистой культуре (формирование вторичных поровых контактов), так и при развитии в растительных тканях (образование «тонкого» мицелия).

Теоретическая и практическая значимость

Значительная часть исследований эндофитных грибов в настоящий момент проводится на ограниченном числе видов злаков, играющих важную роль в сельском хозяйстве. Данная работа больше сосредоточена на ассоциации эндофитов и дикорастущих злаков, что позволяет получить новые данные об этом симбиозе уже в природных условиях.

Обнаруженная возможность существования водно-воздушных гифомицетов (род *Tricladium*) в виде системных эндофитов злаков, распространяемых вертикально вместе с зараженными семенами, расширяет знания об этой группе организмов и открывает новую главу в понимании их жизненного цикла.

Создана коллекция чистых культур эндофитных грибов злаков, которую можно использовать для дальнейшей работы.

Показано присутствие эндофитных грибов, в том числе и потенциально токсичных для сельскохозяйственных животных, в сортовых кормовых и газонных злаках, а также показано, что эндофиты оказывают статистически значимое влияние на ростовые характеристики растений-хозяев. Следовательно, крайне важно вести постоянный мониторинг сельскохозяйственных угодий на предмет наличия заражения эндофитами и учитывать возможность их присутствия при сортоиспытании.

Обнаружено, что рекомендуемые методы ПЦР-диагностики присутствия эндофитов в растительном материале в случае российских образцов могут давать ложноотрицательные результаты, что необходимо учитывать при проведении мониторинга. Показано преимущество работы с молодыми проростками по сравнению с семенами при ПЦР-диагностике присутствия эндофитов.

Методология и методы исследования

В работе были использованы классические методы микологических исследований (сбор материала, микроскопирование, работа с чистыми

культурами), молекулярно-генетические методы и методы статистического анализа данных. Дизайн проведенных экспериментов основан на анализе литературы и проведенных автором пилотных опытах.

Положения, выносимые на защиту

1. Эндофитные грибы способны формировать вторичный поровый контакт между коллатеральными гифами.

2. Грибной мицелий может иметь диаметр менее 1 мкм.

3. Эндофиты положительно влияют на ростовые характеристики овсяницы гигантской при росте на гидропонике в условиях дефицита азота и фосфора.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется выбором методов для решения поставленных задач и соблюдением условий экспериментов. Проведенная статистическая обработка показывает не менее чем 95%-ный уровень надежности полученных результатов. Основные результаты данного исследования были доложены на Второй всероссийской молодежной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2014), Третьем Международном Микологическом Форуме (Москва, 2015), III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2015), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), Международной конференции «Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах» (г. Минск - д. Каменюки, Беларусь, 2016); 10th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses (Саламанка, Испания, 2018), Всероссийской конференции с международным участием «Микология и альгология в России. XX – XXI век: смена парадигм» (Москва, 2018).

Личный вклад автора

Личный вклад автора присутствует на каждом этапе выполнения диссертации и заключается в планировании экспериментов, их методическом и инструментальном обеспечении, в непосредственном выполнении экспериментов, статистической обработке, анализе и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на конференциях.

Список публикаций по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI

1. Благовещенская Е. Ю., **Попкова** Е. Г. Новые находки эндофитных грибов. Короткое сообщение // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2016. — № 2. — С. 17–18. (SJR 2018 = 0,228, RINC 2018 = 0,792)

   Переводная версия: Blagoveshchenskaya E. Yu., Popkova E. G. New findings of endophytic fungi: brief note. Moscow University biological sciences bulletin, 2016, 71(2):80–81.

2. **Попкова** Е. Г., Благовещенская Е. Ю. Алкалоиды грибов-эндофитов злаков и их влияние на травоядных животных // Микология и фитопатология. — 2017. — Т. 51, Вып. 1. — С. 5–14. (SJR 2018 = 0,205, RINC 2018 = 0,685)

3. **Попкова** Е. Г., Благовещенская Е. Ю. Колонизация различных органов Festuca gigantea (L.) Vill. эндофитными грибами // Бюллетень МОИП. — 2019. — Том 124, № 5. — С. 65–69. (RINC 2018 = 0,405)

Иные научные труды

1. **Popkova** E. G., Blagoveshchenskaya E. Y. Giant fescue endophytes in Russia // 10th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses. Book of abstracts. Eds. B. Vazquez de Aldana, I. Zabalgogeazcoa. — Salamanca, Spain, 2018. — P. 72–72.

2. Благовещенская Е.Ю., **Попкова** Е.Г. Развитие эндофитного мицелия внутри растения-хозяина // Современная микология в России. Том 5. Ред.: Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. Материалы III Международного микологического форума. Москва. 14 – 15 апр. 2015 г. — М.: Нац. акад. микол. 2015. Том 5. С. 19–20.

3. **Попкова** Е. Г. Эндосимбиотические грибы злаков на территории Москвы и Московской области // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). — 2014. — №3. — С. 10. (RINC 2018 = 0,332)

4. **Попкова** Е. Г. Эндофиты злаков: выделение и поддержание чистых культур // Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах: Материалы II Международной конференции, г. Минск - д. Каменюки, 20-23 сентября 2016 г. — Минск: Колорград. — 2016. — С. 185–190.

5. **Попкова** Е. Г., Благовещенская Е. Ю. Морфологические и ультраструктурные особенности эндофитных грибов злаков // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, Микология и альгология России. XX – XXI век: смена парадигм. — Перо Москва, 2018. — С. 203–204.

6. **Попкова** Е.Г. Влияние эндофита на развитие *Festuca gigantea* в условиях дефицита минерального питания // ЛОМОНОСОВ 2016. XXIII международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных, Секция "Биология". — 2016. — С. 238–239.

7. **Попкова** Е.Г., Кокаева Л.Ю. Использование метода ПЦР для обнаружения грибов-эндофитов в растительном материале // Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге. — Санкт-Петербург. — 2015. — С. 38.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эндофитные грибы

В естественных экосистемах абсолютное большинство растений вовлечено в те или иные симбиотические отношения с грибами микоризообразователями и/или эндофитами – симбионтами, которые живут в вегетирующих растениях, существенно влияя на их жизнь (Rodriguez et al., 2009; Kotilínek et al., 2017).

Исторически эндофитные грибы принято подразделять на два больших блока (табл. 1), учитывающих эволюционно сложившиеся связи, таксономическое положение как гриба, так и растения-хозяина, и их экологическую роль.

Таблица 1

Характеристика групп неклавициципитальных эндофитов в сравнении с клавициципитальными (по Rodrigiez et al., 2009, с изменением)

Критерий	**Клавициципи-тальные**	**Неклавициципитальные**		
	Группа 1	**Группа 2**	**Группа 3**	**Группа 4**
Круг хозяев	Узкий	Широкий	Широкий	Широкий
Колонизируемые ткани	Побеги и корневища	Побеги, корни, корневища	Побеги	Корни
Инфекция	Системная	Системная	Локальная	Системная
Биоразнообразие в пределах одного растения	Низкое	Низкое	Высокое	Неизвестно
Передача инфекции	Вертикальная и горизонтальная	Вертикальная и горизонтальная	Горизонтальная	Горизонтальная

Во-первых, это клавициципитальные грибы, или эндофиты злаков (группа 1), которые, судя по всему, представляют собой монофилетичную группу и заселяют исключительно злаки и некоторые осоки (именно данной группе организмов посвящена настоящая работа, поэтому далее о ней будет рассказано более подробно). Во-вторых, это неклавициципитальные эндофиты, к которым

относятся все эндофитные грибы, не попадающие в первый блок (Rodriguez et al., 2009).

Неклавиципитальные эндофиты – разнообразная полифилетическая группа грибов, выделяемых как из сосудистых, так и из споровых растений (Zheng et al., 2014). Они обнаружены во всех наземных экосистемах, простирающихся от тропиков до тундры, включая агроценозы (Rodriguez et al., 2009). Их можно разделить на три группы на основании места локализации инфекции, механизма ее передачи между разными поколениями, круга возможных хозяев, биоразнообразия в пределах одного растения и влияния на растение (табл. 1).

Группа 2 включает в себя представителей дикариомицетов (Ascomycota и Basidiomycota), а именно несколько классов из Pezizomycotina и часть из Agaricomycotina и Pucciniomycotina. Симбионты из этой группы предпочитают заселять корни, стебли и листья растения, способны вызывать системную инфекцию, распространяются через семена или корневища и обычно дают хозяину преимущество перед незараженными растениями. Кроме того, отмечено, что частота подобной инфекции среди растений, произрастающих в условиях постоянного стресса, довольно высока и составляет 90-100% (Rodriguez et al., 2009). Примером этой группы могут являться виды рода *Fusarium*, которые способны вести не только сапротрофный или паразитический образ жизни, но и существовать в виде эндофитного мицелия. В частности, *F. oxysporum* Schltdl. описан как эндофит бананового дерева (*Musa* spp.) из семейства Musacaceae, при этом отмечено повышение устойчивости растения-хозяина к паразитическим нематодам *Radopholus similis* (Tylenchida, Secernentea, Nemata) (Paparu et al., 2008), а *F. culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., заселяющий ткани злака *Leymus mollis* (Trin.) Pilg., позволяет ему выдерживать сильное засоление почвы (Rodriguez, Reman, 2008). Кроме того, к этой группе относят *Mycophycias ascophylli* (Cotton) Kohlm. et Volkm.-Kohlm. (в настоящее время – *Stigmidium ascophylli* (Cotton)

Aptroot), симбиоз с которым необходим для нормального роста и развития бурой водоросли *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (Xu et al., 2008).

Представители группы 3 характеризуются, в основном, тем, что в большинстве случаев формируют ограниченные локальные очаги инфекции в надземных частях растения, распространяются горизонтально и отличаются высоким биоразнообразием в пределах определенных тканей хозяина и индивидуального растения. Особенно ярко это выражено у обитателей тропических и субтропических регионов. Эта группа включает в себя представителей большинства порядков из сумчатых и базидиальных грибов (Rodriguez et al., 2009).

В группу 4 включены так называемые темные септированные эндофиты (ТС-эндофиты, DSE – Dark Septate Endophytes), чье присутствие в ризосфере и корнях различных растений отмечалось многими учеными при исследовании микориз. ТС-эндофиты заселяют корни растений, развиваясь внутриклеточно и не формируя структур, характерных для микоризных грибов. Их название обусловлено темной окраской и наличием меланизированной септы. Таксономически эта группа довольно разнообразна: они не проявляют специфичности к определенным хозяевам или к месту их обитания и встречаются повсеместно от Арктики до Антарктики. Предполагают, что ТС-эндофиты распространяются горизонтально; в лабораторных условиях была показана возможность распространения путем фрагментации мицелия и конидиями (Jumpponen, Trappe, 1998). Экологическая роль данной группы все еще мало изучена, но показано, что во многих случаях наличие эндосимбионта оказывает положительное влияние на растение-хозяина, помогая ему переживать абиотический стресс, например, засуху (Zhang et al., 2017; Li et al., 2018) или загрязнение почвы тяжелыми металлами (Zhang et al., 2009).

Помимо описанных четырех групп эндофитов исследователи предлагают выделить в отдельную группу ряд энтомопатогенных грибов, у которых в жизненном цикле может присутствовать достаточно продолжительная стадия

бессимптомного эндофитного роста, предшествующая развитию инфекции на насекомых. В перспективе такие грибы могут служить в качестве потенциальных агентов биоконтроля (Vidal, Jaber, 2015; Lugtenberg et al, 2016).

Активное исследование подобных ассоциаций в течение последних лет нашло отражение в тысячах статей, однако эндофитные грибы все еще остаются недостаточно изученными, несмотря на их важнейшую роль в формировании, стабилизации и эволюции растительных сообществ и других организмов, так или иначе связанных с ними. Этот факт является следствием влияния множества факторов, в число которых входит скрытый от глаз наблюдателя образ жизни, сложности с обнаружением, выделением, культивированием и видовой идентификацией эндофитов и индивидуальные реакции разных членов сообщества друг на друга.

1.2. Таксономическое положение эндофитов злаков

Клавиципитальные эндофитные грибы представляют собой группу, которая включает в себя симбионтов злаков и некоторых осок (Clay, 1990), вступающих с растением-хозяином во взаимоотношения разного характера: от полностью мутуалистических до патогенных (Faeth, Fagan, 2002). Они составляют монофилетичную группу, в которую входят представители семейства Clavicipitaceae (Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota), однако стоит отметить, что по вопросу монофилетичности до сих пор ведутся споры.

В семействе Clavicipitaceae обычно выделяют четыре трибы (Cordycipeae, Clavicipeae, Balansieae, Ustilaginoideae), три из которых инфицируют только травы и осоки, а четвертая, Cordycipeae (род *Cordyceps*), является патогеном насекомых, некоторых других беспозвоночных животных или грибов (Kuldau et al., 1997, цит. по: Clay, Schardl, 2002). Триба Ustilaginoideae включает три анаморфных рода, поражающих травы в Южной и Центральной Америке, а также в других тропических регионах, образуя конидиальное спороношение,

похожее на устоспоры у *Ustilago* spp. (Bischoff et al., 2004). Триба Clavicipeae – известные возбудители болезней, объединяемых названием «спорынья», они паразитируют на широком спектре трав, где образуют склероции, инфицируя одиночные цветки злаков и продуцируя алкалоиды (Коваль, 1984; Pažoutová, 2003). Наиболее разнообразны представители трибы Balansieae, включающей семь родов, формирующих системные инфекции злаков и осок и также способных к синтезу алкалоидов. Именно к этой группе относятся эндофиты, образующие ассоциации с травами преимущественно из подсемейства Pooideae, которые являются предметом изучения в данной работе.

Точкой отсчета в истории изучения клавициципитальных эндофитных грибов принято считать статью Ч.В. Бэкона с соавторами (Bacon et al., 1977). Ее выход связан с массовыми отравлениями скота, произошедшими в Америке и нанесшими многомиллионный ущерб экономике страны. Исследуя кормовые злаки, ставшие причиной гибели животных, ученые обнаружили в растительных тканях мицелий, выделили чистую культуру гриба и идентифицировали его как анаморфу возбудителя чехловидной болезни злаков *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. et C.Tul[1].

Известны и более ранние работы, в которых описывается взаимосвязь между токсичностью некоторых трав и наличием в них эндосимбиотических грибов, в частности, посвященных широко известному злаку *Lolium temulentum* L. (Freeman, 1904), который на протяжении столетий имел весьма зловещую репутацию (Thomas et al., 2016). Данные ранние упоминания эндофитных грибов, как правило, связаны с различными отравлениями: к примеру, описание массового отравления лошадей плевелом опьяняющим (Лисицын, 1915), или отравления людей льняным маслом, полученным из семян льна, загрязненных некоторым количеством семян льняного плевела (*Lolium linicola* A.Br., в настоящее время – *Lolium remotum* Schrank) (Гусынин, 1962).

[1] Авторы в латинских названиях указаны только при первом упоминании; здесь и далее названия организмов приведены так, как они указаны в цитируемых работах, синонимы и систематическое положение растений и грибов приведены по базам Плантариум и Index Fungorum соответственно. В случае отсутствия растений в базе Плантариум (некоторые виды Нового Света) их название приводилось по базе ITIS.

В упомянутой статье Бэкона с соавторами (Bacon et al., 1977) полученные из *Festuca arundinacea* Schreb. изоляты были отнесены к роду *Acremonium* и рассматривались как бесполая стадия *Epichloë typhina*. Однако после более тщательного их изучения и накопления достаточно большого объема данных стало ясно, что анаморфа *E. typhina* и выделенные исследователями изоляты принадлежат к разным видам, и для них была создана новая секция *Albo-lanosa* рода *Acremonium* (Morgan-Jones, Gams, 1982), виды из которой со временем были выделены в отдельный род *Neotyphodium* (Glenn et al., 1996). Для значительной части видов рода *Neotyphodium* не показано наличие телеоморфной стадии, но обнаружено их близкое родство с аскомицетами рода *Epichloë* и *Balansia* (Schardl, Moon, 2003). В 2014 году коллективом авторов в связи с изменениями в кодексе ботанической номенклатуры была пересмотрена систематика данной группы организмов и было предложено перенести виды рода *Neotyphodium* в род *Epichloë* (Leuchtmann et al., 2014), объединив тем самым половые и бесполые стадии одного организма. Описание новых видов клавиципитальных грибов идет сейчас в рамках последнего рода (Shymanovich et al., 2017). Состояние группы в настоящее время представлено далее (табл. 2).

Таблица 2

Виды рода *Neotyphodium* и их принятые при пересмотре группы названия по базе Index Fungorum

№	Виды эндофитов	Статья с описанием вида
1	*Neotyphodium ×siegelii* K.D. Craven, Leuchtm. et Schardl (= ***Epichloë siegelii*** (K.D. Craven, Leuchtm. & Schardl) Leuchtm.)	Craven et al., 2001
2	*Neotyphodium aotearoae* C.D. Moon, C.O. Miles et Schardl (= ***Epichloë aotearoae*** (C.D. Moon, C.O. Miles & Schardl) Leuchtm. & Schardl)	Moon et al., 2002
3	*Neotyphodium australiense* C.D. Moon et Schardl (= ***Epichloë australiensis*** (C.D. Moon & Schardl) Leuchtm.)	Moon et al., 2002
4	*Neotyphodium chilense* (Morgan-Jones, J.F. White et Piont.) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (= ***Acremonium chilense*** Morgan-Jones, J.F. White & Piont.)	Glenn et al., 1996
5	*Neotyphodium chisosum* (J.F. White et Morgan-Jones) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (= ***Epichloë chisosa*** (J.F. White & Morgan-Jones) Schardl)	Glenn et al., 1996
6	*Neotyphodium coenophialum* (Morgan-Jones et W. Gams) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin	Glenn et al., 1996

№	Виды эндофитов	Статья с описанием вида
	(= ***Epichloë coenophiala*** (Morgan-Jones & W. Gams) C.W. Bacon & Schardl)	
7	*Neotyphodium funkii* K.D. Craven et Schardl (= ***Epichloë funkii*** (K.D. Craven & Schardl) J.F. White)	Moon et al., 2007
8	*Neotyphodium gansuense* C.J. Li et Nan (= ***Epichloë gansuensis*** (C.J. Li & Nan) Schardl)	Li et al., 2004
9	*Neotyphodium gansuense* var. *gansuense* C.J. Li & Nan*	Li et al., 2004
10	*Neotyphodium gansuense* var. *inebrians* C.D. Moon & Schardl (= ***Epichloë inebrians*** (C.D. Moon & Schardl) Li Chen & C.J. Li)	Moon et al., 2007
11	*Neotyphodium huerfanum* (J.F. White, G.T. Cole et Morgan-Jones) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin	Glenn et al., 1996
12	*Neotyphodium lolii* (Latch, M.J. Chr. et Samuels) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (= ***Epichloë festucae*** Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel)	Glenn et al., 1996
13	*Neotyphodium melicicola* C.D. Moon et Schardl (= ***Epichloë melicicola*** (C.D. Moon & Schardl) Schardl)	Moon et al., 2002
14	*Neotyphodium occultans* C.D. Moon, B. Scott et M.J. Chr. (= ***Epichloë occultans*** (C.D. Moon, B. Scott & M.J. Chr.) Schardl)	Moon et al., 2000
15	*Neotyphodium pampeanum* Iannone et Cabral (= ***Epichloë pampeana*** (Iannone & Cabral) Iannone & Schardl)	Iannone et al., 2009
16	*Neotyphodium sibiricum* X. Zhang & Y.B. Gao (= ***Epichloë sibirica*** (X. Zhang & Y.B. Gao) Tadych)	Zhang et al., 2009
17	*Neotyphodium sinicum* Z.W. Wang, Y.L. Ji et Y. Kang (= ***Epichloë sinica*** (Z.W. Wang, Y.L. Ji & Y. Kang) Leuchtm.)	Kang et al., 2009
18	*Neotyphodium sinofestucae* Y. Chen, Y. Ji et Z. Wang (= ***Epichloë sinofestucae*** (Y.G. Chen, Y.L. Ji & Z.W. Wang) Leuchtm.)	Chen et al., 2009
19	*Neotyphodium starrii* (J.F. White et Morgan-Jones) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (= ***Acremonium starrii*** J.F. White & Morgan-Jones)	Glenn et al., 1996
20	*Neotyphodium stromatolongum* Y.L. Ji, L.H. Zhan et Z.W. Wang (= ***Epichloë stromatolonga*** (Y.L. Ji, L.H. Zhan & Z.W. Wang) Leuchtm.)	Ji et al., 2009
21	*Neotyphodium tembladerae* Cabral et J.F. White (= ***Epichloë tembladerae*** (Cabral & J.F. White) Iannone & Schardl)	Cabral et al., 1999
22	*Neotyphodium typhinum* (Morgan-Jones et W. Gams) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (= ***Epichloë mollis*** Leuchtm. & Schardl)	Glenn et al., 1996
23	*Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (=***Epichloë uncinata*** (W. Gams, Petrini & D. Schmidt) Leuchtm. & Schardl)	Glenn et al., 1996

1.3. Встречаемость клавициипитальных эндофитов

Колонизация злаков эндофитными грибами – весьма распространенное явление: по некоторым оценкам, около 30% видов злаков имеют постоянного сожителя-эндофита (Leuchtmann, 1992, цит. по: Faeth, 2002). Данные симбионты отмечены, по крайней мере, для 200 видов злаков, принадлежащих к 46 родам. Во многих случаях видовая принадлежность эндофита остается неопределенной (Приложение 1).

Работы по изучению встречаемости эндофитных грибов были начаты еще в 80-е годы прошлого века. В Соединенных Штатах Америки было проведено большое исследование растений, собранных на территории разных штатов, а также образцов семян из коллекций. Около 60 % вегетирующих злаков *Festuca arundinacea*, а также 54% семян оказались инфицированы эндофитом *Acremonium coenophialum* (сейчас *Epichloë coenophiala*) (Shelby, Dalrymple, 1987). Кроме того, показано широкое распространение эндофитных ассоциаций с разными видами родов *Festuca*, *Lolium*, а также с *Melica decumbens* (L.) Weber и *Stipa robusta* (Vasey) Scribn., токсичными для травоядных животных (White, 1987).

Существует множество работ, посвященных исследованию встречаемости подобного рода ассоциаций в различных регионах мира, причем процент инфицированности в некоторых местах довольно высок. *Neotyphodium*- и *Acremonium*-подобные эндофиты обнаружены почти повсеместно. Например, Г. Льюис с соавторами (Lewis et al., 1997) обнаружил эндофиты в естественных популяциях злаков рода *Lolium* в 15 европейских странах из 20 обследованных (Болгария, Чехия, Англия, Франция, Германия, Греция, Ирландия, Италия, Португалия, Польша, Румыния, Словакия, Испания, Швейцария, Турция). Зараженность в 12 из них составляла 60% и более (из 523 проверенных популяций 38% оказались не инфицированными, в 48% случаев инфицированными были менее половины растений (1-50%), а в 14% – более половины (51-100%)). Что касается Бельгии, Люксембурга и Голландии, на

территории которых в данной работе инфекция не была обнаружена, инфицированные популяции описаны другими авторами (Latch et al., 1987; Baert et al., 1994), а несоответствие результатов Льюиса, скорее всего, связано с малой выборкой в его исследовании (от 2 до 7 популяций).

Существуют также работы, посвященные эндофитным инфекциям злаков отдельных стран Европы. В частности, при исследовании наиболее распространенных в Швеции видов злаков обнаружено следующее. Наибольший уровень инфицированности отмечен для *Festuca rubra* (23-27%), в то время как для *Deschampsia flexuosa* (L.) Nees и *Poa trivialis* L. зараженность значительно ниже и не превышает 4%. Ни один образец *Agrostis capillaris* L. не был инфицирован грибами. Интересно, что для *F. rubra,* которая находится в симбиотических отношениях с *Epichloë festucae,* показано снижение встречаемости эндофита с увеличением высоты над уровнем моря (Bazely et al., 2007).

Подобные исследования, проведенные в Дании с *Lolium perenne* L., который является важной кормовой культурой, показали часто встречающуюся ассоциацию с *Neotyphodium lolii* (сейчас *Epichloë festucae*), продуцирующим треморогенные и другие алкалоиды, что играет крайне важную роль в животноводстве. Эндофит был обнаружен с помощью иммунологических методов в 77% обследованных точек, инфицированность варьировала от 4 до 82%, причем наибольшего значения она достигала в тех местах, где проводился наиболее интенсивный выпас скота или же отмечался высокий уровень антропогенного воздействия, что косвенно говорит о преимуществах, предоставляемых растению эндофитом (Jensen, Roulund, 2004).

Работа Иниго Сабальгогеаскоа с коллегами, посвященная анализу существующих ассоциаций между растениями и эндофитами в западной части Испании, показала, что из 49 видов злаков 11 находились в симбиотических отношениях с грибами родов *Epichloë* или *Neotyphodium*. Инфицированные растения *Festuca arundinacea, F. rubra, Lolium perenne* и *Dactylis glomerata* L.

наиболее часто встречались во всех популяциях. В плевеле и в красной овсянице обнаружена *Epichloë festucae* (Zabalgogeazcoa et al., 1999). Для таких видов злаков как *Agrostis castellana* Boiss. et Reut., *Alopecurus arundinaceus* Poir., *Brachypodium phoenicoides* (L.) P. Beauv. ex Roem. et Schult. и *Holcus lanatus* L. процент заражения был низок (около 1%), а для *Festuca ampla* Hack., *A. castellana* и *B. phoenicoides* взаимодействия с эндофитами показаны впервые (Zabalgogeazcoa et al., 2003).

В Австралии были проанализированы 13 родов аборигенных злаков (Aldous et al., 1999), и при этом упоминается только один случай выделения *Neotyphodium*-подобного гриба из семян *Danthonia racemosa* R.Br. (современное название – *Rytidosperma racemosum* (R. Br.) Connor et Edgar), который, однако, был стерильным и, следовательно, остался неопределенным. Исходя из этих данных, авторы сделали вывод, что аборигенные травы вовсе не образуют ассоциаций с *Neotyphodium* или же они встречаются крайне редко. Однако в более поздней работе показана ассоциация между широко распространенным на территории Австралии злаком *Lolium rigidum* Gaudin и *Neotyphodium occultans*, встречающаяся с частотой, варьирующей в зависимости от места в широких пределах – от 4% в западной части материка до 98% на юге (Kirkby et al., 2011).

Интересные результаты получены группой исследователей из Китая (Zhang et al., 2010), которые занимались изучением генетического разнообразия изолятов *Neotyphodium*, выделенных из растения *Achnatherum sibiricum* (L.) Keng ex Tzvelev. Из 5 популяций получено 103 изолята, 33 из которых были определены как *N. sibiricum* X. Zhang et Y.B. Gao и 61 как *N. gansuense*, причем около 13% были гетерозиготны по локусу SSR. Это показывает, что, несмотря на превалирование вертикального переноса инфекции, временами имеет место случайная генетическая рекомбинация, и часть изолятов имеет гибридное происхождение. Ранее, в 2006 году, там же была проведена большая работа по встречаемости эндофитов в диких травах. На предмет наличия эндофитной инфекции протестировали 41 вид трав, собранных в 56 точках и принадлежащих

к 172 популяциям. У 25-и из них обнаружены ассоциации с эндофитами, а именно: *Achnatherum purpurascens* (Hitchcock) Keng, *A. sibiricum*, *A. splendens* (Trin.) Nevski, *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn., *A. cirstatum* var. *pectiniforme* (Roem. et Schult.) Matveev, *A. desertorum* (Fisch.ex Link) A. Love, *A. elongatum* (Host) P. Beauv., *A. mongolicum* Keng, *Cleistogenes squarrosa* (Trin.) Keng (ассоциация с эндофитами показана впервые), *Elymus dahuricus* Turcz. ex Griseb., *E. excelsus* Turcz. ex Griseb., *E. nutans* Griseb., *E. sibiricus* L., *E. smitihii* (Rydb.) Nevski, *E. repens* (L.) Nevski, *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link, *Koeleria cristata* (L.) Pers. (ассоциация с эндофитами показана впервые), *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvelev, *Poa angustifolia* L., *P. annua* L., *P. palustris* L., *P. paucifolia* Keng f. ex SLChen, *P. pratensis* L., *Roegneria turczaninovii* (Drob.) Nevski и *Stipa grandis* P.A. Smirn. Зараженность варьировала в пределах от 1 до 100%, достигая максимума у *Agropyron elongatum*, *A. mongolicum*, *Achnatherum sibiricum*, *Poa angustifolia*, *Poa palustris* и *Roegneria turczaninovii* (Wei et al., 2006).

Ассоциации эндофитов с различными дикорастущими злаками показаны также для Японии: *Acremonium uncinatum* W. Gams, Petrini et D. Schmidt (сейчас *Epichloë uncinata*) с *Festuca pratensis* Huds. в Хоккайдо, *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones et W. Gams (сейчас *Epichloë coenophiala*) с *Festuca arundinacea*; кроме того, инфекции отмечены на территории хозяйственных угодий *Lolium multiflorum* Lam. с инфицированностью, достигающей 91% (Koga et al., 1993; Koga et al., 1995; Yamashita et al., 2010).

О наличии грибных эндофитов в диких травах Аргентины стало известно с начала 20-го века в связи с регистрацией случаев отравлений крупного рогатого скота, употреблявшего в пищу *Festuca hieronymi* Hack. (Rivas, Zanolli, 1909, цит. по: Iannone et al, 2011). В настоящее время для этой страны описаны 2 вида эндофитов: *Neotyphodium tembladerae* с весьма широким кругом хозяев из родов *Poa*, *Festuca*, *Bromus*, *Phleum* and *Melica* (Gentile et al., 2005, цит. по: Iannone et al, 2011), и *N. pampeanum*, ассоциированный с некоторыми популяциями *Bromus auleticus* Trin. ex Nees (Iannone et al., 2009). В одной из последних работ по этой

теме было обработано более 4,5 тыс. растений, принадлежащих к 80 разным видам. 34 из них были вовлечены в симбиоз с грибами рода *Neotyphodium*, в том числе *Briza paleapilifera* Parodi, эндемичный для возвышенных местообитаний в центральной части Аргентины вид, *Bromus brachyantherus* Döll, обитающий в тропических лесах, *Festuca fimbriata* Nees, заселяющий болотистую местность на северо-востоке, *Poa bergii* Hieron., эндемичный для прибрежных дюн, и *Poa durifolia* Giussani, Nicora and Roig, произрастающий на почвах вулканического происхождения, частота встречаемости эндофитов для которых была выше 80% во всех проанализированных популяциях. У видов с более широкими ареалами (*Poa lanigera* Nees, *P. lanuginosa* Poir., *P. bonariensis* (Lam.) Kunth., *P. ligularis* Nees) данный показатель варьировал в пределах от 0 до 100% (Iannone et al, 2011).

Исследование, проведенное в 1999-2000 годах в Новой Зеландии, связанное с изучением 24-х видов злаков, 19 из которых являются эндемичными, а также 3-х интродуцированных, показали, что эндофитные грибы родов *Epichloë* и *Neotyphodium* не встречаются ни у одного аборигенного вида из 64-х протестированных. Единственный аборигенный вид, для которого отмечен случай заражения, это *Echinopogon ovatus* (G.Forst.) P. Beauv. (Miles et al., 1998, цит. по: Rolston et al., 2002). Наибольший интерес вызывает факт, что инфекции не было обнаружено даже у таких родов, как *Poa* и *Festuca*, для которых в Южной Америке и Северном полушарии были неоднократно описаны случаи симбиотических отношений с эндофитами. Авторы статьи объясняют это явление тем, что колонизация этих растений грибными симбионтами произошла уже после отделения Новой Зеландии от суперконтинента Гондвана и, соответственно, континентальных популяций злаков, а также низким уровнем нагрузки, исходящей от позвоночных и беспозвоночных животных. Инфекции также не было обнаружено у злака *Elymus*, интродуцированного из Австралии. Однако в 6 из 20 коллекций *Festuca ovina* L. и *F. rubra*, тоже интродуцированных, обнаружили *Epichloë festucae*, причем 4 из них имели 82-87% инфицированных семян. Кроме того, эндофиты широко распространены в двух

сельскохозяйственных культурах – *Lolium perenne* и *Festuca arundinacea* (Rolston et al., 2002).

Литературных данных по встречаемости эндофитных грибов на территории России крайне мало. Показано существование ассоциаций между овсяницей луговой и грибом *Neotyphodium uncinatum* (= *Epichloë uncinata*) (Москва, Московская и Брянская области), а также единичные находки для овсяницы красной (Московская область) и костреца безостого (Московская область). Кроме того, следует отметить наличие эндофитной инфекции в семенах сортовых злаков (Матевосян, 2000; Шеленга, 2002; Благовещенская, 2006).

1.4. Жизненный цикл клавиципитальных эндофитов

Обобщенный жизненный цикл эндофита включает в себя многолетний системный рост в тканях растения-хозяина в течение большей части года. Такие эндофиты большую часть времени никак себя не проявляют, развиваясь в виде мицелия, проходящего по межклетникам и не образующего гаусторий. Клетки растения, соседствующие с гифами, при этом выглядят абсолютно здоровыми, ничем не угнетенными и не отличаются от других по ультраструктурным признакам (Moon et al., 2002). Отмечена приуроченность клавиципитальных эндофитов к надземным частям растения, причем наиболее часто мицелий обнаруживают в листовых влагалищах и стеблях злаков (Bacon et al., 1977), однако они могут также заселять листовые пластинки (Благовещенская, 2006), а также описаны случаи обнаружения гиф эндофита в корнях молодых проростков злаков, выращенных *in vitro* (Azevedo, Welty, 1995).

Во время перехода растений в стадию цветения *Epichloë* абортирует соцветие, формируя распростертую строму на генеративном побеге растения-хозяина. Многие эндофиты, однако, проходят весь жизненный цикл бессимптомно, распространяясь с семенами растения, а также известен ряд промежуточных случаев. На основании этой разницы в жизненных циклах

выделяют три типа симбиозов, формируемых клавиципитальными эндофитами – см. таблицу 3 (Clay, Schardl, 2002).

Таблица 3

Характеристики разных типов клавиципитальных эндофитов (по Clay, Schardl, 2002, с изменениями)

		Симптоматический Тип I	**Смешанный Тип II**	**Асимптоматический Тип III**
Гриб	Размножение	Половое и бесполое	Половое, бесполое и вегетативное (через семена)	Вегетативное (через семена)
	Распространение	Горизонтальное	Горизонтальное и вертикальное	Вертикальное
	Пропагулы	Аскоспоры и конидии	Аскоспоры, конидии и инфицированные семена	Инфицированные семена
	Взаимодействие с хозяином	Паразитизм	Промежуточный между паразитизмом и мутуализмом	Мутуализм
Хозяин	Размножение	Отсутствует или только вегетативное	Половое размножение частично блокируется	Не нарушается
	Частота инфекции	Низкая	Средняя	Высокая
	Таксон	Любые злаки	С3-злаки	С3-злаки

Первый из них – симптоматический (тип I) – характеризуется тем, что гриб во время цветения злака образует на его соцветии стромы, что ведет к репродуктивной стерилизации хозяина (подобная стратегия принципиально не отличается от других патогенов растений). В случае с *Epichloë* сначала развивается белая конидиальная строма, причем конидии в данном случае выполняют роль спермациев. В процессе оплодотворения показано участие мух рода *Phorbia*, которые питаются спермациями и переносят их на стромы особей противоположного знака (Bultman et al., 1995). После оплодотворения начинается развитие перитециев, и строма приобретает оранжевый цвет. Распространение инфекции в этом случае происходит горизонтально с помощью нитевидных аскоспор. Семена зараженного растения (если они все-таки образуются) остаются чистыми и при прорастании дают свободные от эндофита растения. Аналогичным образом происходит размножение у видов рода *Balansia*. Однако следует отдельно упомянуть гриб *Atkinsonella hypoxylon* (Peck) Diehl, который развивается с образованием плодовых тел и аскоспор, но способен передаваться вертикально с помощью клейстогамных семян (Clay, 1994, цит. по: Clay, Shardl, 2002).

Смешанный тип (тип II) – самый пластичный, так как распространение эндофита идет как вертикально (с инфицированными семенами), так и горизонтально (с помощью аскоспор), при этом плодовые тела гриба и цветки растения-хозяина могут развиваться одновременно на одном растении. Примером такой ассоциации является *Epichloë festucae* – эндофит красной овсяницы (*Festuca rubra* L.) (Schardl, 2001). В подобной ситуации гриб в полной мере реализует мутуалистические взаимоотношения с хозяином, но при этом не теряет половую стадию развития. Такие плейотропные ассоциации представляют особый интерес, поскольку они, возможно, отражают эволюционную стратегию перехода от горизонтального распространения инфекции к вертикальному (Clay, Schardl, 2002). Этот эволюционный переход может быть весьма пластичным, потому что, несмотря на репродуктивную изоляцию растения-хозяина, эндофит может предоставлять хозяину определенные выгоды, к примеру, увеличение густоты кущения, устойчивость к травоядным животным.

Асимптоматический тип (тип III) кардинально отличается тем, что гриб живет в тканях хозяина бессимптомно в течение всего жизненного цикла, в том числе и во время цветения злака. Передача инфекции происходит вертикально вместе с зараженными мицелием семенами: мицелий развивается вблизи от яйцеклетки и затем проникает в эндосперм и зародыш семени (Philipson, Christey, 1986). Подобный тип передачи инфекции может быть очень эффективным и зараженность потомков достигает 100% (Clay, Schardl, 2002), хотя существуют работы, в которых отмечен более низкий процент зараженности (Faeth, 2002). Именно к этой группе относятся рассматриваемые в данной работе представители *Epichloë* (ранее *Acremonium* и *Neotyphodium*), (Schardl, Moon, 2003).

Грибы-эндофиты, полностью утратившие половую стадию (ранее род *Neotyphodium*), не продуцируют аскоспор, поэтому у них нет механизма регулярной генетической рекомбинации, что, в свою очередь, ведет к снижению

генетического разнообразия популяции. Предполагается, что основная часть анаморфных видов этой группы произошла в результате межвидовой гибридизации. В качестве примера можно привести *Neotyphodium australiense*, который является результатом гибридизации *Epichloë festucae* и *Epichloë typhina* (Clay, Schardl, 2002; Moon et al., 2002; Schardl, Moon, 2003).

1.5. Алкалоиды эндофитных грибов и их влияние на травоядных

Алкалоиды – большая группа очень разнообразных по своему строению азотсодержащих органических соединений природного происхождения основного характера. Синтез алкалоидов требует больших затрат азота, который является лимитирующим рост растений биогенным элементом, что связано с его низкой концентрацией в почве в доступной для растений форме. В случае недостаточного поглощения азота гриб начинает конкурировать за него с растением, что негативно сказывается на последнем. Именно этот факт делает спорным полную мутуалистичность взаимоотношений эндофит-хозяин (Faeth, 2002).

В растениях, не колонизированных эндофитами, не были найдены алкалоиды, зато чистые культуры эндофитов сохраняют способность продуцировать эти соединения, что говорит об их грибном происхождении и неспособности растений к продукции данных соединений (Clay, Schardl, 2002). Однако растения играют важную роль в экспрессии алкалоидов. Ученые связывают возможный механизм экспрессии с тем, что в апопластном пространстве, в котором и находится мицелий гриба, наблюдается недостаток необходимых элементов (азот, фосфор, углерод, сера и др.). Это, в свою очередь, является своеобразным стрессовым фактором, действие которого приводит к экспрессии генов, отвечающих за синтез ферментов катаболического пути. Таким образом, повышается экспрессия алкалоидов, которые, как известно, являются вторичными метаболитами (Bacon et al., 1997; Schmid et al., 2017).

У эндофитов злаков известно четыре больших группы алкалоидов, однако при этом ни в одном растении не обнаружено представителей всех четырех групп одновременно (Siegel et al., 1990). Эти группы следующие: лолины, эрготные алкалоиды, индолдитерпены и пирролпиразины.

Лолины (насыщенные аминопирролизидины). Пирролизидиновые алкалоиды – алкалоиды, содержащие в своей структуре циклическую систему 1-метилпирролизидина (I). Лолины характеризует наличие кислородного мостика между 2 и 7 атомами углерода пирролизидинового кольца и наличие различных заместителей (Blankenship, 2004). Самые распространенные лолины, образуемые эндофитами – это N-ацетиллолин и N-формиллолин. Оба этих вещества часто накапливаются в растении в больших концентрациях (Justus et al., 1997). К этой же группе относится первый алкалоид, связанный с эндофитными грибами – темулин (сейчас – норлолин), выделенный из плевела опьяняющего (*Lolium temulentum* L.) (Гусынин, 1962). Норлолин, как и другие лолины, вызывает у травоядных животных паралич нервной системы, обусловливая состояние опьянения, помрачение сознания, нарушение дыхания, общую мышечную слабость и, в конце концов, смерть от остановки дыхания (Thomas et al., 2011).

Соответствующие исследования показали наличие различных лолинов во многих травах, ассоциированных с эндофитами (Siegel et al., 1990; Powell, Petroski, 1992; Tofern et al., 1999; Leuchtmann et al., 2000). Данные алкалоиды обладают инсектицидным действием (Siegel et al., 1990; Patterson et al., 1991; Riedell et al., 1991; Wilkinson et al., 2000) и, предположительно, могут быть вовлечены в повышение засухоустойчивости растений-хозяев (Blankenship, 2004).

Вопрос синтеза грибных лолинов до конца не решен, однако существует предположительный биосинтетический путь, разработанный и предложенный группой ученых. Известно, что растения способны синтезировать вещества, которые по строению сходны с лолинами эндофитов (растительные пирролизидины). Это структурное сходство привело к предположению, что

предшественником лолинов является спермидин, в то время как предшественником синтеза растительных пирролизидинов считают гомоспермидин (Hartmann, Ober, 2000), который, как показано в ряде исследований, образуется из полиаминов (обычно обнаруживаются в грибах-эндофитах), путресцина и спермидина (Boettcher et al., 1994). Предложенный путь синтеза лолинов включает в себя реакцию окислительного дезаминирования спермидина с последующей циклизацией в 1-(3-аминопропил)-пирролин, который также циклизуется, далее происходит образование дополнительной связи между 2 и 7 атомами углерода с образованием норлолина, который дает начало остальным лолинам (Bush et al., 1993).

Эрготные алкалоиды. В исследованиях середины 80-х годов в растениях, колонизированных эндофитными грибами, были обнаружены эрговалин и эргин (Lyons et al., 1986), что подтверждало близость данных эндосимбионтов к грибам семейства Clavicipitaceae, для которых в целом характерны подобные вещества (Berde, Schild, 1978). В основе этих соединений находится индольный алкалоид эрголин. В целом, к эрготным алкалоидам относятся три группы соединений: простые амиды лизергиновой кислоты (эргин, эргоновин), эргопептиды (например, эрговалин) и т.н. клавины, синтезируемые из диметилаллилтриптофана (DMAT). Биологическая активность эргоалкалоидов сильно различается, например, ЛСД имеет психоделический эффект, эргоновин и эрготамин оказывают сосудосуживающее действие, агроклавин обладает антимикробной активностью, а эрговалин (обычно присутствующий в эндофитных грибах) высокотоксичен как для млекопитающих, так и для насекомых (Schardl et al., 2012).

Эрготные алкалоиды являются результатом сложной цепи метаболических процессов, проходящих у гриба-эндофита. Первым этапом синтеза эрготных алкалоидов является работа DMAT-синтетазы, которая кодируется геном dmaW. При амплификации фрагмента ДНК, содержащего dmaW ген, был обнаружен ген

LpsA, в котором записана последовательность нуклеотидов для нерибосомальной пептидсинтетазы (NRPS) – одной из двух синтетаз, ответственных за присоединение трипептида к лизергиновой кислоте с образованием соответствующего лактама, являющегося прямым предшественником эрговалина (Panaccione et al., 2001). Впоследствии был обнаружен еще один ген, участвующий в синтезе эрговалина – это ген LpsB; при делеции этого гена в *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl et M.R. Siegel происходит накопление лизергиновой кислоты и других клавиновых интермедиатов, а амиды лизергиновой кислоты и эрговалин не синтезируются (Fleetwood, 2007).

Индолдитерпены (лолитремы). В структуре этих соединений, как и у эргоалкалоидов, присутствует индольное кольцо (Munday-Finch et al., 1997; Young et al., 2006). Всего в грибах-эндофитах злаков обнаружено 17 соединений этого класса, но наиболее распространенными среди них являются паксиллин и лолитрем B, причем преобразование паксиллина в лолитрем B через ряд промежуточных веществ является ключевым процессом синтеза алкалоидов этой группы. Предполагается, что синтез начинается с диметилаллилдифосфата и идет через геранилгеранилдифосфат (Scott, Young, 2003).

Лолитремы – это липофильные нейротоксины, которые вызывают «райграссовую дрожь» у травоядных животных, что выражается в дискоординации движений животных, дрожи в конечностях. Токсические явления объясняются воздействием на холинэргические рецепторы организма животных и блокадой калиевых (К+) каналов (Miyazaki et al, 2004).

Пирролпиразины. Данная группа представлена только перамином, который обладает инсектицидным действием (Bush et al., 1997), токсичность этого соединения для позвоночных животных не была выявлена (Porter, 1995). Предполагается, что перамин синтезируется из аргинина и пролина (Rowan, 1993) или 1-пирролин-5-карбоскилата (Tanaka et al., 2005). Был выявлен ген perA, отвечающий за синтез нерибосомальной пептид синтетазы (NRPS), необходимой

для образования перамина и возможно, что perA – единственный ген, управляющий синтезом данного соединения (Tanaka et al., 2005).

1.5.1. Концентрация алкалоидов в эндофит-содержащих растениях

Как показали исследования, при рассмотрении темы эндофитов с точки зрения их опасности для травоядных животных, на одно из первых мест выходит вопрос о концентрации алкалоидов, продуцируемых симбиотическими грибами и обусловливающих отравления скота, и степени зараженности полей, служащих для выпаса.

Типы и количество алкалоидов, накапливающихся в растениях, варьируют в довольно широких диапазонах в различных природных ассоциациях растение/эндофит и определяются, главным образом, таксономической принадлежностью эндофита (Siegel et al., 1990; Bush et al., 1993). Отмечается, что содержание алкалоидов может быть связано с жизненной стратегией как растения, так и симбионта. К примеру, эндофиты, которые на протяжении всего жизненного цикла развиваются бессимптомно и характеризуются преимущественно вертикальной семенной передачей инфекции, продуцируют токсины в значительно больших количествах, нежели горизонтально распространяющиеся и формирующие половые стадии (Siegel et al., 1990; Leuchtmann et al., 2000). В некоторых случаях эндофиты вообще не продуцируют алкалоиды (Bouton et al., 2002; Faeth, 2002).

Известно также существование растений, не имеющих симбиотических отношений с грибами, которые можно получать искусственно, и ассоциаций, которые являются нетоксичными, например, используемый в Америке в качестве корма для крупного рогатого скота сорт овсяницы «Jesup», искусственно инфицированный эндофитом, названным MaxQ, не продуцирующим эрготные алкалоиды. Создание подобных ассоциаций осуществляется с целью использования в полной мере всех преимуществ,

которые дает эндофит растению, без ущерба, связанного с отравлением травоядных алкалоидами (Burns, Fisher, 2006).

Кроме того, алкалоиды неодинаково распределены в тканях одного растения. Например, максимальная концентрация эрговалина в растениях *Lolium perenne*, искусственно зараженных эндофитами рода *Neotyphodium*, наблюдалась в апексе побега и во влагалище второго листа, в то время как другой алкалоид – перамин – был распределен по всему растению достаточно равномерно (Spiering et al., 2002). Также отмечается, что содержание алкалоидов во взрослых растениях разных видов, относящихся к родам *Festuca* и *Lolium*, колонизированных эндофитами злаков, ниже, чем в семенах и молодых побегах (Siegel et al., 1990).

Не менее важным фактором, определяющим количество алкалоидов в тканях растения-хозяина, является температура, при которой происходит развитие ассоциации. Этой теме посвящено большое количество работ, так как неоднократно отмечено, что симптомы отравления скота проявляются в разы сильнее при более высоких сезонных температурах. Однако результаты исследований не всегда однозначны, что говорит об индивидуальности данного признака и его зависимости от множества факторов, которые учитываются по-разному (Salminen et al., 2005).

Помимо погодных условий, существенное влияние оказывает минеральный состав почвы, на которой развиваются растения. Особую роль в возникновении заболеваний животных, употребляющих в пищу зараженную овсяницу или другие травы, играет растущее с каждым годом использование на полях азотных удобрений. Показано, что концентрация азотсодержащих алкалоидов в растениях, растущих при минимальном внесении азота, близка к таковой у образцов, взятых из естественных сообществ. Однако чрезмерная обработка азотными удобрениями ведет к сильному увеличению продукции различных алкалоидов (в частности, эргопептина и эрговалина в тканях овсяницы тростниковой) (Lyons et al., 1986), что усугубляет негативное действие

эндофитов на травоядных животных (Fribourg et al., 1991). Кроме того, авторами отмечается влияние формы вносимого азота, однако в этом вопросе мнения ученых довольно противоречивы. В опытах Ф. Лайонза с соавторами форма азота (нитратная в виде KNO_3 или аммонийная в виде $(NH_4)_2SO_4$) никак не повлияла на содержание эрговалина в образцах овсяницы тростниковой (Lyons et al., 1986), в то время как М. Ричардсон отметил, что *Festuca rubra* (овсяница красная), растущая на растворе с аммонийной формой азота, накапливала значительно больше алкалоидов, нежели образцы, развивающиеся на нитратах (Richardson et al., 1999). Скорее всего, это зависит непосредственно от того, какую форму азота предпочитает конкретный штамм эндофита, так как показана вариабельность по этому показателю среди изолятов, полученных из разных растений (Naffaa et al., 1998b, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000).

Некоторые авторы отмечают также роль фосфора в продукции эрготных алкалоидов, но механизмы, которые вовлекают его в биосинтез, пока не ясны (Malinowski et al., 1998).

1.5.2. Симптоматика отравлений травоядных животных при потреблении в пищу злаков, колонизированных эндофитами

В зависимости от степени зараженности пастбищ и содержания в злаках алкалоидов того или иного типа отравление может протекать по-разному. Даже в отсутствии внешних заметных проявлений болезни животное, потребляющее зараженные растения, может иметь худшие показатели удоев и прибавки в весе (Miyazaki et al, 2004). При высокой концентрации алкалоидов в корме развиваются тяжелые отравления разной симптоматики. Наиболее известны два синдрома (овсяничный токсикоз и райграссовая дрожь), а также можно выделить в отдельную группу расстройства, вызванные приемом в пищу плевела опьяняющего, который не является кормовым растением, но может засорять поля и пастбища.

Отравления плевелом опьяняющим. Плевел опьяняющий (*Lolium temulentum* L.) – однолетний злак, широко распространенный в зонах возделывания пшеницы, ядовитость которого известна животноводам очень давно (Гусынин, 1962). Токсическое действие обусловлено присутствием эндофитного гриба *Neotyphodium occultans* C.D. Moon, B. Scott et M.J. Chr. (сейчас *Epichloë occultans* (C.D. Moon, B. Scott & M.J. Chr.) Schardl), образующего лолины и эрготные алколоиды (Thomas et al., 2011).

В острых случаях отравлений у лошадей очень быстро развиваются симптомы поражения центральной нервной системы: животные становятся вялыми, сонливыми, наблюдается помрачение сознания, уменьшение чувствительности, падение температуры тела, нарушение двигательных функций. Происходит учащение дыхания, снижение частоты и силы пульса, ослабление зрения, замедление перистальтики кишечника и запоры. У беременных кобыл наблюдаются выкидыши. Обычно такое отравление заканчивается смертью. У крупного рогатого скота клиническая картина отравления плевелом опьяняющим характеризуется признаками нервного возбуждения (беспокойство, буйство, судорожные состояния отдельных групп мышц, к примеру, тризм челюстей), которые чередуются с состоянием полного оглушения. При посмертном вскрытии погибшего от отравления животного обнаруживают изменения в морфологии головного и спинного мозга: в полостях скапливается экссудат, вещество мозга отечно, а сосуды и оболочка инъецированы. В дополнение к этому находят паренхиматозные изменения сердечной мышцы, печени, а также воспаление желудка и кишок (Гусынин, 1962; Thomas et al., 2011).

Овсяничный токсикоз («fescue toxicosis»). Под овсяничным токсикозом обычно понимают совокупность различных симптомов, причиной которых является негативное воздействие алкалоидов, продуцируемых симбиотическими грибами, живущими в овсянице. Согласно результатам исследований, посвященных проблеме заболеваний сельскохозяйственных животных и других

травоядных, основной группой токсинов, ответственных за появление овсяничного токсикоза, признаны эрготные алкалоиды, в частности, эрговалин и другие эргопептиды (Bacon et al., 1977; Miyazaki et al, 2004; Roberts, Andrae, 2004). Концентрация этих веществ зависит от сезона и можно отметить, что пик приходится на позднюю весну, в течение лета происходит понижение уровня, но к осени он снова начинает возрастать. При этом замечено, что период наиболее высокого уровня алкалоидов не совпадает по времени с появлением первых видимых симптомов отравления, что, вероятно, связано со способностью алкалоидов накапливаться в организме, например, в жировой ткани (Miyazaki et al, 2004), выполняющей роль своеобразного резервуара для токсинов, которые могут постепенно освобождаться при разрушении жировых клеток. Сохранение и медленное высвобождение эрготных алкалоидов может объяснить, почему симптомы наблюдаются в жаркие летние месяцы, а не весной, когда животные получают наибольшую дозу токсинов, а также, почему такие симптомы, как грубая шерсть, продолжают наблюдаться даже после удаления скота с откормочных площадок с инфицированными растениями. Кроме того, сохранение алкалоидов в жировой ткани может дать ключ к разгадке причин некроза жировых клеток (Roberts, Andrae, 2004).

Овсяничный токсикоз у травоядных животных зачастую сводится к трем основным проявлениям: «летний синдром», «овсяничная стопа» (гангрена конечностей) и некроз жировых тканей.

«Летний синдром» - это тоже сборный термин, представляющий комплекс различных симптомов и изменений в поведении, проявляющихся при высоких температурах окружающей среды (Thompson, Stuedemann, 1993). Во-первых, из-за нарушений терморегуляции животные, стремясь понизить температуру тела, большую часть дня проводят в тени, предпочитают стоять в воде или лежать в грязи, становятся вялыми и меньше времени проводят на пастбищах (Fribourg et al., 1991; Paterson et al., 1995). Неспособность охлаждать организм предположительно вызвана нарушениями в работе сердечно-сосудистой

системы, а именно снижением кровотока после попадания в организм алкалоидов-вазоконстрикторов, которыми являются эрготные алкалоиды. Они вызывают сужение кровеносных сосудов в периферических тканях, что приводит к неспособности регулировать температуру тела и, следовательно, к повышению риска теплового стресса в жару. В исследованиях, проведенных на быках и овцах, было отмечено, что при диете, основанной на эндофит-содержащих кормах, у овец сокращается приток крови к коже ног и к надпочечникам, а у быков – к коже, мозжечку, двенадцатиперстной и толстой кишке, то есть к периферии тела и областям мозга, контролирующим температуру тела (Paterson et al., 1995). У животных, пораженных овсяничным токсикозом, наблюдается усиленное слюноотделение и учащенное дыхание, однако установлено, что испарение влаги при дыхании и теплоотдача увеличиваются незначительно, и при температуре среды 32°C теплопотери больных быков составляют всего половину от таковых у здоровых животных (Aldrich et al., 1993). Во-вторых, наблюдается заметное снижение суточного прироста биомассы, что связано с плохой усвояемостью корма. Поскольку эрготные алкалоиды обладают дофаминэргическими свойствами вследствие их структурного сходства с биогенными аминами (норадреналин, дофамин, серотонин), они обладают способностью подавлять сократительную подвижность рубца, а также изменять приток крови к различным органам, в том числе, к двенадцатиперстной и толстой кишке, а снижение притока крови к желудочно-кишечному тракту может, в свою очередь, препятствовать способности животного усваивать питательные вещества (Thompson, Stuedemann, 1993). В-третьих, у животных, питающихся зараженной овсяницей, происходит ухудшение состояния волосяного покрова за счет неполной его смены с зимнего на летний, их шерсть выглядит грубой и взъерошенной вместо гладкой и блестящей (Fribourg et al., 1991).

Синдром «овсяничной стопы» связан, в основном, с холодными сезонными температурами. Заболевание на начальных стадиях развития проявляется в виде

образования на копыте покраснений (гиперемия), за счет переполнения сосудов кровью, далее происходит развитие опухоли и животные начинают хромать, причем наиболее часто страдает задняя часть копыта. В конечном итоге, гиперемия перерастает в некроз тканей, за которым через две или более недели может последовать отслаивание поврежденного копыта. Подобные изменения могут наблюдаться также на кончиках ушей и хвосте животного (Fribourg et al., 1991; Thompson, Stuedemann, 1993). Причина развития синдрома овсяничной стопы заключается в сосудосуживающем действии эрготных алкалоидов, в особенности, эрговалина, которое приводит к снижению циркуляции крови в конечностях.

Некроз жировых тканей (липоматоз) известен для быков и карликовых лошадей. Синдром характеризуется образованием больших масс некротизированного жира вокруг кишечного тракта (от сычуга до прямой кишки), негативно влияет на репродуктивную способность животных, обусловливает проблемы с пищеварением, негативно сказывается на работе выделительной системы. Также липоматоз затрудняет роды и негативно сказывается на работе выделительной системы (Fribourg et al., 1991; Thompson, Stuedemann, 1993).

Овсяничный токсикоз также обычно сопровождается заметными изменениями гормонального фона животных (Browning et al., 1997). В первую очередь, многими исследователями отмечено снижение выработки гормона пролактина (Paterson et al., 1995). Регуляция секреции пролактина проходит по принципу угнетения дофамином, образующимся в гипоталамусе, и при прекращении выработки дофамина, концентрация пролактина в крови возрастает. Наблюдаемое при овсяничном токсикозе заметное снижение концентрации пролактина в плазме связано с тем, что эрготные алкалоиды, вырабатываемые эндофитами и попадающие с пищей в организм животного, способны соединяться с дофаминовыми рецепторами, тем самым ингибируя образование пролактина (Thompson, Stuedemann, 1993). Он, в свою очередь,

вовлечен в большое число физиологических процессов, таких как рост организма, иммунный ответ, осморегуляция, кроме того, он играет определяющую роль в процессах роста и развития молочных желез (маммогенез), синтеза молока (лактогенез) и поддержания секреции молока (галактопоэз) у млекопитающих. Тем самым, при овсяничном токсикозе у животных заметно снижается интенсивность лактации, вплоть до полного ее прекращения при особо тяжелых отравлениях. Существует также мнение, что снижение количества пролактина в плазме связано с ухудшением состояния волосяного покрова (Niklowitz, Hoffmann, 1988). Изменениям также подвергаются другие гормоны, в частности, лютеинизирующий гормон (ЛГ), что отрицательно сказывается на репродуктивной функции (Browning et al., 1997). Особенно сильно это проявляется у беременных кобыл, у которых в случае овсяничного токсикоза наблюдаются выкидыши, увеличенные сроки беременности, утолщение плаценты, мертворождение, агалактия и, в большинстве случаев, смерть во время родов (Fribourg et al., 1991).

Райграссовая дрожь («ryegrass staggers»). Райграссовая дрожь – широко распространенное заболевание травоядных животных, которому подвержены овцы, крупный рогатый скот, лошади, олени, ламы всех возрастов. Оно является следствием употребления в пищу плевела (*Lolium*), колонизированного грибом *Neotyphodium lolii* (Latch, M.J. Chr. et Samuels) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin (Fletcher et al., 1990). Основным действующим алкалоидом в данном случае является лолитрем B, ингибирующим кальций-зависимые калиевые каналы, что приводит к нарушению нейронной передачи в мозжечке, отвечающем за координацию движений (Blankenship, 2004). Животные заболевают только в конце весны, летом и осенью, так как количество грибных гиф и концентрация лолитрема B в зараженных растениях непостоянны: эти показатели увеличиваются до токсичного уровня при повышении температуры воздуха в конце весны и снижаются снова до безопасного уровня в прохладное время года (Fletcher et al., 1990). Признаки болезни развиваются постепенно в течение

нескольких дней. На начальных стадиях заболевания у животных в спокойном состоянии наблюдаются слабые покачивания головой. Однако резкие звуки, шум, физическая нагрузка или испуг вызывают резкие движения головы, при попытках сдвинуться с места походка становится неверной, пошатывающейся, с выраженным нарушением координации. Животные часто падают на бок при беге и могут впадать в состояние опистотонуса – происходит одновременное напряжение разгибателей спины и шеи, голова откидывается назад, позвоночник изгибается дугой, а нижние конечности резко разгибаются. Наблюдаются непроизвольные колебательные движения глаз с высокой частотой (до нескольких сотен в минуту), и беспорядочные размахивания конечностями. В некоторых случаях приступ может утихать через несколько минут, и животное становится на ноги, однако при беге все повторяется снова. Особенно сильно симптомы райграссовой дрожи проявляются при высоких температурах окружающей среды (Cheeke, 1995). Восприимчивость к заболеванию у скота индивидуальна и передается по наследству. Смерти, как правило, случайные, например, животное может утонуть, когда пьет воду из пруда или реки, также гибель возможна из-за невозможности добраться до пищи и воды.

1.6. Влияние эндофитов на растение-хозяина

Несмотря на широкий круг возможных растений-хозяев, показанный для эндофитных грибов, большинство исследований, связанных с разными аспектами взаимоотношений между компонентами данного симбиоза, проводится на довольно ограниченном числе злаков, а именно: *Festuca arundinacea* (овсяница тростниковая), *Festuca pratensis* (овсяница луговая), *Lolium perenne* (плевел многолетний). Как было указано выше, это массовые кормовые культуры, наличие в которых эндофитов может приводить к серьезным проблемам в животноводстве.

Взаимоотношения между растением-хозяином и эндофитом зачастую рассматриваются как мутуалистические, так как наличие мицелия в его тканях повышает устойчивость растения к биотическому стрессу, то есть к патогенам,

насекомым-фитофагам и к поеданию крупным рогатым скотом (Bush et al., 1997; Schardl, Moon, 2003; Siegel et al., 1990) за счет способности симбионта продуцировать разного рода алкалоиды (Bacon et al., 1977; Fribourg et al., 1991; Schardl, Moon, 2003).

Кроме того, колонизированные эндофитами злаки могут аллелопатически влиять на некоторые другие растения, обусловливая подавление их роста и снижение численности (Percival, Duder, 1983, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000; Springer, 1997, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000; Sutherland et al., 1999), причем предполагалось, что алкалоиды, в частности, лолины, принимают в этом эффекте непосредственное участие (Bush et al., 1997).

Что касается семенной продукции зараженных растений, то информация по этой теме крайне противоречива. Например, в работе У. Хессе с соавторами на разных образцах показаны все возможные варианты: снижение урожая, повышение его, а также отсутствие какого-либо влияния (Hesse et al.,2001).

Симбиоз клавиципитальных эндофитов и злаков также обусловливает более высокую конкурентную способность последних в условиях абиотического стресса (Malinowski, Belesky, 2000). Причем наиболее изученной является устойчивость к таким факторам среды, как недостаток влаги в почве при высоких температурах, дефицит питательных веществ (Gwinn, Gavin, 1992; Malinowski, Belesky, 2000; Hartley, Grange, 2009) и загрязнение почвы некоторыми тяжелыми металлами (Ren et al., 2006; Mirzahosseini et al., 2014).

Засухоустойчивость

Способность эндофит-содержащих растений лучше переносить недостаток влаги в почве и высокие температуры окружающей среды – один из наиболее четко описанных в литературе фактов. Как известно, дефицит воды вызывает ряд изменений в физиологии и биохимии растений, призванных компенсировать неблагоприятное воздействие засухи. Все эти механизмы можно подразделить на три группы:

– механизмы избегания (усиление всасывания воды из почвы, снижение уровня транспирации и запасание влаги в тканях растения);

– механизмы, обеспечивающие устойчивость к засухе (накопление и перераспределение ассимилятов, изменение осмотического давления, поддержание эластичности клеточной стенки, повышение эффективности использования воды);

– механизмы быстрого восстановления после неблагоприятного периода (Malinowski, Belesky, 2000).

Усиленное всасывание воды при засухе может быть достигнуто за счет прогрессивного развития корневой системы. Изменение морфологии и/или увеличение сухой биомассы корней у инфицированных эндофитом злаков при недостатке влаги, по сравнению с неинфицированными, показано для *Lolium perenne* (Latch et al., 1985), *Festuca pratensis* (Malinowski et al., 1997), *F. arundinacea* (De Battista et al., 1997a,b, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000), *Elymus dahuricus* (Zhang, Nan, 2007) и *Poa alsodes* (Kannadan, Rudgers, 2008). Кроме того, эндофитная инфекция в условиях засухи у некоторых видов растений обеспечивает ускоренное закрытие устьиц, что помогает снизить уровень транспирации и, соответственно, предотвратить потерю воды. Такой эффект описан для овсяницы тростниковой (Buck et al., 1997) и овсяницы луговой (Malinowski et al., 1997), но, что интересно, не для плевела многолетнего (Barker et al., 1997, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000). Механизм влияния эндофита на скорость закрытия устьиц остается неизученным. Однако существует гипотеза, что наличие эндофитного мицелия в растительных тканях само по себе является своего рода стрессорным фактором, который сенсибилизирует растения к другим видам стрессов, обеспечивая более быстрые адаптивные реакции, а том числе и закрытие устьиц при недостатке воды в почве (Malinowski, Belesky, 2000). В некоторых случаях при засухе у зараженных растений в основаниях стеблей происходит накопление воды (Buck et al., 1997), что может быть объяснено снижением уровня транспирации.

Наряду с вышеописанными механизмами избегания, следует отметить механизмы устойчивости к засухе, такие как накопление и перераспределение осмотически активных веществ (углеводов, полиолов грибного происхождения, аминокислот, разных групп алкалоидов и др.), поддерживающих тургор клеток на необходимом уровне (Siegel et al., 1990; Richardson et al., 1992). Кроме того, по сравнению со свободными от эндофита растениями, для зараженных полевой и тростниковой овсяниц при дефиците воды показано более высокое значение показателя TW/DW[2], отражающего способность клеток тканей впитывать воду. (Malinowski, 1995, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000). Снижение этого показателя говорит о разрушении клеточных стенок, следовательно, подобные результаты говорят о том, что гриб может каким-то образом влиять на характеристики клеточных стенок растения, предотвращая их повреждение, однако детали этого процесса неизвестны (Malinowski, Belesky, 2000).

Минеральное питание

Способность симбиотических грибов влиять на характеристики колонизируемых растений в неоптимальных условиях минерального питания является одним из наиболее важных аспектов в их взаимоотношениях.

Низкое содержание азота в почвах зачастую является лимитирующим фактором для развития как культурных, так и дикорастущих растений, поэтому дополнительное внесение азотных удобрений для повышения урожайности стало весьма распространенным явлением в сельском хозяйстве. Однако сведения о положительной связи токсичности некоторых кормовых трав с концентрацией азота в почве (Gentry et al., 1969, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000) показали необходимость дальнейшего изучения этого вопроса.

Помимо влияния на содержание алкалоидов, высокие концентрации доступного азота вызывают увеличение сухой биомассы побегов и интенсивности кущения у овсяницы тростниковой и плевела многолетнего, зараженных симбиотическими грибами. Интересно, что в случае плевела в

[2] TW/DW – turgid weight/dry weight. Отношение веса свежесобранных растений к их сухому весу.

условиях низкого содержания азота биомасса зараженных и незараженных растений не отличалась, в то время как в случае овсяницы у инфицированных растений в тех же условиях она была значительно ниже, чем у свободных от симбионта (Cheplick et al., 1989). То есть можно сделать вывод, что в условиях недостатка азота гриб начинает конкурировать с растением за ресурс, чего не происходит в оптимальных условиях.

При работе с генетически идентичными клональными растениями *Festuca arundinacea* сорта «Kentucky-31» было показано, что у эндофит-содержащих образцов эффективность вовлечения азота в метаболизм значительно выше, чем у свободных от эндофитов. Биомасса инфицированных образцов, культивируемых при низкой концентрации азота в среде, была такой же, как у неинфицированных при высокой, причем при повышении количества вносимого азота разница становилась все более заметной (Arachevaleta et al., 1989). Детальные исследования показали более высокую активность глутамин-синтетазы у эндофит-содержащих растений вне зависимости от доступности и концентрации азота в почве, однако остается невыясненным, происходит ли это напрямую за счет грибных ферментов или же косвенно за счет активации ферментов растения-хозяина (Lyons et al., 1990).

Одними из первых работ, посвященных изучению влияния фосфора на рост и продукцию алкалоидов эндофит-инфицированных растений, были работы, проведенные в начале 90-х годов XX века. Исследовали два генетически отличных варианта *Festuca arundinacea* сорта «Kentucky-31» DN7 и DN11, первый из которых характеризуется низким уровнем накопления эрготных алкалоидов при наличии инфекции, а второй – высоким. Растения выращивали при дефиците фосфора в почве и при достаточном его содержании. Оказалось, что ростовые характеристики инфицированной овсяницы обоих генотипов ухудшались с возрастанием концентрации фосфора в почве, по сравнению с неинфицированными образцами (Azevedo, 1992, цит. по: Malinowski, Belesky,

2000), в то время как содержание эрговалина увеличивалось (Azevedo et al., 1993, цит. по: Malinowski, Belesky, 2000).

У *Festuca arundinacea*, инфицированной видом *Neotyphodium coenophialum*, в ответ на дефицит фосфора наблюдается уменьшение диаметра корня и значительное возрастание длины корневых волосков по сравнению со свободными от эндофита линиями злаков, выращенных в тех же условиях. (Malinowski et al., 1999). Схожий результат получен для *Lolium perenne*, вступающего в симбиотические отношения с *Neotyphodium lolii*: наличие эндофита в условиях дефицита фосфора не влияло на ростовые характеристики стебля и листьев, в то время как длина корня и его сухая биомасса значительно выросли. Для плевела также показана более высокая активность кислых фосфатаз в корнях инфицированных растений в условиях дефицита фосфора по сравнению со свободными от эндофита, за счет чего происходит более эффективное вовлечение полученного фосфора в метаболизм растения (Ren et al., 2007).

Механизм воздействия симбионтов, приуроченных к надземным частям растения-хозяина, на корень до конца не понят. Отмечено, что присутствие в растении-хозяине *Neotyphodium*-подобных симбионтов может влиять на глубину залегания корневой системы (Crush et al., 2004) и ее морфологию, стимулировать выделение в ризосферу фенольных соединений с достаточно высокой хелатирующей способностью, органических кислот, меняющих ионный баланс ризосферы и повышающих растворимость фосфора, а также активных кислых фосфатаз. Эти экссудаты непосредственно улучшают приток фосфора, железа и кальция из дефицитных почв, при этом снижая доступность меди (Malinowski et al., 1998; Malinowski, Belesky, 2000; Ren et al., 2007). Предполагают также, что эндофит способен индуцировать отток продуктов фотосинтеза в подземные части растения и усиливать поглощение минеральных веществ за счет увеличения площади поверхности всасывания корневой системы, выделяемых экссудатов и более эффективного вовлечения веществ в метаболизм. Кроме того,

для *Neotyphodium* spp. и родственного им вида *Balansia epichloë* (Weese) Diehl *in vitro* показана способность продуцировать ауксины (Porter et al., 1985, цит. по: Malinowski et al., 1999; De Battista et al., 1990, цит. по: Malinowski et al., 1999), которые, в свою очередь, являются одним из факторов роста корневых волосков (Thien et al., 1979, цит. по: Malinowski et al., 1999). Однако синтез ауксинов *in vivo* на настоящий момент не подтвержден.

Таким образом, эндофитная инфекция может быть не только нейтральной или оказывать положительное воздействие на растение-хозяина, но и оказывать угнетающее влияние на него в зависимости от его вида и генотипа, вида и штамма конкретного эндофита, продуцируемых им алкалоидов и условий окружающей среды (Faeth, Fagan, 2002).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Изучение встречаемости эндофитных грибов

Сбор материала проводили в летне-осенние периоды с 2013 по 2018 год на территории Москвы и Московской области, в частности, на территории Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского.

Часть образцов семян различных сортов кормовых злаков была предоставлена для анализа лабораторией иммунитета растений ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса (см. табл. 4).

Вегетативные побеги и генеративные побеги с соцветиями или семенами срезали канцелярскими ножницами у основания, закладывали в целлофановые пакеты и снабжали этикетками (обычно отбирали от 5 до 10 побегов с одного образца). До обработки образцы хранили в холодильнике при температуре +6°С в конвертах из крафтовой бумаги.

Если в исследуемых популяциях уже имелось большое количество зрелых семян, их собирали, отрезая метелки ножницами и складывая в пакет из крафтовой бумаги. В лаборатории собранные образцы семян просушивали для предотвращения развития микромицетов на их поверхности и хранили при комнатной температуре.

Всего было проанализировано 613 образцов растений. Их видовую идентификацию проводили по определителю «Флора средней полосы европейской части СССР» (Маевский, 2014). Исследованные растения относятся к 15 видам (в скобках – число проанализированных образцов): *Agrostis gigantea* Roth. (1), *Arrhenatherum elatius* (L.) J. Presl & C. Presl. (2), *Briza media* L. (2), *Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub (4), *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. (1), *Dactylis glomerata* L. (3), *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. (1), *Elymus caninus* (L.) L. (2), *Festuca arundinacea* Schreb. (5), *Festuca gigantea* (L.) Vill. (6), *Festuca pratensis* Huds. (229), *Festuca rubra* L. (4), × *Festulolium loliaceum* (Huds.) P. Fourn. (1), *Lolium perenne* L. (342), *Phleum pratense* L. (4). Некоторые образцы удалось

определить только до рода (*Agrostis* sp. - 1, *Agropyron* sp. - 1, *Festuca* sp. - 1, *Lolium* sp. - 1), а 2 злака не удалось определить вовсе (Неопределенный злак №1 (1), Неопределенный злак №2 (2)).

Также поздней весной 2014 года на территории вблизи корпуса физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова были собраны стебли *Dactylis glomerata*, пораженные чехловидной болезнью злаков (стромы *Epichloë typhina*), которые были помещены в пакеты из крафтовой бумаги и высушены при комнатной температуре для дальнейшей работы. Там же в 2015 и 2016 годах отбирали пораженные стебли с конидиальными и перитециальными стромами с целью получения чистых культур грибов. Для этого побеги со стромами срезали ножницами и помещали в стерильные бумажные конверты, которые до обработки хранили при температуре +6°С. Обработку материала в данном случае обязательно проводили в день сбора по методике, описанной далее.

Таблица 4

Характеристика проанализированных образцов семян злаков

№	Вид растения	Сорт	Происхождение образца (число образцов)	Год сбора
1	*Agropyron* sp.	(на сортоиспытании)	Воронежская опытная станция (1)	2012
2	*Agrostis gigantea* Roth.	ВИК 2	ВНИИ кормов (1)	-
3	*Agrostis* sp.	*Дикорастущий*	ЗБС, 6 кв. (1)	2015
4	*Arrhenatherum elatius* (L.) J. Presl & C. Presl.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2015
5	*Arrhenatherum elatius* (L.) J. Presl & C. Presl.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2017
6	*Briza media* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
7	*Briza media* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2017
8	*Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub	Воронежский 17	Воронежская опытная станция (1)	2011
9	*Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub	Павловский	Воронежская опытная станция (1)	2012
10	*Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв. (1)	2014
11	*Bromopsis inermis* (Leyss.) Holub	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
12	*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2015
13	*Dactylis glomerata* L.	ВИК 61	ВНИИ кормов (1)	2008

№	Вид растения	Сорт	Происхождение образца (число образцов)	Год сбора
14	*Dactylis glomerata* L.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2015
15	*Dactylis glomerata* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2017
16	*Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
17	*Elymus caninus* (L.) L.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв (1)	2014
18	*Elymus caninus* (L.) L.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв (1)	2018
19	*Festuca arundinacea* Schreber	Paraiso	США (1)	2012
20	*Festuca arundinacea* Schreber	Алексеевский	ВНИИ кормов (1)	2014
21	*Festuca arundinacea* Schreber	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2013
22	*Festuca arundinacea* Schreber	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2017
23	*Festuca arundinacea* Schreber	Лира	ВНИИ кормов (1)	2018
24	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, Пять углов (1)	2013
25	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, Танковая дорога (1)	2013
26	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв. (1)	2014
27	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв. (1)	2015
28	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв. (1)	2017
29	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Дикорастущий*	ЗБС, 7 кв. (1)	2018
30	*Festuca pratensis* Huds.	ВИК 5	ВНИИ кормов (1)	2013
31	*Festuca pratensis* Huds.	ВИК 5	ВНИИ кормов (1)	2014
32	*Festuca pratensis* Huds.	Любохна	ВНИИ кормов (1)	2014
33	*Festuca pratensis* Huds.	Николаевский	ВНИИ кормов (1)	2014
34	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2013
35	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	ЗБС, 1 кв., пойма (1)	2014
36	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	Москва, Новогиреево (1)	2014
37	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	Москва, ул. Молостовых (1)	2014
38	*Festuca pratensis* Huds.	Кварта	ВНИИ кормов (1)	2012
39	*Festuca pratensis* Huds.	Сибинтех	ВНИИ кормов (1)	2012
40	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2015
41	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
42	*Festuca pratensis* Huds.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2017
43	*Festuca rubra* L.	Boreal	Канада (1)	2012
44	*Festuca rubra* L.	Диана	Воронежская опытная станция (1)	2012
45	*Festuca rubra* L.	Максима 1	Дания (1)	2012
46	*Festuca rubra* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
47	*Festuca* sp.	*Дикорастущий*	ЗБС (1)	2015
48	× *Festulolium loliaceum* (Huds.) P. Fourn.	ВИК 90	ВНИИ кормов (1)	2011
49	*Lolium perenne* L.	Феникс	ВНИИ кормов (1)	2011
50	*Lolium perenne* L.	*Газонный*	Биологический ф-т (1)	2016
51	*Lolium* sp.	*Газонный*	Биологический ф-т (1)	2018

№	Вид растения	Сорт	Происхождение образца (число образцов)	Год сбора
52	*Phleum pratense* L.	ВИК 85	ВНИИ кормов (1)	2011
53	*Phleum pratense* L.	ВИК 9	ВНИИ кормов (1)	-
54	*Phleum pratense* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, просека 6/7 (1)	2015
55	*Phleum pratense* L.	*Дикорастущий*	ЗБС, пойма (1)	2015
56	Неопределенный злак №1	*Дикорастущий*	ЗБС, прирусловая часть поймы (1)	2015
57	Неопределенный злак №2	*Дикорастущий*	ЗБС, 6 кв. (1)	2015

2.2. Методы световой микроскопии

2.2.1. Выявление мицелия эндофитов в растительных тканях

Для анализа зараженности ***взрослых вегетирующих растений*** в большинстве случаев использовали срывы адаксиальной поверхности влагалищ листьев, которые окрашивали анилиновым синим. Для этого лист вместе с влагалищем аккуратно отделяли от побега, затем на адаксиальной стороне влагалища лезвием делали несколько надрезов и пинцетом снимали слой эпидермиса, который помещали на предметное стекло в каплю красителя (100 мл 0,1%-ного водного раствора анилинового синего в 50 мл 80%-ой молочной кислоты) (Bacon et al., 1977). Затем препарат прогревали в пламени спиртовки в течение 30-40 секунд (до закипания капли), остужали, аккуратно переносили материал в каплю молочной кислоты, накрывали покровным стеклом и микроскопировали в проходящем свете на малом увеличении (x150). В случае наличия инфекции на фоне голубых клеток эпидермиса растения хорошо заметны синие гифы гриба, идущие по межклетникам.

Анализ молодых ***проростков*** в связи с их маленькими размерами проводили путем окрашивания фрагментов влагалищ листа красителем того же состава, что и в предыдущем пункте, но без предварительного отделения слоя эпидермиса. В этом случае влагалища нарезали на небольшие фрагменты, помещали их в краситель в небольшую стеклянную емкость (например, баночка

от пенициллина), после чего аккуратно кипятили в пламени спиртовки в течение 1-3 минут (в зависимости от толщины образцов), после чего баночки с образцами оставляли на ночь в красителе. Затем окраску дифференцировали в 4%-ом растворе молочной кислоты 10-60 минут, переносили окрашенные фрагменты на предметное стекло в каплю 80%-ой молочной кислоты, расправляли их пинцетом и препаровальной иглой (так как фрагменты влагалищ молодых проростков часто бывают туго скручены в трубочку) и микроскопировали в проходящем свете в разных оптических плоскостях при увеличении в 600 раз.

Для обнаружения мицелия в листовой пластинке проростков фрагмент листа растения помещали в каплю красителя на предметное стекло и кипятили в течение 1-3 минут, добавляя краситель по мере испарения.

С ***корнями*** работали методом мацерации, который обычно используется для изучения арбускулярной микоризы (Минеева, 2011), с некоторыми изменениями. Корни заливали 10%-ым раствором КОН и отстаивали при комнатной температуре в течение суток. После этого материал дважды отмывали от щелочи в дистиллированной воде и один раз в 2%-ой молочной кислоте. Отмытые корни помещали в небольшое количество анилинового синего, нагревали в пламени спиртовки и оставляли на 40 минут для окраски при комнатной температуре. Затем следовала дифференцировка окраски в 2%-ом растворе молочной кислоты в течение 30-40 минут. Обработанные таким образом фрагменты помещали в каплю 80%-ой молочной кислоты под покровное стекло, слегка расплющивали и просматривали на наличие эндофитного мицелия.

Анализ зараженности ***семян*** проводили методом изучения давленых препаратов, окрашенных анилиновым синим. Для приготовления препарата семена предварительно вымачивали в водном растворе гидроксида натрия (20-21 час в 2,5%-ом растворе NaOH или 14-15 часов в 5%-ом растворе) для размягчения оболочек. По истечении срока, необходимого для размягчения семян, пробы тщательно отмывали водопроводной водой от остатков щелочи,

помещали в фарфоровую кастрюлю с красителем (состав: 0,325 г анилинового синего, 100 мл воды, 50 мл 80%-ой молочной кислоты), где кипятили на газовой горелке в течение 3-5 минут. Далее семена вынимали из красителя, помещали на предметное стекло, аккуратно очищали от чешуй, расплющивали покровным стеклом и микроскопировали. При наличии инфекции на препарате в зоне клеток алейронового слоя (рыхло лежащие клетки квадратно-прямоугольно-округлой формы) видны окрашенные в синий цвет гифы эндофитного гриба (при наличии опыта и инфекции, гифы можно увидеть и на неокрашенном препарате).

Работа велась на микроскопе LEICA DM 500.

2.2.2. Изучение культур грибов

Препараты готовили стандартно в молочной кислоте, в растворе анилинового синего, а также методом отпечатков на скотче: полоску прозрачного скотча (ErichKrause Crystal) прикладывали к колонии липкой стороной и помещали ее на предметное стекло с заранее нанесенной каплей уксусной кислоты или специальной среды для световой микроскопии (среда Шира в модификации М.Л. Георгиевой). Полученные таким образом препараты хороши тем, что конидии остаются соединенными с конидиеносцами и располагаются удобным для фотографирования образом, так как лежат в одной оптической плоскости.

Состав среды Шира в модификации М.Л. Георгиевой:

- дистиллированная вода – 150 мл;
- глицерин – 60 мл;
- этанол – 90 мл;
- ацетат калия – 3 г.

Полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа Leica DM500 и фотографировали. Идентификацию полученных изолятов проводили

путем сравнения их морфолого-культуральных и микроскопических признаков с таковыми, представленными в описаниях видов в соответствующих статьях.

Для изучения распределения липидов в грибных гифах проводили окрашивание суданом черным. Краситель судан черный (состав: 0,1 г судана черного, 50 мл глицерина, 50 мл 96° спирта) неизбирательно окрашивает липиды клеток, быстро в них накапливаясь. Для окрашивания участок мицелия помещали в каплю красителя на 5-10 минут и затем тщательно промывали 50° этанолом. Липидные капли при этом окрашиваются в темный цвет.

2.3. Методы электронной сканирующей микроскопии

2.3.1. Исследование растительных тканей

Поиск эндофитной инфекции с помощью сканирующего электронного микроскопа можно проводить как на свежих растениях, так и на фиксированном материале, однако в случае фиксированного материала перед началом приготовления препаратов его необходимо промыть от фиксирующих жидкостей.

В случае необходимости фиксации материала использовали раствор ФСУ (для приготовления 100 мл фиксатора смешивали 90 мл 50° этанола, 5 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл 40%-го формалина).

Исследуемое растение новым острым лезвием нарезали на фрагменты таким образом, чтобы было возможно их размещение на столике срезом кверху. Фрагменты фиксировали в 2,5%-ом растворе глютарового альдегида на фосфатном буфере (PBS Tablets, pH 7,4) при температуре +4°C в течение суток, после чего промывали трижды фосфатным буфером по 10 минут. Далее проводили постфиксацию в 1%-ом водном растворе тетраоксида осмия (OsO_4) при комнатной температуре в течение 1 часа, затем промывали дистиллированной водой (три раза по 10 минут) и обезвоживали в серии растворов этилового спирта (C_2H_5OH) возрастающей концентрации (25°, 50°, 70° и 96° – по 10 минут на каждую концентрацию), а также – в двух сменах ацетона

по 15 минут (при необходимости процесс дегидратации материала можно остановить на этапе 70°-го спирта и затем продолжить). Подготовленный таким образом материал высушивали в критической точке, после чего наклеивали образцы на предметные столики срезами вверх и напыляли Au-Pd смесью.

Изучение срезов проводили на сканирующем электронном микроскопе Jeol GSM.

2.3.2. Изучение стром и культур грибов

Часть образцов анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа. В том числе, для приготовления препаратов были отобраны штаммы 8FP13, у которого было замечено относительно обильное конидиальное спороношение, 4FP13 – фрагмент колонии с воздушным мицелием, Речс-1/2 - целое семя с небольшим участком мицелия и УФЛ-3, выделенный из листового влагалища, а также фрагменты стром *Epichloë typhina* на стеблях *Dactylis glomerata*, собранные весной 2014 года.

Фрагменты стромы и небольшие кусочки агара с участком воздушного мицелия или целым семенем помещали в 2,5%-ый раствор глютарового альдегида на фосфатном буфере (PBS Tablets, pH 7,4) и инкубировали в холодильнике при температуре +4°С в течение суток. Далее следовала трехкратная отмывка фосфатным буфером по 5-7 минут каждая, после чего образцы в течение 1 часа выдерживались в 1%-ом водном растворе тетраоксида осмия (OsO_4) при комнатной температуре. После этого образцы трижды промывали дистиллированной водой и обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации по 10 минут на каждую (25°, 50°, 70° и 96° этиловый спирт), а также – в двух сменах ацетона (по 10 минут). Подготовленный таким образом материал высушивали в критической точке, после чего наклеивали образцы на предметные столики и напыляли Au-Pd смесью.

Штаммы 68FG14, 49FP14, 88EC14 и 62FP14, полученные в 2015 году, обрабатывали иначе. Фиксацию проводили в течение 3-х суток, инкубируя

агаровые блоки с мицелием при комнатной температуре под вытяжкой в чашках Петри с заранее нанесенными каплями 1%-го водного раствора тетраоксида осмия (OsO_4). Подготовленный таким образом материал не требует сушки в критической точке, поэтому далее образцы наклеивали на предметные столики и напыляли Au-Pd смесью.

Работа проводилась на сканирующем электронном микроскопе Jeol GSM.

2.4. Методы электронной трансмиссионной микроскопии

Мицелий для изучения под трансмиссионным электронным микроскопом фиксировали с помощью двух разных методик.

1) Фрагменты мицелия кубической формы (изолят 99DG16ET из среды с нитратом (NO_3) в концентрации 2 г/л и изолят 83FG14St из среды с пептоном в концентрации 5 г/л) помещали в 2,5%-ый раствор глютарового альдегида на фосфатном буфере (PBS Tablets, pH 7,4) на 1 час, после чего промывали трижды фосфатным буфером по 10 минут и выдерживали образцы в 1%-ом водном растворе тетраоксида осмия (OsO_4) при комнатной температуре в течение 2 часов. После трехкратной промывки дистиллированной водой материал обезвоживали в серии растворов этилового спирта возрастающей концентрации (25°, 50°, 70°) и оставляли на ночь в холодильнике.

2) Фрагменты мицелия кубической формы тех же изолятов 2 часа выдерживали в 4%-ом растворе $KMnO_4$ в темноте (баночки оборачивали фольгой и накрывали непрозрачным колпаком), после чего следовала проводка материала в серии спиртов (25°, 50°, 70°) и затем их также оставляли на ночь в холодильнике.

На следующий день из 70° спирта образцы переносили в микропробирки с 1 мл 2%-го уранилацетата $(CH_3COO)_2UO_2$, растворенного в 70° этиловом спирте, для дополнительного контрастирования и инкубировали 1 час в темноте при комнатной температуре под вытяжкой. Затем после двукратной десятиминутной отмывки 70° этиловым спиртом материал обезвоживали в 96° этаноле и 2 сменах ацетона по 15 минут каждая.

Далее материал выдерживали несколько суток в так называемой «каше» – смеси смол (эпон 812 – 4,5 мл, DDSA – 3,5 мл, MNA – 2 мл) и ацетона в соотношении 1:1. Далее готовили свежую смесь смол с добавлением DMP-катализатора (на 10 мл смеси смол – 0,2-0,3 мл катализатора), необходимого для полимеризации. Равномерно и без воздушных пузырей перемешанной смесью заливали ячейки силиконовой формочки, куда аккуратно переносили материал из «каши». Образовавшиеся пузырьки воздуха убирали с помощью тонкой деревянной палочки. Формочку с залитыми смолой образцами помещали на сутки в термостат при температуре +37°С, а затем на двое суток при температуре +60°С. Когда смола полностью полимеризовалась, получали ультратонкие срезы 80–100 нм толщиной, размещенные на металлических сеточках с подложкой, которые дополнительно окрашивали лимоннокислым свинцом по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) Для приготовления раствора необходимо 0,266 г $Pb(NO_3)_2$ растворить в 7 мл бидистиллированной воды, куда потом добавить 0,43 г лимоннокислого натрия ($Na_3C_6H_5O_7$*5,5H_2O), добившись помутнения раствора. В течение 30 минут раствор нужно время от времени перемешивать. Параллельно готовят 1 n раствор NaOH (0,4 г/10 мл), 1,6 мл которого добавляют через 30 минут к первой смеси, которая должна стать прозрачной, после чего объем раствора доводят до 10 мл и хранят в холодильнике при +4°С до помутнения.

Непосредственное окрашивание проводили следующим образом. В стеклянную чашку Петри расплавляли хозяйственную парафиновую свечу для создания гидрофобной поверхности. По периметру чашки насыпали небольшое количество гранул NaOH и закрывали чашку крышкой. Через некоторое время крышку приоткрывали и с помощью дозатора на поверхности застывшего парафина быстро делали капельки раствора лимоннокислого свинца по количеству сеточек, которые нужно окрасить, пытаясь как можно меньше времени держать чашку открытой, и затем помещали сеточки на капли раствора срезами вниз на 3 минуты. Далее срезы отмывали от контрастера, для чего в

небольшие фарфоровые стаканчики (3 штуки) наливали дистиллят «с горкой» и пинцетом опускали сеточку ребром к поверхности воды в каждый из трех стаканчиков по 20 раз. Поверхностное натяжение воды аккуратно и качественно промывает срез от контрастера, не повреждая подложку. Промытые сеточки просушивали на неворсистой бумаге. Готовые сеточки со срезами просматривали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, 2005г) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN.

При работе с другим грибным и растительным материалом придерживались такой же методики с той разницей, что контрастирование уранилацетатом проводили уже непосредственно на сеточках со срезами перед дополнительным контрастированием лимоннокислым свинцом, а не на этапе дегидратации. Для этого на чашку Петри со слоем парафина наносили необходимое число капель уранилацетата, помещали на них сеточки срезами вниз, выдерживали их в закрытой чашке 1 час при комнатной температуре и промывали в 3-х сменах дистиллированной воды.

2.5. Культуральные методы

2.5.1. Выделение чистых культур эндофитных грибов из растительных тканей

Выделение грибов в чистую культуру проводили из влагалищ листа, листовых пластинок и семян образцов, для которых было показано наличие эндофитной инфекции с помощью микроскопирования окрашенных препаратов, а также из свежих конидиальных стром *Epichloë typhina*. Известно, что процесс выделения требует качественной поверхностной стерилизации образца (особенности работы с каждым отдельным типом растительного материала описаны далее) и длительной инкубации, поэтому стеклянные чашки Петри и рабочие инструменты (скальпели, лезвия) обрабатывали сухим жаром в течение 4-6 часов при температуре 180°C. В качестве питательной среды использовали КГА (см. ниже).

Одним из наиболее важных этапов, определяющих успешность выделения эндофитных грибов из растительного материала в чистую культуру, является качественная поверхностная стерилизация образца. Методики отличаются в зависимости от того, какой орган растения подвергается обработке.

Выделение эндофитов из листьев

Поверхность листа и листового влагалища у злаков имеет довольно рельефную поверхность и, кроме того, покрыта гидрофобной кутикулой, поэтому при помещении фрагментов в жидкий стерилизующий агент они сворачиваются вокруг захваченного пузыря воздуха. Это затрудняет доступ стерилизующего агента к поверхности и значительно снижает его эффективность. В то же время, малая толщина листовой пластинки ограничивает агрессивность используемых растворов и время экспозиции, поэтому стерилизацию проводили по следующей методике. Фрагменты листьев и влагалищ в первую очередь помещали в стерильную воду с добавлением капли твина (Tween®80) – детергента, который обеспечивает смачиваемость поверхности листьев; затем материал переносили в 0,1%-ый раствор сулемы ($HgCl_2$), где выдерживали в течение 3-5 секунд. Далее следовала однократная промывка в стерильной воде, после чего фрагменты помещали на КГА в стеклянные чашки Петри по 1-3 штуки.

Выделение эндофитов из семян

Семена злаков, в особенности дикорастущих, покрыты несколькими слоями весьма плотных чешуй с рельефной поверхностью, которая имеет тенденцию к накапливанию большого числа пропагул различных микроорганизмов, что делает необходимой довольно агрессивную стерилизацию.

Семена вымачивали в 50%-ой серной кислоте (H_2SO_4) в течение 30-40 минут, после чего дважды промывали стерильной водой. Далее материал перекладывали в бюкс с неразбавленным чистящим средством «Доместос», содержащим гипохлорит натрия. По истечении 30-40 минут семена снова промывали несколькими сменами стерильной воды до тех пор, пока в воде не

переставала образовываться пена и исчезал запах чистящего средства, так как содержащиеся в нем химические соединения могут отрицательно влиять на развивающийся проросток злака и гриб. Отмытые семена, от которых в процессе стерилизации обычно отделяется бóльшая часть оболочек, помещали на КГА в стеклянные чашки Петри по 3 штуки на чашку. Все манипуляции проводили в боксе у пламени газовой горелки с использованием стерильной посуды.

Выделение Epichloë typhina в чистую культуру из стром

Строма, развивающаяся на злаках, пораженных чехловидной болезнью, представляет собой плотное мицелиальное сплетение на поверхности побега, несущее конидии и затем плодовые тела гриба, поэтому поверхностная стерилизация образцов должна быть щадящей, но при этом эффективной. Строму нарезали на фрагменты стерильным скальпелем, предварительно поместив ее в стерильную чашку Петри. Далее полученные фрагменты прополаскивали в стерильной воде и с помощью пинцета по одному опускали в 0,1%-ый раствор сулемы ($HgCl_2$) на несколько секунд, после чего их снова промывали стерильной водой и помещали на КГА в стеклянные чашки Петри по одному фрагменту на чашку.

После помещения стерилизованных образцов на питательную среду края чашек обжигали в пламени горелки и оборачивали парафильмом для дополнительной защиты от случайного заражения микроорганизмами и высыхания среды. Образцы инкубировали в термостате при температуре 20-25°C в течение 3-х и более месяцев.

2.5.2. Хранение культур эндофитных грибов

По мере выделения культуры пересевали на чашки Петри со средой КГА, а также на пробирки со скошенным агаром (пробки оборачивали парафильмом и/или пищевой пленкой, чтобы предотвратить высыхание). После нарастания достаточного количества биомассы пробирки помещали в холодильник с температурой +6°C.

Кроме того, для поддержания полученных чистых культур эндофитных грибов использовали сыпучие среды, а именно пшеницу (см. ниже) Колбы со стерилизованным зерном засевали культурами грибов и инкубировали в термостате при температуре 20-25°С, периодически встряхивая колбы по мере нарастания мицелия.

С 2017 года полученные изоляты коллекции закладывали на длительное хранение в морозильные камеры с температурой –70°С с глицерином в качестве криопротектора. Для этого колонии после 1 месяца роста на КГА скальпелем нарезали на небольшие кубики и переносили вместе с агаром в стерильные криопробирки с 30 %-ым водным раствором глицерина (в зависимости от реакции изолята на криопротектор, концентрацию иногда меняли на 20-25% для спорулирующих изолятов и 40-50% для стерильных). Через 15 минут после погружения мицелия в криопротектор, криопробирки помещали в морозильную камеру (Ultra-low temperature freezer MDF-192, SANYO, Japan). Замороженные таким образом образцы могут храниться в течение длительного времени, не подвергаясь старению, которое происходит с постоянно пересеваемыми культурами.

2.5.3. Использованные питательные среды

Картофельно-глюкозный агар (КГА):

- водопроводная вода – 1000 мл;
- клубни картофеля – 200 г;
- D-глюкоза – 20 г;
- агар – 16 г.

Для приготовления среды очищенный и промытый картофель нарезали кубиками, заливали холодной водой и ставили на огонь. Варили в течение 20-30 минут от закипания. Отвар отфильтровывали через двойной слой марли и доводили до нужного объема холодной водопроводной водой. Затем среду разливали по качалочным колбам объемом на 750 мл и автоклавировали. После

остывания среды добавляли антибиотик (пенициллин, гентамицин, цефазолин или цефтриаксон) в концентрации 100 мг/л, чтобы исключить рост бактерий, перемешивали и разливали толстым слоем (50-55 мл на чашку), чтобы предотвратить высыхание агара при длительной инкубации.

Картофельно-глюкозный агар двойной концентрации (КГА2):

- водопроводная вода – 1000 мл;
- клубни картофеля – 200 г;
- D-глюкоза – 40 г;
- агар – 16 г.

Минеральная среда для эндофитов (СДЭ; Благовещенская, 2006):

- водопроводная вода – 1000 мл;
- D-глюкоза – 40 г;
- $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5 г;
- KH_2PO_4 – 1,0 г;
- KCl – 0,5 г;
- $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5 г;
- агар – 12 г.

Пшеница (сыпучая среда):

Очищенную пшеницу тщательно промывали и варили на небольшом огне до появления первых треснувших зерен. После этого добавляли щепотку меловой пудры и рассыпали по колбам на 250 мл. Полученные колбы подвергали двукратной дробной стерилизации в автоклаве при 0,5 атм.

Жидкая модифицированная среда Чапека

- водопроводная вода – 1000 мл;
- D-глюкоза – 40 г;

- $NaNO_3$ – 1,5 г;
- KH_2PO_4 – 1,0 г;
- KCl – 0,5 г;
- $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5 г.

Раствор Кнопа (для культивирования растений):

- водопроводная вода – 1000 мл;
- $Ca(NO_3)_2$ – 1 г;
- KNO_3 – 0,25 г;
- KH_2PO_4 – 0,25 г;
- $MgSO_4*7H_2O$ – 0,25 г;
- KCl – 0,125 г.

2.6. Молекулярно-генетические методы

2.6.1. Обнаружение эндофитов в растительном материале методом ПЦР

Традиционные методы обнаружения эндофитов, заключающиеся либо в прямом наблюдении эндофитного мицелия с помощью микроскопа, либо в получении изолятов на питательных средах, имеют целый ряд ограничений и недостатков, поэтому в настоящее время молекулярно-генетические методы становятся все более популярными в работе с эндофитными грибами. Они позволяют определять наличие инфекции быстро и менее энергозатратно. Кроме того, они дают возможность обнаружения присутствия некультивируемых грибов, а также видовой идентификации даже при отсутствии спороношений, что очень важно конкретно для эндофитов, так как они зачастую выделяются в виде стерильного мицелия, который невозможно определить классическими методами.

Одним из наиболее важных этапов при использовании метода ПЦР является подбор специфичных праймеров для амплификации участков ДНК. Использованные нами праймеры первоначально были разработаны для

Neotyphodium coenophialum, заселяющего, в основном, тростниковую овсяницу, на основании последовательности интронного региона гена *tub2* (Doss et al., 1998). В 2006 году они были усовершенствованы на основании последовательностей того же гена у *N. lolii* (*Lolium perenne*) и *N. occultans* (*Lolium multiflorum*) (Dombrowski et al., 2006).

На первом этапе работы проводили пробный сеанс амплификации с выбранными праймерами на ДНК, полученной из чистых культур эндофитных грибов. На втором этапе амплификацию проводили уже на ДНК, выделенной непосредственно из растительного материала (табл. 5).

Таблица 5

Материал, использованный для отработки метода обнаружения эндофитов с помощью ПЦР

№	Название штамма	Исходный материал
01	E001	Мицелий (из коллекции Благовещенской Е.Ю.)
02	E003	Мицелий (из коллекции Благовещенской Е.Ю.)
03	E005	Мицелий (из коллекции Благовещенской Е.Ю.)
04	*Claviceps purpurea*	Склероций из гербария
05	32FP13EF(Выс-8/1)	Мицелий *Epichloë festucae*
06	2FP13St (Цс-8/1)	Мицелий
07	10FP13St (Прос-1/3)	Мицелий
08	84FG13St (TFG-7)	Мицелий
09	85FG13St (TFG-9)	Мицелий
10	30FP13EF (Выс-1/1)	Мицелий *Epichloë festucae*
11	20FP13St (Прос-7/1)	Мицелий
12	13FP13St (Прос-3/2)	Мицелий
13	*Epichloë typhina*	Стромы из гербария (на *Dactylis glomerata*), 2014 год сбора
14	Выс	Семена *Festuca pratensis*, урожай 2013 года
15	Цс	Семена *Festuca pratensis*, урожай 2013 года
16	Прос	Семена *Festuca pratensis*, урожай 2013 года
17	TFG	Семена *Festuca gigantea*, урожай 2013 года
18	Ник	Семена *Festuca pratensis*, урожай 2014 года
19	Ник	Проростки *Festuca pratensis* (семена 2014 года сбора)
20	1КВ	Проростки *Festuca pratensis* (семена 2014 года сбора)
21	149	Проростки *Festuca gigantea* (семена 2014 года сбора)
22	149	Семена *Festuca gigantea*, урожай 2014 года
23	149	Семена *Festuca gigantea* (инкубация в воде при температуре +6ºС в течение суток), урожай 2014 года
24	149	Семена *Festuca gigantea* (инкубация в 1 %-ом растворе NaOH при комнатной температуре в течение суток), урожай 2014 года
25	Ely	Семена *Elymus caninus*, урожай 2014
26	Сиб	Семена *Festuca pratensis*, сорт Сибинтех, урожай 2012 года
27	ВИК 5	Семена *Festuca pratensis*, сорт ВИК 5, урожай 2012 года

Методика выделения ДНК

1) Мицелий растирали в микропробирках фирмы «Eppendorf» с добавлением жидкого азота, а семена, проростки, стромы *Epichloë typhina* и склероции *Claviceps purpurea* – в стерильных керамических ступках с жидким азотом. Растертый в ступках материал переносили в микропробирки стерильным скальпелем.

2) В каждую микропробирку добавляли 700 мкл лизирующего CTAB-буфера (0,2 M Tris (pH 8); 2 M NaCl; 0,05 M EDTA (pH 8); 2 % CTAB) и инкубировали при 65°C в течение часа, встряхивая их на мини-центрифуге-вортексе Microspin FV-2400 (Biosan) каждые 20 минут.

3) К полученной смеси добавляли 500 мкл хлороформа и центрифугировали 10 минут при 13 000 об/мин.

4) Отбирали супернатант (надосадочную жидкость), переносили его в новые микропробирки, в которые добавляли 500 мкл хлороформа и повторяли центрифугирование для повторной очистки смеси.

5) К полученному супернатанту добавляли 400 мкл изопропанола и 70 мкл раствора ацетата калия (1/10 от объема полученной смеси), аккуратно перемешивали руками, медленно переворачивая микропробирку, и затем центрифугировали 10 минут при 13 000 об/мин.

6) Супернатант сливали, выпавший осадок дважды промывали охлаждённым 70%-ным этанолом. Остатки этанола испаряли, инкубируя микропробирки в термостате при температуре 37ºC. Сухой осадок ДНК ресуспендировали в 100 мкл деионизированной воды и хранили при температуре –20ºC.

Амплификация участков ДНК

ПЦР проводили на амплификаторе «Biometra T1» с использованием набора реагентов для амплификации ДНК GenPak от компании ISOGENE и праймерами фирмы «Евроген» (табл. 6).

Таблица 6

Информация о праймерах, используемых для обнаружения эндофитных грибов в растительном материале

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, ºС	Ссылка на литературный источник
IS-1	GGTGTTGAGCCCCCCTGATTT	57	Doss et al., 1998
IS-3	GTCTCATCTCCGGGGCGGTAT		
IS-RS-5’	GAGCCCCTGATTTCGTAC	52	Dombrowski et al., 2006
IS-NS-3’	TTGAAGTAGACACTCATACGCTC		

Амплификацию проводили по программе:

1) Предварительная денатурация двухцепочечной молекулы ДНК – нагрев до 94°С на 3 минуты;

2) 30 циклов: **денатурация** при 94°С в течение 30 секунд, **отжиг** праймеров при температуре, указанной в табл. 6, в течение 30 секунд, **элонгация** при 72°С в течение 30 секунд;

3) конечная элонгация – нагрев до 72 °С в течение 4-х минут.

Разделение фрагментов ДНК

Полученные в результате амплификации фрагменты ДНК разделяли стандартным электрофорезом в агарозном геле (для приготовления геля использовали агарозу производства Research Organic в конечной концентрации 1,2 %). В качестве буферной системы использовали Tris-BORAT-EDTA-буфер (TBE). Окрашивание ДНК проводили путем добавления в расплавленный гель раствора бромистого этидия. После электрофореза гели анализировали в УФ свете на трансиллюминаторе.

2.6.2. Идентификация изолятов молекулярно-генетическими методами

Верификацию наименования спорулирующих изолятов, определенных с помощью микроскопии, и определение стерильных изолятов эндофитных грибов проводили путем постановки ПЦР со специфичными к грибам праймерами,

последующего секвенирования и анализа участка ITS1-5,8S-ITS2 рибосомальной ДНК.

Для этого проводили посев изолятов на стерильные целлофановые диски диаметром до 8 см по 3 колонии на 1 чашку (для стерилизации диски помещали в колбу с широким горлом, заливали дистиллированной водой и дважды автоклавировали при давлении в 1 атм.). Использование целлофановых дисков необходимо, так как при росте на твердой питательной среде мицелий эндофитов имеет тенденцию переходить к внутрисубстратному росту, делая невозможным чистый отбор мицелиальной массы без среды, которая может помешать выделению ДНК и последующей амплификации.

После накопления достаточного объема биомассы мицелий стерильным скальпелем переносили в микропробирки и помещали в морозильную камеру до начала выделения ДНК.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК небольшое количество мицелия переносили в пробирки с крышками и утолщенными стенками для гомогенизаторов, вносили шарики оксида циркония (1 шт. – 5 мм, 2 шт. – 1,1 мм, 6 шт. – 0,6 мм) и 200 мкл CTAB-буфера (0,2 M Tris (pH 8); 2 M NaCl; 0,05 M EDTA (pH 8); 2 % CTAB) и растирали с помощью ротационного гомогенизатора «Precellys Evolution» по программе «Hard» (3 цикла по 20 секунд на скорости 6800 об/мин. и паузами в 30 секунд). К растертому материалу добавляли 500 мкл лизирующего CTAB-буфера и 40 мкл раствора ацетилцистеина (концентрация 10 г/л), перемешивали на вортексе и инкубировали на термостате «Termo 48» при 65°C в течение 1 часа (пробирки встряхивали каждые 10-20 минут). Далее работу проводили по методике, описанной в разделе 2.6.1.

Определение концентрации выделенной ДНК

Измерение концентрации и чистоты выделившейся ДНК в образцах проводили с помощью спектрофотометра «NanoDrop OneC» от компании Thermo

Scientific (США). Для дальнейшей работы использовали образцы, концентрация ДНК в которых была более 10 нг/мкл.

Амплификация ДНК

ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот «Bio-Rad T100 Thermal Cycler» с использованием набора реагентов «GenPak PCR Core» от компании ISOGENE и праймерами ITS1/ITS4 производства фирмы «Евроген» (последовательность нуклеотидов см. в табл. 7) по программе:

1) Предварительная денатурация двухцепочечной молекулы ДНК – нагрев до 95°С на 3 минуты;

2) 35 циклов: **денатурация** при 95°С в течение 30 секунд, **отжиг** праймеров при температуре 55ºС в течение 30 секунд, **элонгация** при 72°С в течение 30 секунд;

3) конечная элонгация – нагрев до 72 °С в течение 4-х минут.

Таблица 7

Информация о праймерах для видовой идентификации эндофитов

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, ºС	Ссылка на литературный источник
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

Разделение фрагментов ДНК

Полученные в результате амплификации фрагменты ДНК разделяли стандартным электрофорезом в 1,5% агарозном геле (агароза LE 2, Helicon) с добавлением бромистого этидия. В качестве буферной системы использовали Tris-BORAT-EDTA-буфер (TBE). После электрофореза гель анализировали в гель-документирующей системе Quantum-ST-4-1500 (Япония). Для контроля за длиной полученных ПЦР-продуктов использовали маркер длин ДНК (DNA Ladder) от фирмы «Евроген».

Очистка ПЦР-продукта и пробоподготовка к анализу нуклеотидной последовательности

Целевую ДНК, полученную электрофоретическим разделением, вырезали стерильными скальпелями из агарозного геля и очищали с помощью набора CleanUp Standart от компании «Евроген», следуя инструкции, предоставленной производителем. Секвенирование полученных последовательностей проводили в компании «Евроген» по методу Сэнгера с теми же праймерами, которые использовали для амплификации (как прямые, так и обратные).

Анализ нуклеотидных последовательностей

Полученные после секвенирования хроматограммы и нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы «Geneious» и базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.7. Обработка данных

Обработку полученных данных проводили стандартными статистическими методами в пакетах Microsoft Excel и Statistica.

Для определения доверительного интервала для доли вариант, в случае малых значений – меньше или равных 5% – использовали приближение Пуассона. В данном случае верхняя граница доверительного интервала для доли определяется как $p_в = x_в/N$, нижняя - $p_н = x_н/N$. Значения $x_в$ и $x_н$ для числа положительных исходов x взяты из таблицы доверительных границ для параметра в распределении Пуассона (Урбах, 1964). Аналогичным образом проводили вычисления границ доверительного интервала для значений, превышающих 95%.

Для значений доли, лежащих в интервале 5–95% вычисление границ доверительного интервала проводили с помощью φ-преобразования. Для этого вводится величина φ такая, что $p = \sin^2(\frac{\varphi}{2})$. Границы 95%-ного доверительного

интервала для φ определяются как $\varphi \pm \frac{1{,}96}{\sqrt{N}}$, после чего производится обратный переход к параметру p (Урбах, 1964).

2.8. Изучение роста изолятов на разных средах

2.8.1. Сравнение роста эндофитов на естественных и искусственных питательных средах

Для данного опыта использовали 2 различных среды, одна из которых является естественной (картофельно-глюкозный агар с удвоенной концентрацией глюкозы), а другая – искусственной (СДЭ).

Для защиты от бактериального заражения в готовые среды стерильно добавляли пенициллин в концентрации 100 мг/л.

Для первого посева были отобраны образцы, которые на момент постановки опыта образовали колонии достаточного размера, то есть более 10 мм в диаметре:1FP13St (Цс-1/1), Цс-7/1, 3FP13St (Цс-10/1), 4FP13EF (Речс-1/1), 5FP13St (Речс-7/1), 6FP13StE (Речс-8/1); 8FP13EF (Прос-1/1), 11FP13St (Прос-2/1), Прос-4/1, 23FP13EF (Прос-8/1), 24FP13St (Прос-9/1), а также штаммы E001, E003 и E005, полученные из коллекции Благовещенской Е.Ю.

Для второго посева использовали следующие штаммы: 30FP13EF (Выс-1/1), 31FP13St (Выс-1/2), 32FP13EF (Выс-8/1), 33FP13St (Марс-5/1), 8FP13EF (Прос-1/1), 9FP13St (Прос-1/2), 10FP13St (Прос-1/3), 11FP13St (Прос-2/1), 12FP13St (Прос-3/1), 13FP13St (Прос-3/2), 14FP13St (Прос-3/3), 15FP13St (Прос-4/2), 16FP13EF (Прос-5/1), 17FP13St (Прос-5/2), 18FP13EF (Прос-6/1), 19FP13St (Прос-6/2), 20FP13St (Прос-7/1), 21FP13St (Прос-7/2), 22FP13St (Прос-7/3), 23FP13EF (Прос-8/1), 24FP13St (Прос-9/1), 25FP13St (Прос-10/1), 26FP13St (Прос-10/2), 4FP13EF (Речс-1/1), 5FP13St (Речс-7/1), 6FP13StE (Речс-8/1), 7FP13EF (Речс-9/1), 29FP13St (УФЛ-3), 27FP13St (УФС-1/1), 28FP13EF (УФС-9/1), 2FP13St (Цс-8/1), 3FP13St (Цс-10/1).

Первый посев выполняли на пластиковые одноразовые чашки Петри (ø 60 мм) методом агаровых блоков, которые вырезали с помощью стерильных лезвий и скальпелей, так как данные штаммы образуют чрезвычайно плотные колонии, часто уходящие вглубь субстрата. Чашки оборачивали парафильмом и инкубировали в течение 4-х недель при температуре 20-25°С, измеряя диаметры колоний через сутки-двое, начиная с 5-х суток роста.

Второй посев выполняли таким же способом на стеклянные чашки (ø 90 мм) Петри с КГА2, измерения проводили 1 раз в две недели в течение двух месяцев.

Колонии описывали по стандартной схеме: цвет колоний, характер поверхности, зональность, тяжистость, характер воздушного мицелия, наличие экссудата, окраска реверса. Для дисперсионного анализа использовали данные 17-х суток роста в случае первого посева и 42-х суток для второго.

2.8.2. Изучение роста эндофитных грибов в зависимости от азотного питания

Низкая скорость роста эндофитных грибов, несмотря на наличие у них высокой метаболической активности и способности к синтезу ряда алкалоидов и других весьма интересных соединений, препятствует их потенциальному использованию в биотехнологии. Поэтому была проведена проверка роста изолятов при культивировании в жидких средах.

Для постановки опыта по изучению влияния формы азота и его концентрации в питательной среде на рост эндофитных грибов в жидкой культуре было отобрано 3 штамма эндофитов: 90EC14EF, 83FG14St, 99DG16ET. В основу опыта положены жидкая модифицированная среда Чапека с варьированием формы и концентрации азота (табл. 8).

Таблица 8

Форма и концентрация источников азота в среде

Форма азота	$NaNO_3$			$(NH_4)_2SO_4$			Пептон		
Варианты концентраций, г/л	1	2	3	0,75	1,5	2,25	2,5	5	7,5

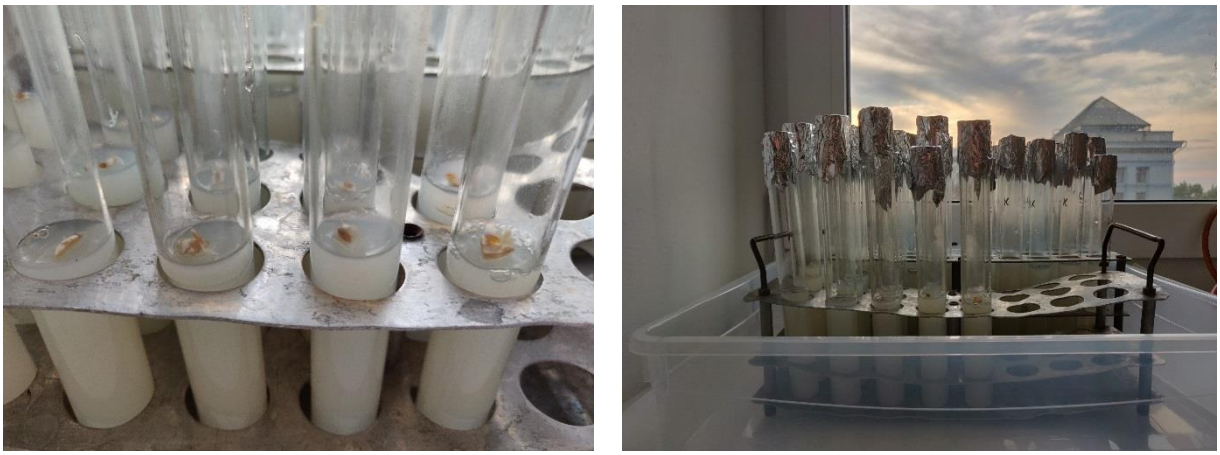
Среды разливали в колбы объемом 150 мл (по 75 мл на колбу), дважды дробно автоклавировали при 0,5 атм. и засевали агаровым блоком с мицелием каждого из трех штаммов эндофитов в трех повторностях на каждый вариант среды (итого – 81 колба). Горлышко и пробку каждой колбы оборачивали слоем парафильма, накрывали колпачком из стерильной бумаги и инкубировали в стационарном состоянии при комнатной температуре и естественном освещении 1,5 месяца. Далее мицелий отфильтровывали, подсушивали и взвешивали. Часть полученного мицелия при этом была исследована с помощью методов световой (окраска суданом черным) и электронной просвечивающей микроскопии.

2.9. Эксперимент по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов

Для постановки опыта по искусственному заражению злаков эндофитами был отобран штамм 201FA17Tr, выделенный из семян тростниковой овсяницы 2017 года сбора и который по анализу участка ITS рДНК был определен как представитель рода *Tricladium*. В качестве потенциального растения-хозяина использовали семена тростниковой овсяницы сорта Лира 2018 года сбора, предоставленных лабораторией иммунитета растений ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса, для которых не было обнаружено случаев колонизации эндофитами семян или проростков, полученных из поверхностно стерилизованных семян, и который характеризовался высокой всхожестью и быстрым прорастанием.

Схема эксперимента выглядела следующим образом. Сначала проводили посев гриба на КГА для получения достаточного количества биомассы мицелия. Для этого скальпелем вырезали из исходной колонии блок агара с мицелием, который затем с помощью фламбированного пинцета переносили в другую чашку Петри, где стороной блока, покрытой мицелием, проводили по поверхности агаризованной среды в форме штриха. Наращивание биомассы длилось около 2,5 месяцев.

В качестве питательной среды для развивающегося растения использовали среду Кнопа (состав описан выше), но с добавлением агара в концентрации 16 г/л. Среду готовили в качалочных колбах на 750 мл, автоклавировали при 1 атм. и затем разливали у пламени горелки в предварительно простерилизованные в сушильном шкафу при температуре 180 ^{o}C в течение 3 часов широкие биологические стеклянные пробирки, закрытые колпачками из фольги. После застывания среды на ее поверхность помещали вырезанный скальпелем фрагмент колонии эндофитного гриба вместе с кусочком агара. Далее поверхностно стерилизованные по методике, описанной в пункте 2.5.1, семена овсяницы помещали в центр фрагмента колонии с мицелием эндофитного гриба и снова закрывали колпачком из фольги (рис. 1). В контрольном варианте опыта семена помещали непосредственно на поверхность среды Кнопа. Всего к инкубации подготовили 98 пробирок, из которых 42 были контрольными.



А Б

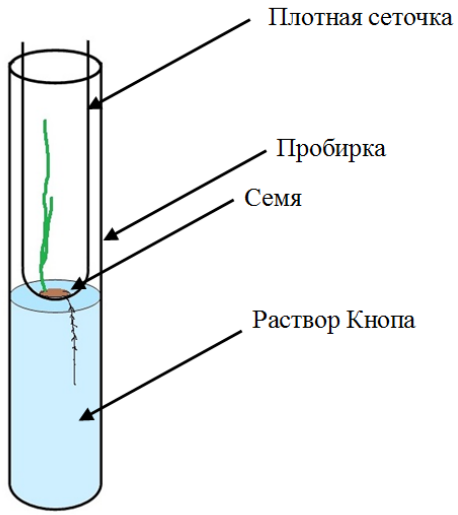
Рис. 1. Экспериментальное заражение овсяницы тростниковой эндофитным грибом: А – закладка мицелия и семени в пробирку, Б – инкубация пробирок

Пробирки инкубировали при комнатной температуре и естественном освещении на подоконнике в течение 33 суток. Полученные в результате опыта молодые растения анализировали на наличие эндофитной инфекции по методике, описанной в 2.2.1 с помощью световой микроскопии.

2.10. Изучение распределения мицелия эндофитных грибов в растениях

2.10.1. Изучение распределения мицелия в молодых проростках *in vitro*

Семена из двух образцов семян со 100%-ной зараженностью (20 штук из образца Речс и 20 штук из УФС) поверхностно стерилизовали по методике, описанной в пункте 2.5.1, и помещали во влажные камеры. В качестве влажных камер использовали стерильные стеклянные чашки Петри с дисками фильтровальной бумаги, увлажненными стерильной водой. После прорастания семян (т.е. через 2 недели инкубации) молодые растения помещали по одному на пластиковую сетку в пробирки с питательным раствором Кнопа для гидропоники и инкубировали при естественном освещении (на окне) 20 дней (рис. 2).



А Б

Рис. 2. Опыт по изучению распределения мицелия в молодых злаках: А – схема закладки семени в пробирку, Б – пробирки с молодыми растениями

У растений измеряли высоту (фактически – длину первого листа), длину корня и проверяли присутствие эндофитного мицелия в разных частях растения: корень, влагалище 1-го листа, листовая пластинка 1-го листа (в трех зонах – основании, средней и верхней части), листовая пластинка 2-го листа (в случае его наличия).

2.10.2. Изучение распределения мицелия во взрослых растениях открытого грунта

Для анализа использовали дикорастущие растения овсяницы гигантской на стадии формирования семян, произрастающие на территории ЗБС МГУ в популяции, где ранее был отмечен 100% уровень зараженности эндофитами (7-й квартал). Всего обследовано 3 дерновины овсяницы, для которых подсчитывали число генеративных побегов, измеряли их длину, а также готовили окрашенные анилиновым синим препараты листовых пластинок, листовых влагалищ, семян, стеблей генеративных побегов и корней по методикам, описанным выше.

Образцы частей растений были зафиксированы раствором ФСУ, и в дальнейшем на фиксированных образцах проводили исследование распределения мицелия в тканях с помощью сканирующего электронного микроскопа и трансмиссионного электронного микроскопа.

2.11. Изучение влияния дефицита фосфора и/или азота на Е+ и Е- растения

На первом этапе данной части работы была проверена всхожесть семян. Проростки получали методом, описанным в пункте 2.10.1, и проверяли на наличие эндофитного мицелия (пункт 2.2.1). По результатам предварительной проверки для следующего этапа были отобраны семена *Festuca gigantea* со 100 %-ной зараженностью («Е+»), для которых был искусственно получен свободный от эндофита вариант («Е-»), а также *Festuca pratensis* сорта ВИК 5 («Е-») и дикорастущие образцы *Festuca pratensis* («Е+»), выступающие в паре.

Для получения «Е-» варианта перед стерилизацией семена прогревали в термостате 15 минут при температуре 43°C и 25 минут при 57°C (Ren et al., 2007). Далее семена стандартно проращивали в стерильных влажных камерах. При контаминации камер микромицетами семена промывали слабым раствором $KMnO_4$ и несколько суток выдерживали в холодильнике при температуре +6°C. Полученные проростки помещали на разные варианты питательной среды Кнопа

методом, описанным в пункте 2.10.1, и инкубировали 33 дня при 1300 лк (контроль освещенности проводили с помощью прибора Digital light meter модели LX-1330B) и 16/8 световом дне (рис. 3).

Использованные варианты среды Кнопа:

1) $Ca(NO_3)_2$ – 1 г; KNO_3 – 0,25 г; KH_2PO_4 – 0,25 г; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,25 г; KCl – 0,125 г на 1 литр воды (вариант с фосфором и азотом);

2) $Ca(NO_3)_2$ – 1 г; KNO_3 – 0,25 г; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,25 г; KCl – 0,125 г на 1 литр воды (вариант с азотом, но без фосфора);

3) KH_2PO_4 – 0,25 г; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,25 г; KCl – 0,125 г на 1 литр воды (вариант с фосфором, но без азота);

4) $MgSO_4*7H_2O$ – 0,25 г; KCl – 0,125 г на 1 литр воды (вариант без азота и без фосфора).

Рис. 3. Инкубация проростков *Festuca gigantea*

По завершении срока инкубации для каждого растения проводили проверку эндофитного статуса по методике, описанной в пункте 2.2.1, чтобы убедиться в корректности метода получения свободных от гриба семян. Также измеряли длину побега, длину корня и взвешивали каждый проросток. В общей сложности, проанализировано 320 растений (по 40 «E+» и «E-» растений на каждый из четырех вариантов среды).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Встречаемость эндофитных грибов

Основной трудностью, с которой сталкиваются исследователи при изучении встречаемости эндофитных грибов, является то, что обнаружить инфекцию вне лаборатории практически невозможно, так как внешне наличие симбиоза никак не проявляется и такие растения не отличаются от неколонизированных. Но при микроскопировании предварительно окрашенных срезов и срывов тканей при наличии инфекции можно обнаружить распространяющийся по межклетникам, слабоветвящийся, слегка извивающийся, септированный мицелий (рис. 4). Кроме того, показано, что один и тот же злак может иметь как инфицированные побеги, так и свободные от гриба (Благовещенская, 2006), что также увеличивает вероятность ошибки при поиске зараженных популяций злаков.

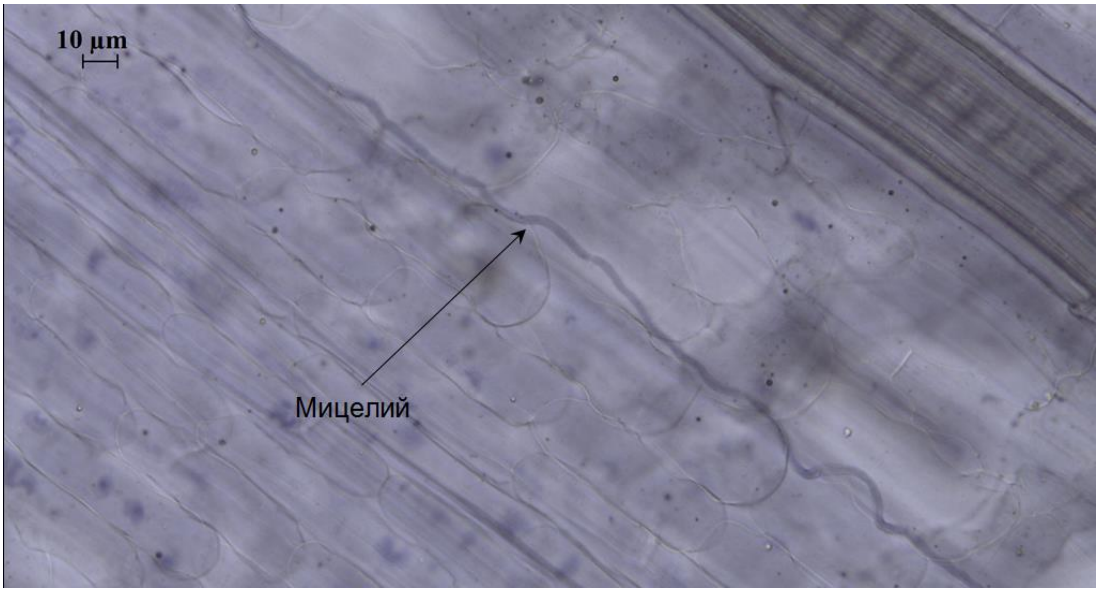
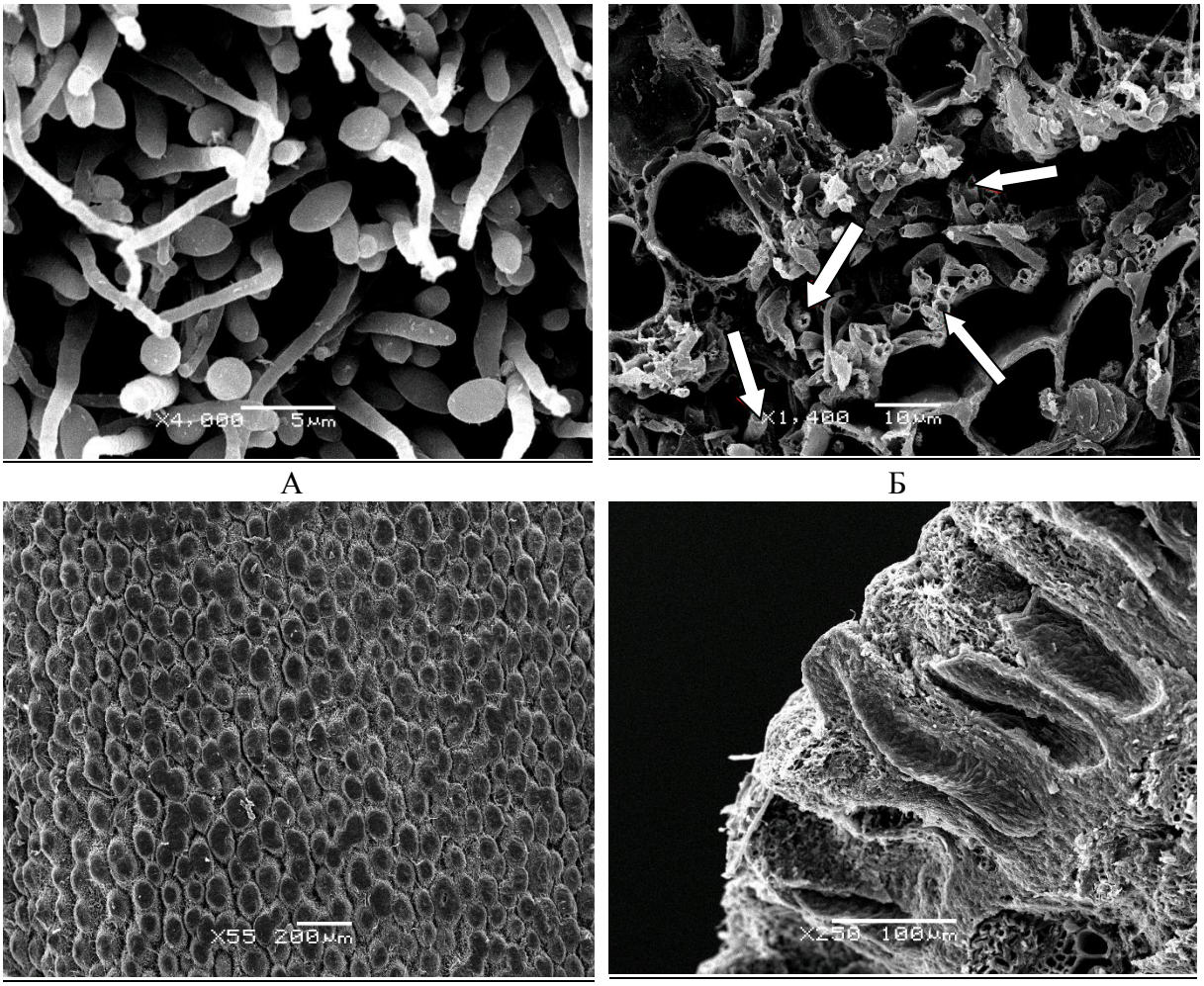


Рис. 4. Гифа гриба в ткани растения

В этом плане намного легче работать с теми представителями эндофитных грибов, которые способны к стабильному половому размножению и образуют

хорошо заметные стромы на стеблях генеративных побегов злаков, например, вид *Epichloë typhina* (рис. 5).

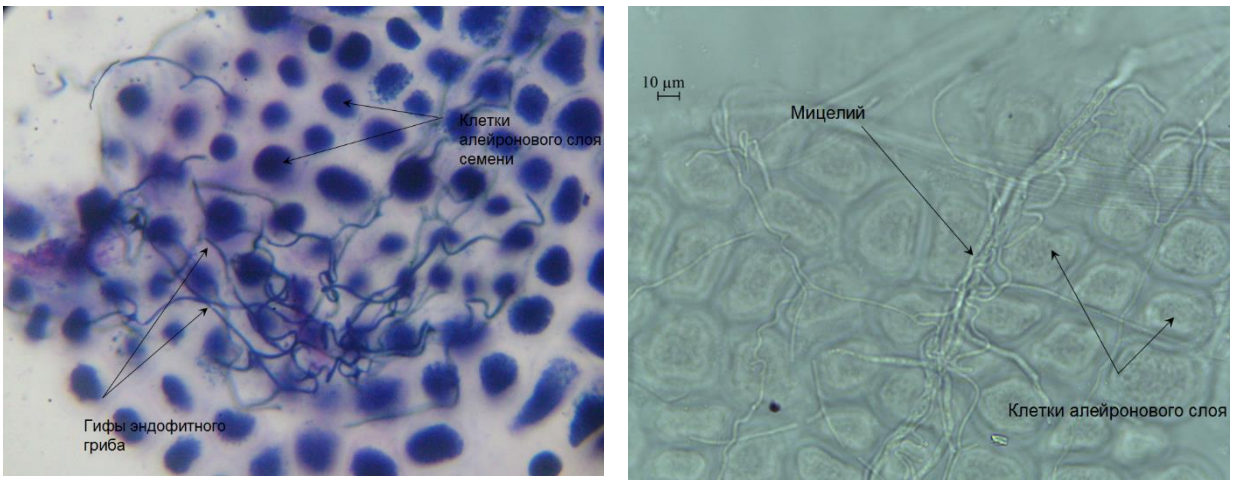


А Б

В Г

Рис. 5. *Epichloë typhina* (СЭМ). А – поверхность конидиальной стромы, видны конидии и конидиеносцы; Б – поперечный срез стебля со стромой, стрелками указаны гифы гриба; В – поверхность перитециальной стромы; Г – поперечный срез через перитециальную строму, видны внутренние стенки перитециев

В семенах мицелий приурочен к алейроновому слою, который представляет собой слой толстостенных клеток, богатых белком, прилегающих к эндосперму. На препаратах видно беспорядочное сплетение грибных гиф в области алейронового слоя (рис. 6).



А Б

Рис. 6. Эндофитный мицелий в семени: А – препарат, окрашенный анилиновым синим; Б – неокрашенный препарат

Из 613 образцов дикорастущих и сортовых злаков, принадлежащих к 15-ти видам, эндофитную инфекцию удалось обнаружить в 49-ти образцах шести видов: *Lolium perenne* (+*Lolium* sp.), *Festuca pratensis*, *Festuca arundinacea*, *Festuca gigantea*, *Festuca rubra* и *Elymus caninus.*

1) *Lolium perenne* – многолетний злак, широко распространенный на территории России, активно используется в качестве кормовой культуры и для создания газонов. Из 342 проанализированных в данной работе образцов только для 1 было отмечено наличие эндофитного мицелия в семенах, причем интересно, что для многолетнего плевела авторами зарубежных работ (Zabalgogeazcoa et al., 1999; Rolston et al., 2002; Dombrowski et al., 2006) показана высокая частота встречаемости эндофитов в естественных популяциях, в то время как в нашей работе единственный случай заражения связан с газоном, а образцы из естественных местообитаний не несли в себе эндофитной инфекции. Зараженным также оказался собранный на газоне образец семян плевела, который удалось определить только до рода.

2) Вид *Festuca pratensis* является наиболее подробно изученным на территории России (Матевосян, 2000; Шеленга, 2002; Благовещенская, 2006). В нашей работе эндофитные грибы были обнаружены в 9 популяциях Москвы, 5 популяциях Московской области (расположение популяций луговой овсяницы и

плевела многолетнего, показаны на рис. 7 и рис. 8), а также у 3 сортовых образцов семян (сорт Кварта урожая 2012 года пастбищно-газонного назначения, сорт Николаевский 2014 года и сорт Сибинтех 2012 года), предоставленных ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса (Приложение 2).

Рис. 7. Присутствие эндофитов на территории Москвы. Условные обозначения: ● - наличие инфекции у *Festuca pratensis*, ○ – отсутствие инфекции у *Festuca pratensis,* Δ - *Lolium perenne,* 1- Выхино, 2- Красносельская, 3- Марьино, 4- Проспект Мира, 5- Речной вокзал, 6- Университет, 7- Филевский парк, 8- Царицыно

Анализ образцов семян сортовых злаков представляет особый интерес в связи с важнейшей ролью, которую злаковые культуры играют в животноводстве, земледелии, ландшафтном дизайне и озеленении территорий. Несмотря на то, что наличие эндофитной инфекции в семенах может оказывать значительное влияние на важные для сельского хозяйства характеристики растений, вероятность формирования симбиозов с эндофитными грибами редко учитывается при сортопроизводстве, что может не только делать неустойчивыми показатели продуктивности внедряемой культуры, но и делать их опасными, учитывая способность некоторых эндофитных грибов продуцировать токсичные для фитофагов вещества. Овсяница луговая является одной из самых

распространенных и широковозделываемых культур на территории России и именно этот вид наиболее часто оказывался колонизирован эндофитными грибами.

Рис. 8. Присутствие эндофитов на территории МО в 2013 г. (обозначения – см. рис. 7)

3) *Festuca arundinacea* – многолетний широко распространенный в европейской части России злак пастбищно-сенокосного назначения. Нами было проанализировано 5 образцов семян данного вида, но только для 1 образца, собранного в популяции, расположенной на территории ЗБС в пойме, была показана эндофитная инфекция. Российские сорта Лира и Алексеевский, а также американский сорт Paraiso, оказались незараженными.

4) *Festuca gigantea* – широко распространенный на территории России злак. 5 образцов семян, собранных на территории ЗБС, оказались зараженными эндофитами, причем в одной из обнаруженных популяций, образцы в которой отбирали в период с 2013-го по 2018-ый год, зараженность держалась на уровне 100%, но в 2018 году снизилась до 43%. Наличие популяций гигантской овсяницы, зараженных эндофитами, на территории России показано впервые. Ранее зараженные эндофитами образцы овсяницы гигантской были отмечены на

территории Франции (Leyronas, Raynal, 2001) и по анализу ДНК – в Швейцарии (Schardl et al., 1997).

5) Анализ семян дикорастущего злака *Elymus caninus*, собранных на территории ЗБС (7 квартал) в 2014 году, показал наличие эндофитов, причем зараженность в популяции достигала 42%, что является довольно высоким показателем. Однако отобранные в той же популяции семена 2018-го года урожая не несли в себе мицелий. Так как падение уровня зараженности наблюдали не только в этой популяции, но и у гигантской овсяницы, есть вероятность, что это явление связано, например, с погодными условиями. Как и в случае с гигантской овсяницей, наличие эндофитов у пырейника собачьего для территории России показано впервые. Причем из семян обоих видов злаков нам удалось получить спорулирующие изоляты грибов и определить их видовую принадлежность, чего не было сделано в других работах. Случай обнаружения инфекции у пырейника собачьего описан в статье, в которой не приведена информация о месте сбора образцов (Leuchtmann, Clay, 1997).

6) Из 4 образцов семян *Festuca rubra* эндофиты присутствовали только в 1 образце, собранном на территории ЗБС в пойме реки. Сортовые образцы Диана, Максима 1 и Boreal не несли инфекции. Ранее для Московской области (опытные участки института кормов) уже были известны единичные случаи колонизации красной овсяницы (Благовещенская, 2006).

Свободными от эндофитной инфекции оказались образцы *Agropyron* sp., *Agrostis* sp., *Agrostis gigantea*, *Arrhenatherum elatius*, *Briza media*, *Bromopsis* sp., *Calamagrostis epigeios*, *Deschampsia caespitosa*, *Festulolium loliaceum*, *Phleum pretense*, а также оба неопределенных злака. Для *Bromopsis inermis* ранее были показаны единичные случаи обнаружения мицелия в тканях растений с опытных участков института кормов (Благовещенская, 2006), но исследованные нами дикорастущие и сортовые образцы не несли инфекции. У *Dactylis glomerata* по весне неоднократно наблюдали развитие на некоторых генеративных побегах стром полового размножения *Epichloë typhina*, которые абортировали соцветия,

препятствуя формированию метелок, однако при исследовании семян мицелий не был обнаружен. Информация по всем зараженным образцам семян приведена в таблице 9.

Следует отметить, что растения, для которых показано присутствие эндофита, в большинстве случаев были отобраны в местообитаниях, на которые в той или иной степени действует антропогенная нагрузка (газоны, сельскохозяйственные угодья, пастбища), что говорит о преимуществах, получаемых растениями при колонизации эндофитами, позволяющих им выживать при воздействии.

Интересно также, что в нашей работе на территории Звенигородской биологической станции было многократно отмечено наличие зараженных популяций злаков, хотя при предыдущих исследованиях на биостанции эндофитных грибов не было обнаружено ни в одном из исследованных образцов (Благовещенская, 2006).

Таблица 9

Зараженность семян эндофитными грибами (М – Москва, ЗБС – Звенигородская биостанция; доверительные интервалы с индексом «[a]» посчитаны с помощью приближения Пуассона, «[b]» – с помощью φ-преобразования)

Происхождение образца	**Год сбора**	**Доля зараженных семян, %**	**95%-ный доверительный интервал**
Festuca pratensis			
м. Речной вокзал, сквер (М)	2013	100	87,7-100,0[a]
м. Университет, газон у физического факультета МГУ (М)	2013	100	87,7-100,0[a]
м. Выхино, двор у дороги (М)	2013	100	82,4-100,0[a]
м. Филевский парк, парковая зона (М)	2013	100	89,1-100,0[a]
м. Царицыно, музей-заповедник «Царицыно», у пруда (М)	2013	96,3	75,7-96,4[a]
м. Проспект Мира, парковая зона (М)	2013	93,3	81,9-99,3[b]
м. Красносельская, сквер (М)	2013	85,2	69,6-95,8[b]
м. Марьино, парк (М)	2013	80,8	63,7-93,3[b]
ЗБС, 1 квартал, пойма	2014	94,9	76,4-95,5[a]

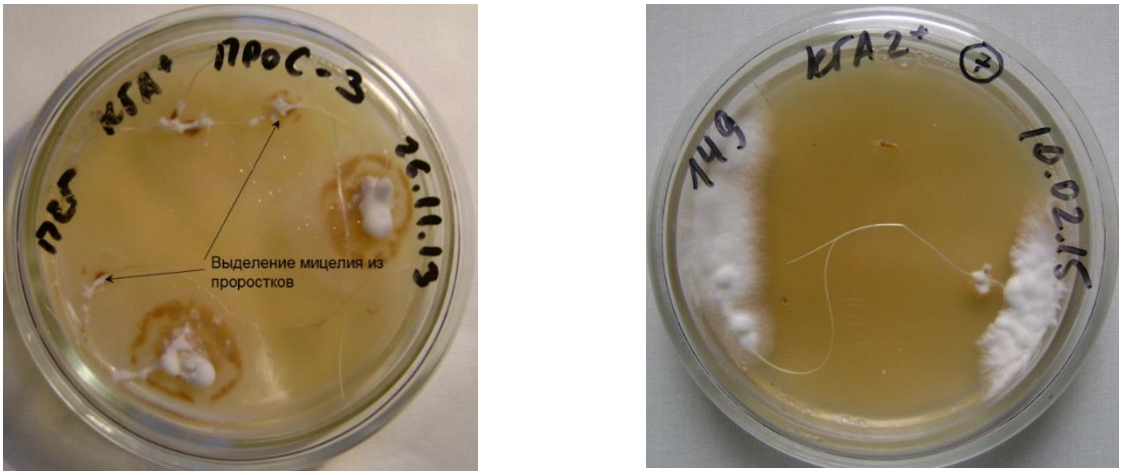
Происхождение образца	**Год сбора**	**Доля зараженных семян, %**	**95%-ный доверительный интервал**
Сорт Сибинтех (ВНИИ кормов)	2012	80,0	69,0-89,1[b]
ЗБС	2013	73,3	61,5-83,7[b]
Сорт Николаевский (ВНИИ кормов)	2014	35,6	24,0-48,1[b]
Сорт Кварта (ВНИИ кормов)	2012	5,0	1,0-14,6[a]
ЗБС	2015	64,0	53,6-73,7 [b]
ЗБС, пойма	2017	89,8	79,9-96,6 [b]
Festuca gigantea			
ЗБС, 7 квартал	2015	100	95,1-100,0[a]
ЗБС, 7 квартал	2017	100	97,0-100,0[a]
ЗБС, 7 квартал	2018	43,1	31,9-54,6 [b]
ЗБС, 7 квартал	2014	100	97,1-100,0[a]
ЗБС, Пять углов	2013	90,7	81,7-96,9[b]
ЗБС, Танковая дорога	2013	74,5	61,8-85,4[b]
Festuca arundinacea			
ЗБС, пойма	2017	100	92,8-100,0[a]
Festuca rubra			
ЗБС, пойма	2015	35,3	15,1-58,8[b]
Lolium perenne			
Газон у Биологического факультета	2018	21,1	9,8-35,2[b]
Lolium sp.			
Газон у Биологического факультета МГУ	2016	9,0	4,2-15,4[b]
Elymus caninus			
ЗБС	2014	41,9	30,0-54,3[b]

3.2. Коллекция чистых культур эндофитов

Попытки выделения эндофитных грибов в чистую культуру встречают массу трудностей. Поверхность растений, развивающихся в естественной среде, всегда несет большое число пропагул разнообразных микроорганизмов, которые часто переходят к активному росту при наличии питательного субстрата.

Следовательно, необходимо проводить тщательную поверхностную стерилизацию образцов, чтобы быть уверенными, что в культуру выделяется именно внутренняя инфекция, а не внешняя. Так как эндофитные грибы выделяются в культуру и растут значительно медленнее других грибов, которые обычно встречаются на поверхности растений, в принципе вполне возможно отбраковать чашки, рост колоний в которых начинается в течение первой недели при некачественной поверхностной стерилизации. С другой стороны, слишком агрессивная обработка может погубить мицелий, залегающий внутри растительного материала, сведя на нет все усилия.

Кроме того, эндофиты, будучи сильно специализированными биотрофами, крайне неохотно переходят на питательную среду, предпочитая оставаться в растении. Если мицелий остался жизнеспособен после обработки стерилизующими агентами, то при длительной инкубации вокруг растительного материала начинается формирование колонии эндофита. При прорастании семян в чашках Петри гриб развивается в тканях молодого проростка в виде типичного мицелия, идущего по межклетникам, причем в случае соприкосновения проростка с питательной средой может происходить его выход на среду, причем не только из побега, но и из корня, что говорит в пользу способности эндофитов колонизировать подземные части молодых растений (рис. 9).



А Б

Рис. 9. Выделение эндофитного мицелия из семян и проростков на питательную среду: А – 8-я неделя инкубации; Б – 11-я неделя инкубации

Следующая существенная проблема, сильно влияющая на успешность получения изолятов, – необходимость длительного времени инкубации чашек с растительным материалом. Выделение мицелия на среду может занимать очень длительные промежутки времени (до 4-х месяцев и более), поэтому работу нужно проводить очень осторожно, чтобы чашки оставались стерильными в течение всего этого времени. В целом, потеря изолятов происходит очень часто из-за случайной контаминации чашек микромицетами, развития устойчивых к антибиотику бактерий, нападения микофильных клещей, высыхания питательной среды, либо при накоплении большого количества конденсата в чашке.

При работе со стромами *Epichloë typhina*, развившихся на *Dactylis glomerata*, оказалось очень сложно соблюсти баланс между тщательностью поверхностной стерилизации и ее агрессивностью. В большинстве повторностей и в 2015, и в 2016 годах в культуру либо выделялись заносные грибы (роды *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp.), либо чашки оставались стерильными, так как мицелий в строме погибал. Связано это, скорее всего, с тем, что поверхность стром обычно влажная и их часто посещают насекомые, переносящие на своем теле большое число различных спор, которые в итоге прилипают к стромам, обусловливая малую вероятность ликвидации этих спор без сопутствующего повреждения целевого мицелия. Тем не менее, нам удалось получить 2 чистых культуры *Epichloë typhina* (98DG15ET, 99DG15ET).

Выделение из листовых пластинок и влагалищ злаков в нашей работе оказалось неэффективным. Из 10 повторностей только в одном случае удалось получить изолят эндофитного гриба (штамм УФЛ-3). Вероятно, эндофит в большинстве случаев погибал при поверхностной стерилизации растительного материала (рис. 10). Из-за того, что получение изолятов из зеленых частей растений не увенчалось успехом, в дальшейшем мы сконцентрировались на работе с семенами.

А

Б

Рис. 10. Выделение мицелия из влагалища листа: А- 52-е сутки инкубации, Б- 82-е сутки инкубации

Первые изоляты эндофитных грибов были получены из семян *Festuca pratensis*, собранных на территории музея-заповедника «Царицыно» в 2013 году, для чего понадобилось 55-96 суток инкубации. Так как эндофитная инфекция именно для овсяницы луговой была наиболее часто встречаемой, наибольшее количество изолятов (114) получено именно от нее, причем 15 из них – из сортового образца семян («Николаевский»).

Изоляты были получены также и из образцов семян *Festuca gigantea* (53), *Festuca arundinacea* (13), *Lolium perenne* (8) и *Elymus caninus* (12). Информация по всем выделенным из семян изолятам представлена в таблице 10.

Таблица 10

Изоляты эндофитных грибов, выделенные из семян*

Происхождение образца (год сбора) – Зараженность, %	**Успешность выделения, %****	**Срок инкубации, сут.**	**Перечень изолятов*****
Festuca pratensis			
м. Речной вокзал, сквер (2013) – 100%	20	73	4FP13, Речс- 1/2, Реч-6/1, 5FP13, 6FP13, 7FP13
м. Университет, газон у физического факультета МГУ (2013) – 100%	6,7	93	27FP13, 28FP13

Происхождение образца (год сбора) – Зараженность, %	**Успешность выделения, %****	**Срок инкубации, сут.**	**Перечень изолятов*****
м. Выхино, двор у дороги (2013) – 100%	23,3	73-95	30FP13, 31FP13, Выс-1/3, Выс-3/1, Выс-3/2, Выс-4/1, 32FP13
м. Филевский парк, парковая зона (2013) – 100%	16,7	83-121	Филс-4/1, Филс-6/1, Филс-7/1, Филс-8/1, Филс-9/1
м. Царицыно, музей-заповедник «Царицыно», у пруда (2013) – 96,3%	30	55-96	1FP13, Цс-1/2, Цс-3/1, Цс-3/4, Цс-7/1, 2FP13, 3FP13, Цс-10/2, Цс-10/3
м. Проспект Мира, парковая зона (2013) – 93,3%	73,3	80	8FP13, 9FP13, 10FP13, 11FP13, 12FP13, 13FP13, 14FP13, Прос-4/1, 15FP13, 16FP13, 17FP13, 18FP13, 19FP13, 20FP13, 21FP13, 22FP13, 23FP13, Прос-8/2, 24FP13, Прос-9/2, 25FP13, 26FP13
м. Марьино, парк (2013) – 80,8%	3,3	95	33FP13
ЗБС, 1 квартал, пойма (2014) – 94,9%	63,3	27+	34FP14, 35FP14, 36FP14, 37FP14, 38FP14, 39FP14, 40FP14, 41FP14, 42FP14, 43FP14, 44FP14, 45FP14, 46FP14, 47FP14, 48FP14, 49FP14, 50FP14, 51FP14, 52FP14
Сорт Николаевский (2014) – 35,6%	50,0	27-34+	53FP14, 54FP14, 55FP14, 56FP14, 57FP14, 58FP14, 59FP14, 60FP14, 61FP14, 62FP14, 63FP14, 64FP14, 65FP14, 66FP14, 67FP14
ЗБС (2015) – 64%	23	67+	100FP15, 101FP15, 102FP15, 103FP15, 104FP15, 105FP15, 106FP15
ЗБС, пойма (2017) – 89,8%	80	90+	235FP17, 236FP17, 237FP17, 238FP17, 239FP17, 240FP17, 241FP17, 242FP17, 243FP17, 244FP17, 245FP17, 246FP17, 247FP17, 248FP17, 249FP17, 250FP17, 251FP17, 252FP17, 253FP17, 254FP17, 255FP17, 256FP17
Festuca gigantea			
ЗБС, Танковая дорога (2013) – 74,5%	6,67	151	84FG13, 85FG13
ЗБС, 7 квартал (2014) – 100%	53,3	34+	68FG14, 69FG14, 70FG14, 71FG14, 72FG14, 73FG14, 74FG14, 75FG14, 76FG14,

Происхождение образца (год сбора) – Зараженность, %	**Успешность выделения, %****	**Срок инкубации, сут.**	**Перечень изолятов*****
			77FG14, 78FG14, 79FG14, 80FG14, 81FG14, 82FG14, 83FG14
ЗБС, 7 квартал (2015) – 100%	50	83+	107FG15, 108FG15, 109FG15, 110FG15, 111FG15, 112FG15, 113FG15, 114FG15, 115FG15, 116FG15, 117FG15, 118FG15, 119FG15, 120FG15, 121FG15
ЗБС, 7 квартал (2017) – 100%	66	90+	213FG17, 214FG17, 215FG17, 216FG17, 217FG17, 218FG17, 219FG17, 220FG17, 221FG17, 222FG17, 223FG17, 224FG17, 225FG17, 226FG17, 227FG17, 228FG17, 229FG17, 230FG17, 231FG17, 232FG17
Festuca arundinacea			
ЗБС, пойма (2015) – 100%	43	95+	200FA17, 201FA17, 202FA17, 203FA17, 204FA17, 205FA17, 206FA17, 207FA17, 208FA17, 209FA17, 210FA17, 211FA17, 212FA17
Lolium perenne			
Газон у Биологического факультета (2018) – 21,1%	26	75+	257LP18, 258LP18, 259LP18, 260LP18, 261LP18, 262LP18, 263LP18, 264LP18
Elymus caninus			
ЗБС (2014) – 41,9%	40,0	27-48+	86EC14, 87EC14, 88EC14, 89EC14, 90EC14, 91EC14, 92EC14, 93EC14, 94EC14, 95EC14, 96EC14, 97EC14

*Образцы семян, для которых показано наличие инфекции, но выделения не произошло за год инкубации, не включены в таблицу.

**Процент высчитывали как количество случаев выделения относительно общего числа поставленных на выделение семян (30 штук).

***В названиях формата «108FG15StEF» сначала указан порядковый номер, затем аббревиатура названия растения-хозяина и год сбора материала – этот индекс постоянен для каждого изолята. Буквами, стоящими после индекса, указана характеристика гриба (наличие/отсутствие спороношений, и/или название рода/вида), которая используется для удобства исследователя и местами может опускаться

Таким образом, всего за время работы было получено 203 изолята, 200 из которых получены из дикорастущих и сортовых образцов семян, 2 – из стром *Epichloë typhina*, а 1 – из листового влагалища. За счет части из них была создана ценная коллекция эндофитных грибов на кафедре микологии и альгологии

биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Она поддерживается на чашках Петри с КГА, пробирках со скошенным агаром, колбах с зернами пшеницы, а также заложена на длительное хранение в морозильной камере при –70°С с глицерином в качестве криопротектора.

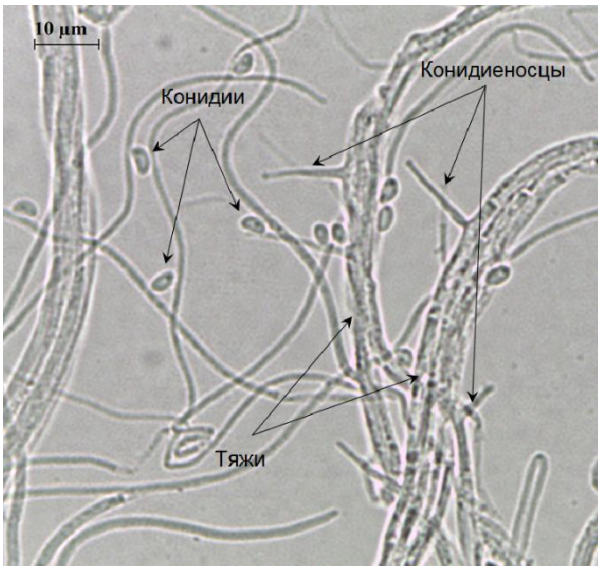
3.3. Видовой состав полученных изолятов и их характеристика

Клавиципитальные эндофиты, выделенные нами в ходе работы, характеризуются крайне бедной макро- и микроморфологией, к тому же, подавляющее большинство полученных изолятов представляет собой стерильный мицелий, не формирующий спороношений, поэтому видовая идентификация классическими методами сильно затруднена и часто бывает ошибочной, или же вообще невозможна.

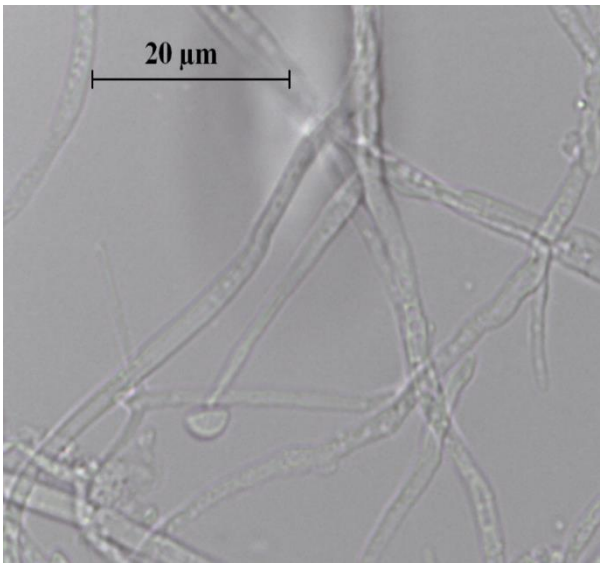
При изучении выделенных изолятов с помощью световой и сканирующей микроскопии наличие конидиального спороношения в культуре было отмечено у 26-ти изолятов (28FP13, 30FP13, 32FP13, 4FP13, 7FP13, 8FP13, 16FP13, 18FP13, 23FP13, 62FP14, 49FP14, Речс-1/2, выделенные из овсяницы луговой; 68FG14, 70FG14, 78FG14, 220FG15, 121FG15, выделенные из овсяницы гигантской; 86EC14, 87EC14, 88EC14, 90EC14, 91EC14, 94EC14, 96EC14, выделенные их пырейника собачьего, а также 98DG15ET и 99DG16ET, полученные из стром). Остальные культуры представляют собой стерильный мицелий. Попытки индуцировать у них конидиогенез не увенчались успехом, кроме того, отмечено, что изоляты, способные формировать спороношение после выделения в чистую культуру, со временем при частых пересевах могли терять эту способность.

Микроморфология 19-ти из полученных нами спороносящих культур (28FP13, 30FP13, 32FP13, 4FP13, 7FP13, 8FP13, 16FP13, 18FP13, 23FP13, 68FG14, 70FG14, 78FG14, 121FG15, 86EC14, 87EC14, 90EC14, 91EC14, 96EC14, Речс-1/2) более-менее одинакова. При микроскопировании препаратов обнаруживается типичный септированный мицелий 1,5–2,5 мкм шириной, который имеет тенденцию к объединению в тяжи по 4-6 и более гиф. Фиалиды, в случае их

наличия, образуются как на одиночных гифах, так и на тяжах, чаще одиночно. Септа при основании, как правило, отсутствует, в большинстве случаев отмечено наличие латеральной септы. Фиалиды конусовидной формы у основания (1,5-2 мкм в ширину) к вершине сужаются до 0,5-1 мкм; от 9 до 29 мкм в длину. Конидии полулунные, иногда почти почковидные, но с более-менее суженными концами, размером 3,8-5 мкм в длину и 2-2,5 мкм в ширину (рис. 11, А и Б; 12, А, Б и В).



А



Б

Рис. 11. *Epichloë festucae* (СМ). А – изолят 8FP13, конидиеносцы, отходящие от гифальных тяжей и скопление конидий; Б – конидиеносец, отходящий от небольшого тяжа из двух гиф

Сканирующая электронная микроскопия показала также наличие вегетативного мицелия необычной морфологии у стерильного штамма УФЛ-3, выделенного из влагалища листа. Он представляет собой утолщенные, четковидно вздутые гифы с более укороченными, по сравнению с нормальными, клетками. Подобные вздутия на мицелии напоминают хламидоспоры (рис. 12, Г). Такой же тип мицелия обнаруживается у других изолятов эндофитных грибов при исследовании их под световым микроскопом. Вероятно, при росте в культуре гриб с помощью данных структур размножается вегетативно.

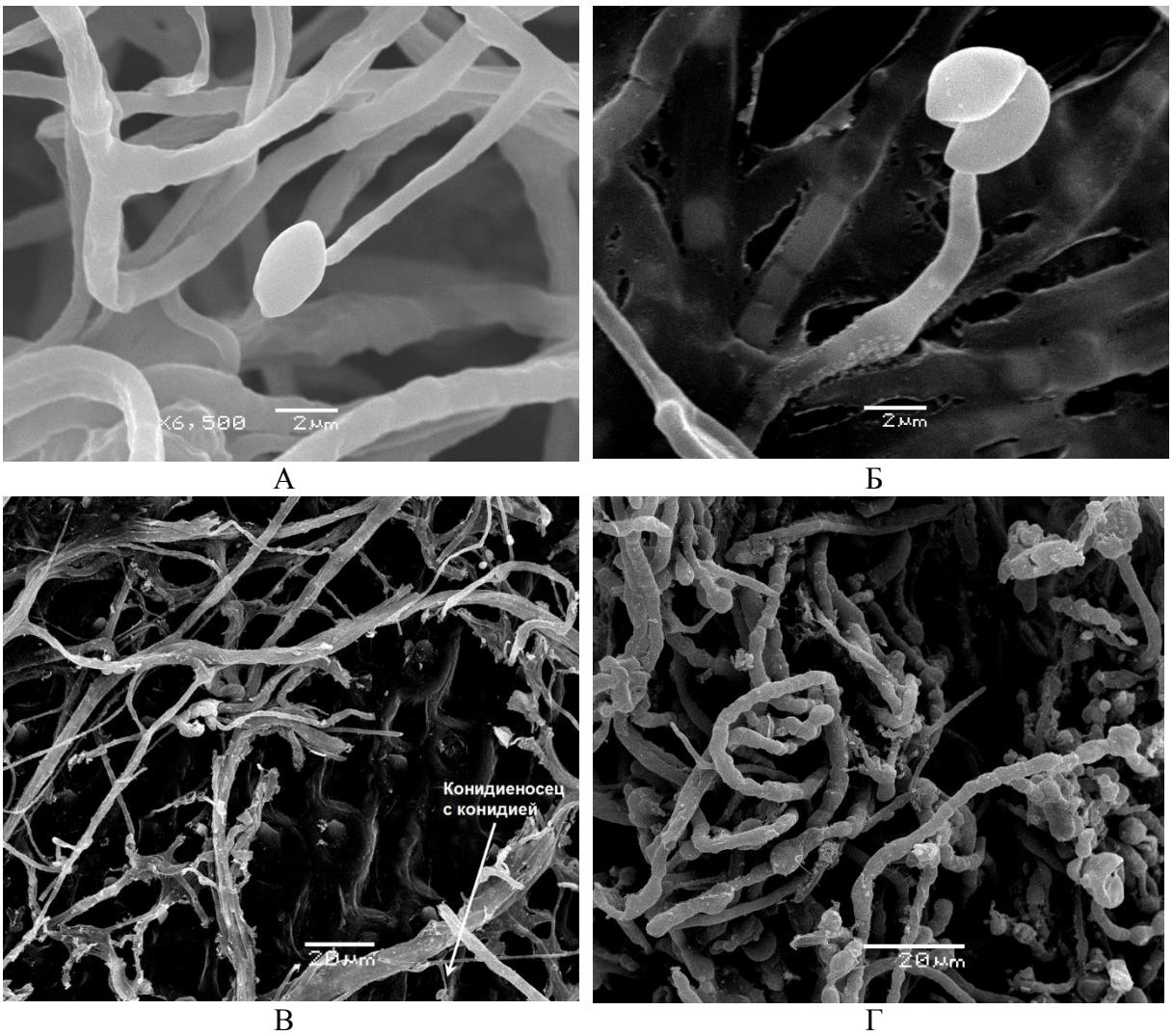


Рис. 12. Микроморфология эндофитных грибов (СЭМ): А – отходящий от одиночной гифы конидиеносец с конидией; Б – конидиеносец с конидиями, изолят 8FP13; В – общий вид мицелия на фоне оболочки семени, изолят Речс-1/2; Г – стерильный мицелий, изолят УФЛ-3

По морфологическим признакам, а также размеру конидий данные 19 изолятов, 10 из которых получены от овсяницы луговой, 4 – от овсяницы гигантской и, наконец, 5 – от пырейника собачьего, оказываются наиболее близки виду *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel (сравнительная характеристика размеров конидий наиболее близких к нашим изолятам видов эндофитов приведена в табл. 11). Данный вид исходно описан на овсянице красной, но также может заселять и другие виды рода *Festuca* s.l. При заселении овсяницы красной эндофит обычно формирует стромы, а на других хозяевах он распространяется вертикально через семена (Leuchtmann et al., 1994). Ранее этот

вид в России не был обнаружен, как и случаи колонизации им овсяницы гигантской и пырейника собачьего. Для овсяницы луговой на территории Москвы и области ранее была известна только *Epichloë uncinata*, типичная для данного растения-хозяина (Благовещенская, 2006), и именно к этому виду относятся 2 других изолята, выделенных нами из овсяницы луговой (62FP14 и 49FP14).

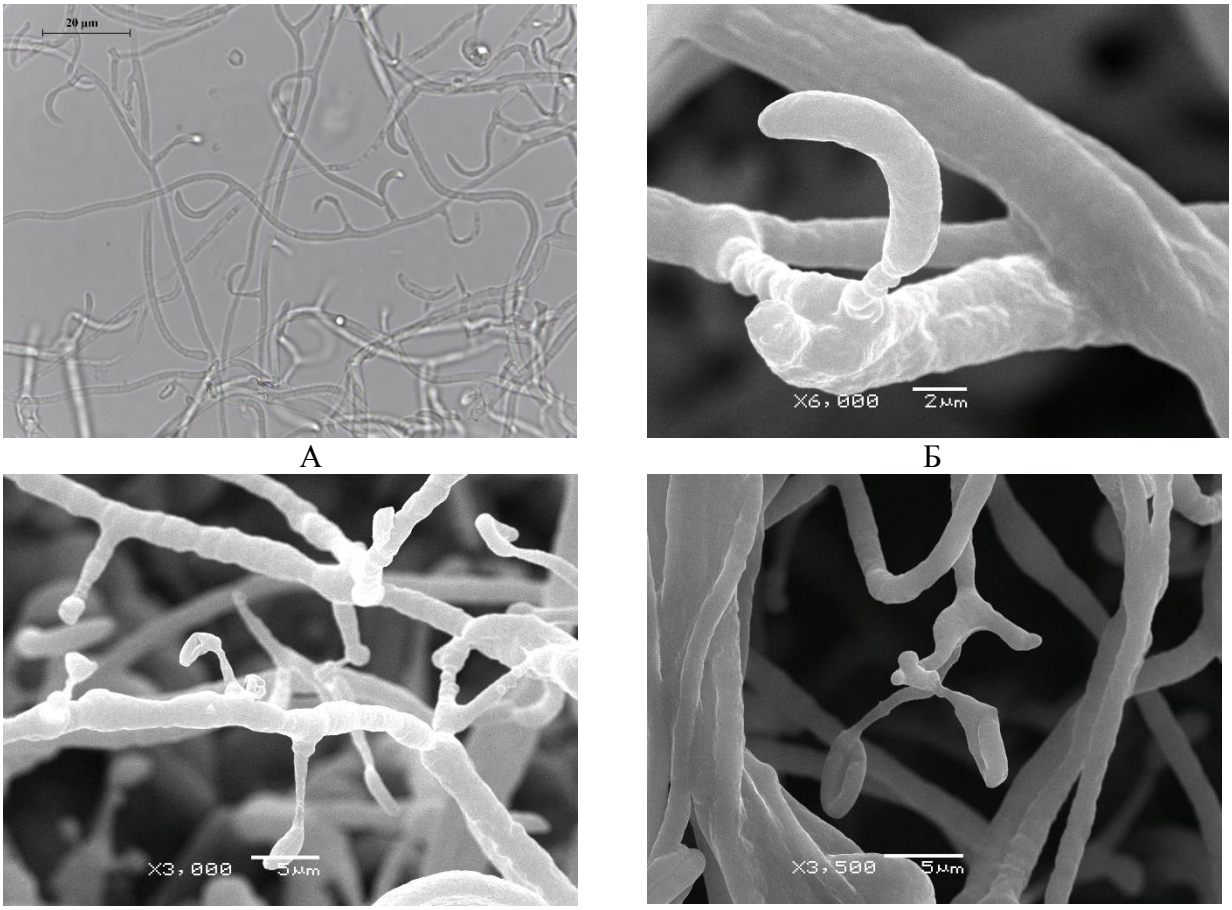
Таблица 11

Размеры конидий некоторых видов *Neotyphodium* и *Epichloë*

Вид эндофита/Название изолята	**Размер конидий, мкм**	**Литературный источник**
28FP13, 30FP13, 32FP13, 4FP13, 7FP13, 8FP13, 16FP13, 18FP13, 23FP13, 68FG14, 70FG14, 78FG14, 121FG15, 86EC14, 87EC14, 90EC14, 91EC14, 96EC14, Речс-1/2	3,8-4,8x2-2,5	
Epichloë festucae	4,1-5,3x1,9-2,5	Leuchtmann et al., 1994
Neotyphodium typhinum	4,5-7x2-3	Morgan-Jones, Gams, 1982
Neotyphodium gansuense	3,8-5x2,5-3,8	Schardl, 2001
Neotyphodium lolii	4,7-7x1,9-2,5	Latch et al., 1984
Neotyphodium tembladerae	4-10x2-4	Moon et al., 2002

Изоляты 62FP14 и 49FP14, которые отнесены к виду *Epichloë uncinata*, имеют типичный септированный мицелий диаметром 1,3 – 2,4 мкм, который зачастую агрегируется в тяжи из 2 – 4-х и более гиф, причем местами встречаются более крупные по сравнению с обычным мицелием четковидно вздутые участки, напоминающие хламидоспоры. Фиалиды отходят как от одиночных гиф, так и от тяжей. Септа при основании, как правило, отсутствует, иногда встречаются латеральные септы. Фиалиды от 5 до 35 мкм в длину, слегка расширенные при основании (до 2,5 мкм), к вершине суживаются до 0,6 – 1,5 мкм. Довольно часто встречаются различные пролиферации фиалид (рис. 13, Г). В разной степени изогнутые, вытянутые конидии (1,8 – 3,1 х 5,0 – 16 мкм) в

зрелом состоянии располагаются перпендикулярно оси фиалиды (рис. 13, А, Б и В).



А Б

В Г

Рис. 13. *Epichloë uncinata* (=*Neotyphodium uncinatum*). А – изолят 62FP14, фиалиды с конидиями на гифах (СМ); Б – фиалида с конидией, изолят 62FP14 (СЭМ); В – фиалиды с конидиями на мицелии, изолят 62FP14 (СЭМ); Г – пролиферации фиалид, изолят 49FP14 (СЭМ)

Так как большая часть полученных изолятов не формирует спороношения, далее работу по их идентификации вели с помощью молекулярно-генетических методов (табл. 12).

Таблица 12

Видовая идентификация эндофитных грибов коллекции на основании последовательностей ITS рДНК

Изолят	**№ последовательности из GenBank с наибольшим сходством**	**Процент совпадения, %**	**Результат идентификации**
4FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
6FP13	CP031388.1	99	*Epichloë festucae*
11FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*

Изолят	**№ последовательности из GenBank с наибольшим сходством**	**Процент совпадения, %**	**Результат идентификации**
15FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
16FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
21FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
25FP13	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
234FP17	JQ417288.1	95	*Tricladium* sp.
236FP17	JQ417289.1	96	*Tricladium* sp.
240FP17	JQ417289.1	97	*Tricladium* sp.
248FP17	JQ417289.1	98	*Tricladium* sp.
252FP17	JQ417289.1	96	*Tricladium* sp.
78FG14	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
82FG14	JQ417289.1	95	*Tricladium* sp.
108FG15	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
110FG15	CP031388.1	99	*Epichloë festucae*
113FG15	CP031388.1	99	*Epichloë festucae*
114FG15	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
120FG15	CP031388.1	100	*Epichloë festucae*
121FG15	CP031388.1	99	*Epichloë festucae*
215FG17	JQ417288.1	96	*Tricladium* sp.
224FG17	JQ417288.1	96	*Tricladium* sp.
232FG17	JQ417288.1	95	*Tricladium* sp.
201FA17	JQ417288.1	96	*Tricladium* sp.
88EC14	AB237147.1	99	*Neotyphodium occultans*
89EC14	AB237147.1	99	*Neotyphodium occultans*
92EC14	AB237147.1	99	*Neotyphodium occultans*
94EC14	AB237147.1	99	*Neotyphodium occultans*

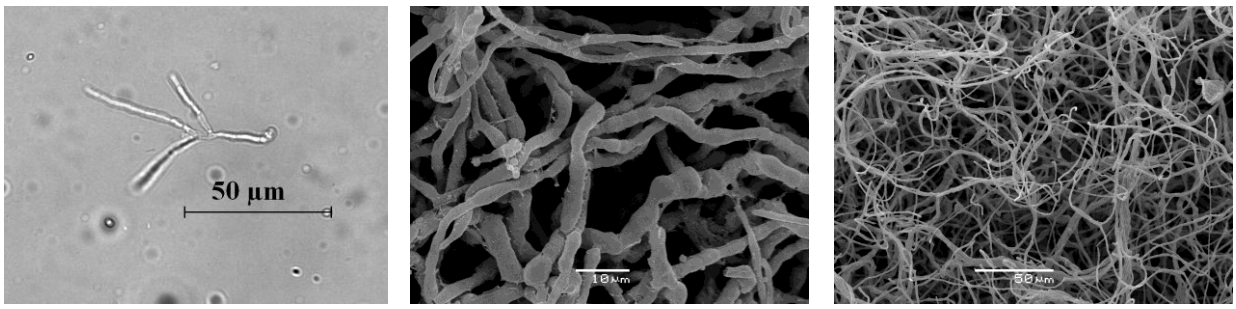
По анализу ITS 14 изолятов, выделенных из овсяницы гигантской и овсяницы луговой, оказались наиболее близки виду *Epichloë festucae*, что подтвердило правильность идентификации с помощью микроскопии для некоторых из образцов. 4 изолята из пырейника собачьего отнесены к виду *Epichloë occultans*, что является первыми случаями обнаружения данного вида на территории России.

Интересно, что 10 изолятов по гомологии с последовательностями ITS рДНК, депонированными в GenBank, оказались наиболее близки к роду *Tricladium* (Ascomycota, Pezizomycotina, Leotiomycetes, Leotiomycetidae, Helotiales, Helotiaceae) – известному представителю так называемых водно-воздушных гифомицетов, или ингольдовых грибов (Ingold, 1975). Ингольдовы

грибы – широко известные водные сапротрофы, развивающиеся на растительных остатках, часть жизненного цикла которых, предположительно, проходит в наземных местообитаниях в ассоциациях с сосудистыми растениями (Jones, Oliver, 1964; Kane et al., 2002). К настоящему времени уже было показано, что ингольдовы грибы способны эндофитно развиваться в корнях ряда растений околоводных местообитаний, что отчасти подтверждает эту гипотезу (Fisher et al., 1991; Paul et al., 2007).

Однако в нашем случае изоляты были получены из поверхностно стерилизованных семян, и упоминаний о подобных случаях в литературе не обнаружено. Кроме того, тот факт, что выделение происходило неоднократно при обработке разных образцов различных видов растений (*Festuca arundinacea, Festuca gigantea, Festuca pratensis*), также снижает вероятность того, что это случайная поверхностная инфекция.

В культуре имеющиеся у нас изоляты формируют мицелий, неотличимый по своей морфологии от типичного септированного мицелия клавиципитального эндофитного гриба. Имеется несколько типов гиф: одни стандартного вида с вытянутыми клетками шириной 1,4–2,5 мкм, объединяемые слизью в тяжи, а другие – с укороченными клетками, плотно скрученные и несущие структуры, напоминающие хламидоспоры. Для некоторых изолятов показано отложение меланина в клеточной стенке. Ни один из наших изолятов, идентифицированных как *Tricladium,* не образует спороношений. Попытки индуцировать конидиогенез воздействием УФ, низкими и высокими температурами, культивированием на различных средах, а также инкубацией изолятов на дробно простерилизованных перезимовавших листьях деревьев во влажных камерах в стационарном состоянии (рис. 14, Б, В) и на качалке, не увенчались успехом. При анализе воды из колб, крайне редко встречались разветвленные структуры, похожие внешне на конидии (рис. 14, А), но действительно ли это они – достоверно сказать нельзя.



А Б В

Рис. 14. *Tricladium* sp. (изолят). А – разветвленная структура, напоминающая конидии из колбы со стерильными листьями; Б – вздутые гифы 201FA17 на поверхности листа из стационарной влажной камеры; В – воздушный мицелий, развившийся на поверхности листа из стационарной влажной камеры

Отдельно стоит отменить находку, сделанную при изучении ультраструктуры мицелия одного из изолятов *Epichloë* sp. с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. У данного изолята гифы имели типичные для аскомицетов септы с центральной порой, рядом с которыми расположены тельца Воронина (рис. 15, А). Причем в некоторых случаях видно, что одно из телец Воронина полностью перекрывает пору в септе (рис. 15, Б). Подобного рода пробки, формируемые тельцами Воронина, обычно связывают с защитным механизмом, препятствующим вытеканию цитоплазмы при повреждении клетки гифы (Markham, Collinge, 1987; Steinberg et al., 2017). Тем не менее, подобного рода пробки могут быть и временным явлением, связанным с теми или иными физиологическими процессами, протекающими в грибной клетке. Во всяком случае, в пользу подобной возможности говорит то, что в данном конкретном случае ни одна из клеток гифы не имеет видимых признаков повреждений.

Однако, кроме обычных поровых контактов, между клетками одной гифы было обнаружено поровое соединение между коллатерально расположенными гифами (рис. 15, В).

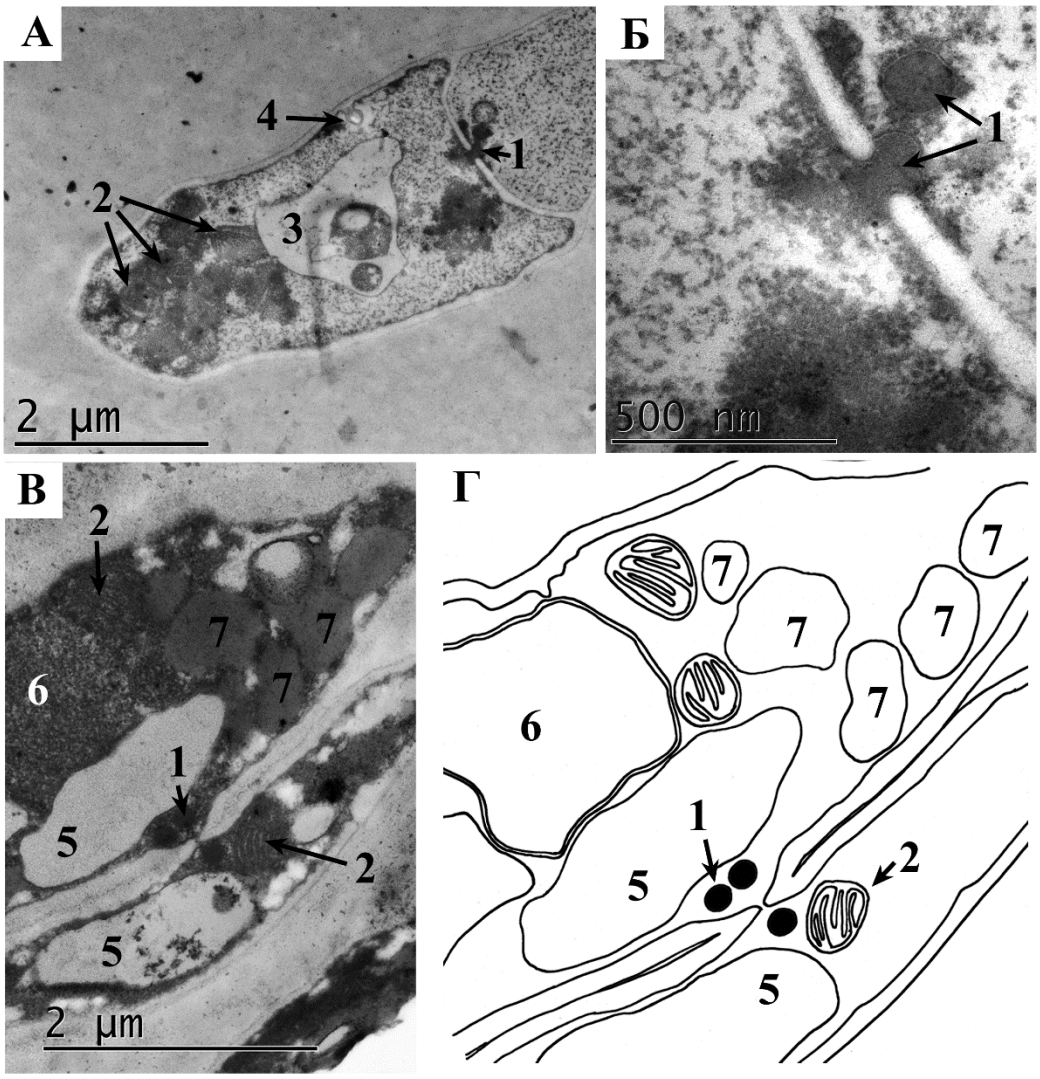


Рисунок 15. Поровые контакты между клетками *Epichloë* sp. А - фрагмент гифы; Б - септа с центральной порой, закрытой тельцем Воронина; В - две коллатеральные гифы с поровым контактом; Г - схема порового контакта между коллатеральными гифами. Пояснения. 1 – тельца Воронина; 2 – митохондрии; 3 – поздняя эндосома; 4 – активный эндоцитоз (инвагинация плазмалеммы); 5 – вакуоли; 6 – ядро; 7 – липидные капли

На фотографии видны две гифы разного диаметра, что достаточно характерно для штаммов эндофитных грибов при росте в культуре. Несмотря на то что их клеточные стенки непосредственно контактируют, здесь мы не видим формирования анастомоза, представляющего собой результат соединения участков гиф, растущих апикально. Для эндофитов характерно формирование тяжей, включающих от трех до десяти и более гиф, часто соединенных внеклеточным слизистым материалом, так что подобное расположение нитей мицелия достаточно обычно. При этом срез прошел через участок, на котором видно резкое соединение двух клеточных стенок в одну, вплоть до образования

поры. То, что это именно поровый контакт, подтверждается наличием трех телец Воронина в данном месте. Тем самым, данные параллельно расположенные гифы имеют единое цитоплазматическое пространство, что изображено на схеме (рис. 15, Г). Возможно, что подобные вторичные поровые контакты могут образовываться и у других грибов, особенно у видов, формирующих мицелиальные тяжи. Но также возможно, что подобного рода вторичное поровое соединение характерно именно для эндофитных грибов, так как эндофиты на настоящий момент времени являются единственной группой, для которых экспериментально подтверждена возможность интеркалярного роста гиф (Christensen et al., 2008), которая ранее была постулирована только теоретически (Hesse et al., 2004), в противоположность строго апикальному росту, характерному для всех мицелиальных грибов. Поскольку способность к интеркалярному росту подразумевает способность к временному изменению структуры уже сформированной клеточной стенки, то ожидаемо, что у грибов с подобной способностью при плотном контакте двух гиф возможно формирование поры между ними.

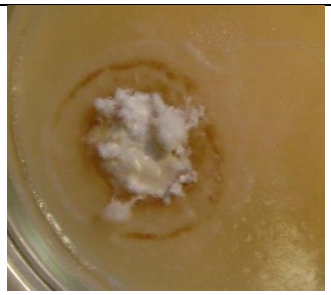
Таким образом, нами было обнаружено, что клавиципитальные грибы способны формировать поровый контакт между рядом расположенными гифами вегетативного мицелия без образования специальных анастомозов. Данное явление является новым для царства Грибов и может быть характерной особенностью узкой таксономической группы эпихлоидных эндофитов. С другой стороны, возможно, что данное явление встречается у гораздо большего числа таксонов, и не было описано ранее из-за того, что изучение строения грибных гиф является сложным и трудоемким процессом, занимающим длительное время, а прохождение среза через подобный поровый контакт, даже если он присутствует в образце, имеет крайне низкую вероятность.

Что касается макроморфологии, то в целом, среди всех выделенных нами изолятов эндофитных грибов можно выделить 12 морфотипов. Далее представлена таблица, в которой приведено описание каждого из них, фото наиболее характерной колонии, а также перечислены названия штаммов (как спороносящих, так и стерильных), которым присущ данный морфотип (табл. 13).

Таблица 13

Морфотипы колоний выделенных эндофитных грибов

№	Фотография	Описание	Штаммы
1		Колония белая в центре, к периферии становится кремового оттенка; поверхность морщинистая; выделяется зона с воздушным мицелием (короткий, бархатистый) и зона субстратного роста; почти не тяжистая, наличие экссудата не отмечено; реверс темно-бежевого цвета; колония очень плотная. Очень медленный рост	УФЛ-3 (на фото); 64FP14; 57FP14; 55FP14; 54FP14; 53FP14; 264LP18; 263LP18; 262LP18; 261LP18; 260LP18; 259LP18; 257LP18
2		Колония белая в центральной части, где есть войлочный воздушный мицелий, при переходе к субстратному росту – кремовая (темнее у края зоны с воздушным мицелием и светлее к периферии); субстратный мицелий формирует тяжи; экссудата нет; реверс колонии темно-бежевый; колония очень плотная	2FP13 (на фото); Выс-1/3; Выс-3/1; Выс-3/2; Выс-4/1
3		Колония с белым очень коротким и плохо развитым воздушным мицелием, похожим на крупную муку, под ним зона коричневого субстратного мицелия, переходящая в кремово-белые субстратные тяжи, край колонии неясных очертаний; реверс коричневый; экссудата нет; очень плотная колония	72FG14; 56FP14; 225FG17; 217FG17; 16FP13 (на фото); 121FG15
4		Колония белая, воздушный мицелий бархатистый, плотный, слегка комковатый; колония не зональная с слегка зубчатым краем, не тяжистая; реверс темно-бежевый; экссудата нет	230FG17; 231FG17; 245FP17; 247FP17; 27FP13; Филс-4/1; Филс-6/1; Филс-7/1; Филс-8/1; Филс-9/1; Цс-1/2; Цс-10/2; Цс-10/3; Цс-3/1; Цс-3/4 (на фото); Цс-7/1

№	Фотография	Описание	Штаммы
5		Колония белая в зоне ватообразного, но очень плотного воздушного мицелия, по периферии в зоне субстратного роста несколько концентрических коричневых окружностей, край колонии светло-кремовый, нечетких очертаний (рост глубоко в субстрате, плотный); поверхность гладкая; не тяжистая, реверс темно-бежевый, экссудата нет	8FP13 (на фото); 10FP13; 12FP13; 13FP13; Прос-4/1; Прос-8/2; Прос-9/2; 15FP13
6		Колония белая, плотный воздушный подушковидный мицелий, на периферии переходит в кремовый с желтоватым оттенком субстратный мицелий, очертания колонии нечеткие; поверхность гладкая, в глубине субстрата не образует тяжей; реверс бежевый; экссудата нет	1FP13; 3FP13; 5FP13; 6FP13; 7FP13; 18FP13; 19FP13; 23FP13 (на фото); 28FP13; 30FP13; 31FP13; 32FP13; 37FP14; 38FP14; 39FP14; 47FP14; 48FP14; 49FP14; 62FP14; 63FP14; 66FP14; 67FP14; 69FG14; 79FG14; 81FG14; 82FG14; 100FP15; 101FP15; 102FP15; 103FP15; 104FP15; 105FP15; 106FP15; 110FG15; 251FP17
7		Колония белая в зоне комковатого воздушного мицелия, по периферии в зоне субстратного роста одна (или более) концентрическая коричневая окружность, край колонии светло-кремового цвета и нечетких очертаний (рост глубоко в субстрате); реверс темно-бежевый, экссудата нет; колония очень плотная в зоне субстратного роста	11FP13 (на фото); 14FP13; 20FP13; 21FP13; 22FP13; 24FP13; 25FP13; 26FP13; Реч-6/1; Речс-1/2
8		Колония плотная, белая, поверхность колонии слегка зернистая; хорошо развитый воздушный мицелий в центре колонии, край более тонкий, четкий; реверс кремового цвета; экссудата нет	84FG13; 85FG13; 86EC14; 87EC14; 88EC14 (на фото); 89EC14; 90EC14; 91EC14; 95EC14; 96EC14; 97EC14; 220FG17

№	Фотография	Описание	Штаммы
9		Колония белая, плотный воздушный подушковидный мицелий, четкие очертания колонии; поверхность гладкая, в разной степени волнистая; реверс желтовато-бежевый, у некоторых - темный; экссудата нет	34FP14; 35FP14; 36FP14; 40FP14; 41FP14; 42FP14; 43FP14; 44FP14; 45FP14; 46FP14 (на фото); 50FP14; 51FP14; 52FP14; 58FP14; 59FP14; 60FP14; 61FP14; 65FP14; 200FA17; 201FA17; 202FA17; 204FA17; 206FA17; 207FA17; 208FA17; 210FA17; 211FA17; 212FA17; 237FP17; 238FP17; 239FP17; 242FP17; 243FP17; 244FP17; 246FP17; 256FP17; 240FP17;
10		Белый воздушный мицелий по центру колонии, по периферии плотный с желтоватым оттенком и слегка мелкозернистой поверхностью; край четкий, но не совсем ровный, реверс коричневатый; экссудата нет	71FG14; 74FG14; 75FG14; 76FG14; 95EC14; 107FG15; 113FG15; 114FG15; 116FG15; 117FG15; 119FG15; 120FG15; 213FG17; 215FG17; 216FG17; 218FG17; 219FG17; 221FG17; 222FG17; 223FG17; 224FG17; 227FG17; 226FG17; 228FG17; 229FG17; 232FG17;
11		Колония белая, плотная по центру, к краю становится рыхлой и тяжистой; поверхность более-менее гладкая; реверс не окрашен или коричнево-желтоватый	68FG14; 70FG14; 73FG14; 77FG14; 203FA17; 205FA17; 209FA17; 234FP17; 235FP17; 236FP17; 241FP17; 248FP17; 249FP17; 250FP17; 252FP17; 253FP17; 254FP17; 255FP17; 258LP18
12		Колония белая, плотная, поверхность клочковатая, к краю становится тонкой, рыхлой и тяжистой; реверс не окрашен или коричнево-желтоватый	4FP13; 9FP13; 17FP13; 78FG14 (на фото); 83FG14; 92EC14; 93EC14; 94EC14; 98DG15ET; 99DG15ET; 108FG15; 109FG15; 111FG15; 112FG15; 115FG15; 118FG15; 214FG17

3.4. Обнаружение эндофитов в растительном материале методом ПЦР

Для проверки принципиальной возможности использования предложенных в литературе праймеров для обнаружения эндофитной инфекции непосредственно в растительном материале (Doss et al., 1998; Dombrowski et al., 2006) первоначальный этап работы был проведен на полученных ранее чистых культурах эндофитных грибов (№№ 1-3, 5-12), стромах *Epichloë typhina* (№13), склероциях *Claviceps purpurea* – близкого родственника клавициипитальных эндофитов (№4), а также на *Alternaria alternata* (№А), взятой в качестве дополнительного контроля (рис. 16).

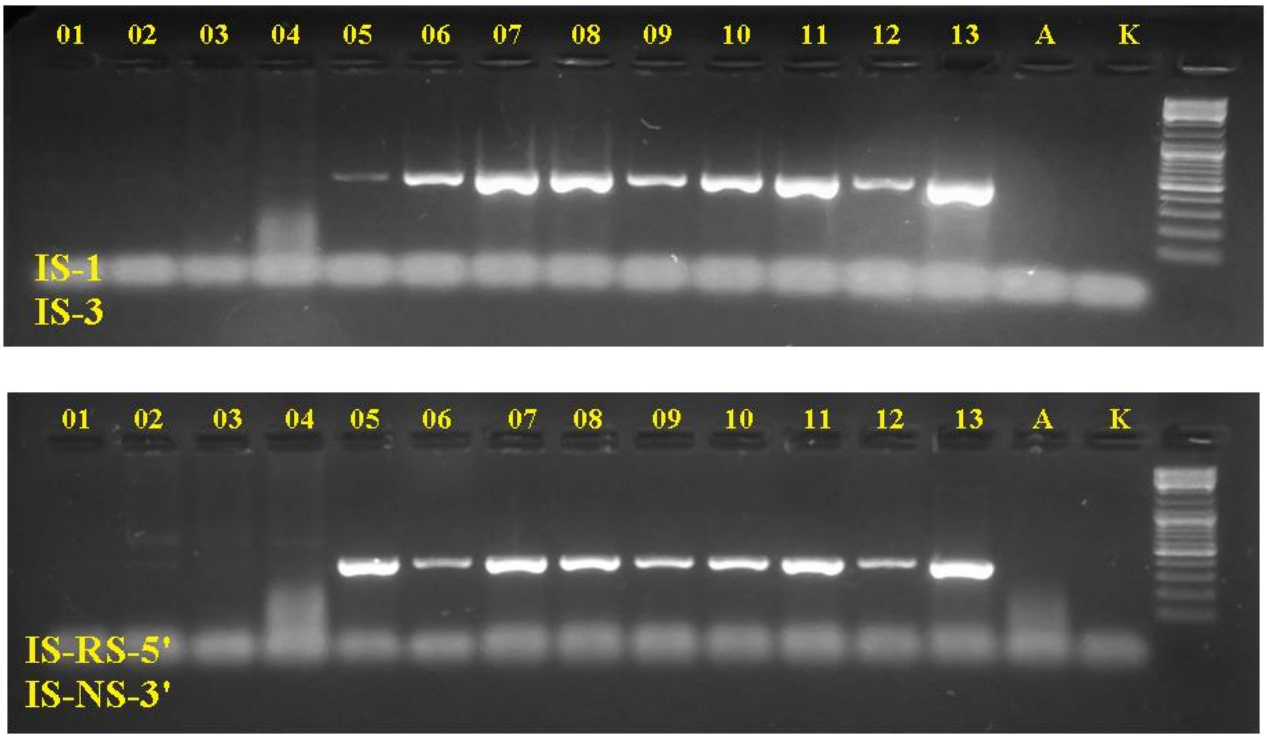
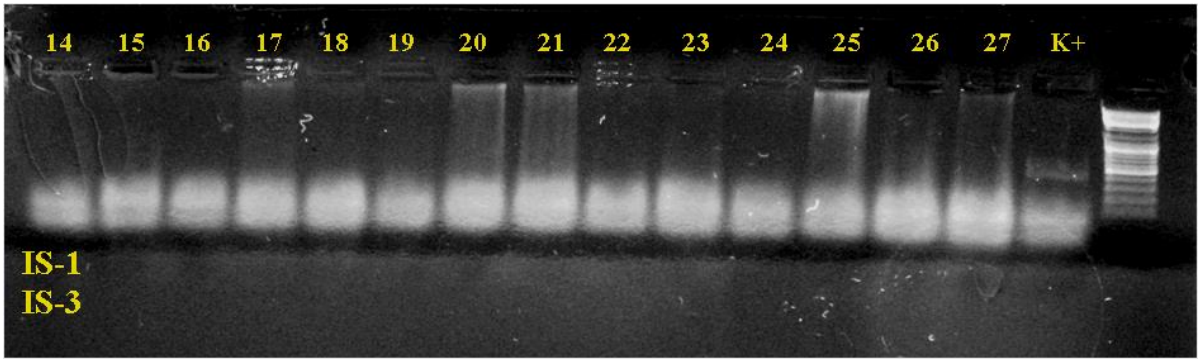


Рис. 16. Электрофореграммы, полученные в результате амплификации ДНК, выделенной из мицелия эндофитных грибов с разными парами праймеров. К – отрицательный контроль. Остальные обозначения лунок см. табл. 5 (Материалы и методы)

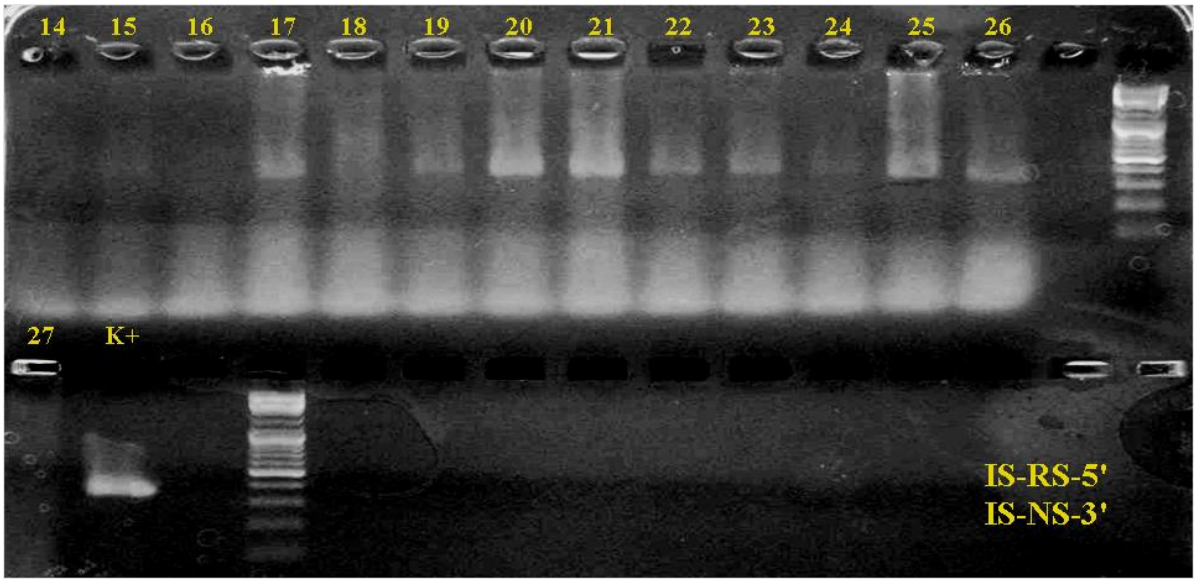
Как можно видеть на электрофореграммах, амплификация ДНК с обеими парами праймеров успешно прошла для изолятов, полученных в 2013-2014 годах и представленных стерильным мицелием, выделенным из *Festuca pratensis* и *F. gigantea*, а также для *Epichloë festucae*. Фрагмент наибольшей интенсивности получился в результате амплификации ДНК, выделенной из стром *Epichloë*

typhina. В случае штаммов эндофитов, выделенных до 2006 года (№№1-3), с праймерами, предложенными в 1998 году, амплификация не прошла, в то время как с праймерами, модифицированными в 2006 году, фрагменты получились низкой интенсивности. К тому же, амплификация была не специфичной, так как видно два бэнда, вместо одного. Причины такого эффекта остаются неясными. Амплификации ДНК *Claviceps purpurea* и *Alternaria alternata*, взятых в виде контроля, не наблюдали ни с одной из пар праймеров, что говорит о специфичности разработанных праймеров к группе клавиципитальных эндофитов. По результатам данного опыта был сделан вывод о принципиальной возможности использования данных праймеров для наших образцов и проведена проверка ДНК, выделенной из различного растительного материала, зараженного и не зараженного эндофитами (табл. 5).

В данном варианте опыта с парой праймеров IS-1/IS-3 амплификация не пошла (рис. 17, А). Единственный интенсивный фрагмент амплифицирован в положительном контроле, который представляет собой результат амплификации ДНК, выделенной непосредственно из мицелия изолята Прос-1/3 (К+). Амплификация ДНК с использованием пары праймеров IS-RS-5’/IS-NS-3’ прошла более успешно (рис. 17, Б): можно увидеть интенсивные бэнды для проростков *Festuca pratensis* (№№ 19, 20) и *F. gigantea* (№21), семян *F. gigantea* 2013 (№ 17) и 2014 (№№ 22-24) года сбора, семян *Elymus caninus* 2014 года (№25) и положительного контроля Прос-1/3 (К+). Однако присутствие эндофита методом ПЦР не обнаружилось в семенах *Festuca pratensis* 2013 года (№14-16), наличие эндофитов в которых было показано классическим методом, причем их зараженность была выше 90%.



А



Б

Рис. 17. Электрофореграммы, полученные в результате амплификации ДНК, выделенной из растительного материала с разными парами праймеров: К+ - положительный контроль (Прос-1/3). Обозначения остальных лунок см. табл. 5

Семена овсяницы гигантской 2014 года со 100% зараженностью, которые подготавливали к выделению ДНК разными способами (вариант без обработки и варианты с вымачиванием в течение суток в воде или 1% растворе щелочи), дали фрагменты разной интенсивности. Если судить по ней, то наиболее эффективным методом работы при выделении ДНК из семян является предварительное их вымачивание в воде, однако если сравнить интенсивность бэнда 23 (семена *F. gigantea*, обработанные водой) с бэндом 21 (проростки *Festuca gigantea*), становится понятно, что работать с проростками лучше, чем с семенами. Возможно, это связано с более тщательным разрушением растительных клеточных стенок проростка при растирании материала в ступке, нежели семени, для которого характерно наличие большого числа плотных

защитных чешуй. Возможно также, что соотношение растительной и грибной ДНК в семени выше, чем в вегетирующих растениях и количество выделяемой грибной ДНК недостаточно для анализа. Однако для того, чтобы делать какие-либо окончательные выводы по этому вопросу, нужны дальнейшие исследования.

Таким образом, праймеры IS-RS-5’/IS-NS-3’ можно рекомендовать для выявления эндофитных грибов в вегетирующих растениях и семенах, но при этом необходимо учитывать, что метод, при меньшей трудоемкости, не дает, однако, 100% надежности результата. Кроме того, необходимо проверить, как будут работать праймеры на образцах с невысоким уровнем зараженности, которые не вошли в данный анализ.

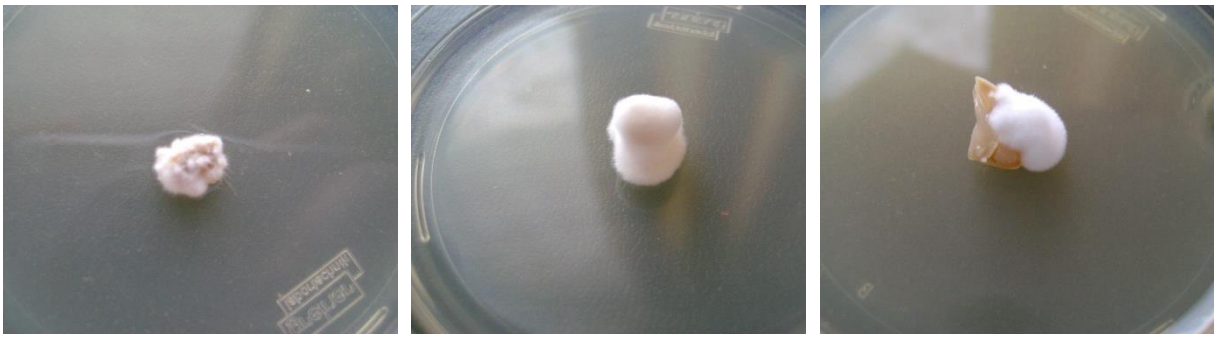
3.5. Влияние состава питательной среды на рост культур эндофитов

При исследовании эндофитных грибов, в основном, предпочтение отдается работе с естественными питательными средами. Однако несмотря на все свои преимущества, они обладают и целым рядом минусов, в частности, приготовленные из естественных субстратов среды характеризуются непостоянством состава, так как накопление в исходном субстрате тех или иных соединений зависит от огромного числа факторов и потенциально неконтролируемо. Следовательно, они являются непригодными для целого ряда экспериментов, например, для изучения физиологии и биохимии. Поэтому было необходимо изучить, как эндофиты реагируют на среды искусственные с постоянным составом.

3.5.1. Сравнение роста эндофитов на естественных и искусственных питательных средах

Штаммы Цс-1/1 и Цс-7/1 не дали роста ни в одной из повторностей. Посевы штаммов Е001, Е003 и Е005 не учитывались в опыте, потому что после месяца инкубации наблюдалось появление белого плотного бархатистого мицелия

только на исходном блоке агара, а переход на новую среду был не более 1 мм (рис. 18).



А Б В

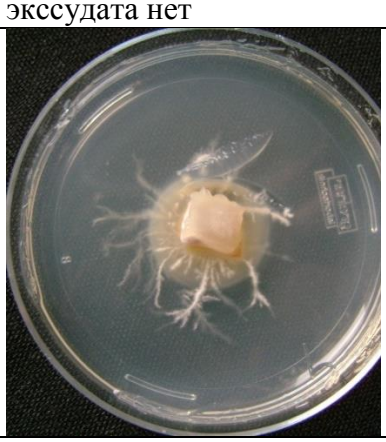
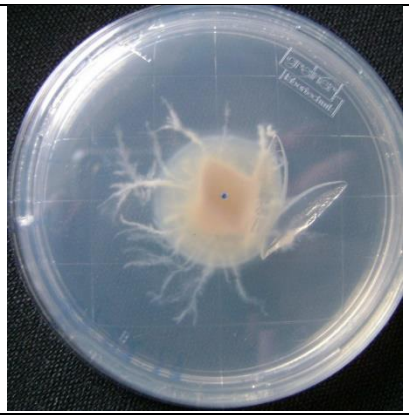
Рис. 18. Колонии штаммов Е001 (А), Е003 (Б), Е005 (В) после месяца инкубации в термостате

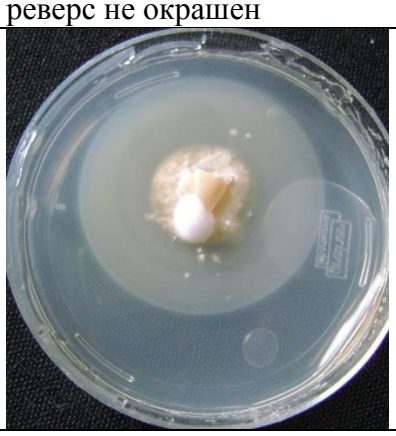
Как и при выделении эндофитного мицелия из семян, в опыте по наблюдению за ростом некоторых штаммов выделилось несколько морфотипов, которые в разной степени представлены у различных изолятов. Далее описаны морфотипы и перечислены штаммы, у которых они наблюдались (табл. 14).

Таблица 14

Морфотипы, выделившиеся при росте изолятов на искусственной и естественной средах

№	Внешний вид колонии	Реверс колонии	Изоляты*
1			Прос-1/1-5, Прос-1/1-6, Прос-2/1-11, Прос-2/1-12, Прос-4/1-9, Прос-8/1-13 (на фото), Прос-9/1-14; Речс-1/1-9, Речс-1/1-10, Речс-1/1-11, Речс-1/1-12, Речс-1/1-13, Речс-1/1-14, Речс-7/1-8, Речс-8/1-5, Речс-8/1-6, Речс-8/1-7; Цс-10/1-10, Цс-10/1-12, Цс-10/1-14
	Морфотип, характерный почти для всех колоний, развивающихся на КГА2. Колония белая, воздушный мицелий пушистый, комковатый, наблюдается широкая зона глубинного роста мицелия в виде белых радиально расходящихся тяжей, к периферии толщина колонии уменьшается; реверс колонии от коричневого в центральной части до светло-кремового на периферии; колонии такого типа характеризуются самой большой скоростью роста; экссудата нет		

№	Внешний вид колонии	Реверс колонии	Изоляты*
2			Прос-2/1-10, Прос-4/1-7, Прос-4/1-8 (на фото)
	Другой морфотип, появившийся на КГА2. Колонии с плохо развитым воздушным мицелием белого цвета (только на изначальном блоке агара), на новую среду переходит в виде тонкой гифальной пленки грязно-белого с легкой желтизной цвета с заметной радиальной исчерченностью; край колонии слегка зубчатый; реверс коричневый под старым блоком агара, на периферии не окрашен; экссудата нет		
3			Прос-1/1-16, Прос-2/1-21, Прос-2/1-22, Прос-4/1-15, Прос-4/1-17; Речс-7/1-15 (на фото), Речс-8/1-17, Речс-8/1-18
	Морфотип, появившийся на СДЭ. Колонии полупрозрачные, воздушный мицелий не развит, в пределах колонии от агарового блока развиваются глубинные светлые тяжи, размер которых варьирует у разных изолятов; реверс не окрашен; экссудата нет		
4			Прос-1/1-18, Прос-2/1-20, Прос-4/1-19 (на фото), Прос-8/1-23; Речс-1/1-16, Речс-1/1-19, Речс-1/1-21, Речс-1/1-19
	Морфотип, который тоже представлен только на СДЭ. Колонии светлые с желтоватым оттенком, воздушный мицелий не развит, субстратный мицелий растет плотно, образуя круг, за пределы которого выходят тяжи, тяжи у разных изолятов развиты в разной степени, варьирует их количество (от 1-2 до неск. десятков), толщина и степень ветвления; реверс не окрашен; экссудата нет		

№	Внешний вид колонии	Реверс колонии	Изоляты*
5			Речс-1/1-20, Речс-1/1-21, Речс-1/1-23 (на фото)
	Морфотип на среде СДЭ. Колонии почти не развиты, представляют собой тонкие пучки гиф, отходящие от агарового блока и от нескольких точек вблизи него; реверс не окрашен		
6			Цс-10/1-15 (на фото)
	Морфотип, обнаруженный только у единственной повторности на СДЭ. Колония в центре на агаровом блоке белая плотная, воздушный мицелий ватообразный, вокруг блока идет зона, на которой есть воздушный мицелий, но развит он в значительно меньшей степени, чем в центре, кроме того, мицелий начинает погружаться в субстрат. Далее следует полупрозрачная зона из тонких, относительно плотно растущих гиф; край колонии ровный; реверс не окрашен, экссудата нет		

*****Число, стоящее после названия изолята, указывает на конкретную повторность (например, в названии Прос-1/1-5 «Прос-1/1» – это название изолята, а «5» - номер чашки, в которой проводили измерения

Дисперсионный анализ показывает, что для линейных размеров колонии определяющим фактором является тип среды. Значимых различий между какими-либо изолятами не выявлено. Возможно, что для выявления подобных различий время инкубации было недостаточным. Во всяком случае, можно сказать, что естественные среды для эндофитных грибов являются более предпочтительными по сравнению с искусственными (рис. 19). Скорость роста мицелия на КГА2 составила 0,95 мм/сут, а то время как на СДЭ она равнялась 0,54 мм/сут.

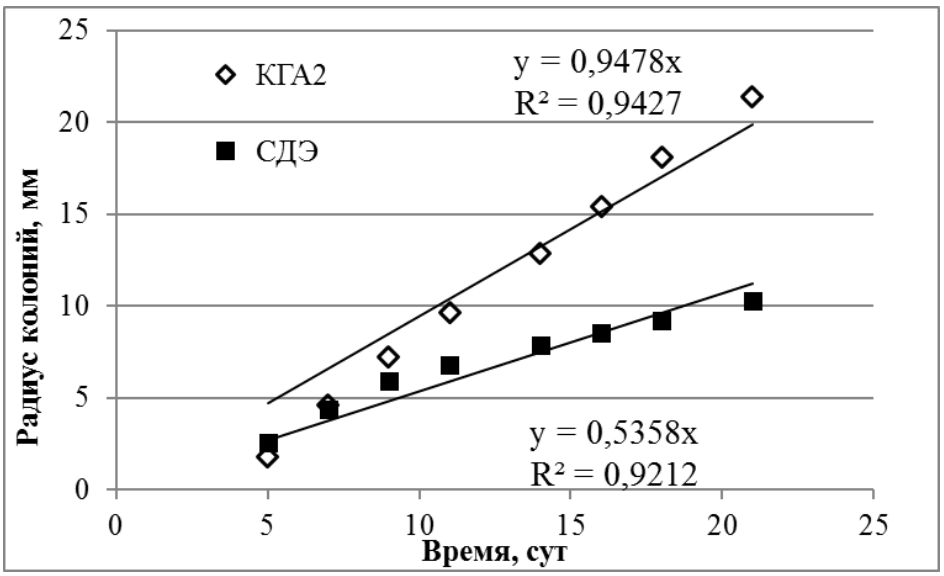


Рис. 19. Динамика роста штаммов на разных средах (усредненные данные)

Результат второго посева, соотносится с первым. Так как проводили его только на КГА2, такого разнообразия морфотипов, как в первом случае, не получилось. Все изоляты, кроме УФЛ-3, выделенного из листового влагалища, характеризовались примерно одинаковой скоростью роста (в среднем 0,9 мм/сут) и тем же морфотипом (морфотип №1 в табл. 13), что и в случае первого посева (рис. 20). Скорость роста изолята УФЛ-3 была значительно ниже, чем у всех остальных: радиус колонии на 42-е сутки составил менее 4 мм. Внешний вид колонии был таким же, как и при выделении из семени (см. табл.13, морфотип №1).

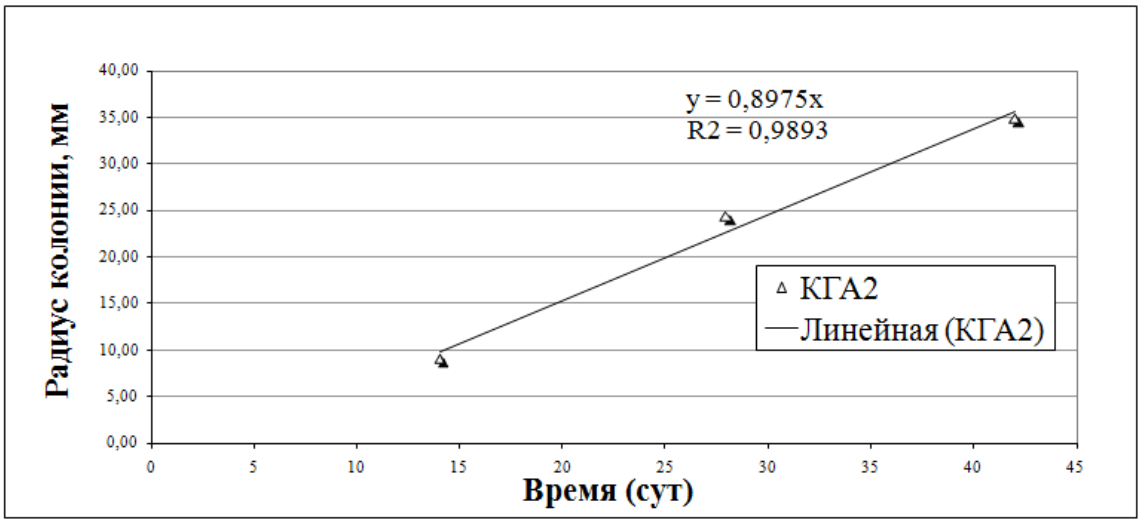
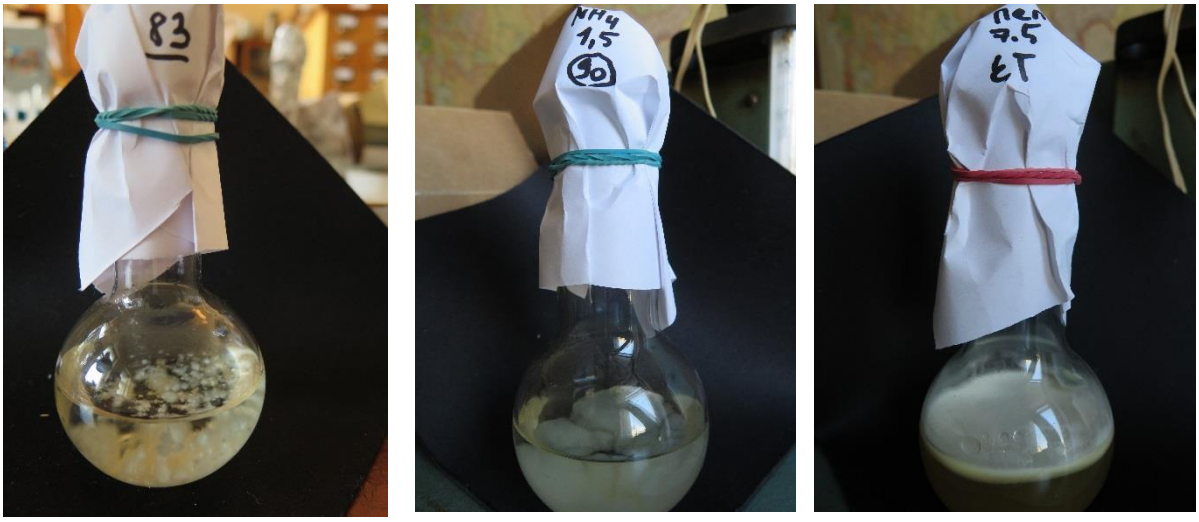


Рис. 20. Динамика роста штаммов на разных средах (усредненные данные по всем изолятам, кроме УФЛ-3)

Таким образом, проведенные посевы показали, что для изолятов, выделенных в нашей работе, минеральная среда СДЭ не рекомендуется. Она способна поддерживать рост колонии, но при этом происходит критическое изменение морфологии гриба. Развитие нормального воздушного мицелия наблюдается только на исходном блоке естественной агаризованной среды (КГА), а в минеральной среде развиваются отдельные тяжи и тонкие поисковые гифы, что обычно случается, когда гриб пытается выйти из зоны с неблагоприятными условиями и найти более подходящий для жизни субстрат.

3.5.2. Влияние азотного питания на рост культур эндофитных грибов

За 1,5 месяца инкубации во всех колбах сформировался мицелий эндофитных грибов, причем изоляты вели себя в жидкой стационарной культуре по-разному (рис. 21).



А Б В

Рис. 21. Примеры морфологии мицелия разных изолятов при росте в жидкой среде. А - изолят 83FG14 при росте в среде с $(NH_4)_2SO_4$ в концентрации 0,75 г/л; Б - 90EC14 при росте в среде с $(NH_4)_2SO_4$ в концентрации 1,5 г/л; В - 99DG16ET при росте в среде с пептоном в концентрации 7,5 г/л

Стерильный изолят 83FG14 развивался в виде множества мелких рыхлых пеллет, в то время как *Epichloë typhina* (99DG16ET) формировала толстую (до 6 мм) мицелиальную подушку на поверхности среды, кроме варианта с пептоном

в концентрации 2,5 г/л, где эндофит развивался в виде крупных и неплотных пеллет с более-менее четкими очертаниями, занимающими большую часть объема среды. Изолят *Epichloë festucae* (90EC14) также имел тенденцию формировать мицелиальный слой на поверхности среды или средней величины пеллеты.

Во всех вариантах опыта при окрашивании мицелия суданом черным обнаруживается большое количество липидов, которые при микроскопировании предстают перед наблюдателем в виде темных сферических тел, взвешенных внутри клеток мицелия (рис. 22, А). Интенсивно окрашиваются также и те изоляты, которые развивались на агаризованной питательной среде. Липидные скопления в больших количествах обнаружены также и при изучении ультратонких срезов образцов мицелия под трансмиссионным электронным микроскопом. Там же хорошо заметны типичные для аскомицетов тельца Воронина, расположенные у поры септы (рис. 22, Г).

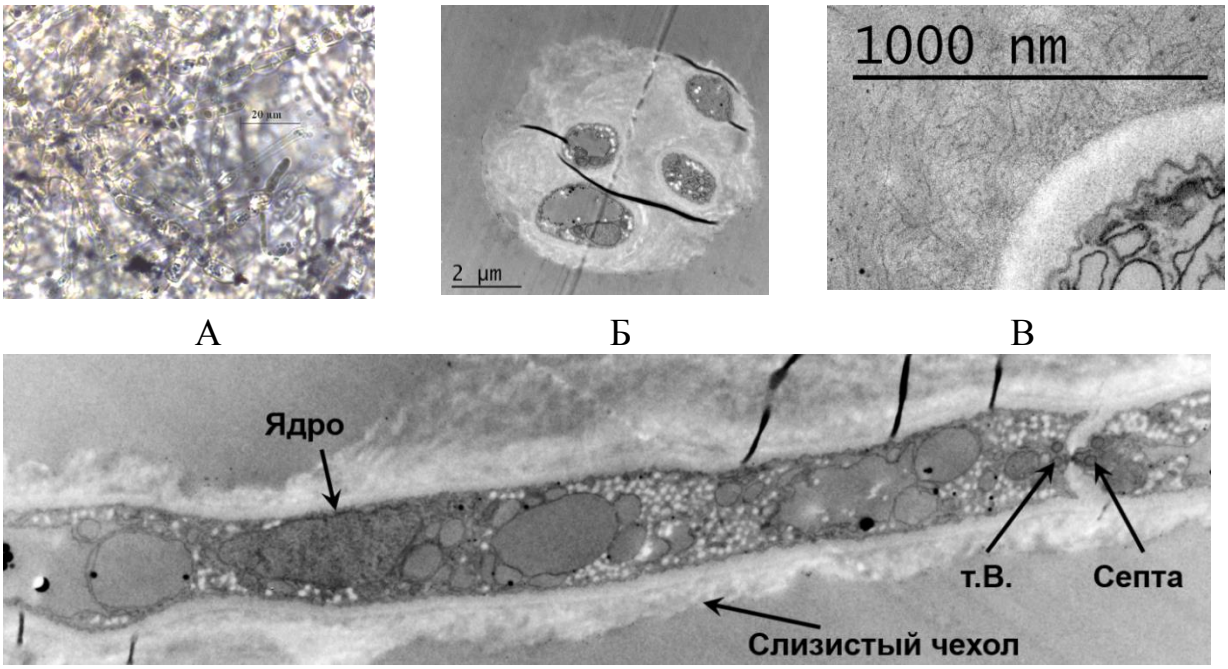
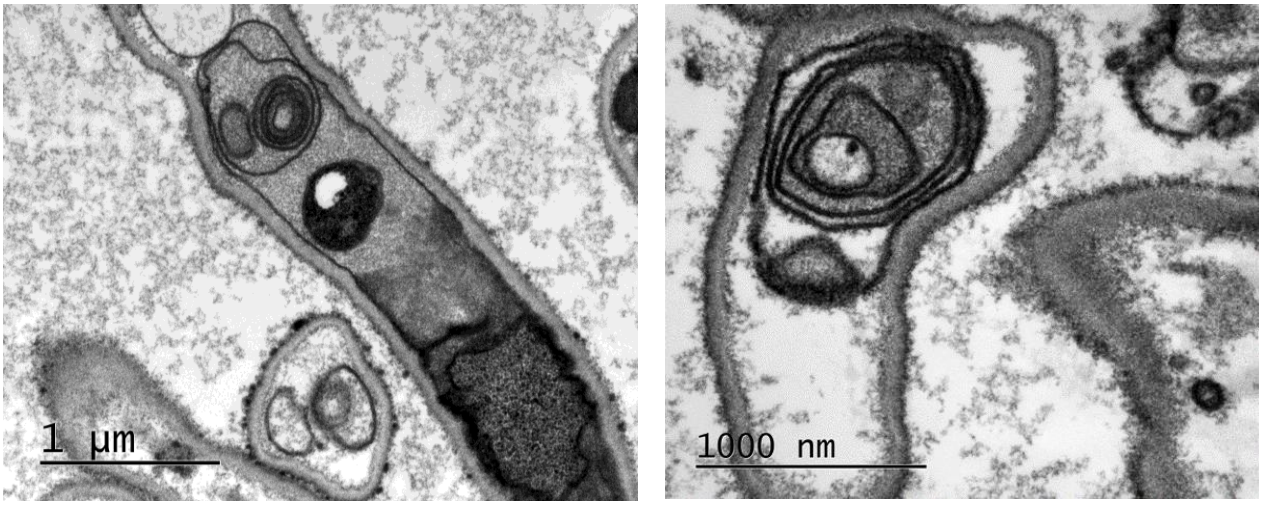


Рис. 22. Исследование изолята 99DG16ET с помощью световой и просвечивающей электронной микроскопии. А – окраска на выявление липидов суданом черным, Б – поперечный срез мицелиального тяжа, покрытого мощным слизистым чехлом, В – неоднородность слизистого чехла, Г – продольный срез гифы, т.В. – тельца Воронина

Следует подчеркнуть, что тенденция эндофитов к формированию мицелиальных тяжей, отмеченная на исследованных изолятах с твердых питательных сред, сохраняется и при культивировании в жидкой среде. Более того, у изолятов, растущих в жидкой среде, происходит образование более мощных слизистых чехлов, которые окружают как единичные гифы, так и мицелиальный тяж в целом, причем данная слизь зачастую имеет неоднородную структуру (рис. 22, Б, В, Г). Кроме того, показано наличие в гифах развитой эндомембранной структуры и формирования большого количества мультивезикулярных тел (рис. 23, А, Б).



А Б

Рис. 23. Мультивезикулярные тела в мицелии изолята 99DG16ET, исследованного с помощью просвечивающей электронной микроскопии

Многофакторный анализ, проведенный по полученным данным, показал, что в опыте на скорость накопления биомассы мицелия трех исследованных изолятов, растущих при разных источниках азота в 3 возможных концентрациях, в той или иной степени влияют все факторы (рис. 24).

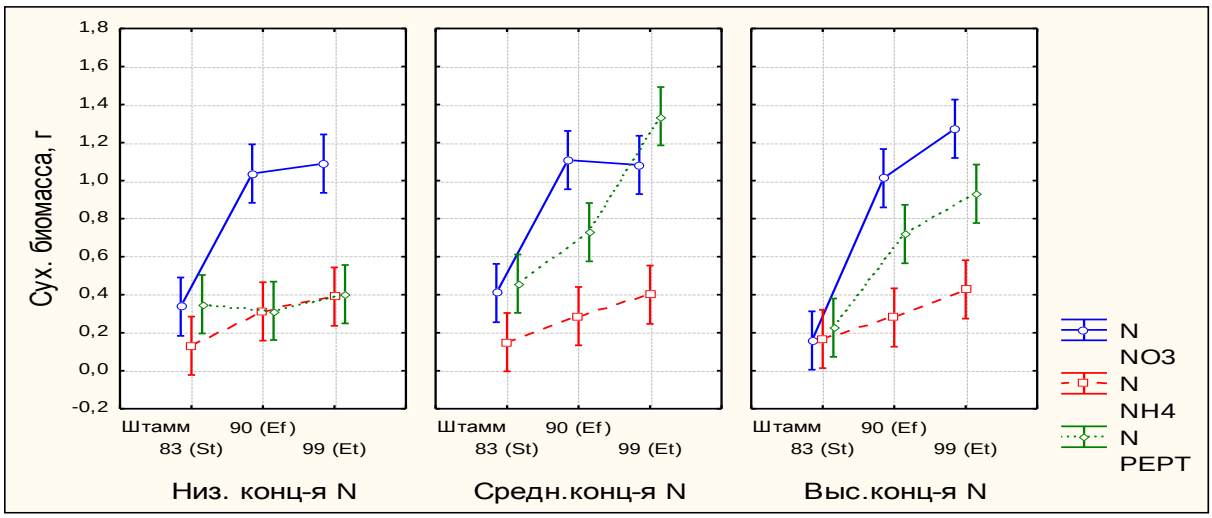


Рис. 24. Значения накопления сухой биомассы изолятами 83FG14, 90EC14 и 99DG16ET при росте в жидкой культуре с различиями по составу питательной среды. Здесь и далее: точки – средние значения, «усы» – 95%-ный доверительный интервал

Стерильный штамм 83FG14 вне зависимости от источника азота и его концентрации характеризовался самым низким показателем накопления сухой биомассы мицелия, причем во всех вариантах опыта она была примерно равной. Для *Epichloë festucae* (90EC14) предпочтительной является нитратная форма азота, так как во всех предложенных вариантах концентраций среды с нитратом натрия в качестве источника азотного питания данный изолят формировал статистически значимо бóльшую биомассу, нежели с другими источниками азота. *Epichloë typhina* (99DG16ET) в среднем во всех случаях активнее всего набирала биомассу, достигнув максимального значения при росте на среде с пептоном в концентрации 5 г/л (среднее значение) и на нитрате в концентрации 3 г/л (высокое).

Интересно также, что на среде с аммонийным азотом вне зависимости от концентрации прирост биомассы всех изолятов был одинаково небольшой.

Таким образом, оптимальная форма азота и его концентрация в среде зависит от предпочтений конкретного изолята. Так, стерильный мицелий 83FG14 одинаково медленно рос во всех вариантах сред, тогда как у двух других наблюдается значимо бóльшая биомасса в присутствии нитратов.

3.6. Распределение мицелия эндофитных грибов в растениях

3.6.1. Распределение мицелия в молодых проростках *in vitro*

У образца УФС всхожесть семян составила 36% (27-46%[3]), а для образца Речс данный показатель составил 38% (29-48%), данные значения в целом типичны для дикорастущих злаков.

По окончании срока инкубации растения в среднем достигли высоты 106 мм в надземной части (от 12 до 169 мм). Высота этих молодых растений полностью определялась длиной первого листа. Растения на момент снятия опыта имели два листа, второй из которых не вышел из влагалища. Длина корня составила в среднем 57 мм (от 14 до 96 мм). Данные по присутствию эндофитного мицелия в разных частях органов растений, а также характеристики каждого индивидуального проростка указаны в приложении 3.

Согласно литературным данным, клавиципитальные эндофиты в основном приурочены к надземным частям растений (Schulz, Boyle, 2006), причем наиболее часто их обнаруживают во влагалищах листа и в стеблях генеративных побегов (Hesse et al., 2004). Также показана возможность присутствия мицелия в листовых пластинках (Благовещенская, 2006). Однако, как видно из таблицы в приложении 3, все исследованные растения были пронизаны эндофитным мицелием от корня до верхней части листьев. Дело в том, что упоминания о корневой локализации эндофитов в литературе встречаются крайне редко и звучат при этом не очень убедительно. Если рассмотреть фотографию эндофитного мицелия в корне (рис. 25), становится понятно, почему так происходит.

[3] Здесь и далее, если не указано другого, для долей приводятся 95%-ные доверительные интервалы, посчитанные с помощью φ-преобразования.

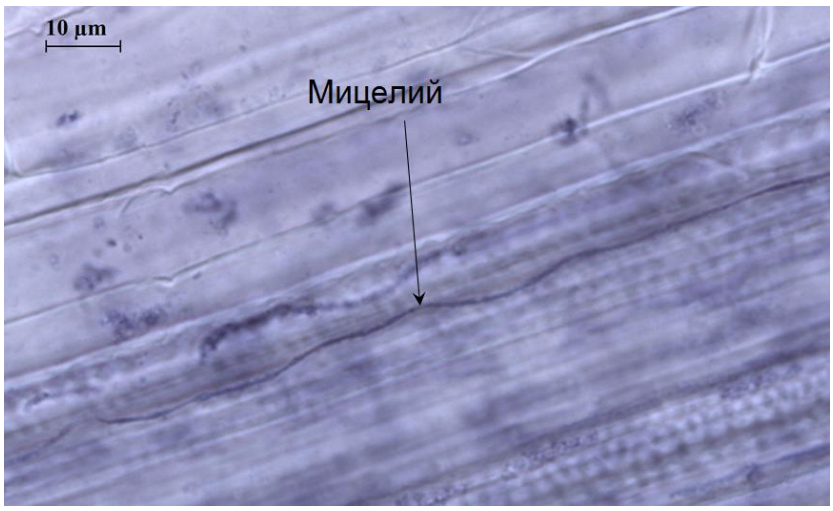


Рис. 25. Мицелий эндофитного гриба в корне *Festuca pratensis*

По морфологии корневые гифы отличаются от локализованных в надземных частях: они очень тонкие (0,6 – 1 мкм в диаметре), в меньшей степени извитые, почти не ветвящиеся, с малозаметными септами. Они остаются едва различимыми в тканях растения даже после долгого и трудоемкого процесса окрашивания препаратов, кроме того, чтобы их рассмотреть, требуется иммерсионный объектив, качественная оптическая техника и внимательность. Следовательно, в больших работах, когда требуется обработать огромное количество материала, использование подобных методик не всегда приемлемо, поэтому нет ничего удивительного в том, что эндофитный мицелий, колонизирующий корни, остается незамеченным.

В большинстве исследованных листьев присутствовал мицелий, причем не только в эпидермисе влагалища, но и в листовой пластинке. При микроскопировании препаратов наблюдали типичный септированный мицелий, развивающийся в межклетниках, морфология гиф почти не отличалась в разных органах растения (рис. 26).

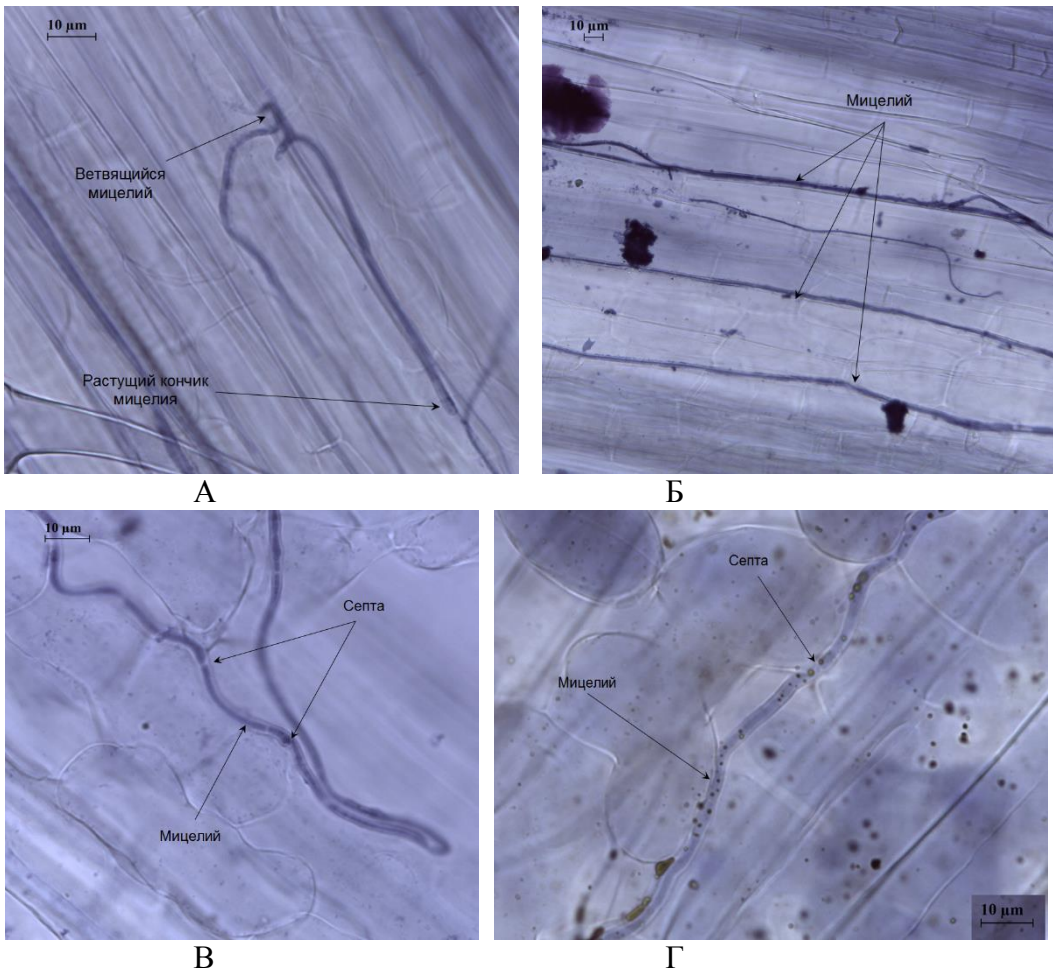


Рис. 26. Мицелий в разных частях растений. А – основание листовой пластинки 1го листа, Б – средняя часть листовой пластинки 1-го листа, В – конец листовой пластинки 1-го листа, Г – мицелий во 2-ом листе

Растения были разделены на две группы в зависимости от наличия (E=1) или отсутствия (E=0) эндофитного мицелия в верхней части листовой пластинки 1-го листа. Проведенный по полученным данным дисперсионный анализ показал значимое влияние этого фактора как на длину листа, так и на длину корня растения (табл. 15, 16; рис. 27).

Таблица 15

Основная таблица дисперсионного анализа для проростков (по длине листа). Жирным шрифтом выделены значимые факторы (для уровня значимости 5%). Local – место отбора проб, E – наличие мицелия в верхней части листовой пластинки

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
Local	4,32	1	4,32	0,00383	0,951
E	**11401,93**	**1**	**11401,93**	**10,10730**	**0,003**
Local*E	300,27	1	300,27	0,26618	0,609
Ошибка	39483,08	35	1128,09		

Таблица 16

Основная таблица дисперсионного анализа для проростков (по длине корня). Жирным шрифтом выделены значимые факторы (для уровня значимости 5%). Local – место отбора проб, E – наличие мицелия в верхней части листовой пластинки

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
Local	314,49	1	314,495	0,755669	0,391
E	**3082,59**	**1**	**3082,586**	**7,406847**	**0,010**
Local*E	**1834,24**	1	**1834,238**	**4,407312**	**0,043**
Ошибка	14566,32	35	416,181		

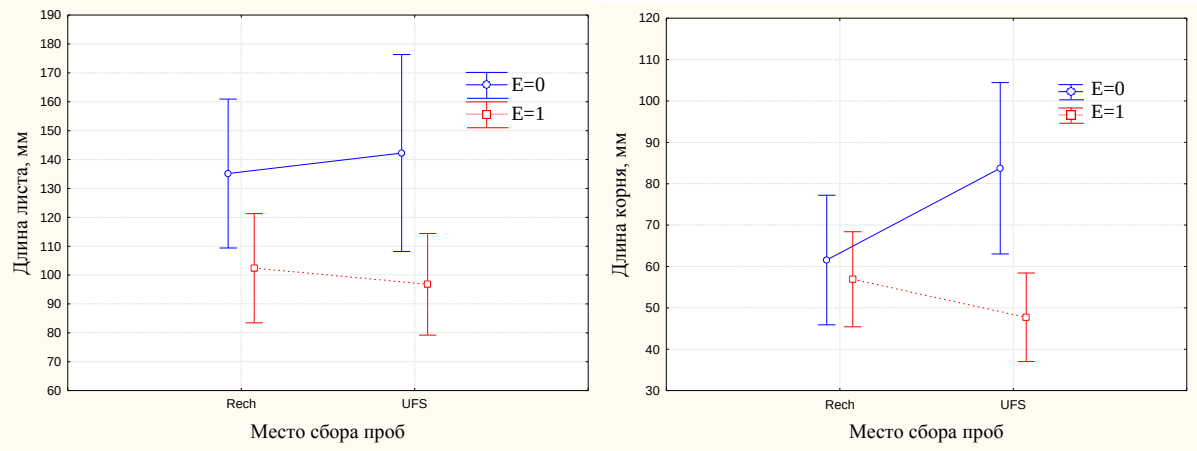


Рис. 27. Зависимость длины листа и корня от наличия эндофитов в листе и происхождения образцов (обозначения в тексте)

То есть растения, для которых показано отсутствие мицелия в кончике первого листа, в целом выше. Можно было бы предположить, что эндофит отрицательно влияет на рост растения. Но на самом деле инфицированными

являются все исследованные образцы. Поэтому более вероятно, что мицелий просто не успел дорасти до данной части проростка (рис. 28). Данный вывод о более медленном росте гриба по сравнению с растением-хозяином подтверждается отсутствием мицелия во вторых листьях некоторых из исследованных растений.

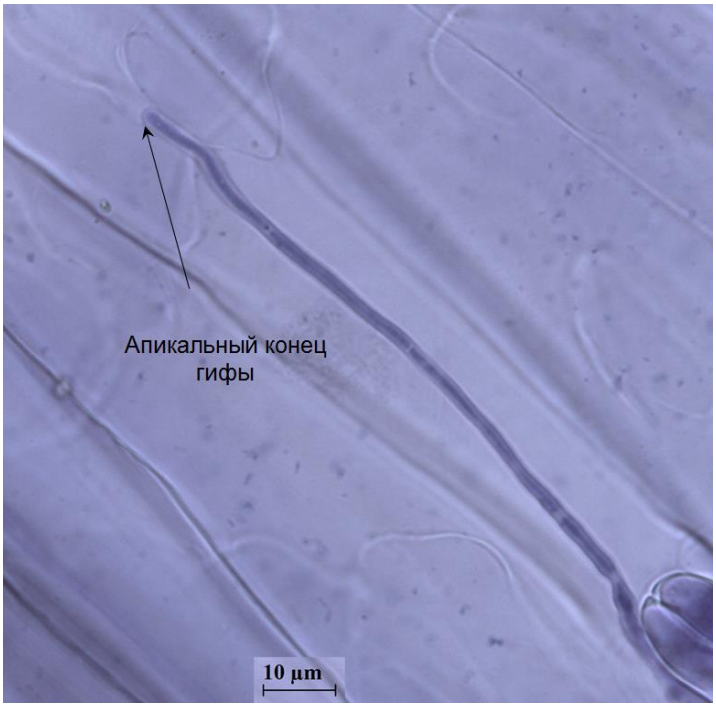


Рис. 28. Апикальный конец гифы, растущей между клетками ткани листа

Таким образом, на молодых проростках, полученных из поверхностно стерилизованных семян и выращенных на гидропонике в условиях лаборатории, показано, что эндофитный мицелий может заходить во все органы растения, в том числе в листовые пластинки и корни, причем мицелий, локализованный в корне, заметно тоньше, чем в зеленых частях растения (0,6-0,7 мкм).

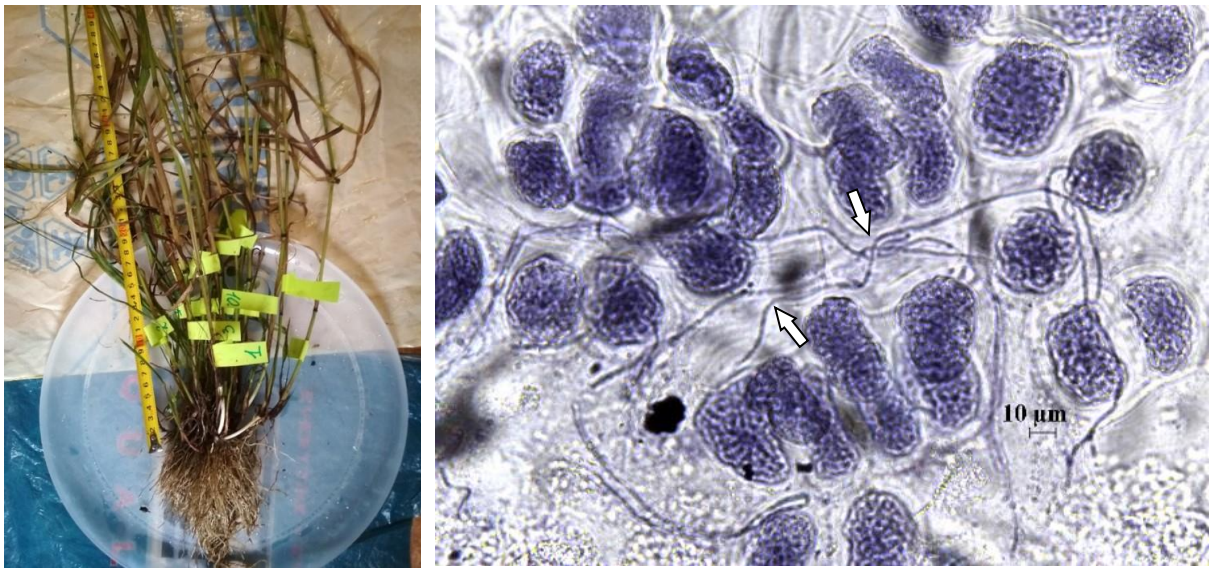
3.6.2. Распределение мицелия во взрослых растениях открытого грунта

Исследуемые на предмет распределения эндофитного мицелия растения на момент анализа уже имели полностью сформированные зрелые семена. Число генеративных побегов было одинаковым у двух наиболее крупных образцов (12 на каждую дерновину), а у более молодого образца их было всего 4. При этом их

высота в среднем достигала 1,5 м (разброс значений составил от 101 до 174 см) (рис. 29, А).

Все семена, собранные с исследуемых растений, были проверены на зараженность, и оказалось, что 72% из них несли в себе мицелий, то есть не все семена этого года урожая были инфицированы. Данный результат соотносится со значением зараженности, полученным при предыдущем исследовании данной популяции гигантской овсяницы, в котором фигурировала более крупная выборка семян. В 2018 году, по сравнению с показателями прошлых лет, было отмечено снижение зараженности семян в популяции со 100% до 43%. Следовательно, нет ничего удивительного, что не все семена исследуемых растений были заражены.

Мицелий у исследованных семян, как и следовало ожидать, был локализован в зоне алейронового слоя, образуя там беспорядочно лежащие гифы (рис. 29, Б).



А Б

Рис. 29. Исследование овсяницы гигантской. А – внешний вид одного из исследуемых образцов; Б – мицелий эндофитного гриба в алейроновом слое семени (стрелками отмечены гифы)

При анализе зеленых частей злаков мицелий эндофитных грибов был обнаружен также и в листовых влагалищах всех трех образцов растений (рис. 30, А). Одиночные гифы диаметром 1,5-1,8 мкм залегают в межклетниках

растительных тканей (рис. 30, Б), прикрепляясь к стенкам клеток растения, вдоль которых они расположены, за счет формирования чехла из полисахаридной слизи, что особенно хорошо заметно при изучении ультратонких срезов колонизированных эндофитами растений с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (рис. 30, В, Г).

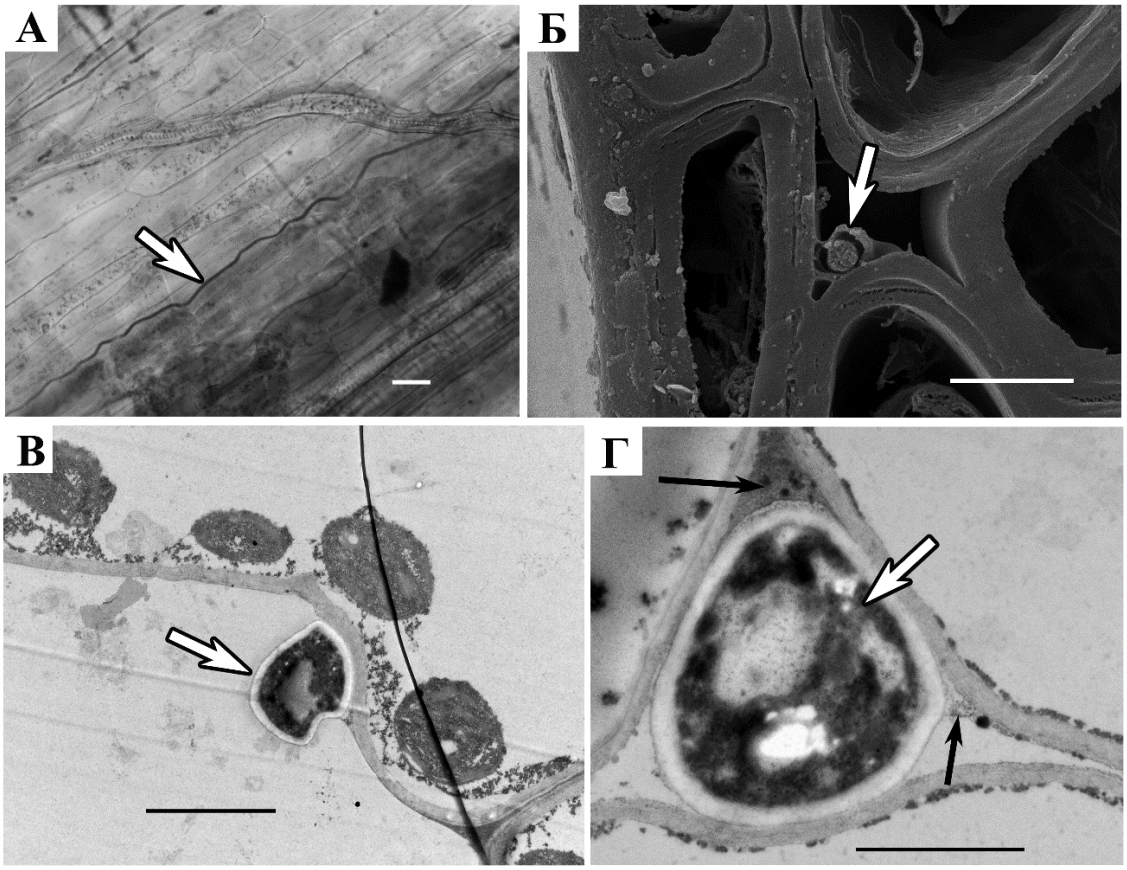


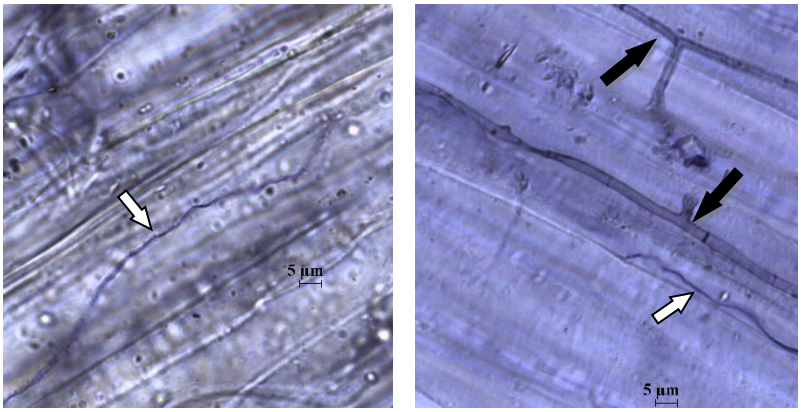
Рис. 30. Эндофитный мицелий среди клеток влагалища листа овсяницы гигантской. А – световая микроскопия (масштабная линейка – 20 мкм); Б – сканирующая электронная микроскопия (линейка – 5 мкм); В и Г – трансмиссионная электронная микроскопия (линейка – 2 и 1 мкм соответственно). Белыми стрелками указаны гифы гриба, черными – полисахаридная слизь

При изучении продольных и поперечных срезов стеблей генеративных побегов, несущих зараженные семена, гифы эндофитных грибов не были обнаружены ни в одном из обследованных образцов, что является слегка озадачивающим результатом. При наличии инфекции в листьях и семенах, логично ожидать присутствие мицелия и в переходной между зараженными органами зоне. Наблюдаемое явление может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, есть вероятность, что в генеративных побегах после формирования

семян имеются лишь единичные гифы, которые были незаметны для исследователя. А во-вторых, исследуемые растения находились на той стадии развития, когда после созревания семян у злаков обычно начинается пожелтение соломины. Листья остаются зелеными и активно фотосинтезируют, а в генеративном побеге происходит частичное отмирание тканей, что может приводить к одновременному отмиранию гиф эндофитных грибов, лишающихся в таких условиях источника питательных веществ и воды.

Корневая система обследованных злаков оказалась очень плотно заселена разными грибами, в том числе, был замечен мицелий, по своей морфологии сильно напоминающий тот, который мы обнаруживали в корнях растений из предыдущего опыта (рис. 31, А). Это очень тонкие (0,7 мкм в диаметре) неветвящиеся гифы, залегающие в межклетниках и не образующие дополнительных структур. Мы предполагаем, что этот тонкий мицелий является мицелием клавиципитального эндофита, так как в условиях гидропонной культуры у растений также имелись гифы двух типов – обычного размера в надземных частях и тонкий в подземных.

Помимо эндофитного мицелия, в корнях овсяницы гигантской обнаружено присутствие грибов везикулярно-арбускулярной микоризы, причем в ряде случаев они располагались в непосредственной близости друг от друга (рис. 31, Б), и, по всей видимости, антагонизма между ними не происходит.



А Б

Рис. 31. Мицелий в корнях овсяницы гигантской. А – эндофитный мицелий (белая стрелка); Б – эндофитная гифа, растущая рядом с гифами микоризного гриба (черные стрелки)

Таким образом, эндофитные грибы способны колонизировать как надземные, так и подземные органы растений, развивающихся в естественных условиях, не оказывая заметного негативного воздействия на соседствующие с гифами клетки растений.

3.7. Результаты эксперимента по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов

Неоднократные случаи выделения изолятов, которые по анализу участка ITS рДНК были определены как наиболее близкие к представителям рода *Tricladium*, вызвали неподдельный интерес, так как наличие данных грибов в семенах может значить, что близкие родственники водно-воздушных гифомицетов могут выступать в роли системных эндофитов злаков, распространяемых вертикально с помощью семян, несущих мицелий. Описанные ранее случаи колонизации растений водно-воздушными гифомицетами связаны с отмершими растительными остатками, погруженными в воду или с вегетативной сферой растений: корнями или листьями. Инфекция в тех случаях чаще является локальной и начинается с того места, где появилась пропагула гифомицета (чаще всего – конидия). Упоминаний об обнаружении подобных грибов в генеративной сфере растений в литературе не найдено.

В нашем исследовании мицелий эндофита обнаруживался как в вегетативной сфере злаков, так и в их семенах. Изоляты получены из поверхностно-стерилизованных семян, с которых за счет агрессивного воздействия стерилизующих растворов снимаются почти все наружные защитные оболочки, что сильно снижает вероятность того, что в культуру выделилась случайная внешняя инфекция.

Чтобы доказать, что наши изоляты действительно являются системными эндофитами, необходимо искусственно заразить растение-хозяина пропагулами гриба, довести злак до стадии плодообразования и реизолировать гриб в культуру из полученных семян. Тогда можно будет с уверенностью сказать, что

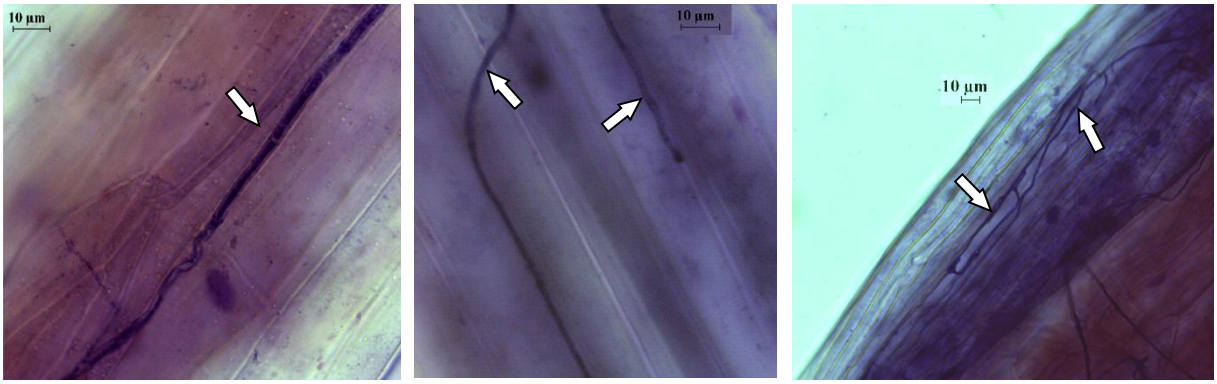
данные грибы являются системными эндофитами. Именно поэтому для постановки данного опыта был выбран штамм 201FA17, выделенный из семян тростниковой овсяницы 2017 года сбора.

Используемый в качестве потенциального растения-хозяина сорт тростниковой овсяницы Лира 2018 года сбора характеризовался высокой всхожестью, в отличие от дикорастущих образцов. Из 98 семян за время инкубации не проросло только 2, причем оба непроросших семени были в контрольных пробирках. Таким образом, для анализа на наличие инфекции получили 96 растений, у которых на момент снятия опыта было как минимум 3 развитых листа (рис. 32)

Рис. 32. Молодые растения овсяницы тростниковой на 33 сутки инкубации

Анализ зеленых частей полученных растений показал, что ни одно из 40 контрольных растений, развивавшихся в пробирках без колонии гриба, не несло мицелия, в то время как у 9 растений из 56, развивавшихся в присутствии гриба, в межклетниках обнаружено наличие гиф (рис. 33), то есть искусственное инфицирование тростниковой овсяницы было успешным в 16% случаев. Мицелий отмечен как для листовых влагалищ, так и для листовых пластинок, однако в последних из-за наличия большого количества хлоропластов иногда было трудно разглядеть гифы. Из особенностей, которые удалось отметить при

изучении препаратов, стоит упомянуть, что мицелий чаще ветвился, анастомозировал и местами залегал слегка беспорядочно, что в принципе характерно для неклавиципитальных эндофитов в отличие от весьма строго соблюдающегося клавиципитальными эндофитами роста вдоль длинной оси клеток растения.



А Б В

Рис. 33. Мицелий в тканях искусственно зараженной изолятом 201FA17 тростниковой овсяницы сорта Лира (эндофитный мицелий указан белыми стрелками, длина масштабной линейки 10 мкм). А – септированный мицелий типичного для эндофитов строения; Б – более тонкий мицелий в листовой пластинке; В – ветвящийся мицелий

Таким образом, в настоящем опыте была показана принципиальная возможность заражения злаков нашими изолятами. Конечно, делать выводы об их связи с группой специализированных системных эндофитов пока рано, так как не проводилась реизоляция гриба в чистую культуру не только из семян, но и из зараженных в опыте растений, но работа в этом направлении будет продолжена.

3.8. Влияние дефицита фосфора и/или азота на Е+ и Е- растения

Для постановки опыта необходимо было отобрать образцы с достаточным количеством семян, характеризующихся высоким процентом зараженности и более-менее высокой всхожестью. Так как всхожесть дикорастущих злаков обычно не высока и, к тому же, снижается с течением времени, было решено остановиться только на свежих семенах. Сравнительная характеристика образцов семян представлена в таблице 17.

Таблица 17

Сравнительная характеристика образцов семян

Вид растения	**Происхождение образца**	**Зараженность, %**	**Всхожесть, %***
Bromopsis inermis	ЗБС (дикорастущий)	0	37 (28-47)
Elymus caninus	ЗБС (дикорастущий)	42 (33-52)	48 (38-58)
Festuca arundinacea	ВНИИ кормов (сорт Алексеевский)	0	87 (82-91)
Festuca gigantea	ЗБС, 7 квартал (дикорастущий)	**100**	**43 (39-47)**
Festuca pratensis	ВНИИ кормов (сорт ВИК 5)	**0**	**92 (86-96)**
	ВНИИ кормов (сорт Любохна)	0	95 (90-98)
	ВНИИ кормов (сорт Николаевский)	36 (29-42)	64 (57-70)
	ЗБС, 1 квартал (дикорастущий)	**95 (76-96)**	**59 (47-61)**
	Москва, Новогиреево (дикорастущий)	0	98 (89-96)
	Москва, ул. Молостовых (дикорастущий)	0	96 (87-95)

*Срок инкубации влажных камер до прорастания семян составил 2 недели

На основании этих данных, для постановки опыта решили использовать семена *F. gigantea* со 100%-ной зараженностью, искусственно создавая свободный от эндофита контроль, а также *F. pratensis* с зараженностью 94,9%, используя в качестве отрицательного по наличию эндофита контроля сортовой образец овсяницы луговой ВИК 5. Получение искусственным путем свободного от эндофита варианта в этом случае решили не проводить, так как количество семян в образце было не очень большим.

Однако, к сожалению, получить проростки овсяницы луговой не удалось. Во-первых, образец с инфицированными эндофитом семенами был настолько сильно контаминирован микромицетами родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma*, что стандартная методика поверхностной стерилизации семян, успешная до сего момента, не смогла предотвратить зарастания чашек с семенами. Попытки отмыть их в растворе марганцовки и перенести на новые стерильные бумажные фильтры не имели успеха. Во-вторых, всхожесть семян ВИК 5 по неизвестным причинам снизилась почти до нулевого значения, и более чем за месяц инкубации проросло всего одно семя из более чем 300.

Что касается семян *F. gigantea*, для них показан существенно увеличенный период покоя перед прорастанием. Если при первичной проверке всхожести большинство семян проросло за 14 суток, то далее этот срок увеличился до 36 суток, после чего начали появляться первые зеленые побеги.

На момент снятия опыта большинство растений имело 2 листа, в среднем высота побегов составила 121,8 мм (от 51 до 260 мм), а длина корня – 123,4 мм (от 10 до 305 мм). Первичные данные всех измерений приведены в приложении 4.

Все растения (320) были проверены на наличие эндофитной инфекции. 160 «E+» растений содержали в основании 1-го листа типичный эндофитный мицелий. Из 160 растений «E-» варианта 3 оказались инфицированными эндофитом, то есть метод получения свободных от инфекции семян путем их двухэтапного прогревания в термостате был успешен на 98%. Эти 3 растения были исключены из дальнейшего анализа.

По полученным данным проводили многофакторный дисперсионный анализ, который показал довольно интересные результаты (основные таблицы дисперсионного анализа – Приложение 5).

Анализ показал, что на длину 1-го листа влияет только наличие в питательной среде источников фосфора: в среднем, как и можно было ожидать, длина больше для тех растений, которые росли на среде с фосфором (рис. 34). При этом никакой разницы между «E+» и «E-» растениями не обнаружено.

На длину корня, с другой стороны, влияет только присутствие эндофитных грибов, а именно – у «E+» растений корень в среднем длиннее, чем у «E-» (рис. 35). В работе Дариуша Малиновски и Давида Белески показано, что зараженные растения овсяницы тростниковой в условиях дефицита фосфора формируют более тонкие корни с более длинными корневыми волосками, что авторы объясняют как раз приспособлением к нехватке фосфатов в среде (Malinowski, Belesky, 2000). К сожалению, в этой работе не указана длина корней, а у нас не

было возможности измерить длину корневых волосков растений, так что, возможно, что результаты наших опытов достаточно близки.

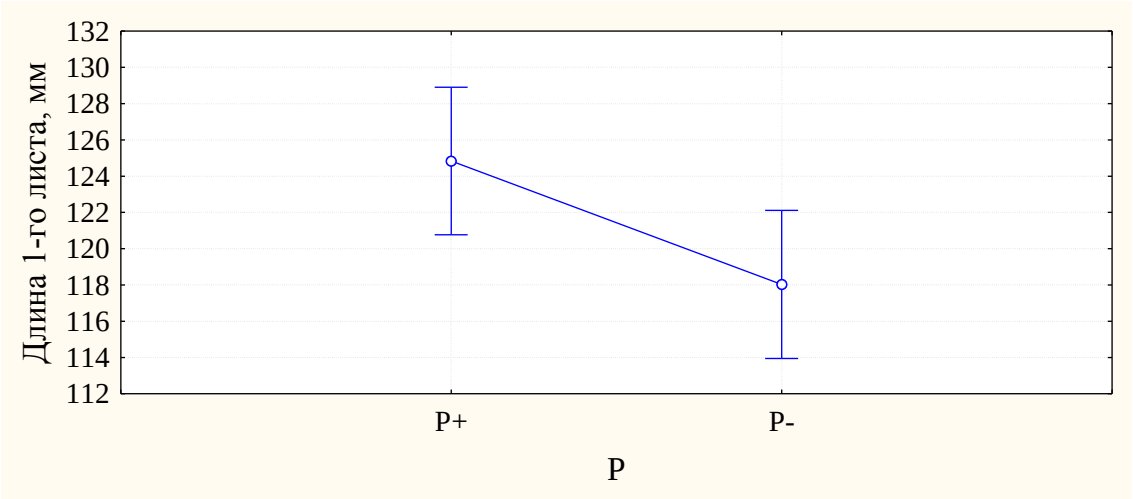


Рис. 34. Зависимость длины 1-го листа от наличия или отсутствия в питательной среде источника фосфора (P+ и P- соответственно)

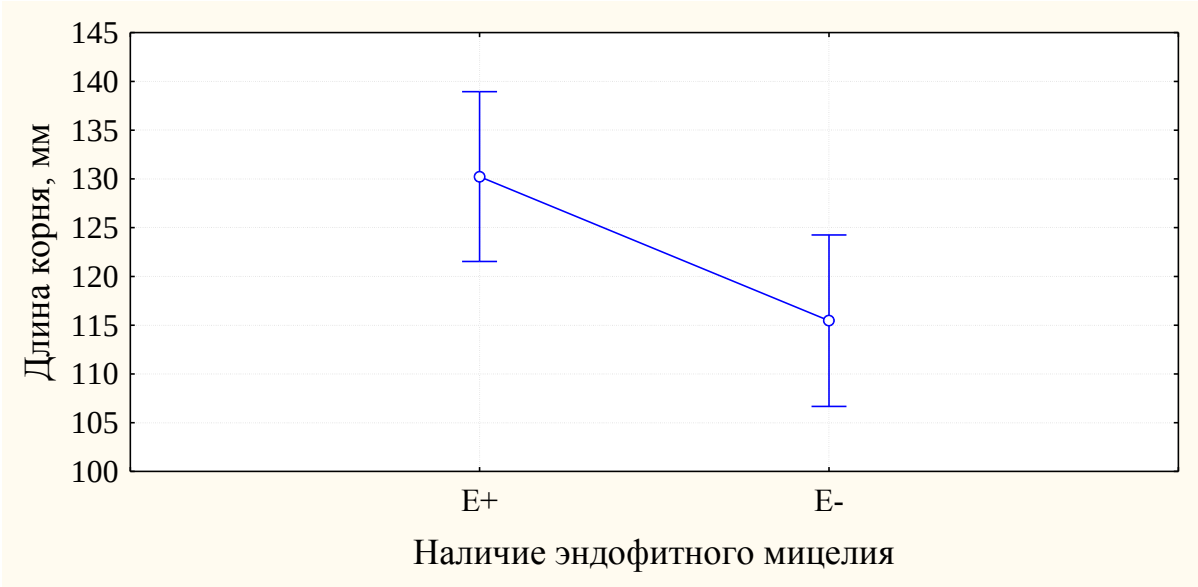


Рис. 35. Зависимость длины корня от наличия в растении эндофитного мицелия

Результаты по биомассе растений и по длине второго листа показывают большее разнообразие. В отличие от длины 1-го листа, значимое влияние на которую оказывает только наличие/отсутствие источников фосфора, длина 2-го листа зависит еще и от эндофитного статуса растения, а также от сочетания факторов наличия эндофита в растении и присутствия нитратов в среде. Причем в отсутствии и фосфора, и азота 2-ой лист эндофит-содержащих растений имеет

статистически значимо большую длину, нежели лист свободных от симбионта образцов. Если же в среде присутствует только азот, то средние значения длины 2-го листа для «E+» растений снижаются, в то время как для «E-» они возрастают до некой величины, которая попадает примерно в середину интервала между максимальным значением «E+» растений и минимальным «E-». При наличии в среде фосфора «E+» растения имеют более длинный 2-ой лист вне зависимости от наличия азота (рис. 36). То есть, в целом можно сказать, что зараженные растения овсяницы гигантской имеют более развитый второй лист, чем незараженные, что особенно выражено в условиях дефицита минеральных веществ.

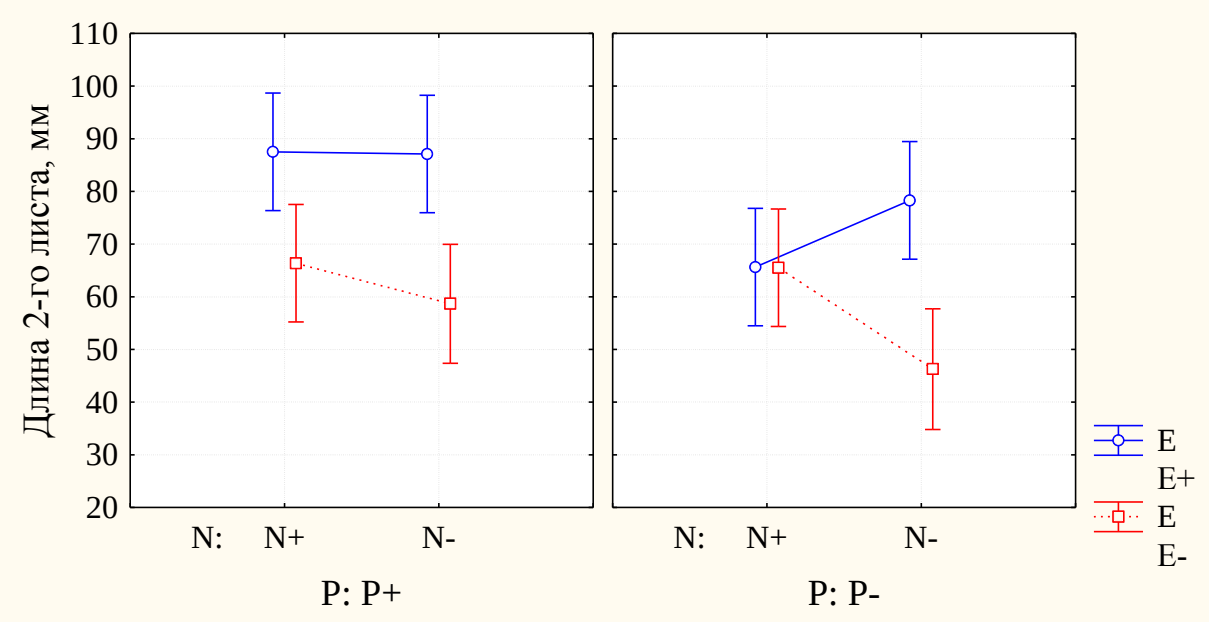


Рис. 36. Зависимость длины 2-го листа от наличия эндофитной инфекции и состава питательной среды

На биомассу оказывает влияние сочетание всех факторов (табл. 18). Как и в случае длины 2-го листа, при отсутствии и фосфора, и азота «E+» растения имеют более развитые ростовые характеристики, нежели «E-». Как видно из рис. 37, зеленая биомасса «E+» растений больше, чем «E-», на дефицитной среде, однако в присутствии азота для инфицированных растений наблюдается резкий спад биомассы, в то время как этот показатель для «E-» растений при наличии

азота приближается к таковому у «E+» вариантов при дефиците и азота, и фосфора (рис. 37).

Таблица 18

Вероятности принятия нулевой гипотезы о равенстве средних (по биомассе) по вариантам опыта.

Средние приведены в первой строке, варианты опыта указаны в столбцах E, N, P. Вероятности рассчитаны с помощью критерия Фишера, полужирным шрифтом выделены ячейки, где указан p-значение в 5% и ниже.

	E	N	P	{1} - 87,525	{2} - 65,650	{3} - 87,100	{4} - 78,300	{5} - 66,375	{6} - 65,525	{7} - 58,667	{8} - 46,263
1	E+	N+	P+		**0,007**	0,958	0,251	**0,009**	**0,006**	**0,000**	**0,000**
2	E+	N+	P-	**0,007**		**0,008**	0,116	0,928	0,988	0,387	**0,018**
3	E+	N-	P+	0,958	**0,008**		0,273	**0,010**	**0,007**	**0,000**	**0,000**
4	E+	N-	P-	0,251	0,116	0,273		0,138	0,112	**0,016**	**0,000**
5	E-	N+	P+	**0,009**	0,928	**0,010**	0,138		0,916	0,340	**0,014**
6	E-	N+	P-	**0,006**	0,988	**0,007**	0,112	0,916		0,396	**0,018**
7	E-	N-	P+	**0,000**	0,387	**0,000**	**0,016**	0,340	0,396		0,130
8	E-	N-	P-	**0,000**	**0,018**	**0,000**	**0,000**	**0,014**	**0,018**	0,130	

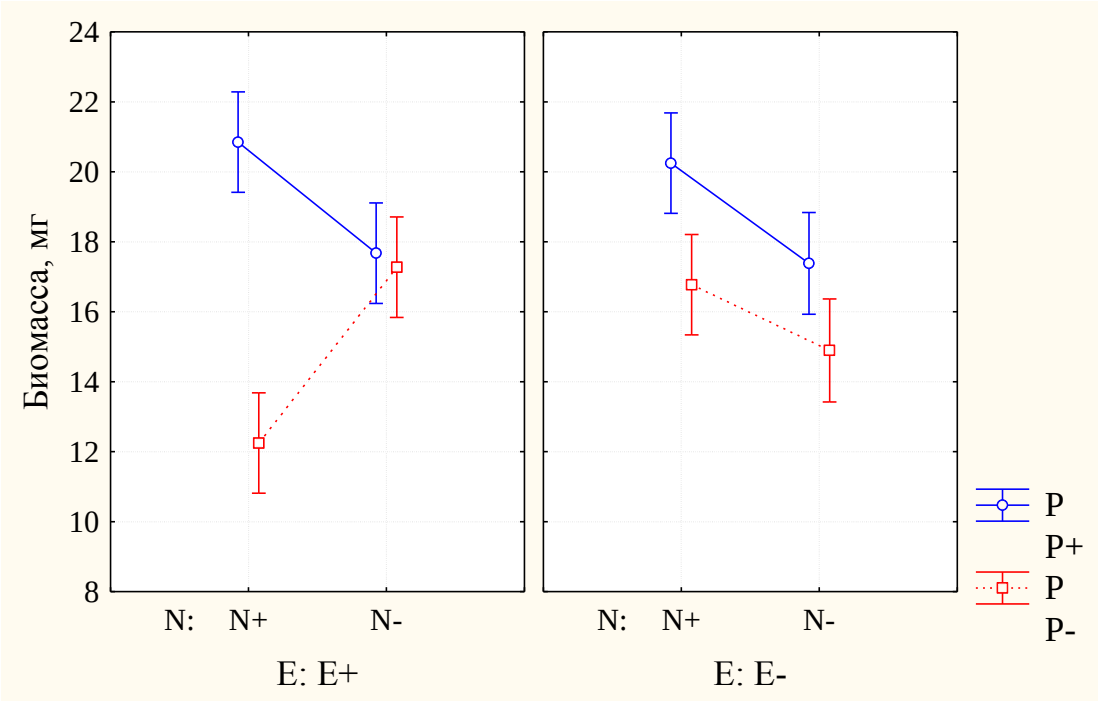


Рис. 37. Зависимость биомассы растений от наличия эндофитной инфекции и состава питательной среды

Таким образом, проведенный анализ показывает, что существуют некоторые отличия в физиологии эндофит-содержащих растений *Festuca*

gigantea и свободных от симбионтов в условиях дефицита по фосфору и/или азоту. В целом, «E+» растения имеют более высокие показатели как в условиях голодания по азоту и фосфору, так и на полных средах. Единственный случай, когда «E-» растения имели более высокий показатель по сравнению с «E+», отмечен на среде, в которой присутствовал азот, но отсутствовал фосфат. Показано, что наличие в питательной среде азота при отсутствии фосфора оказывает на ростовые характеристики «E+» растений негативное влияние, снижая прирост биомассы и длину 2-го листа, в то время как с «E-» растениями наблюдается противоположный эффект. Следует отметить, что в присутствии фосфора оба варианта растений показывают более высокие показатели роста, нежели в его отсутствии, кроме того, на полной среде как «E+», так и «E-» растения имеют наибольшую биомассу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа расширила имеющиеся представления о распространенности и видовом составе клавиципитальных эндофитов, присутствующих на территории Москвы и Московской области. Показано, что помимо важной для селекции кормовых и газонных трав ассоциации между луговой овсяницей (как дикорастущей, так и сортовой) и грибом *Epichloë uncinata*, обнаруженной и изученной ранее рядом исследователей, на нашей территории имеются другие ассоциации, в частности, между дикорастущими злаками и эндофитными грибами, известными своей способностью к синтезу алкалоидов, опасных для теплокровных животных.

Всего эндофитная инфекция была обнаружена у 6 видов злаков из 15 изученных (*Lolium perenne, Festuca rubra, F. pratensis, F. arundinacea, F. gigantea* и *Elymus caninus*). Важно отметить, что определение наличия эндофитной инфекции с помощью ПЦР в некоторых случаях дает ложноотрицательные результаты, что необходимо учитывать в работах по скринингу растений.

Из зараженных образцов растений были получены чистые культуры клавиципитальных эндофитов следующих видов: *Epichloë uncinata, E. occultans, E. festucae*, причем последние 2 были обнаружены на территории России впервые. Из них сформирована коллекция, расположенная на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, которая может являться источником материала для дальнейших исследований разных направлений.

Помимо клавиципитальных эндофитных грибов, из семян злаков нами был получен ряд изолятов, которые по участку ITS рДНК оказались наиболее близки роду *Tricladium* – представителю ингольдовых грибов (Leotiomycetes, Ascomycota). Их локализация в семенах различных злаков разных лет урожая в сочетании с отсутствием конидиального спороношения как на самих растениях, так и при развитии в чистой культуре, а также проведенный опыт по искусственному заражению растений, говорят в пользу того, что данные

представители способны существовать в виде системных эндофитов злаков и, подобно клавиципитальным эндофитам, полагаться на растение-хозяина для своего распространения. Данная находка, несомненно, заслуживает дальнейшего пристального изучения.

В целом, в ходе работы с полученными изолятами был отмечен ряд общих черт, например, формирование очень плотных колоний, имеющих тенденцию переходить к росту внутри субстрата, наличие двух типов мицелия, а также объединение гиф в тяжи разной толщины, окруженные слизистым чехлом, причем между соседними гифами возможно образование вторичных поровых соединений, что ранее не было известно для грибов. Низкая скорость роста изолятов как на твердой среде, так и в жидкой культуре весьма затрудняет работу с ними в лаборатории. При случайной контаминации культур микромицетами неоднократно отмечено образование зон подавления, что говорит о способности синтезировать антифунгальные соединения, которые могут являться перспективными для биотехнологии.

Изучение распределения мицелия эндофитов в растениях показало, что эндофитные грибы способны колонизировать как надземные, так и подземные органы растений, развивающихся на гидропонике и в естественных местообитаниях, причем при развитии в корне гифы заметно тоньше, чем в надземных органах. Гифы одиночно залегают в межклетниках и плотно прикрепляются к клеткам растения-хозяина с помощью полисахаридного матрикса.

Проведенный эксперимент по изучению влияния дефицита фосфора и/или азота в питательной среде на молодые проростки овсяницы гиганской подтвердил способность эндофитной инфекции положительно влиять на длину корней и биомассу растения-хозяина в условиях дефицита по обоим элементам, однако в условиях достаточного количества азота при единовременном отсутствии фосфора присутствие грибов отрицательно сказывалось на биомассе.

Выводы

1. Эндофитная инфекция показана для шести видов злаков: *Lolium perenne*, *Festuca rubra*, *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. gigantea* и *Elymus caninus*, причем для трех последних – впервые для территории России.

2. За время работы выделено 203 изолята, причем 87% изолятов в культуре не формировали спороношений.

3. На территории России выявлено присутствие следующих видов клавиципитальных эндофитов: *Epichloë uncinata*, *E. festucae*, и *E. occultans* (последние два – впервые для России), а также показана возможность существования грибов, известных как водно-воздушные гифомицеты (род *Tricladium*), в виде системных эндофитов злаков.

4. Для клавиципитальных эндофитов характерно накопление большого количества липидов, а также формирование слизистого матрикса для прикрепления к клеточным стенкам растения-хозяина при росте *in planta* и для объединения гиф в тяжи при росте в культуре.

5. На примере клавицицпитальных эндофитов впервые для аскомицетов показана способность формировать вторичный поровый контакт между коллатеральными гифами.

6. Мицелий клавиципитальных эндофитов способен заселять стебли, листовые влагалища, листовые пластинки, семена и корни злаков. В корнях клавиципитальные эндофиты способны формировать мицелий 0,7 мкм в диаметре, что меньше минимальных значений, известных для грибов.

7. Клавиципитальные эндофиты оказывают положительное влияние на ростовые характеристики овсяницы гигантской при росте на гидропонике в условиях дефицита азота и фосфора, но в условиях достаточного количества азота и дефицита по фосфору присутствие эндофитов оказывает отрицательное влияние на биомассу растений.

Список литературы

1) **Благовещенская** Е.Ю. Эндофитные грибы злаков. Дис. … канд. биол. наук. М.: МГУ. **2006**. 138 с.

2) **Гусынин** И.А. Токсикология ядовитых растений. М.: Сельхозиздат, **1962**. 624 с.

3) **Коваль** Э.З. Клавиципитальные грибы СССР. Киев: Наукова думка. **1984**. 287 с.

4) **Лисицын** Ф. Отравление лошадей семенами ядовитого плевела (*Lolium temulentum*) // Ветеринарный врач. **1915**. С. 3-6.

5) **Маевский П.Ф.** Флора средней полосы европейской части России. 11 издание. М.: Товарищество научных изданий КМК. **2014.** 635 с.

6) **Матевосян** Г.Л., Дрижаченко А.И., Петрова О.С. Роль эндофита и регуляторов роста в прорастании семян овсяницы луговой с пониженной всхожестью // Защита растений от вредителей и болезней. СПб. **2000**. С. 125-131.

7) **Минеева** Т.И. Изучение особенностей орхидной микоризы на примере зелёной наземной орхидеи *Goodyera repens* (L.) R.Br.: корневые эндофиты и азотное питание. Дипломная работа. Москва, **2011.**

8) Плантариум [Электронный ресурс]: Определитель растений on-line/ Открытый атлас сосудистых растений России и сопредельных стран — Режим доступа: http://www.plantarium.ru/, свободный. — Загл. с экрана.— Яз. рус.

9) **Шеленга** Т.В. Анализ эндофитной инфекции и алкалоидов в связи с проявлением хозяйственно ценных признаков у овсяницы // Науч.-информ.бюл. ВИР. **2002**. Вып. 241. С. 6-9.

10) **Урбах** В.Ю. Биометрические методы. М: Наука. 1964. 415 с.

11) **Aldrich** C.G., Rhodes M.T., Miner J.L., Kerley M.S., Paterson J.A. The effects of endophyte-infected tall fescue consumption and use of a dopamine antagonist on intake, digestibility, body temperature, and blood constituents in sheep // J. Anim. Sci. **1993**. V. 71. P. 158-163.

12) **Aldous** D.E., Isaacs S., Mebalds M.I. Endophytes in the genus *Neotyphodium* are not found in Australian native grasses // Australasian Plant Pathology. **1999**. V. 28. P. 183-186.

13) **Arachevaleta** M., Bacon C.W., Hoveland C.S., Radcliffe D.E. Effect of the tall fescue endophyte on plant responses to environmental stress // Agron. J. **1989**. V. 81. P. 83-90.

14) **Azevedo** M.D., **Welty** R.E. A study of fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in the roots of tall fescue seedlings // Mycologia. **1995**. V. 87. P. 289-297.

15) **Bacon** C.W., Porter J.K., Robbins J.D., Luttrell E.S. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses // Appl. Environ. Microbiol. **1977**. V. 34. P. 576-581.

16) **Bacon** C.W., Richardson M. D., White J. F., Jr. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: A role of molecular technology // Crop. Sci. **1997**. V. 37. P. 1415-1425.

17) **Baert** J., Verbruggen I., Carlier L. About the ryegrass endophyte (*Acremonium lolii*) in Belgium // Proceedings of 15th General Meeting of the European Grassland Federation, Wageningen. **1994**. P. 142-144.

18) **Bazely** D.R., Ball J.P., Vicari M., Tanentzap A.J., Bérenger M., Rakocevic T., Koh S. Broad-scale geographic patterns in the distribution of vertically-transmitted, asexual endophytes in four naturally-occurring grasses in Sweden // Ecography. **2007**. V. 30. P. 367-374.

19) **Berde** B.L., **Schild** H. O. Ergot alkaloids and related compounds // Handbook of experimental Pharmacology. **1978**. Vol. 49. P. 47-54.

20) **Bischoff** J.F., Sullivan R.F., Kjer K.M., White J.F. Jr. Phylogenetic placement of anamorphic tribe Ustilaginoideae (Hypocreales, Ascomycota) // Mycologia. **2004**. V. 95. P. 1088-1094.

21) **Boettcher** F., Ober D., Hartmann T. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation // Canadian Journal of Chemistry. **1994**. V. 72. P. 80-85.

22) **Blankenship** J.D. Loline alkaloid biosynthesis in *Neotyphodium uncinatum*, a fungal endophyte of *Lolium pratense*. Ph.D. Diss. University of Kentucky, Lexington. **2004**.

23) **Bouton** J.H., Latch G.S.M., Hill N.S., Hoveland C.S., McCan M.A., Watson R.H., Parish J.A., Hawkins L.L., Thompson F.N. Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes // Agron. J. **2002**. V. 94. P. 567-574.

24) **Browning** R.J., Thompson F.N., Sartin J.L., Leite-Browning M.L. Plasma concentrations of prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in steers administered ergotamine or ergovaline // J. Anim. Sci. **1997**. V. 75. P. 796-802.

25) **Buck** G.W., West C.P., Elbersen H.W. Endophyte effect on drought tolerance in diverse *Festuca* species. *In*: Bacon C.W., Hill N.S. (eds.) *Neotyphodium*/grass interactions. Plenum Press. New York, **1997**. P. 141-143.

26) **Bultman** T.L., White J.F., Jr., Bowdish T.I., Welch A.M., Johnston J. Mutualistic transfer of *Epichloë* spermatia by *Phorbia* flies // Mycologia. **1995**. V. 87. P. 182-189.

27) **Burns** J.S., **Fisher** D.S. Intake and digestion of 'Jesup' tall fescue hays with a novel fungal endophyte, without an endophyte, or with a wild-type endophyte // Crop Sci. **2006**. V. 46. P. 216-223.

28) **Bush** L.P., Fannin F.F., Siegel M.R., Dahlman D.L., Burton H.R. Chemistry, occurrence and biological effects of saturated pyrrolizidine alkaloids associated with endophyte-grass interactions // Agriculture, Ecosystems & Environment. **1993**. V. 44. P. 81-102.

29) **Bush** L.P., Wilkinson H., Schardl C.L. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses // Plant Physiol. **1997**. V. 114. P. 1-7.

30) **Cabral** D., Cafaro M.J., Saidman B., Lugo M., Reddy P.V. White J.F., Jr. Evidence supporting the occurence of a new species of endophyte in some South American grasses // Mycologia. **1999**. V. 91. P. 315-325.

31) **Cheeke** P.R. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock // J. Anim. Sci. **1995**. V. 73. P. 909-918.

32) **Cheplick** G.P., Clay K., Marks S. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* // New Phytol. **1989**. V. 111. P. 89-97.

33) **Chen** Y., Ji Y., Yu H., Wang Z. A new *Neotyphodium* species from *Festuca parvigluma* Steud. grown in China // Mycologia. **2009**. V. 101. P. 681-685.

34) **Christensen** M.J., Bennett R.J., Ansari H.A., Koga H., Johnson R.D., Bryan G.T., Simpson W.R., Koolaard J.P., Nickless E.M., Voisey C.R. *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves // Fungal Gen. Biol. **2008**. Vol. 45. N 2. P. 84–93.

35) **Clay** K. Fungal endophytes of grasses // Annu. Rev. Ecol. Syst. **1990**. V. 21. P. 275-297.

36) **Clay** K., **Schardl** C.L. Evolutionary origin and ecological consequences of endophyte symbioses with grasses // Am. Nat. **2002**. V. 160. P. 99-127.

37) **Craven** K.D., Blankenship J.D., Leuchtmann A., Hignight K., Schardl C.L. Hybrid fungal endophytes symbiotic with the grass *Lolium pratense* // Sydowia. **2001**. V. 53. P. 44-73.

38) **Crush** J.R., Popay A.J., Waller J. Effect of different *Neotyphodium* endophytes on root distribution of a perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivar // New Zealand Journal of Agricultural Research. **2004**.V. 47. P. 345-349.

39) **Doss** R.P., Clement S.L., Kuy S.-R., Welty R.E. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of Tall Fescue // Plant Dis. **1998**. V. 82. P. 738-740.

40) **Dombrowski** J.E., Baldwin J.C., Azevedo M.D., Banowetz G.M. A Sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species // Crop Sci. **2006**. V. 46. P. 1064-1070.

41) **Faeth** S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? // Oikos. **2002**. V. 98. P. 25-36.

42) **Faeth** S.H., **Fagan** W.F. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists // Integ. and Comp. Biol. **2002**. V. 42. P. 360-368.

43) **Fisher** P.J., Petrini 0., Webster L. Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of *Alnus glutinosa* // Mycol. Res. **1991**. V. 95 (5). P. 543-547.

44) **Fleetwood** D.J. Molecular characterisation of the EAS gene cluster for ergot alkaloid biosynthesis in *Epichloë* endophytes of grasses. PhD thesis, Massey University, **2007**. 195 p.

45) **Fletcher** L.R., Hogllind J.H., Sutherland B.L. The impact of *Acremonium* endophytes in New Zealand, past, present and future // Proceedings of the New Zealand Grassland Association. **1990**. V. 52. P. 227-235.

46) **Freeman** E.M. The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel // Phil. Trans., B. **1904**. V. 196. P. 1-27.

47) **Fribourg** H.A., Hoveland C.S., Gwinn K.D. Tall fescue and the fungal endophyte – a review of current knowledge // Tenessee Farm and Home Science. **1991**. P. 30-37.

48) **Ghimire** S.R., Rudgers J.A., Charlton N.D., Young C., Craven K.D. Prevalence of an intraspecific *Neotyphodium* hybrid in natural populations of stout wood reed (*Cinna arundinacea* L.) from eastern North America // Mycologia. **2011**. V. 103. P. 75-84.

49) **Glenn** A.E., Bacon C.W., Price R., Hanline R.T. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implifications // Mycology. **1996**. V. 88. P. 369-383.

50) **Gonzalo-Turpin** H., Barre P., Gilbert A., Grisard A., West C.P., Hazard L. Co-occurring patterns of endophyte infection and genetic structure of the alpine grass, *Festuca eskia*: implications for seed sourcing in ecological restiration // Conserv. Genet. **2010**. V. 11. P. 877-887.

51) **Gwinn** K.D., **Gavin** A.M. Relationship between endophyte infestation level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease // Plant Disease. **1992**. V. 76. P. 911-914.

52) **Han** K., Ji Y.L., Wang Y., Wang Z.W. A *Neotyphodium* endophyte fron *Festuca myuros* L. in Nanjing, China // Mycology. **2012**. V. 3. P. 201-209.

53) **Hartley** S.E., **Grange** A.C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context // Annu. Rev. Entomol. **2009**. V. 54. P. 323-342.

54) **Hartmann** T., **Ober** D. Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in lants and specialized insect herbivores // Topics in Current Chemistry. **2000**. V. 209. P. 207-243.

55) **Hesse** U., Förster K., Schöberlein W., Diepenbrock W. Einfluss des Endophyten *Neotyphodium lolii* auf den Samemertrag von *Lolium perenne*-Genotypen. *In*: Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung österreichischer Pflanzenzuchter.- Irdning, **2001**; 2000. S. 135-138.

56) **Hesse** U., Christensen M.J., Schardl C.L. Tissue specificity of endophyte development in *Epichloë/Neotyphodium* symbioses with grasses // Proceedings of the 11th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. **2004**. V. 4. P. 448-452.

57) **Iannone** L.J., Cabral D., Schardl C.L., Rossi M.S. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America // Mycologia. **2009**. V. 101. P. 340-351.

58) **Iannone** L.J., White J.F.Jr., Giussani L.M., Cabral D., Novas M.V. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina // Mycol Progress. **2011**. V. 10. P. 9-19.

59) Index Fungorum [Электронный ресурс]: the global fungal nomenclator/ CABI, CBS, Landcare Research-N — Режим доступа: http://www.indexfungorum.org/, свободный. — Загл. с экрана.— Яз. англ.

60) **Ingold** C.T. An illustrated guide to aquatic and water-borne Hyphomycetes (Fungi Imperfecti) with notes on their biology // Freshwater Biological Association, Science publications. **1975.** V. 30. P. 1-96.

61) ITIS [Электронный ресурс]: Integrated Taxonomic Information System — Режим доступа: http://www.itis.gov/, свободный. — Загл. с экрана.— Яз. англ.

62) **Jensen** A.M.D., Roulund N. Occurrence of *Neotyphodium* endophytes in permanent grassland with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in Denmark // Agriculture, Ecosystems and Environment. **2004**. V. 104. P. 419-427.

63) **Ji** Y., Zhan L., Kang Y., Sun X., Yu H., Wang Z. A new stromata-producing *Neotyphodium* species symbiotic with clonal grass *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth. grown in China // Mycologia. **2009**. V. 101. P. 200-205.

64) **Jones** E.B.G., **Oliver** A.C. Occurrence of aquatic hyphomycetes on wood submerged in fresh and brackish water // Transactions of the British Mycological Society. **1964**. V. 47. P. 45-48.

65) **Jumpponen** A., Trappe J.M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi // New Phytologist. **1998**. V. 140. P. 295-310.

66) **Justus** M.D., White L. K., Hartman T. O. Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte infected Festuca pratensis // J. Phytochemistry. **1997**. Vol. 44. P. 151-157.

67) **Kane** D.F., Tarn W.Y., Jones, E.B.G. Fungi colonising and sporulating on submerged wood in the River Severn, UK. *In*: Hyde K.D., Jones E.B.G. (eds.) Fungal Succession. Fungal Diversity. **2002**. V.10.P. 45-55.

68) **Kang** Y., Ji Y.L., Sun X.H., Zhan L.H., Li W., Yu H.S. Taxonomy of *Neotyphodium* endophytes of Chinese native *Roegneria* plants // Mycologia. **2009**. V. 101. P. 211-219.

69) **Kannadan** S., Rudgers J.A. Endophyte symbiosis benefits a rare grass under low water availability // Functional Ecology. **2008**. V. 22. P. 706-713.

70) **Kirkby** K.A., Pratley J.E., Hume D.E., Faville M.J., An M., Wu H. Incidence of endophyte *Neotyphodium occultans* in *Lolium rigidum* from Australia // Weed Research. **2011**. V. 51. P. 261-272.

71) **Kohlmeyer** J., **Kohlmeyer** E. Distribution of *Epichloë typhina* (Ascomycetes) and its parasitic fly // Mycologia. **1974**. V. 66. P. 77-86.

72) **Koga** H., Tsukiboshi T., Uematsu T. Incidence of endophytic fungus, *Acremonium uncinatum*, in meadow fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido // Bull. Nat. Grassl. Res. Inst. **1993**. V. 49. P. 35-41.

73) **Koga** H., Tsukiboshi T., Uematsu T. Incidence of endophytic fungus *Acremonium coenophialum* in tall fescue (*Festuca arundinacea*) in Japan// J. Japan. Grassl. Sci. **1995**. V. 40. P. 373-380.

74) **Kotilínek** M., Hiiesalu I., Košnar J., Šmilauerová M., Šmilauer P., Altman J., Dvorský M., Kopecký M., Doleža J. Fungal root symbionts of highaltitude vascular plants in the Himalayas // Scientific Reports. **2017.** V. 7. N 6562. P. 1-14.

75) **Latch** G.C.M., Christensen M.J., Samuels G.J. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand // Mycotaxon. **1984**. V. 20. P. 535-550.

76) **Latch** G.C.M., Hunt W.F., Musgrave D.R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass // New Zealand Journal of Agricultural Research. **1985**. V. 28. P. 165-168.

77) **Latch** G.C.M., Potter L.R., Tyler B.R. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species // Annals of Applied Biology. **1987**. V. 111. P. 59-64.

78) **Lembicz** M., Górzyńska K., Leuchtmann A. Choke disease caused by *Epichloë bromicola* in the grass *Agropyron repens* in Poland // Plant Dis. **2010**. V. 94. P. 1372-1372.

79) **Lembicz** M., Górzyńska K., Olejniczak P., Leuchtmann A. Geographical distribution and effects of choke disease caused by *Epichloë typhina* in populations of the grass *Puccinellia distans* in Poland // Sydowia. **2011**. V. 63. P. 35-48.

80) **Leuchtmann** A., **Clay** K. Nonreciprocal compatibility between *Epichloë typhina* and four host grasses // Mycologia. **1993**. V. 85. P. 157-163.

81) **Leuchtmann** A., **Clay** K. The population biology of grass endophytes. *In*: Carroll G.C., Tudzynski (eds.) The Mycota. V. Plant relationships, part B. Springer, Berlin Heidelberg New York, **1997**. P. 185-204.

82) **Leuchtmann** A., **Schardl** C.L. Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloë* and other congeneric European species // Mycol. Res. **1998**. V. 102. P. 1169-1182.

83) **Leuchtmann** A., Schardl C.L., Siegel M.R. Sexual compatibility and taxonomy of a new species of *Epichloë* symbiotic with fine fescue grasses // Mycologia. **1994**. V. 86. P. 802-812.

84) **Leuchtmann** A., Schmidt D., Bush L. P. Different levels of protective alkaloids ingrasses with stroma forming and seed-transmitted Epichloë/Neotyphodium endophytes // Journal of Chemical Ecology. **2000**. V. 26. P. 1025-1036.

85) **Leuchtmann** A., Bacon C.W., Schardl C.L., White J.F., Tadych M. Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë* // Mycologia. **2014**. V. 106. P. 202-215.

86) **Lewis** G.C., Ravel C., Naffaa W., Astier C., Charmet G. Occurence of *Acremonium* endophytes in wild populations of *Lolium* spp. in European countries and a relationship between level of infection and climate in France // Ann. appl. Biol. **1997**. V. 130. P. 227-238.

87) **Leyronas** C., Raynal G. Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses // Ann. appl. Biol. 2011. V. 139. P. 119-127.

88) **Li** C., Nan Z., Paul V.H., Dapprich P.D., Liu Y. A new *Neotyphodium* species symbiotic with drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*) in China // Mycotaxon. **2004**. V. 90. P. 141-147.

89) **Li** W., Ji Y.L., Yu H.S., Wang Z.W. A new species of *Epichloë* symbiotic with Chinese grasses // Mycologia. 2006. V. 98. P. 560-570.

90) **Li** X., He X., Hou L., Ren Y., Wang S., Su F. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition // Scientific reports. **2018.** V. 8. N. 7896. P. 1-11.

91) **Lugtenberg** B.J.J., Caradus J.R., Johnson L.J. Fungal endophytes for sustainable crop production // FEMS Microbiology Ecology. **2016.** V. 92. N 12. P. 1-17.

92) **Lyons** P.C., Plattner R.D., Bacon C.W. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass // Science. **1986**. V. 232. 487-489.

93) **Lyons** P.C., Evans J.J., Bacon C.W. Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation and metabolism in tall fescue // Plant Physiol. **1990**. V. 92. P. 726-732.

94) **Malinowski** D.P., **Belesky** D.P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of draught and mineral stress tolerance // Crop. Sci. **2000**. V. 40. P. 923-940.

95) **Malinowski** D., Leuchtmann A., Schmidt D., Nösberger. Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* May Increase the Competitive Ability of Medow Fescue // Agron. J. **1997**. V. 85. P. 833-839.

96) **Malinowski** D.P., Alloush G.A., Belesky D.P. Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* // Plant Soil. **1998**. V. 205. P. 1-12.

97) **Malinowski** D.P., Brauer D.K., Belesky D.P. The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency // J. Agronomy and Crop Science. **1999**. V. 183. P. 53-60.

98) **Markham** P., Collinge A.J. Woronin bodies of filamentous fungi // FEMS Microbiol. Rev. **1987.** Vol. 46. N 1. P. 1-11.

99) **Marshall** D., Tunali B., Nelson L.R. Occurrence of Fungal Endophytes in Species of Wild *Triticum* // Crop. Sci. **1999**. V. 39. P. 1507-1512.

100) **Miles** C.O., Di Menna M.E., Jacobs S.W.L., Garthwaite I., Lane G.A., Prestidge R.A., Marshall S.L., Wilkinson H.H., Schardl C.L., Ball O.J.-P., Latch G.C.M. Endophytic Fungi in Indigenous Australian Grasses Assosiated with Toxicity to Livestock // Appl. Environ. Microbiol. **1998**. V. 64. P. 601-606.

101) **Mirlohi** A., Sabzalian M.R., Sharifnabi B., Nekoui M.K. Widespread occurrence of *Neotyphodium*-like endophyte in popullations of *Bromus tomentellus* Boiss. in Iran // FEMS Microbiol. Lett. **2006**. V. 256. P. 126-131.

102) **Mirzahosseini** Z., Shabani L., Sabzalian M.R., Sharifi-Tehrani M. *Neotyphodium* endophytes may increase tolerance to Ni in tall fescue // European Journal of Soil Biology. **2014**. V. 63. P. 33-40.

103) **Miyazaki** S., Ishizaki I., Ishizaka M., Kanbara T., Ishiguro-Takeda Y. Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw // J. Vet. Diagn. Invest. **2004**. V. 16. P. 340-342.

104) **Moon** C.D., Scott B., Schardl C.L., Christensen M.J. The evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses // Mycologia. **2000**. V. 92. P. 1113-1118.

105) **Moon** C.D., Miles C.O., Järlfors U., Schardl C.L. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* species from grasses indigenous to the southeren hemisphere // Mycologia. **2002**. V. 94. P. 694-711.

106) **Moon** C.D., Craven K.D., Leuchtmann A., Clement S.L., Schardl C.L. Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses // Molecular Ecology. **2004**. V. 13. P. 1455-1467.

107) **Moon** C.D., Guillaumin J.J., Ravel C., Li C., Craven K.D., Schardl C.L. New *Neotyphodium* endophyte species from the grass tribes Stipeae and Meliceae // Mycologia. **2007**. V. 99. P. 895-905.

108) **Morgan-Jones** G., Gams W. Notes on Hyphomycetes. XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium* // Mycotaxon. **1982**. V. 15. P. 311-318.

109) **Morgan-Jones** G., White J.F. Jr., Piontelli E.L. Endophyte-host assosiations in forage grasses XIII. *Acremonium chilense*, an undescribed endophyte occurring in *Dactylis glomerata* in Chile // Mycotaxon. **1990**. V. 39. P. 441-454.

110) **Munday-Finch** S.C., Wilkins A.L., Miles C.O., Tomoda H., Omura S. Isolation and structure elucidation of a possible biosynthetic precursor of the lolitrem

family of tremorgenic mycotoxins // J. of Agricultural and Food Chemistry. **1997**. V. 45. P. 199-204.

111) **Niklowitz** P., **Hoffmann** K. Pineal and pituitary involvement in the photoperiodic regulation of body weight, coat color and testicular size of the Djungarian Hamster, Phodopus sungorus // Biol. Reprod. **1988**. V. 39. P. 489-498.

112) **Panaccione** D.G., Wang J., Young C.A., Schardl C.L., Scott B., Damrongkool P. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2001**. V. 98. P. 12820-12825.

113) **Paparu** P., Dubois T., Gold C.S., Niere B., Adipala E., Coyne D. Screenhouse and field persistence of nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* in *Musa* tissue culture plants // Microb. Ecol. **2008**. V. 55. P. 561-568.

114) **Paterson** J., Forcherio C., Larson B., Samford M., Kerley M. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity // J. Anim. Sci. **1995**. V. 73. P. 889-898.

115) **Patterson** C. G., Potter D. A., Fannin F. F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte-infected grasses to Japanese beetle grubs // Entomologia Experimentalis et Applicata. **1991**. V. 61. P. 285-289.

116) **Paul** N.C., Kim W.K., Woo S.K., Park M.S., Yu S.H. Fungal Endophytes in Roots of *Aralia* Species and Their Antifungal Activity // Plant Pathol. J. **2007**. V. 23(4). P. 287-294.

117) **Pažoutová** S. The Evolutionary Strategy of *Claviceps*. *In*: White J.F., Jr., Bacon C.W., Hywel-Jones N.L. and J.W. Spatafora (eds.) Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. Marcel Dekker, Inc. New York, **2003**. P. 334-359.

118) **Philipson** M.N., Christey M.C. The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne* // New Zealand J. Bot. **1986**. V. 24. P. 125-134.

119) **Porter** J.K. Analysis of endophyte toxins: Fescue and other grasses toxic to livestock // J. Anim. Sci. **1995**. V. 73. P. 871-880.

120) **Powell** R.G., Petroski R.J. The loline group of pyrrolizidine alkaloids // Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. **1992**. V. 8. P. 320-338.

121) **Reynolds** E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol. **1963**. V. 17. P. 208-212.

122) **Ren** A., Gao Y., Zhang L., Xie L. Effects of cadmium on growth parameters of endophyte-infected and endophyte-free ryegrass // J. Plant Nutr. Soil Sci. **2006**. V. 169. P. 857-860.

123) **Ren** A.Z., Gao Y.B., Zhou F. Response of *Neotyphodium lolii*-infected perennial ryegrass to phosphorus deficiency // Plant Soil Environ. **2007**. V. 53. P. 113-119.

124) **Richardson** M.D., Chapman G.W., Jr., Hoveland C.S., Bacon C.W. Sugar alcohols in endophyte-infected tall fescue under drought // Crop Sci. **1992.** V. 32. P. 1060-1061.

125) **Richardson** M.D., Cabrera R.I., Murphy J.A., Zaurov D.E. Nitrogen-form and endophyte infection effects on growth, nitrogen uptake, and alkaloid content of chewings fescue turfgrass // J. Plant Nutrit. **1999**. V. 22. P. 67-79.

126) **Riedell** W.E., Kieckhefer R.E., Petroski R.J., Powell R.G. Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity // Journal of Entomological Science. **1991**. V. 26. P. 122-129.

127) **Roberts** C., **Andrae** J. Tall fescue toxicosis and management // Crop Manage. **2004**. doi:10:1094/CM-2004-0427-01-MG.

128) **Rodriguez** R.J., **Redman** R. More than 400 million years of evolution and some plants still can’t make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis // Journal of Experimental Botany. **2008**. V. 59. P. 1109-1114.

129) **Rodriguez** R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles // New phytologist. **2009**. V. 185. P. 314-330.

130) **Rolston** M.P., Stewart A.V., Latch G.C.M., Hume D.E. Endophytes in New Zealand grass seeds: Occurrence and implications for conservation of grass species // New Zealand Journal of Botany. **2002**. V. 40. P. 365-372.

131) **Rowan** D.D. Lolitrems, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction // Agriculture Ecosystems and Environment. **1993**. V. 44. P. 1-4.

132) **Saikkonen** K., Helander M., Faeth S.H., Schulthess F., Wilson D. Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neoptyphodium* endophytes in Arizona fescue populations // Oecologia. **1999**. V. 121. P. 411-420.

133) **Saikkonen** K., Ahlholm J., Helander M., Lehtimäki S., Niemeläinen O. Endophytic fungi in wild and cultivated grasses of Finland // Ecography. **2000**. V. 23. P. 360-366.

134) **Salminen** O.S., Richmond D.S., Grewal S.K., Grewal P.S. Influence of temperature on alkaloid levels and fall armyworm performance in endophytic tall fescue and perennial ryegrass // The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata. **2005**. V. 115. P. 417-426.

135) **Schardl** C.L. *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses // Fungal Genetics and Biology. **2001**. V. 33. P. 69-82.

136) **Schardl** C.L., **Leuchtmann** A. Three new species of Epichloë symbiotic with North American grasses // Mycologia. **1999**. V. 91. P. 95-107.

137) **Schardl** C.L., **Moon** C.D. Processes of species evolution in *Epichloë/Neotyphodium* endophytes of Grasses. *In*: White J.F., Jr., Bacon C.W., Hywel-Jones N.L. and J.W. Spatafora (eds.) Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts. Marcel Dekker, Inc. New York, **2003**. P. 273-310.

138) **Schardl** C.L., Leuchtmann A., Chung K.-R., Penny D., Siegel M. Coevolution by Common Descent of Fungal Symbionts (*Epichloë* spp.) and Grass Host // Mol. Biol. Evol. **1997**. V. 14. P. 133-143.

139) **Schardl** C.L., Young C.A., Faulkner J.R., Florea S., Pan J. Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses // Fungal Ecology. V. 5. **2012**. P. 331-344.

140) **Schmid** J., Day R., Zhang N., Dupont P.-Y., Cox M.P., Schardl C.L., Minards N., Truglio M., Moore N., Harris D.R., Zhou Y. N. Host tissue environment directs activities of an *Epichloë* endophyte, while it induces systemic hormone and defense responses in its native Perennial Ryegrass host // MPMI. **2017.** V. 30. N. 2. P. 138–149.

141) **Schulz** B., **Boyle** C. The endophytic continuum // Mycol. Res. **2006**. V. 109. P. 661-686.

142) **Shymanovich** T., Charlton N.D., Musso A.M., Scheerer J., Cech N.B., Faeth S.H., Young C.A. Interspecific and intraspecific hybrid *Epichloë* species symbiotic with the North American native grass *Poa alsodes* // Mycologia. 2017. V. 109. P. 459-474.

143) **Scott** B., **Young** C. Genetic manipulation of clavicipitalean endophytes / Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts / Eds. White J. F., Jr., Bacon C. W., Hywel-Jones N. L., Spatafora J. W. New York: Marcel Dekker, **2003**. P. 425-443.

144) **Shelby** R.A., **Dalrymple** L.W. Incidence and distribution of the tall fescue endophyte in the United States // Plant Disease. 1987. V. 71. P. 783-786.

145) **Siegel** M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid responce // J. Chem. Ecol. **1990**. V. 16. P. 3301-3315.

146) **Spiering** M.J., Davies E., Tapper B.A., Schmid J., Lane G.A. Simplified extraction of ergovaline and peramine for analysis of tissue distribution in endophyte-infected grass tillers // J. Agric. Food Chem. **2002**. V. 50. P. 5856-5862.

147) **Steinberg** G., Harmer N.J., Schuster M., Kilaru S. Woronin body-based sealing of septal pores // Fungal Genet. Biol. **2017**. Vol. 109. P. 53–55.

148) **Sugawara** K., Inoue T., Yamashita M., Ohkubo H. Distribution of the endophytic fungus, *Neotyphodium occultans* in naturalized Italian ryegrass in western Japan and its production of bioactive alkaloids known to repel insect pests // Grassland Science. **2006**. V. 52. P. 147-154.

149) **Sutherland** B.L., Hume D.E., Tapper B.A. Allelopathic effects of endophyte-infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings // New Zealand Journal of Agricultural Research. **1999**. V. 42. P. 19-26.

150) **Tadych** M., Ambrose K.V., Bergen M.S., Belanger F.C., White J.F. Jr. Taxonomic placement of *Epichloë poae* sp. nov. and horizontal dissemination to seedlings via conidia // Fungal Divers. **2012**. V. 54. P. 117-131.

151) **Tanaka** A., Tapper B.A., Popay A., Parker E.J., Scott B.A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory // Molecular Microbiology. **2005**. V. 57. P. 1036-1050.

152) **Thomas** H., Archer J.E., Turley R.M. Evolution, physiology and phytochemistry of the psychotoxic arable mimic weed darnel (Lolium temulentum L.) // Progress in Botany. **2011**. V. 72. P. 73-104.

153) **Thomas** H., Archer J.E., Turley R.M. Remembering darnel, a forgotten plant of literary, religious, and evolutionary significance // Journal of Ethnobiology. 2016. V. 36. N 1. P. 29–44.

154) **Thompson** F.N., **Stuedemann** J.A. Pathophysiology of fescue toxicosis // Agric. Ecosistems Environ. **1993**. V. 44. P. 263-281.

155) **Tofern** B., Kaloga M., Witte L., Hartmann T., Eich E. Phytochemistry and chemotaxonomy of the Convolvulaceae. Part 8. Occurrence of loline alkaloids in Argyreia mollis (Convolvulaceae) // Phytochemistry. **1999**. V. 51. P. 1177-1180.

156) **Tsai** H.-F., Liu J.-S., Staben C., Christensen M.J., Latch C.M., Siegel M.R., Schardl C.L. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **1994**. V. 91. P. 2542-2546.

157) **Vidal** S, Jaber L.R. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control // Curr. Sci. **2015**. V. 109. P. 46–54.

158) **Wei** Y.K., Gao Y.B., Xu H., Su D., Zhang X., Wang Y.H., Lin F., Chen L., Nie L.Y., Ren A.Z. Occurrence of endophytes in grasses native to northern Chine // Grass and Forage Science. **2006**. V. 61. P. 422-429.

159) **White** J.F. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae // Plant Disease. **1987**. V. 71. P. 340-342.

160) **White** T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. **1990**. V. 18. P. 315-322.

161) **Wilkinson** H.H., Siegel M.R., Blankenship J.D., Mallory A.C., Bush L.P., Schardl C.L. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism // Molecular Plant-Microbe Interactions. **2000**. V.13. P. 1027-1033.

162) **Xu** H., Deckert R.J., Garbary D.J. *Ascophyllum* and its symbionts. X. Ultrastructure of the interaction between *A. nodosum* (Phaeophyceae) and *Mycophycias ascophylli* (Ascomycetes) // Botany. **2008**. V. 86. P. 185-193.

163) **Yamashita** M., Iwamoto M., Maruyama K., Ichihara M., Sawada H. Contrasting infection frequencies of *Neotyphodium* endophyte in naturalized Italian ryegrass populations in Japanese farmlands // Grassland Science. **2010**. V. 56. P. 71–76.

164) **Young** C.A., Felitti S., Shields K., Spangenberg G., Johnson R.D., Bryan G.T., Saikia S., Scott B. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii* // Fungal Genetics and Biology. **2006**. V. 43. P. 679-693.

165) **Zabalgogeazcoa** I., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B., García Ciudad A. The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae*.

Mediterranean permanent grasslands // Grass and Forage Science. **1999**. V. 54. P. 91–95.

166) **Zabalgogeazcoa** I., García Criado B., Bony S. Identification of the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the fine fescue *Festuca ampla* // Plant Disease. **2002**. V. 86. P. 1272-2917.

167) **Zabalgogeazcoa** I., Vázquez de Aldana B.R., García Ciudad A., García Criado B. Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain // Grass and Forage Science. **2003**. V. 58. P. 94-97.

168) **Zabalgogeazcoa** I., García Ciudad A., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B. // Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra* // Europ. J. Agronomy. **2006**. V. 24. P. 374-384.

169) **Zabalgogeazcoa** I., García Ciudad A., Leuchtmann A., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B. Effects of choke disease in the grass *Brachypodium phoenicoides* // Plant Pathology. **2008**. V. 57. P. 467-472.

170) **Zhang** Y.P., **Nan** Z.B. Growth and anti-oxidative systems changes in *Elymus dahuricus* is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability // J. Agronomy and Crop Science. **2007**. V. 193. P. 377-386.

171) **Zhang** Yu., Zhang Ya., Liu M., Shi X., Zhao Z. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro* // The Journal of Microbiology. **2009.** V. 46. N. 6. P. 624-632.

172) **Zhang** X., Ren A., Wei Y., Lin F., Li C., Liu Z., Gao Y. Taxonomy diversity and origins of symbiotic endophytes of *Achnatherum sibiricumin* the Inner Mongolia Steppe of China // FEMS Microbiol. Lett. **2009**. V. 301. P. 12-20.

173) **Zhang** X., Ren A., Ci H., Gao Y. Genetic diversity and structure of *Neotyphodium* species and their host *Achnatherum sibiricum* in a natural grass-endophyte system // Microb. Ecol. **2010**. V. 59. P. 744-756.

174) **Zhang** Q., Gong M., Yuan J., Hou Y., Zhang H., Wang Y., Hou X. Dark Septate Endophyte Improves Drought Tolerance in *Sorghum* // International Journal of Agriculture & Biology. **2017.** V. 19. N. 1. P. 53-60.

175) **Zheng** Y.K., Qiao X.G., Miao C.P., Liu K., Chen Y.W., Xu L.H., Zhao L.X. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi // Ann Microbiol. **2016**. V. 66. P. 529–542.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Спектр растений-хозяев, показаный для эндофитов злаков

(Включая виды *Epichloë*, если они отмечены в статье как эндофиты)

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
1	*Agrostis stolonifera* L.	*Epichloe baconii*	Tsai et al., 1994
2	*Achnatherum eminens* (Cav.) Barkworth	*Neotyphodium chisosum*	Glenn et al., 1996
3	*Achnatherum eminens* (Cav.) Barkworth (*Stipa eminens* Cav.)	*Neotyphodium chisosum*	White, 1987; Glenn et al., 1996
4	*Achnatherum inebrians* (Hance) Keng	*Neotyphodium gansuense*	Moon et al., 2007
5	*Achnatherum purpurascens* (Hitchcock) Keng	(неизвестно)	Wei et al., 2006
6	*Achnatherum robustum* (Vasey) Barkworth	*Neotyphodium funkii*	Moon et al., 2007
7	*Achnatherum robustum* (Vasey) Barkworth (*Stipa lobata* Swallen)	(неизвестно)	White, 1987
8	*Achnatherum robustum* (Vasey) Barkworth (*Stipa robusta* (Vasey) Scribn.)	(неизвестно)	White, 1987
9	*Achnatherum sibiricum* (L.) Keng ex Tzvelev	*Neotyphodium sibiricum*	Zhang et al., 2010
10	*Achnatherum splendens* (Trin.) Nevski	*Neotyphodium* spp.	Wei et al., 2006
11	*Aegilops caudata* L. (*Triticum dichasians* Bowden)	*Neotyphodium* sp.	Marshall et al., 1999
12	*Aegilops columnaris* Zhuk. (*Triticum columnare* (Zhuk.) Morris & Sears)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
13	*Aegilops cylindrica* Host (*Triticum cylindricum* (Host) Cesati)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
14	*Aegilops mutica* Boiss. (*Triticum tripsacoides* (Jaub. & Spach) Bowden)	*Neotyphodium* sp.	Marshall et al., 1999
15	*Aegilops neglecta* Req. ex Bertol. (*Triticum neglectum* (Beretol.) Grueter)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
16	*Aegilops recta* (Zhuk.) Chennav. (*Triticum rectum* (Zhuk.) Bowden)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
17	*Aegilops triuncialis* L. (*Triticum triunciale* (L.) Rasp.)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
18	*Aegilops umbellulata* Zhuk. (*Triticum umbellulatum* (Zhuk.) Bowden)	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
19	*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
20	*Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
21	*Agropyron mongolicum* Keng	(неизвестно)	Wei et al., 2006
22	*Agropyron pectinatum* (M. Bieb.) P. Beauv. (*Agropyron cristatum* var. *pectiniforme* (Roem. & Schult.) Matveev)	(неизвестно)	Wei et al., 2006
23	*Agrostis canina* L.	*Epichloe* sp.	Schardl et al., 1997
24	*Agrostis castellana* Boiss. & Reut.	*Epichloe* sp.	Zabalgogeazcoa et al., 2006
25	*Agrostis macrothyrsa* Hack. (*Agrostis perennans* auct.)	*Epichloe amarillans*	Moon et al., 2004
26	*Agrostis scabra* Willd. (*Agrostis hiemalis* auct.)	*Epichloe amarillans*	Tsai et al., 1994

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
27	*Agrostis tenuis* Sibth. (*Agrostis capillaris* auct.)	*Epichloe baconii*	Schardl et al., 1997
28	*Alopecurus arundinaceus* Poir.	(неизвестно)	Zabalgogeazcoa et al., 2006
29	*Alopecurus bulbosus* Gouan	*Epichloe* sp.	Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1974
30	*Alopecurus pratensis* L.	*Epichloe* sp.	Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1974
31	*Anthoxanthum odoratum* L.	*Epichloe typhina*	Schardl et al., 1997
32	*Arrhenatherum elatius* (L.) J. Presl & C. Presl	*Epichloe typhina*	Craven et al., 2001
33	*Avenella flexuosa* (L.) Drejer (*Deschampsia flexuosa* (L.) Nees)	*Epichloe* sp.	Bazely et al., 2007
34	*Brachyelytrum erectum* (Schreb.) P. Beauv.	*Epichloe brachyelytri*	Shardl, Leuchtmann, 1999
35	*Brachypodium phoenicoides* (L.) P. Beauv. ex Roem. & Schult.	*Epichloe typhina*	Zabalgogeazcoa et al., 2008
36	*Brachypodium pinnatum* (L.) Beauv.	*Epichloe typhina*	Craven et al., 2001
37	*Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv.	*Epichloe sylvatica*	Schardl et al., 1997
38	*Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv.	(неизвестно)	Zabalgogeazcoa et al., 2006
39	*Bromopsis benekenii* (Lange) Holub (*Bromus benekenii* (Lange) Trimen)	*Epichloe bromicola*	Craven et al., 2001
40	*Bromopsis erecta* (Huds.) Fourr. (*Bromus erectus* Huds.)	*Epichloe bromicola*	Schardl et al., 1997
41	*Bromopsis ramosa* (Huds.) Holub (*Bromus ramosus* Huds.)	*Epichloe bromicola*	Leuchtmann, Schardl, 1998
42	*Bromopsis tomentella* (Boiss.) Holub (*Bromus tomentellus* Boiss.)	(неизвестно)	Mirlohi et al., 2006
43	*Bromus anomalus* Rupr. ex E. Fourn.	*Neotyphodium starii*	White et al., 2001, цит. по: Mirlohi et al., 2006
44	*Bromus auleticus* Trin. ex Nees	*Neotyphodium tembladerae, Neotyphodium pampeanum*	Iannone et al., 2011
45	*Bromus brachyantherus* Döll	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
46	*Bromus kalmii* A. Gray	*Neotyphodium* sp.	Moon et al., 2004
47	*Bromus setifolius* J. Presl	Neotyphodium tembladerae	Iannone et al., 2011
48	*Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth	*Epichloe* sp.	Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1974
49	*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth	*Neotyphodium stromatolongum*	Ji et al., 2009
50	*Calamagrostis villosa* (Chaix) J.F. Gmel.	*Epichloe baconii*	Schardl et al., 1997
51	*Ceratochloa cathartica* (Vahl) Herter (*Bromus catharticus* Vahl)	(неизвестно)	Colabelli et al., 2007, цит. по: Iannone et al., 2011
52	*Chascolytrum paleapiliferum* (Parodi) Matthei (*Briza paleapilifera* Parodi)	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
53	*Cinna arundinacea* L.	*Neotyphodium schardii*	White, 1987; Ghimire et al., 2011
54	*Cinna latifolia* (Trevir.) Griseb.	(неизвестно)	White, 1987
55	*Cleistogenes squarrosa* (Trin.) Keng	(неизвестно)	Wei et al., 2006

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
56	*Dactylis glomerata* L.	*Epichloe typhina*	Schardl et al., 1997
57	*Dactylis glomerata* L.	*Neotyphodium chilense*	Glenn et al., 1996; Morgan-Jones et al., 1990
58	*Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv.	(неизвестно)	Saikkonen et al., 2000
59	*Digitaria insularis* (L.) Fedde	(неизвестно)	White, 1987
60	*Echinopogon caespitosus* C.E. Hubb.	*Neotyphodium* sp.	Miles et al., 1998
61	*Echinopogon cheelii* C.E. Hubb.	*Neotyphodium* sp.	Miles et al., 1998
62	*Echinopogon intermedius* C.E. Hubb.	*Neotyphodium* sp.	Miles et al., 1998
63	*Echinopogon nutans* var. *major* C.E. Hubb.	*Neotyphodium* sp.	Miles et al., 1998
64	*Echinopogon ovatus* (G. Forst.) P. Beauv.	*Neotyphodium aotearoae*	Moon et al., 2002
65	*Echinopogon ovatus* (G. Forst.) P. Beauv.	*Neotyphodium australiense*	Moon et al., 2002
66	*Elymus canadensis* L.	*Epicoloe elymi*	Tsai et al., 1994
67	*Elymus caninus* (L.) L. (*Agropyron caninum* (L.) P. Beauv.)	(неизвестно)	Leuchtmann, Clay, 1997
68	*Elymus ciliaris* (Trin.) Tzvelev (*Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski)	*Neotyphodium sinicum*	Kang et al., 2009
69	*Elymus ciliaris* (Trin.) Tzvelev (*Roegneria japonensis* (Honda) Keng & S.L.Chen)	*Neotyphodium sinicum*	Kang et al., 2009
70	*Elymus dahuricus* Turcz. ex Griseb.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
71	*Elymus elymoides* ssp. *brevifolius* (J.G. Sm.) Barkworth (*Sitanion longifolium* J.G. Sm.)	(неизвестно)	White, 1987
72	*Elymus excelsus* Turcz. ex Griseb.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
73	*Elymus gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev (*Roegneria turczaninovii* (Drob.) Nevski)	(неизвестно)	Wei et al., 2006
74	*Elymus hybridus* (Keng) S.L.Chen (*Roegneria hybrida* Keng)	*Neotyphodium sinicum*	Kang et al., 2009
75	*Elymus hystrix* L.	*Epichloe elymi*	Craven et al., 2001
76	*Elymus hystrix* L. (*Hystrix patula* Moench)	*Epichloe typhina*	Leuchtmann, Clay, 1993
77	*Elymus hystrix* var. *hystrix* L. (*Asperella hystrix* (L.) Humb.)	*Epichloe* sp.	Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1974
78	*Elymus macgregorii* R.E. Brooks & J.J.N. Campb.	Epichloe elymi	Moon et al., 2004
79	*Elymus nutans* Griseb.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
80	*Elymus sibiricus* L.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
81	*Elymus tsukushiensis* Honda (*Roegneria kamoji* (Ohwi) Ohwi ex Keng)	*Epichloe yangzii*	Li et al., 2006
82	*Elymus tsukushiensis* Honda (*Roegneria kamoji* (Ohwi) Ohwi ex Keng)	*Neotyphodium sinicum*	Kang et al., 2009
83	*Elymus tsukushiensis* Honda (*Roegneria mayebarana* (Honda) Ohwi)	*Neotyphodium sinicum*	Kang et al., 2009
84	*Elymus villosus* Muhl. ex Willd.	*Epichloe elymi*	Craven et al., 2001
85	*Elymus virginicus* L.	*Epichloe elymi*	Schardl et al., 1997
86	*Elymus virginicus* L.	*Neotyphodium* sp.	Moon et al., 2004
87	*Elytrigia bessarabica* (Savul. & Rayss) Prokudin (*Agropyron junceum* Nevski)	*Epichloe* sp.	Leuchtmann, Clay, 1997

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
88	*Elytrigia elongata* (Host) Nevski (*Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv.)	(неизвестно)	Wei et al., 2006
89	*Elytrigia repens* (L.) Nevski	(неизвестно)	Wei et al., 2006
90	*Elytrigia repens* (L.) Nevski (*Agropyron repens* (L.) P. Beauv.)	*Epichloe bromicola*	Lembicz et al., 2010
91	*Elytrigia repens* (L.) Nevski (*Agropyron repens* (L.) P. Beauv.)	*Epichloe* sp.	Leuchtmann, Clay, 1997
92	*Elytrigia repens* (L.) Nevski (*Elymus repens* (L.) Gould)	(неизвестно)	Saikkonen et al., 2000
93	*Festuca altissima* All.	(неизвестно)	Schardl et al., 1997
94	*Festuca ampla* Hack.	*Epichloe festucae*	Zabalgogeazcoa et al., 2002
95	*Festuca arenaria* Osbeck	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
96	*Festuca argentina* (Speg.) Parodi	*Neotyphodium tembladerae*	Iannone et al., 2011
97	*Festuca arizonica* Vasey	*Neotyphodium huerfanum*	Moon et al., 2004
98	*Festuca arizonica* Vasey	*Neotyphodium starrii*	Sullivan, Faeth, 2004, цит по: Zhang et al., 2010
99	*Festuca arizonica* Vasey	*Neotyphodium tembladerae*	Saikkonen et al., 1999
100	*Festuca arundinacea* Schreb.	*Neotyphodium coenophialum*	Koga et al., 1995
101	*Festuca arundinacea* Schreb.	*Neotyphodium typhinum*	Glenn et al., 1996
102	*Festuca curvula* Gaudin	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
103	*Festuca dissitiflora* Steud. ex Griseb.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
104	*Festuca eskia* Ramond ex DC.	*Epichloe festucae*	Gonzalo-Turpin et al., 2010
105	*Festuca fiebrigii* Pilg.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
106	*Festuca fimbriata* Nees	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
107	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	*Epichloe festucae*	Schardl et al., 1997
108	*Festuca gigantea* (L.) Vill.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
109	*Festuca glauca* Lam.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
110	*Festuca heterophylla* Lam.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
111	*Festuca hieronymi* Hack.	*Neotyphodium lolii*	Rivas, Zanolli, 1909, цит. по: Miles et al., 1998
112	*Festuca hieronymi* Hack.	*Neotyphodium tembladerae*	Iannone et al., 2011
113	*Festuca juncifolia* St.-Amans	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
114	*Festuca magellanica* Lam.	*Neotyphodium tembladerae*	Iannone et al., 2011
115	*Festuca ovina* L.	*Epichloe festucae*	Zabalgogeazcoa et al., 2006
116	*Festuca pallens* Host (*Festuca vaginata* auct.)	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
117	*Festuca parodii* St.-Yves	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
118	*Festuca parvigluma* Steud.	*Neotyphodium sinofestucae*	Chen et al., 2009
119	*Festuca pratensis* Huds.	*Neotyphodium uncinatum*	Saikkonen et al., 2000

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
120	*Festuca pratensis* Huds. (*Lolium pratense* (Huds.) Darbysh.)	*Neotyphodium siegelii*	Craven et al., 2001
121	*Festuca pseudodalmatica* Krajina	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
122	*Festuca rubra* L.	*Epichloe festucae*	Tsai et al., 1994
123	*Festuca rupicaprina* (Hack.) A.Kern.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
124	*Festuca simpliciuscula* (Hack.) E.B. Alexeev	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
125	*Festuca spectabilis* Bertol.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
126	*Festuca subverticillata* (Pers.) E.B. Alexeev (*Festuca obtusa* Biehler)	*Neotyphodium* sp.	Moon et al., 2004
127	*Festuca superba* Parodi ex Türpe	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
128	*Festuca trachyphylla* (Hack.) Krajina	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
129	*Festuca trachyphylla* (Hack.) Krajina (*Festuca longifolia* auct.)	*Epichloe festucae*	Tsai et al., 1994
130	*Festuca tucumanica* E.B. Alexeev	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
131	*Festuca ulochaeta* Nees ex Steud.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
132	*Festuca valesiaca* Gaudin	*Epichloe* sp.	Schardl et al., 1997
133	*Festuca varia* Haenke	(неизвестно)	Schardl et al., 1997
134	*Festuca weberbaueri* Pilg.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
135	*Glyceria striata* (Lam.) Hitchc.	*Epichloe glyceriae*	Schardl et al., 1997
136	*Holcus lanatus* L.	*Epichloe clarkii*	Schardl et al., 1997
137	*Holcus mollis* L.	*Epichloe* sp.	Moon et al., 2004
138	*Hordelymus europaeus* (L.) Harz	*Neotyphodium* sp.	Moon et al., 2004
139	*Hordelymus europaeus* (L.) Harz (*Elymus europaeus* L.)	(неизвестно)	White, 1987
140	*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link	*Neotyphodium* sp.	Moon et al, 2004
141	*Hordeum comosum* J. Presl	(неизвестно)	Vila Aiub et al., 2001, цит. по: Iannone et al., 2011
142	*Koeleria cristata* (L.) Pers.	*Epichloe festucae*	Craven et al., 2001
143	*Leymus chinensis* (Trin.) Tzvelev	(неизвестно)	Wei et al., 2006
144	*Lolium canariense* Steud.	*Neotyphodium typhinum* var. *canariense*	Moon et al., 2000
145	*Lolium multiflorum* Lam.	*Neotyphodium occultans*	Sugawara et al., 2006
146	*Lolium perenne* L.	*Epichloe typhina*	Craven et al., 2001
147	*Lolium perenne* L.	*Neotyphodium lolii*	Dombrowski et al., 2006
148	*Lolium remotum* Schrank	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
149	*Lolium rigidum* Gaudin	*Neotyphodium occultans*	Kirkby et al., 2011
150	*Lolium temulentum* L.	*Neotyphodium occultans*	Leyronas, Raynal, 2001
151	*Melica ciliata* L.	*Neotyphodium guerinii*	Moon et al., 2007
152	*Melica dendroides* Lehm. (*Melica decumbens* Thunb.)	*Neotyphodium aotearoae*	Moon et al., 2002
153	*Melica dendroides* Lehm. (*Melica decumbens* Thunb.)	*Neotyphodium melicicola*	Moon et al., 2002
154	*Melica macra* Nees	(неизвестно)	Iannone et al., 2011

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
155	*Melica mutica* Walter (*Melica racemosa* Muhl.)	*Neotyphodium aotearoae*	Moon et al., 2002
156	*Melica mutica* Walter (*Melica racemosa* Muhl.)	*Neotyphodium melicicola*	Moon et al., 2007
157	*Melica picta* K. Koch	(неизвестно)	Leuchtmann, Clay, 1997
158	*Melica scaberrima* (Nees ex Steud.) Hook.f.	(неизвестно)	White, 1987
159	*Melica stuckertii* Hack.	*Neotyphodium tembladerae*	Moon et al., 2007
160	*Melica transsilvanica* Schur	*Neotyphodium guerinii*	Moon et al., 2007
161	*Micropyrum tenellum* (L.) Link	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
162	*Milium effusum* L.	*Epichloe* sp.	Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1974
163	*Molinia caerulea* (L.) Moench	*Epichloe* sp.	Leyronas, Raynal, 2001
164	*Nassella viridula* (Trin.) Barkworth (*Stipa viridula* Trin.)	(неизвестно)	White, 1987
165	*Pascopyrum smithii* (Rydb.) Barkworth & D.R. Dewey (*Elytrigia smithii* (Rydb.) Nevski)	(неизвестно)	Wei et al., 2006
166	*Phleum alpinum* L.	*Neotyphodium tembladerae*	Iannone et al., 2011
167	*Phleum pratense* L.	*Epichloe typhina*	Schardl et al., 1997
168	*Poa* aff. *ligularis* Nees ex Steud.	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
169	*Poa alopecurus* (Gaudich. ex Mirb.) Kunth	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
170	*Poa angustifolia* L.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
171	*Poa annua* L.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
172	*Poa autumnalis* Muhl. ex Elliott	(неизвестно)	White, 1987
173	*Poa bergii* Hieron.	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
174	*Poa bonariensis* (Lam.) Kunth	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
175	*Poa chaixii* Vill.	*Epichloe* sp.	Schardl et al., 1997
176	*Poa compressa* L.	*Epichloe* sp.	Schardl et al., 1997
177	*Poa durifolia* Giussani, Nicora & F.A. Roig	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
178	*Poa faberi* Rendle (*Poa paucifolia* Keng f. ex Shan Chen)	(неизвестно)	Wei et al., 2006
179	*Poa gymnantha* Pilg.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
180	*Poa hieronymii* Hack.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
181	*Poa holciformis* J. Presl	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
182	*Poa huecu* Parodi	*Neotyphodium tembladerae*	Iannone et al., 2011
183	*Poa lanigera* Nees	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
184	*Poa lanuginosa* Poir.	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
185	*Poa lilloi* Hack.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
186	*Poa nemoralis* L.	*Epichloe typhina*	Leuchtmann, Schardl, 1998
187	*Poa palustris* L.	(неизвестно)	White, 1987; Wei et al., 2006
188	*Poa paucispicula* Scribn. & Merr.	(неизвестно)	White, 1987
189	*Poa plicata* Hack.	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
190	*Poa pratensis* L.	*Epichloe typhina*	Schardl et al., 1997

No	Растение-хозяин	Вид эндофита	Источник
191	*Poa secunda* ssp. *juncifolia* (Scribn.) Soreng	*Epichloe poae*	Tadych et al., 2012
192	*Poa spiciformis* (Steud.) Hauman & Parodi	*Neotyphodium* sp.	Iannone et al., 2011
193	*Poa stuckertii* (Hack.) Parodi	(неизвестно)	Iannone et al., 2011
194	*Poa sylvestris* A. Gray	*Neotyphodium* sp.	Moon et al., 2004
195	*Poa trivialis* L.	*Epichloe typhina*	Craven et al., 2001
196	*Poa trivialis* L. (*Poa sylvicola* Guss.)	*Epichloe typhina*	Schardl et al., 1997
197	*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.	*Epichloe typhina*	Lembicz et al., 2011
198	*Sphenopholis obtusata* (Michx.) Scribn.	*Epichloe amarillans*	Tsai et al., 1994
199	*Stipa grandis* P.A. Smirn.	(неизвестно)	Wei et al., 2006
200	*Triticum monococcum* L.	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
201	*Triticum turgidum* L.	*Acremonium* sp.	Marshall et al., 1999
202	*Vulpia ciliata* Dumort.	(неизвестно)	Leyronas, Raynal, 2001
203	*Vulpia myuros* (L.) C.C. Gmel. (*Festuca myuros* L.)	*Neotyphodium sinofestucae*	Han et al., 2012

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Результаты анализа образцов, собранных в Москве и Московской области (2013 г.)

1 - наличие эндофитной инфекции, 0 - отсутствие.

Дата сбора	Место сбора	Вид растения	Части растения	Наличие инфекции
МОСКВА				
07.08.2013	м. Речной вокзал (Парк Дружбы)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
07.08.2013	м. Речной вокзал (сквер)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
07.08.2013	м. Сокол (остановка)	*F. pratensis*	Листья	0
07.08.2013	м. Сокол (остановка)	*L. perenne*	Листья	0
07.08.2013	м. Сокол (у магазина)	*L. perenne*	Листья	0
08.08.2013	м. Маяковская (Патриаршие пруды)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
08.08.2013	м. Маяковская (Сад "Аквариум")	*F. pratensis*	Листья	0
08.08.2013	м. Маяковская (Сад "Аквариум")	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
08.08.2013	м. Цветной бульвар (задний двор МГМСУ)	*F. pratensis*	Листья, соцветия	0
08.08.2013	м. Цветной бульвар (задний двор МГМСУ)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
08.08.2013	м. Цветной бульвар (парк)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
09.08.2013	м. Алма-Атинская (газон)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
09.08.2013	м. Коломенская	*L. perenne*	Листья	0
09.08.2013	м. Коломенская (Музей-заповедник, у пруда)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
10.08.2013	м. Кунцевская (парк "Москворецкий")	*L. perenne*	Листья	0
10.08.2013	**м. Филевский парк**	***F. pratensis***	**Семена**	**1**
10.08.2013	м. Электрозаводская (Сквер "Молодежный")	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
11.08.2013	м. Волоколамская (Митинский парк)	*F. pratensis*	Листья	0
11.08.2013	м. Волоколамская (Митинский парк)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
11.08.2013	м. Крылатское (лесной массив)	*F. pratensis*	Листья, соцветия	0
11.08.2013	м. Крылатское (лесной массив)	*L. perenne*	Листья	0
11.08.2013	м. Парк Победы	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
12.08.2013	м. Александровский сад	*F. pratensis*	Листья, семена	0
12.08.2013	м. Александровский сад	*L. perenne*	Листья	0
12.08.2013	м. Курская	*L. perenne*	Листья	0
12.08.2013	м. Партизанская	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
12.08.2013	м. Щёлковская	*F. pratensis*	Листья, соцветия	0
12.08.2013	м. Щёлковская	*L. perenne*	Листья	0
13.08.2013	**м. Красносельская**	***F. pratensis***	**Семена**	**1**
13.08.2013	м. Красные ворота (Сад им. А. Баумана)	*L. perenne*	Листья	0
13.08.2013	м. Лубянка	*L. perenne*	Листья	0
13.08.2013	м. Фрунзенская (усадьба)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
14.08.2013	**м. Марьино**	***F. pratensis***	**Семена**	**1**
14.08.2013	**м. Университет (Биологический факультет)**	***F. pratensis***	**Листья**	**1**
14.08.2013	м. Шаболовская (парк)	*L. perenne*	Соцветия, листья	0
15.08.2013	м. Планерная	*L. perenne*	Листья	0
15.08.2013	м. Тушинская	*F. pratensis*	Листья, соцветия	0

Дата сбора	Место сбора	Вид растения	Части растения	Наличие инфекции
15.08.2013	м. Тушинская	*L. perenne*	Листья	0
15.08.2013	м. Университет (Черемушкинский рынок)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
16.08.2013	м. Баррикадная	*L. perenne*	Листья	0
16.08.2013	м. Беговая	*L. perenne*	Листья	0
16.08.2013	м. Октябрьское поле	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
17.08.2013	**м. Выхино (двор)**	***F. pratensis***	**Семена, листья**	**1**
17.08.2013	м. Таганская (газон у магазина)	*L. perenne*	Листья	0
17.08.2013	м. Текстильщики	*F. pratensis*	Листья	0
17.08.2013	м. Текстильщики	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
18.08.2013	м. ВДНХ	*F. pratensis*	Листья, соцветия	0
18.08.2013	м. ВДНХ	*L. perenne*	Листья, семена	0
18.08.2013	м. Медведково	*F. pratensis*	Листья	0
18.08.2013	м. Медведково	*L. perenne*	Листья	0
18.08.2013	**м. Проспект Мира**	***F. pratensis***	**Семена**	**1**
18.08.2013	м. Свиблово	*L. perenne*	Листья	0
19.08.2013	м. Новокузнецкая	*L. perenne*	Листья	0
19.08.2013	м. Ходынское поле	*L. perenne*	Листья	0
19.08.2013	**м. Царицыно (парк)**	***F. pratensis***	**Семена**	**1**
20.08.2013	м. Академическая	*F. pratensis*	Листья	0
20.08.2013	м. Академическая	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
20.08.2013	м. Китай-город	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
20.08.2013	м. Октябрьская	*L. perenne*	Листья	0
21.08.2013	м. Университет (Манеж МГУ)	*F. pratensis*	Соцветия, листья	0
21.08.2013	м. Юго-Западная	*F. pratensis*	Листья	0
21.08.2013	м. Юго-Западная	*L. perenne*	Листья	0
22.08.2013	м. Алтуфьево	*F. pratensis*	Листья	0
22.08.2013	м. Алтуфьево	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
22.08.2013	м. Менделеевская	*L. perenne*	Листья	0
22.08.2013	м. Отрадное	*F. pratensis*	Листья, семена	0
22.08.2013	м. Петровско-Разумовская	*F. pratensis*	Листья	0
22.08.2013	м. Петровско-Разумовская	*L. perenne*	Листья	0
23.08.2013	м. Калужская	*L. perenne*	Листья	0
23.08.2013	м. Новоясеневская (лесной массив)	*F. pratensis*	Листья	0
23.08.2013	м. Профсоюзная	*F. pratensis*	Листья	0
23.08.2013	м. Тёплый Стан	*F. pratensis*	Листья	0
23.08.2013	м. Тёплый Стан	*L. perenne*	Листья	0
24.08.2013	м. Нагорная	*L. perenne*	Листья	0
24.08.2013	м. Полянка	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
24.08.2013	м. Севастопольская	*F. pratensis*	Листья	0
24.08.2013	м. Севастопольская	*L. perenne*	Листья	0
24.08.2013	м. Тульская	*L. perenne*	Листья	0
25.08.2013	м. Сокольники (парк)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
25.08.2013	м. Улица Подбельского (двор)	*F. pratensis*	Листья	0
25.08.2013	м. Улица Подбельского (остановка трамвая)	*L. perenne*	Листья	0
25.08.2013	м. Улица Подбельского (трамвайные пути)	*L. perenne*	Листья	0
25.08.2013	**м. Университет (Физический факультет)**	***F. pratensis***	**Листья, семена**	**1**
26.08.2013	м. Аннино	*F. pratensis*	Листья, семена	0
26.08.2013	м. Аннино	*L. perenne*	Листья	0

Дата сбора	Место сбора	Вид растения	Части растения	Наличие инфекции
26.08.2013	м. Южная	*F. pratensis*	Листья	0
27.08.2013	м. Бунинская Аллея	*L. perenne*	Листья	0
27.08.2013	м. Варшавская	*L. perenne*	Листья	0
27.08.2013	м. Ул. Скобелевская	*L. perenne*	Листья	0
29.08.2013	**м. Речной вокзал**	***F. pratensis***	**Семена, листья**	**1**
30.08.2013	м. Марьина Роща	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
30.08.2013	м. Римская	*L. perenne*	Листья	0
30.08.2013	м. Сретенский бульвар	*L. perenne*	Листья, семена	0
31.08.2013	м. Братиславская	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
31.08.2013	м. Волжская	*L. perenne*	Листья	0
31.08.2013	м. Дубровка	*F. pratensis*	Листья	0
31.08.2013	м. Дубровка	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
01.09.2013	м. Борисово	*F. pratensis*	Листья	0
01.09.2013	м. Борисово	*L. perenne*	Листья	0
01.09.2013	м. Зябликово	*L. perenne*	Листья	0
02.09.2013	м. Авиамоторная	*F. pratensis*	Листья	0
02.09.2013	м. Авиамоторная	*L. perenne*	Листья	0
02.09.2013	м. Новокосино	*F. pratensis*	Листья	0
02.09.2013	м. Новокосино	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
02.09.2013	м. Перово	*L. perenne*	Листья	0
05.09.2013	м. Пятницкое шоссе	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
МОСКОВСКАЯ ОБЛАСТЬ				
27.08.2013	ст. Клин (Ленинградское направление)	*L. perenne*	Листья	0
29.08.2013	Зеленоград, Андреевка (двор)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
04.09.2013	1-й микрорайон Митина	*F. pratensis*	Листья	0
04.09.2013	1-й микрорайон Митина	*L. perenne*	Листья	0
04.09.2013	4-й микрорайон Митина	*F. pratensis*	Листья, семена	0
04.09.2013	Вахнеевка (авт.400Т)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
04.09.2013	Вахнеевка (авт.400Т)	*L. perenne*	Листья	0
04.09.2013	Поселок Юрлово (авт.400Т)	*L. perenne*	Листья, семена	0
04.09.2013	Поселок Юрлово (авт.400Т)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
04.09.2013	Ул. Заводская (авт.400Т)	*F. pratensis*	Листья	0
06.09.2013	ст. Жилево (Павелецкое направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
06.09.2013	ст. Михнево (Павелецкое направление)	*F. pratensis*	Листья	0
07.09.2013	ст. Яганово (Павелецкое направление)	*F. pratensis*	Листья	0
07.09.2013	ст. Яганово (Павелецкое направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
10.09.2013	ст. Балабаново (Киевское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
10.09.2013	ст. Кресты (Киевское направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
10.09.2013	ст. Селятино (Киевское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
11.09.2013	ст. Подольск (Курское направление)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
11.09.2013	ст. Столбовая (Курское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
11.09.2013	ст. Столбовая (Курское направление)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
11.09.2013	ст. Чепелево (Курское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
12.09.2013	ст. Опалиха (Рижское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
12.09.2013	ст. Снегири (Рижское направление)	*L. perenne*	Листья	0
12.09.2013	ст. Устиновка (Рижское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
12.09.2013	ст. Устиновка (Рижское направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
13.09.2013	ст. Дрезна (Горьковское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
13.09.2013	ст. Дрезна (Горьковское направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
13.09.2013	ст. Захарово (Горьковское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
13.09.2013	ст. Храпуново (Горьковское направление)	*F. pratensis*	Листья	0

Дата сбора	Место сбора	Вид растения	Части растения	Наличие инфекции
23.09.2013	ст. Дмитров (Савеловское направление)	*L. perenne*	Листья	0
23.09.2013	ст. Икша (Савеловское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
23.09.2013	**ст. Лобня (Савеловское направление)**	***F. pratensis***	**Листья**	**1**
24.09.2013	ст. Заветы Ильича (Ярославское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
24.09.2013	ст. Путилово (Ярославское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
24.09.2013	ст. Семхоз (Ярославское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
26.09.2013	ст. Голицыно (Белорусское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
26.09.2013	ст. Голицыно (Белорусское направление)	*L. perenne*	Листья	0
26.09.2013	ст. Звенигород, биостанция (Белорусское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена, соцветия	0
26.09.2013	ст. Кубинка (Белорусское направление)	*L. perenne*	Листья, соцветия	0
27.09.2013	ст. Крюково (Ленинградское направление)	*L. perenne*	Листья	0
27.09.2013	ст. Подсолнечная (Ленинградское направление)	*F. pratensis*	Листья	0
27.09.2013	ст. Подсолнечная (Ленинградское направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
30.09.2013	ст. Белоозерская (Казанское направление)	*L. perenne*	Листья, семена	0
30.09.2013	ст. Куровская (Казанское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
30.09.2013	ст. Раменское (Казанское направление)	*F. pratensis*	Листья, семена	0
30.09.2013	ст. Раменское (Казанское направление)	*L. perenne*	Листья	0

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Характеристики проростков *Festuca pratensis* на 20-е сут. роста

1 - наличие эндофитной инфекции, 0 - отсутствие.

Растение	Длина корня, мм	Длина надземной части, мм	Корень	Лист1, влагалище	Лист1, основание пластинки	Лист1, средняя часть	Лист1, конец	Лист2
Речс-1	78	147	1	1	1	1	1	1
Речс-2	36	92	1	1	1	1	1	1
Речс-3	71	128	1	1	1	1	1	1
Речс-4	45	98	1	1	1	1	1	1
Речс-5	93	160	1	1	1	0	0	1
Речс-6	46	120	1	1	1	1	0	1
Речс-7	94	113	1	1	1	1	1	1
Речс-8	69	103	1	1	1	1	1	1
Речс-9	38	87	1	1	1	1	1	1
Речс-10	68	80	1	1	1	1	1	1
Речс-11	40	119	1	1	1	1	1	1
Речс-12	60	143	1	1	1	1	0	1
Речс-13	69	144	1	1	1	1	0	1
Речс-14	57	113	1	1	1	1	1	1
Речс-15	74	169	1	1	1	1	0	0
Речс-16	46	110	1	1	1	1	1	1
Речс-17	81	112	1	1	1	1	1	1
Речс-18	56	160	1	1	1	1	0	1
Речс-19	17	29	1	1	1	1	1	1
Речс-20	33	50	1	1	1	1	0	1
УФС-1	63	128	1	1	1	1	0	1
УФС-2	61	151	1	1	1	1	1	1
УФС-3	75	130	1	1	1	1	1	1
УФС-4	52	107	1	1	1	1	1	1
УФС-5	75	112	1	1	1	1	1	1
УФС-6	82	140	1	1	1	1	1	1
УФС-7	91	149	1	1	1	1	0	1
УФС-8	85	143	1	1	1	1	0	1
УФС-9	38	104	1	1	1	1	1	1
УФС-10	33	12	1	1	1	1	1	1
УФС-12	25	104	1	1	1	1	1	1
УФС-13	27	72	1	1	1	1	1	1
УФС-14	14	43	1	1	1	1	1	1
УФС-15	52	134	1	1	1	1	1	1
УФС-16	26	82	1	1	1	1	1	1
УФС-17	56	66	1	1	1	1	1	1
УФС-18	96	149	1	1	1	0	0	1
УФС-19	53	102	1	1	1	1	1	1
УФС-20	47	93	1	1	1	1	1	1
Инфицированность разных частей растения, %			100	100	100	94,9	71,8	97,4

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Ростовые характеристики отдельных растений *Festuca gigantea*, выращенных на питательной среде с вариацией минерального состава

Обозначения: N+/N- – наличие/отсутствие источников азота в среде, P+/P- – наличие/отсутствие источников фосфора в среде, E+/E- – присутствие/отсутствие эндофита в растении; выделены растения, исключенные из анализа

№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм	№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм
1	N+P+	E+	33	132	2	202	119	161	N+P+	E-	25	220	2	151	121
2	N+P+	E+	25	138	2	135	120	162	N+P+	E-	25	179	2	130	80
3	N+P+	E+	22	124	2	120	97	163	N+P+	E-	24	112	2	140	121
4	N+P+	E+	20	216	2	173	96	164	N+P+	E-	27	173	2	193	122
5	N+P+	E+	13	98	2	111	80	165	N+P+	E-	19	125	2	129	44
6	N+P+	E+	20	119	2	134	116	166	N+P+	E-	24	243	2	156	94
7	N+P+	E+	21	180	2	147	85	167	N+P+	E-	25	110	2	105	98
8	N+P+	E+	19	191	2	119	105	168	N+P+	E-	28	163	2	111	102
9	N+P+	E+	18	197	2	110	70	169	N+P+	E-	26	42	2	125	46
10	N+P+	E+	23	159	2	157	109	170	N+P+	E-	23	90	1	165	-
11	N+P+	E+	21	76	2	135	116	171	N+P+	E-	26	168	2	139	105
12	N+P+	E+	21	85	2	121	110	172	N+P+	E-	27	226	2	151	136
13	N+P+	E+	23	194	2	125	92	173	N+P+	E-	20	97	2	122	106
14	N+P+	E+	24	69	2	109	88	174	N+P+	E-	23	172	2	148	73
15	N+P+	E+	19	95	2	108	92	175	N+P+	E-	17	115	2	112	90
16	N+P+	E+	23	96	2	129	110	176	N+P+	E-	23	120	2	121	96
17	N+P+	E+	16	110	2	92	36	177	N+P+	E-	24	241	1	162	-
18	N+P+	E+	21	66	2	110	81	178	N+P+	E-	17	53	2	157	54
19	N+P+	E+	26	190	2	140	135	179	N+P+	E-	16	48	2	127	32
20	N+P+	E+	20	140	2	128	30	180	N+P+	E-	22	94	2	80	60
21	N+P+	E+	20	151	2	143	81	181	N+P+	E-	22	129	2	114	90
22	N+P+	E+	16	110	2	118	115	182	N+P+	E-	14	100	1	118	-
23	N+P+	E+	29	224	2	180	151	183	N+P+	E-	20	103	2	128	95
24	N+P+	E+	20	209	2	136	61	184	N+P+	E-	18	145	2	137	52
25	N+P+	E+	19	110	2	120	88	185	N+P+	E-	14	40	2	82	30
26	N+P+	E+	27	111	2	120	91	186	N+P+	E-	20	113	2	153	64
27	N+P+	E+	25	125	2	123	92	187	N+P+	E-	20	80	2	135	80
28	N+P+	E+	18	117	2	126	109	188	N+P+	E-	24	69	2	123	85
29	N+P+	E+	24	172	2	146	99	189	N+P+	E-	31	165	2	190	105
30	N+P+	E+	10	64	2	75	32	190	N+P+	E-	18	73	2	133	58
31	N+P+	E+	22	92	2	130	64	191	N+P+	E-	17	91	2	132	65
32	N+P+	E+	18	30	2	105	74	192	N+P+	E-	15	30	1	102	-
33	N+P+	E+	21	110	2	164	115	193	N+P+	E-	19	180	1	159	-
34	N+P+	E+	16	31	2	76	77	194	N+P+	E-	13	100	2	91	80
35	N+P+	E+	19	97	2	160	70	195	N+P+	E-	13	80	1	111	-
36	N+P+	E+	18	117	1	125	-	196	N+P+	E-	12	44	1	110	-
37	N+P+	E+	27	119	2	140	54	197	N+P+	E-	16	40	2	115	55
38	N+P+	E+	22	61	2	151	113	198	N+P+	E-	12	51	2	108	52
39	N+P+	E+	18	140	2	112	40	199	N+P+	E-	17	74	2	109	90
40	N+P+	E+	17	113	2	99	88	200	N+P+	E-	14	136	2	91	74
41	N-P+	E+	24	135	2	133	112	201	N+P-	E-	22	230	2	133	100
42	N-P+	E+	17	212	2	134	70	202	N+P-	E-	14	131	2	115	82
43	N-P+	E+	30	263	2	139	120	203	N+P-	E-	12	46	2	100	21
44	N-P+	E+	16	123	2	151	40	204	N+P-	E-	20	195	2	116	90
45	N-P+	E+	17	132	2	82	85	205	N+P-	E-	30	118	2	175	138
46	N-P+	E+	26	170	2	155	110	206	N+P-	E-	18	101	2	131	92
47	N-P+	E+	30	244	2	143	113	207	N+P-	E-	23	102	2	90	86
48	N-P+	E+	23	151	2	170	80	208	N+P-	E-	26	100	2	122	120

№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм	№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм
49	N-P+	E+	29	231	2	163	130	209	N+P-	E-	16	64	1	101	-
50	N-P+	E+	29	191	2	182	147	210	N+P-	E-	17	171	2	114	102
51	N-P+	E+	17	135	2	113	110	211	N+P-	E-	18	132	2	101	99
52	N-P+	E+	26	191	2	165	142	212	N+P-	E-	23	132	2	127	110
53	N-P+	E+	15	112	2	115	89	213	N+P-	E-	19	126	2	110	96
54	N-P+	E+	15	77	2	102	73	214	N+P-	E-	14	143	2	130	50
55	N-P+	E+	18	112	2	110	111	215	N+P-	E-	15	180	1	121	-
56	N-P+	E+	10	133	2	77	54	216	N+P-	E-	17	119	2	97	78
57	N-P+	E+	19	147	2	120	98	217	N+P-	E-	15	127	2	131	75
58	N-P+	E+	14	216	2	163	30	218	N+P-	E-	12	112	2	91	87
59	N-P+	E+	18	201	2	142	89	219	N+P-	E-	16	120	2	160	24
60	N-P+	E+	18	139	2	125	100	220	N+P-	E-	14	62	2	97	41
61	N-P+	E+	21	210	2	110	100	221	N+P-	E-	24	147	2	110	103
62	N-P+	E+	14	80	2	128	55	222	N+P-	E-	16	85	2	95	84
63	N-P+	E+	18	120	2	123	116	223	N+P-	E-	14	106	2	102	74
64	N-P+	E+	16	215	2	114	109	224	N+P-	E-	20	150	2	120	75
65	N-P+	E+	15	119	2	114	63	225	N+P-	E-	17	146	2	143	64
66	N-P+	E+	13	91	2	91	54	226	N+P-	E-	15	77	2	83	65
67	N-P+	E+	20	221	2	122	118	227	N+P-	E-	18	160	2	101	60
68	N-P+	E+	22	210	2	130	111	228	N+P-	E-	19	47	1	130	-
69	N-P+	E+	13	170	2	117	30	229	N+P-	E-	14	180	2	118	50
70	N-P+	E+	18	130	2	113	109	230	N+P-	E-	15	136	2	130	49
71	N-P+	E+	14	62	2	116	111	231	N+P-	E-	23	152	2	155	116
72	N-P+	E+	15	141	2	122	90	232	N+P-	E-	14	155	2	140	23
73	N-P+	E+	6	52	2	60	40	233	N+P-	E-	15	71	2	100	65
74	N-P+	E+	19	125	2	110	104	234	N+P-	E-	14	65	2	119	45
75	N-P+	E+	15	79	2	153	30	235	N+P-	E-	9	40	2	75	25
76	N-P+	E+	15	135	2	123	92	236	N+P-	E-	11	80	2	125	55
77	N-P+	E+	16	55	2	89	80	237	N+P-	E-	9	46	1	82	-
78	N-P+	E+	11	126	2	84	65	238	N+P-	E-	13	72	2	90	53
79	N-P+	E+	7	52	2	90	39	239	N+P-	E-	8	35	1	80	-
80	N-P+	E+	8	111	2	84	65	240	N+P-	E-	22	69	2	125	124
81	N+P-	E+	10	163	1	51	-	241	N-P+	E-	17	66	2	110	51
82	N+P-	E+	16	132	2	123	74	242	N-P+	E-	17	122	2	96	52
83	N+P-	E+	21	247	2	165	89	243	N-P+	E+	42	173	2	260	110
84	N+P-	E+	12	33	2	85	44	244	N-P+	E-	25	214	2	130	116
85	N+P-	E+	9	116	2	120	30	245	N-P+	E-	18	74	2	140	60
86	N+P-	E+	5	87	1	101	-	246	N-P+	E-	24	139	2	151	113
87	N+P-	E+	14	135	2	140	95	247	N-P+	E-	20	171	2	109	99
88	N+P-	E+	13	126	2	130	100	248	N-P+	E-	19	174	2	135	72
89	N+P-	E+	15	176	2	166	104	249	N-P+	E-	10	55	1	75	-
90	N+P-	E+	13	141	2	195	31	250	N-P+	E-	24	260	2	154	122
91	N+P-	E+	8	94	2	91	68	251	N-P+	E-	26	134	2	140	115
92	N+P-	E+	14	154	2	124	77	252	N-P+	E-	20	220	2	130	86
93	N+P-	E+	15	80	2	132	81	253	N-P+	E-	19	180	2	120	62
94	N+P-	E+	11	92	2	95	31	254	N-P+	E-	22	120	2	122	102
95	N+P-	E+	13	129	2	127	89	255	N-P+	E-	26	139	2	160	136
96	N+P-	E+	14	150	2	101	100	256	N-P+	E-	25	97	2	132	113
97	N+P-	E+	18	133	2	150	102	257	N-P+	E-	14	100	2	99	40
98	N+P-	E+	10	86	2	133	60	258	N-P+	E-	22	187	2	110	80
99	N+P-	E+	16	204	2	90	86	259	N-P+	E-	17	50	1	130	-
100	N+P-	E+	22	182	2	205	117	260	N-P+	E-	13	75	1	94	-
101	N+P-	E+	17	98	2	190	100	261	N-P+	E-	16	131	2	118	50
102	N+P-	E+	10	141	2	109	80	262	N-P+	E-	20	120	2	131	83
103	N+P-	E+	11	168	2	126	98	263	N-P+	E-	6	58	1	55	-
104	N+P-	E+	7	37	1	75	-	264	N-P+	E-	16	70	1	120	47
105	N+P-	E+	15	123	2	117	104	265	N-P+	E-	11	44	1	95	-
106	N+P-	E+	9	103	2	112	72	266	N-P+	E-	20	85	2	105	70
107	N+P-	E+	19	176	2	161	86	267	N-P+	E-	13	43	2	113	12

№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм	№ растения	Вариант среды	Эндофитный статус	Масса растения, мг	Длина корня, мм	Число листьев	Длина 1-го листа, мм	Длина 2-го листа, мм
108	N+P-	E+	13	130	2	156	79	268	N-P+	E-	16	97	1	127	-
109	N+P-	E+	4	16	1	74	-	269	N-P+	E-	19	184	2	132	131
110	N+P-	E+	8	33	2	70	69	270	N-P+	E-	13	48	1	120	-
111	N+P-	E+	15	118	2	140	85	271	N-P+	E-	12	126	1	111	-
112	N+P-	E+	10	125	2	84	46	272	N-P+	E-	17	152	2	114	91
113	N+P-	E+	15	136	2	130	91	273	N-P+	E-	13	33	2	127	32
114	N+P-	E+	14	195	2	122	104	274	N-P+	E-	17	40	2	111	90
115	N+P-	E+	4	21	1	66	-	275	N-P+	E-	16	141	2	114	90
116	N+P-	E+	12	107	2	120	74	276	N-P+	E-	14	130	1	132	-
117	N+P-	E+	3	25	1	69	-	277	N-P+	E-	12	71	2	125	40
118	N+P-	E+	9	113	1	114	-	278	N-P+	E-	15	150	2	130	12
119	N+P-	E+	15	35	2	175	96	279	N-P+	E-	13	151	2	137	34
120	N+P-	E+	11	54	2	106	64	280	N-P+	E-	21	136	2	99	87
121	N-P-	E+	11	94	2	65	54	281	N-P-	E-	19	168	1	110	-
122	N-P-	E+	28	213	2	164	147	282	N-P-	E-	15	99	2	106	66
123	N-P-	E+	15	116	2	116	110	283	N-P-	E-	10	47	2	107	32
124	N-P-	E+	22	236	2	160	124	284	N-P-	E-	15	180	2	125	50
125	N-P-	E+	12	87	2	130	86	285	N-P-	E-	18	136	2	110	70
126	N-P-	E+	19	105	2	131	85	286	N-P-	E-	16	185	2	121	85
127	N-P-	E+	20	81	2	120	120	287	N-P-	E-	17	189	2	120	78
128	N-P-	E+	13	180	2	100	80	288	N-P-	E-	15	73	2	125	70
129	N-P-	E+	19	141	2	122	64	289	N-P-	E-	17	140	2	113	50
130	N-P-	E+	20	168	2	129	77	290	N-P-	E-	21	201	2	110	80
131	N-P-	E+	21	180	2	135	113	291	N-P-	E-	14	48	2	98	41
132	N-P-	E+	19	305	2	147	80	292	N-P-	E-	16	100	2	98	65
133	N-P-	E+	17	115	2	130	83	293	N-P-	E-	14	39	1	110	-
134	N-P-	E+	18	21	2	160	110	294	N-P-	E-	21	230	2	182	68
135	N-P-	E+	16	140	2	112	90	295	N-P-	E-	13	132	1	122	-
136	N-P-	E+	25	236	2	179	110	296	N-P-	E-	11	111	2	102	37
137	N-P-	E+	21	125	2	129	111	297	N-P-	E-	15	71	2	90	77
138	N-P-	E+	15	81	2	110	42	298	N-P-	E+	20	195	2	131	78
139	N-P-	E+	20	173	2	140	90	299	N-P-	E-	15	70	1	120	-
140	N-P-	E+	15	150	2	115	91	300	N-P-	E-	18	187	2	121	94
141	N-P-	E+	16	191	2	115	69	301	N-P-	E-	18	141	2	110	80
142	N-P-	E+	19	180	2	148	76	302	N-P-	E-	15	150	2	100	30
143	N-P-	E+	21	150	2	144	110	303	N-P-	E-	15	196	2	127	78
144	N-P-	E+	10	76	1	113	-	304	N-P-	E-	16	30	2	115	80
145	N-P-	E+	12	72	1	115	-	305	N-P-	E-	15	45	2	138	55
146	N-P-	E+	21	300	2	157	112	306	N-P-	E-	12	40	2	73	49
147	N-P-	E+	20	140	2	113	107	307	N-P-	E-	15	149	1	130	-
148	N-P-	E+	16	166	2	115	41	308	N-P-	E-	16	115	2	135	25
149	N-P-	E+	15	120	2	121	53	309	N-P-	E+	21	140	2	115	113
150	N-P-	E+	15	130	2	83	81	310	N-P-	E-	20	182	2	96	80
151	N-P-	E+	14	120	2	140	52	311	N-P-	E-	15	71	2	116	36
152	N-P-	E+	18	113	2	120	58	312	N-P-	E-	12	50	2	125	20
153	N-P-	E+	16	92	2	102	55	313	N-P-	E-	8	10	1	79	-
154	N-P-	E+	19	114	2	121	35	314	N-P-	E-	18	208	2	151	50
155	N-P-	E+	13	60	2	87	85	315	N-P-	E-	7	161	1	62	-
156	N-P-	E+	14	58	2	104	35	316	N-P-	E-	12	48	2	120	22
157	N-P-	E+	12	62	2	90	38	317	N-P-	E-	14	97	2	118	50
158	N-P-	E+	22	110	2	125	108	318	N-P-	E-	10	35	2	106	18
159	N-P-	E+	19	40	2	105	100	319	N-P-	E-	10	97	2	90	47
160	N-P-	E+	13	186	2	120	50	320	N-P-	E-	18	144	2	111	75

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Основные таблицы дисперсионного анализа для растений, выращенных на питательной среде с варьированием минерального состава

Полужирным шрифтом выделены значимые факторы (для уровня значимости 5%). E – наличие эндофитной инфекции, N – присутствие в питательной среде азота, P – присутствие в питательной среде фосфора.

Таблица I

Основная таблица дисперсионного анализа для длины первого листа

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
E	1800,7	1	1800,695	2,667	0,104
N	1286,7	1	1286,673	1,905	0,169
P	**3699,9**	**1**	**3699,900**	**5,477**	**0,020**
E*N	233,7	1	233,694	0,346	0,557
E*P	1024,7	1	1024,662	1,517	0,219
N*P	1493,1	1	1493,052	2,210	0,138
E*N*P	5,8	1	5,833	0,009	0,926
Ошибка	208722,2	309	675,476		

Таблица II

Основная таблица дисперсионного анализа для длины второго листа

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
E	**33087,6**	**1**	**33087,64**	**25,751**	**0,000001**
N	1076,6	1	1076,57	0,838	0,360724
P	**9555,1**	**1**	**9555,08**	**7,436**	**0,006757**
E*N	**7606,9**	**1**	**7606,88**	**5,920**	**0,015535**
E*P	1502,8	1	1502,84	1,170	0,280325
N*P	11,5	1	11,46	0,009	0,924813
E*N*P	3003,4	1	3003,43	2,337	0,127318
Ошибка	397036,5	309	1284,91		

Таблица III

Основная таблица дисперсионного анализа для длины корня

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
E	**17296,6**	**1**	**17296,61**	**5,523**	**0,019**
N	10025,5	1	10025,54	3,201	0,075
P	2848,2	1	2848,25	0,910	0,341
E*N	7038,7	1	7038,73	2,248	0,135
E*P	945,2	1	945,19	0,302	0,583
N*P	1,7	1	1,69	0,001	0,981
E*N*P	3,3	1	3,30	0,001	0,974
Ошибка	967651,9	309	3131,56		

Таблица IV

Основная таблица дисперсионного анализа для биомассы растений

Фактор	SS	Число степеней свободы	MS	F	p
E	7,791	1	7,791	0,366	0,546
N	41,518	1	41,518	1,951	0,164
P	**1108,889**	**1**	**1108,889**	**52,101**	**0,000**
E*N	**215,405**	**1**	**215,405**	**10,121**	**0,002**
E*P	45,614	1	45,614	2,143	0,144
N*P	**417,745**	**1**	**417,745**	**19,628**	**0,000**
E*N*P	**257,751**	**1**	**257,751**	**12,110**	**0,001**
Ошибка	6576,635	309	21,284		