

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель:** *Благовецкая Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник каф. микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова*
- Официальные оппоненты:** *Садыкова Вера Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, зам. директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»*
- Ткаченко Олег Борисович, доктор биологических наук, зав. лабораторией защиты растений, главный научный сотрудник ФГБНУ «Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН»*
- Сколотнева Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики растений, зав. лабораторией молекулярной фитопатологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»*

Защита диссертации состоится «13» декабря 2019 года в 15.30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1/12, МГУ, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru, тел.: 8(495)939-11-48

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/249465122/>

Автореферат разослан «__» ноября 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Гершкович
Дарья Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

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. Эндоефитные 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.

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 клавиципитальных 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 различных 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 в селекции газонных и кормовых трав.

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

- 1) выявление клавиципитальных 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 arundinacea*, *F. gigantea* и *Elymus caninus*, из которых получены и идентифицированы изоляты грибов. Впервые отмечены случаи заражения российских злаков эндофитами видов *Epichloë festucae* и *Epichloë occultans*, 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.

Публикации результатов. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 – статьи в рецензируемых журналах, в том числе 3 из которых опубликованы в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, RSCI, WoS.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 166 страницах, включает 18 таблиц, 37 графиков и рисунков. Она состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы содержит 175 наименований, в том числе 165 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены основные группы грибов, существующих в виде эндофитов. Очерчена и охарактеризована группа системных эндофитов злаков, которые являются предметом исследования в данной работе, описано их таксономическое положение и встречаемость на

территории различных стран мира. Подробно рассмотрен жизненный цикл клавиципитальных эндофитов, типы взаимоотношений с растением-хозяином, стратегии размножения и пути возможной генетической рекомбинации, которая в виду отсутствия полового процесса у большинства представителей данной группы представляется важной проблемой. Особое внимание уделено алкалоидам, продуцируемым данной группой организмов, а также факторам, от которых зависит конечная концентрация токсичных соединений в растениях. Описана симптоматика отравлений травоядных животных при употреблении в пищу злаков, колонизированных эндофитами. Рассмотрено также и то влияние, которое наличие эндофитной инфекции может оказывать на растение-хозяина. Обсуждены сами эффекты, а также возможные механизмы воздействия. Показано, что абсолютное большинство экспериментальных работ по тематике выполняется на весьма ограниченном круге злаков, играющих наиболее важную роль в качестве кормовых и газонных культур в крупнейших центрах, занимающихся исследованием данных симбиотических ассоциаций, в частности в США и Новой Зеландии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение встречаемости эндофитных грибов. Сбор материала проводили с 2013 по 2018 год на территории Москвы и Московской области. Часть образцов семян различных сортов кормовых злаков была предоставлена для анализа лабораторией иммунитета растений ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса. Всего проанализировано 613 образцов растений 15 видов злаков.

Методы световой микроскопии. Для выявления мицелия в растительных тканях с помощью световой микроскопии готовили окрашенные анилиновым синим препараты. Изучение культур эндофитов проводили как стандартным образом (в молочной кислоте), так и методом отпечатков на скотче. Для изучения распределения липидов в грибных гифах проводили окрашивание суданом черным. Работа велась на микроскопе LEICA DM 500.

Методы электронной микроскопии. Изучение срезов растений и культур грибов проводили на сканирующем электронном микроскопе Jeol GSM. Изучение ультратонких срезов проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011.

Культуральные методы. Выделение грибов в чистую культуру проводили из поверхностно стерилизованного растительного материала на картофельно-глюкозный агар (КГА). Культуры для сохранения закладывались в холодильник (+4°C) на скошенном агаре (КГА) и на зерне пшеницы; с 2017 года изоляты закладывали на длительное хранение в морозильные камеры с температурой –70°C с глицерином в качестве криопротектора.

Молекулярно-генетические методы. Проверку потенциальной возможности применения рекомендуемых в литературе молекулярно-генетических методов обнаружения эндофитной инфекции для российских злаков проводили в 2 этапа. Сначала праймеры (IS-1/IS-3; IS-RS-5'/IS-NS-3') тестировали на ДНК, выделенной непосредственно из мицелия эндофитов, а затем – на зараженных проростках и семенах злаков с известным процентом зараженности. Отрицательный контроль – ДНК *Claviceps purpurea*, *Alternaria alternata*, незараженные семена; положительный контроль – ДНК *Epichloë typhina*. ДНК выделяли по стандартной методике с использованием СТАВ-буфера. ПЦР проводили на амплификаторе «Biometra T1» с использованием набора реагентов GenPak (ISOGENE) и праймерами фирмы «Евроген». Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли стандартным электрофорезом в агарозном геле (1,2 %) с бромистым этидием и Tris-BORAT-EDTA-буфером в качестве буферной системы.

Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью постановки ПЦР с праймерами ITS1/ITS4, последующего секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5,8S-ITS2 рибосомальной ДНК с помощью программы «Geneious» и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

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

Изучение роста изолятов на разных средах. Было проведено два опыта. В первом проводили сравнение роста эндофитных грибов на естественной и искусственной питательных средах (КГА и СДЭ соответственно). Во втором – проводили изучение влияния источников азота

в разных концентрациях. Для этого 3 штамма эндофитов 90EC14EF, 83FG14St и 99DG16ET агаровым блоком сеяли в колбы объемом 150 мл со стерильной жидкой модифицированной средой Чапека (по 75 мл на колбу) с варьированием формы и концентрации азота (табл. 1).

Таблица 1

Форма и концентрация источников азота в среде

| Форма азота | NaNO ₃ | | | (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | Пептон | | |
|----------------------------|-------------------|------|------|---|------|------|--------|------|------|
| Варианты концентраций, г/л | 1,00 | 2,00 | 3,00 | 0,75 | 1,50 | 2,25 | 2,50 | 5,00 | 7,50 |

Посев проводили в трех повторностях на каждый вариант среды (итого – 81 колба). Инкубировали в стационарном состоянии при комнатной температуре и естественном освещении 1,5 месяца. Далее мицелий отфильтровывали, измеряли сухую биомассу.

Эксперимент по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов. Питательную среду Кнопа (вода – 1000 мл; Ca(NO₃)₂ – 1 г; KNO₃ – 0,25 г; KH₂PO₄ – 0,25 г; MgSO₄*7H₂O – 0,25 г; KCl – 0,125 г; агар – 16 г/л) разливали в биологические пробирки, на ее поверхность помещали фрагмент колонии эндофитного гриба (штамм 201FA17 – *Tricladium* sp.) и поверхностно стерилизованные семена тростниковой овсяницы сорта Лира. В контрольном варианте опыта семена помещали непосредственно на поверхность среды (всего 98 пробирок, из них 42 – контроль). Молодые растения на 33 сутки анализировали на наличие эндофитного мицелия с помощью световой микроскопии.

Изучение распределения мицелия эндофитных грибов в растениях.

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

Поверхностно стерилизованные семена *Festuca pratensis* (зараженность 100%) проращивали во влажных камерах, помещали на пластиковую сетку в пробирки с раствором Кнопа и инкубировали при естественном освещении 20 дней. У молодых растений измеряли высоту (фактически – длину первого листа), длину корня и проверяли присутствие эндофитного мицелия в корне,

влагалище 1-го листа, листовой пластинке 1-го листа (в основании, средней и верхней части) и листовой пластинке 2-го листа (в случае его наличия).

2. Изучение распределения мицелия во взрослых растениях открытого грунта. На предмет наличия эндофитного мицелия в разных органах взрослых злаков анализировали 3 дерновины уже сформировавшей семена дикорастущей *Festuca gigantea* с территории ЗБС МГУ (7 кв.) с помощью световой микроскопии (окрашивание анилиновым синим), сканирующего и трансмиссионного электронного микроскопа (фиксация в 2,5%-ом растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (PBS Tablets, рН 7,4) с постфиксацией в 1%-ом водном растворе тетраоксида осмия).

Изучение влияния дефицита фосфора и/или азота на Е+ и Е- растения. Для постановки опыта использовали семена *Festuca gigantea* со 100 %-ной зараженностью («Е+»). Для получения «Е-» варианта их прогревали в термостате (15 мин при 43°C и 25 мин при 57°C). Поверхностно стерилизованные семена проращивали в стерильных влажных камерах, затем помещали на пластиковые сеточки в пробирки с вариантами питательной среды Кнопа (с фосфором и азотом; с азотом, но без фосфора; с фосфором, но без азота; без азота и без фосфора) и инкубировали 33 дня при 16/8 световом дне. Каждое растение взвешивали, проводили проверку эндофитного статуса, измеряли длину побега, длину корня. В общей сложности проанализировано 320 растений.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Встречаемость эндофитных грибов. Из 613 образцов дикорастущих и сортовых злаков эндофитную инфекцию удалось обнаружить в 49-ти образцах шести видов: *Lolium perenne* (1 образец с газона, а также 1 образец *Lolium* sp.), *Festuca pratensis* (9 популяций Москвы, 5 популяций Московской области, сорт Кварта 2012 года, сорт Николаевский 2014 года и сорт Сибинтех 2012 года), *Festuca arundinacea* (1 популяция на территории ЗБС МГУ в пойме), *Festuca gigantea* (6 образцов семян с территории ЗБС МГУ), *Festuca rubra* (1 образец с территории ЗБС МГУ), *Elymus caninus* (1 популяция на территории ЗБС). Наличие зараженных эндофитами популяций гигантской овсяницы и пырейника собачьего для территории России показано впервые. Впервые были

обнаружены зараженные популяции злаков на территории Звенигородской биологической станции. Процент зараженности варьировал от 5 до 100%.

Коллекция чистых культур грибов. За время работы всего получено 203 изолята, 200 из которых выделены из дикорастущих и сортовых образцов семян злаков *Festuca pratensis* (114), *Festuca gigantea* (53), *Festuca arundinacea* (13), *Lolium perenne* (8) и *Elymus caninus* (12); 2 – из стром *Epichloë typhina*; 1 – из листового влагалища *Festuca pratensis*. За счет части из них была создана ценная коллекция эндофитных грибов на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Видовой состав полученных изолятов и их характеристика. Наличие спороношений показано для 26 изолятов, а остальные 177 являются стерильным мицелием. 29 изолятов на основании морфологии спороношений и по результатам секвенирования ДНК отнесены к виду *Epichloë festucae*, 4 неспорулирующих культуры по анализу ДНК отнесены к виду *Epichloë occultans*. Оба эти вида впервые обнаружены на территории России. По строению конидий 2 изолята определены как *Epichloë uncinata* и 2 как *Epichloë typhina*.

Помимо вышеупомянутых классических клавиципитальных эндофитов, также был получен ряд изолятов (10), которые по участку ITS рДНК оказались наиболее близки роду *Tricladium* – представителю так называемых водно-воздушных гифомицетов, или ингольдовых грибов – водных сапротрофов, развивающихся на растительных остатках, для которых показана способность колонизировать корни наземных растений. Однако в нашем случае изоляты были получены из поверхностно стерилизованных семян злаков, и в литературе описаний подобных случаев не обнаружено. Наличие мицелия в семенах говорит о том, что водно-воздушные гифомицеты могут являться системными эндофитами злаков, распространяемых вертикально вместе с зараженными семенами.

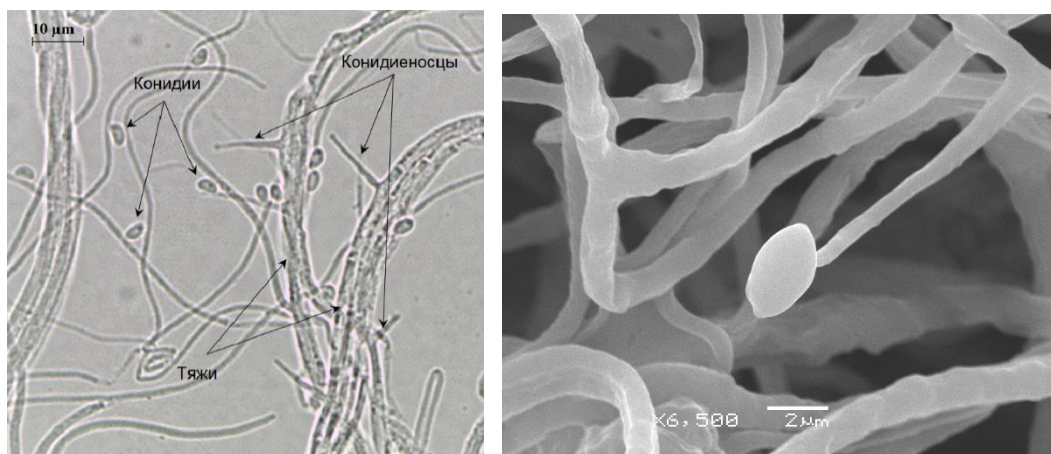


Рисунок 1. *Epichloë festucae* (слева – световая микроскопия, справа – сканирующая электронная микроскопия)

В целом, полученные изоляты обладают рядом характерных особенностей. Они имеют бедную морфологию, низкие скорости роста как на твердой среде, так и в жидкой культуре, образуют очень плотные светлые колонии и имеют тенденцию переходить к погруженному в субстрат росту, формируя скудный воздушный мицелий. При микроскопировании обычно обнаруживается мицелий двух типов: 1 – вздутые и плотно переплетенные гифы, в которых часто формируются структуры, напоминающие хламидоспоры, 2 – типичный разветвленный мицелий до 2,5 мкм шириной. При окрашивании мицелия суданом черным или на ультратонких срезах обнаруживается большое количество липидов. (рис. 2, А, Д). Там же хорошо заметны типичные для аскомицетов тельца Воронина, расположенные у поры септы (рис. 2, Д). Характерной особенностью также являются так называемые мультивезикулярные тела (рис. 2, В).

Как при росте на твердых средах, так и в жидкой культуре гифы эндофитов имеют тенденцию объединяться в толстые мицелиальные тяжи, окруженные слизистым чехлом, причем данная слизь зачастую имеет неоднородную структуру (рис. 2, Б, Г, Д). Между соседствующими в тяже коллатеральными гифами без образования анастомозных соединений могут формироваться полноценные поры с тельцами Воронина. Подобное явление ранее не отмечалось для аскомицетных грибов (рис. 3).

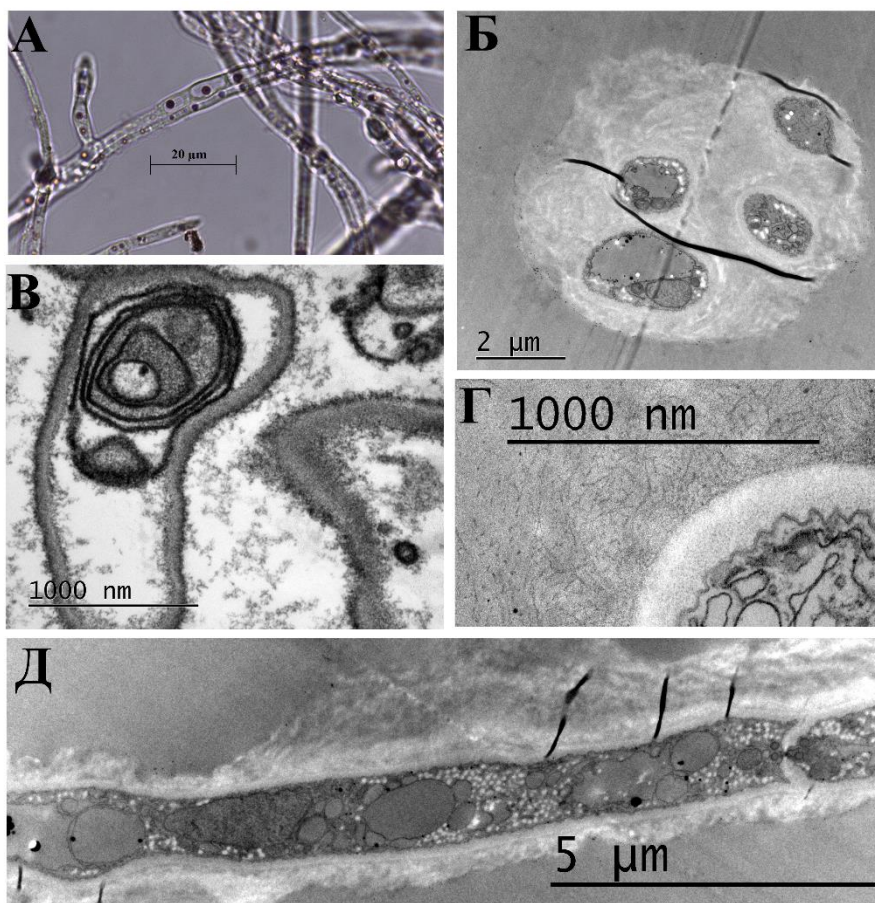


Рисунок 2. Исследование изолята 99DG16ET с помощью световой и просвечивающей электронной микроскопии. А – окраска на выявление липидов суданом черным, Б – поперечный срез мицелиального тяжа, покрытого мощным слизистым чехлом, В – мультивезикулярное тело в клетке гифы, Г – неоднородность слизистого чехла, Д – продольный срез гифы

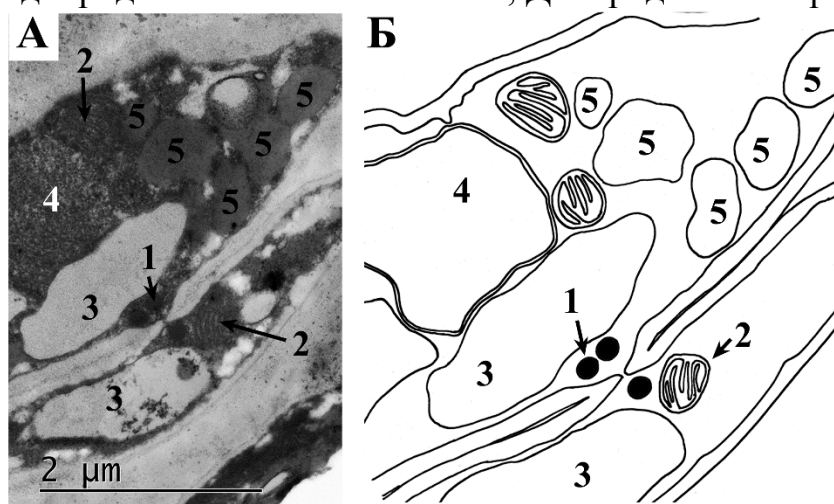


Рисунок 3. Поровые контакты между клетками *Epichloë* sp. (штамм 6FP13ST). А. Фрагмент гифы. Б. Септа с центральной порой, закрытой тельцем Воронина. В. Две коллатеральные гифы с поровым контактом. Г. Схема порового контакта между коллатеральными гифами. Пояснения. 1 – тельца Воронина; 2 – митохондрии; 3 – вакуоли; 4 – ядро; 5 – липидные капли

То, что это именно поровый контакт, подтверждается наличием трех телец Воронина в данном месте. Тем самым, данные параллельно расположенные гифы имеют единое цитоплазматическое пространство. Возможно, что подобного рода вторичное поровое соединение характерно именно для эпихлоидных эндофитных грибов, так как только для них на настоящий момент времени подтверждена возможность интеркалярного роста гиф 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, ожидаемо, что у грибов с подобной способностью при плотном контакте двух гиф возможно формирование поры между ними.

Обнаружение эндофитов в растительном материале методом ПЦР.

При работе с ДНК, выделенной непосредственно из мицелия эндофитных грибов, амплификация с обеими парами праймеров успешно прошла для изолятов 2013-2014 годов, но не для выделенных до 2006 года.

При амплификации ДНК, выделенной из семян и проростков, с парой праймеров IS-1/IS-3 единственный интенсивный фрагмент получился в положительном контроле. С помощью пары IS-RS-5'/IS-NS-3' обнаружить эндофитную инфекцию удалось во всех вариантах опыта, кроме семян *Festuca pratensis* 2013 года, несмотря на то что их зараженность была выше 90%.

Сравнение интенсивности фрагментов показывает, что предпочтительнее работать с молодыми проростками, чем с семенами, а в случае необходимости работы с семенами, их следует предварительно размочить. Таким образом, праймеры IS-RS-5'/IS-NS-3' можно рекомендовать для выявления эндофитных грибов в вегетирующих растениях и семенах, но стоит учитывать высокую вероятность ложно отрицательного результата.

Влияние состава питательной среды на рост культур эндофитных грибов. Все изученные изоляты показывают более высокие скорости роста на среде КГА, но в целом все они характеризуются низкими скоростями роста. В опыте по влиянию источников азота тоже отмечен достаточно низкий прирост сухой биомассы – в среднем около 11 мг/сут. Многофакторный

дисперсионный анализ, проведенный по полученным данным, показал, что 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 (табл. 2, рис. 4).

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. *E. 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). 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 зависят от предпочтений конкретного изолята.

Таблица 2

Основная таблица 3-х факторного дисперсионного анализа биомассы мицелия эпихлоидных грибов в разных условиях. Условные обозначения факторов: Strain – штамм, N – источник азота, Co – концентрация азота

| Фактор | Сумма квадратов | Число степеней свободы | Средний квадрат | F | p |
|-------------|-----------------|------------------------|-----------------|----------|----------|
| Strain | 4,272 | 2 | 2,1362 | 121,3590 | 0 |
| N | 4,145 | 2 | 2,0726 | 117,7415 | 0 |
| Co | 0,426 | 2 | 0,2128 | 12,0912 | 0,000046 |
| Strain*N | 1,240 | 4 | 0,3099 | 17,6084 | 0 |
| Strain*Co | 0,291 | 4 | 0,0727 | 4,1288 | 0,005441 |
| N*Co | 0,656 | 4 | 0,1641 | 9,3209 | 0,000008 |
| Strain*N*Co | 0,553 | 8 | 0,0692 | 3,9286 | 0,00102 |
| Error | 0,951 | 54 | 0,0176 | | |

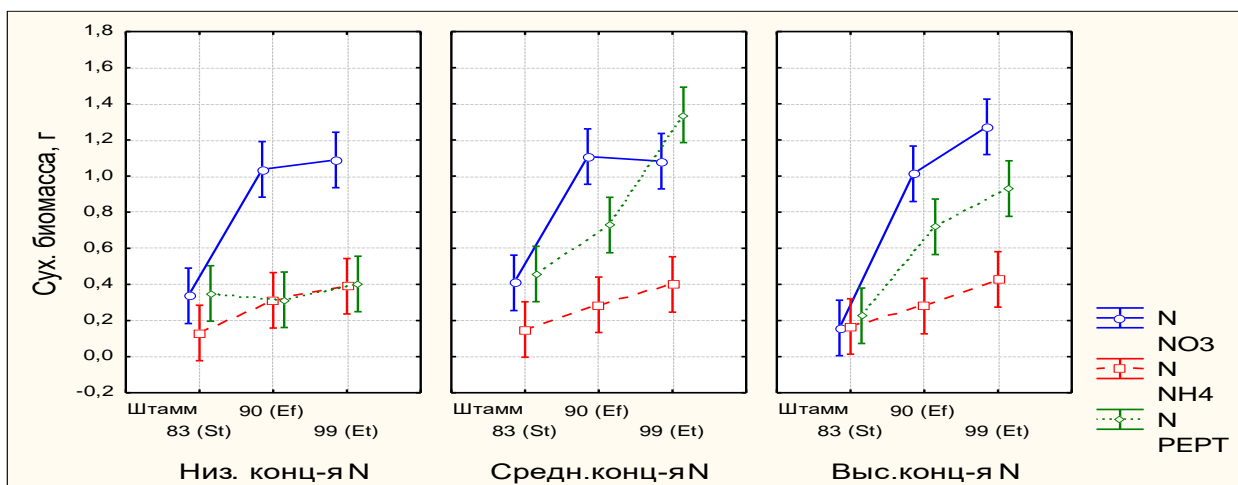


Рисунок 4. Накопление сухой биомассы изолятами 83FG14, 90EC14 и 99DG16ET при росте в жидкой культуре с различиями по составу питательной среды. Здесь и далее: точки – средние значения, «усы» – 95%-ный доверительный интервал

Распределение мицелия эндофитных грибов в растения

1. Распределение мицелия в молодых проростках *in vitro*. По окончании срока инкубации растения в среднем достигли высоты 106 мм (от 12 до 169 мм). Высота этих молодых растений полностью определялась длиной первого листа. Длина корня составила в среднем 57 мм (от 14 до 96 мм). Типичный септированный мицелий обнаружен во влагилицах листьев и по всей длине листовой пластинки (рис. 5, А), а также в корнях, однако по морфологии корневые гифы отличаются от локализованных в надземных частях. Они очень тонкие (0,7 мкм в диам.), в меньшей степени извитые, почти не ветвящиеся, с малозаметными септами (рис. 5, Б).

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 (рис. 6). Растения, для которых показано отсутствие мицелия в кончике первого листа, в целом выше, что может объясняться тем, что мицелий просто не успел дорасти до данной части проростка. Данный вывод о более медленном росте гриба по сравнению с

растением-хозяином подтверждается отсутствием мицелия во вторых листьях некоторых из исследованных растений.

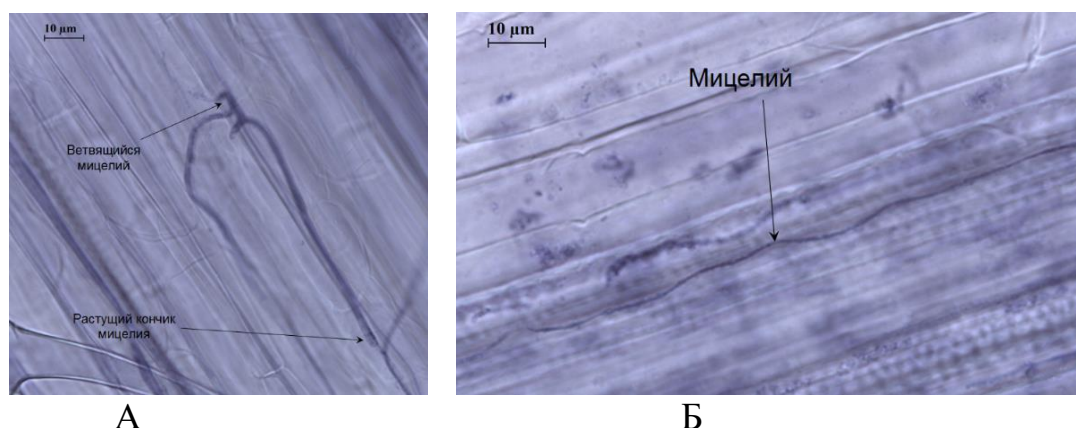


Рисунок 5. Мицелий в разных частях молодых растений. А – основание листовой пластинки 1-го листа, Б – корень

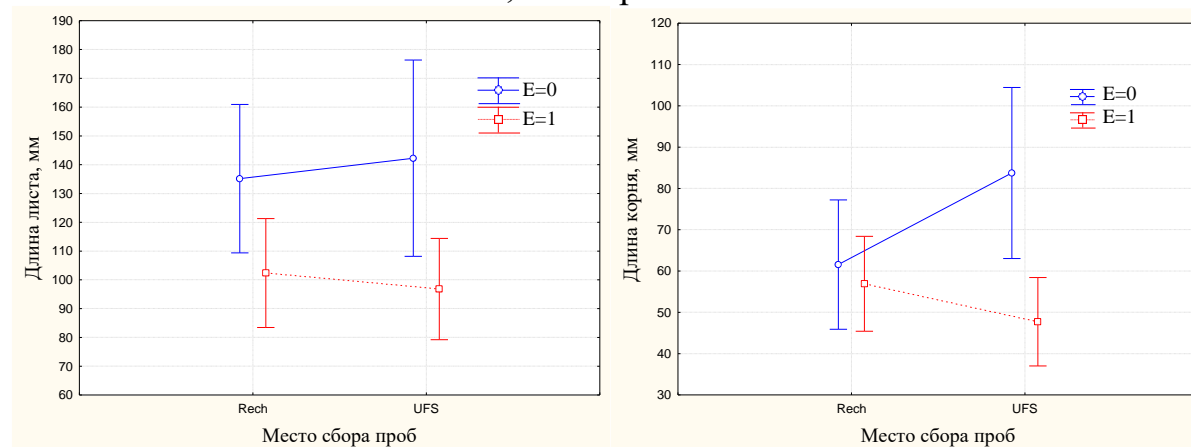


Рисунок 6. Зависимости длины листа (слева) и длины корня (справа) от присутствия эндофитов и происхождения образцов (пояснения в тексте)

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 (0,7 мкм).

2. Распределение мицелия во взрослых растениях открытого грунта.

Семена исследуемых образцов в 72% случаев несли в зоне алейронового слоя эндофитный мицелий. Гифы также обнаружены в листовых влагалищах и листовых пластинках всех трех образцов растений (рис. 7, А). Одиночные гифы диаметром 1,5-1,8 мкм залегают в межклетниках тканей (рис. 7, Б),

прикрепляясь к клеточным стенкам за счет формирования чехла из полисахаридной слизи (рис. 7, В, Г).

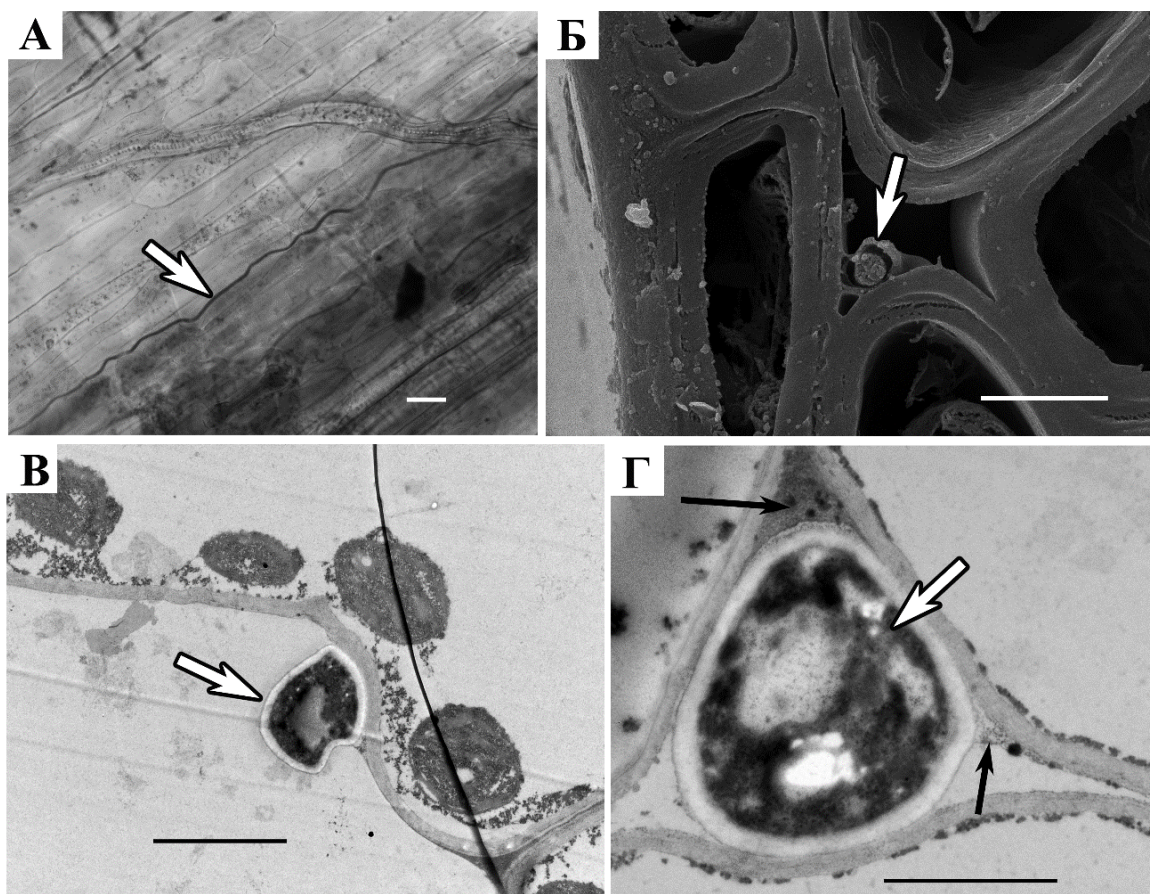


Рисунок 7. Эндофитный мицелий среди клеток влагалища листа овсяницы гигантской. А – световая микроскопия (масштабная линейка – 20 мкм); Б – сканирующая электронная микроскопия (линейка – 5 мкм); В и Г – трансмиссионная электронная микроскопия (линейка – 2 и 1 мкм соответственно). Белыми стрелками указаны гифы гриба, черными – полисахаридная слизь

Однако в стеблях генеративных побегов, несущих зараженные семена, мицелий не был обнаружен. Вероятно, это связано с тем, что после созревания семян началось частичное отмирание тканей соломины, приведшее к отмиранию гиф эндофита, лишившихся в таких условиях источника питательных веществ и воды. Корневая система обследованных злаков оказалась плотно заселена грибами, в том числе мицелием, по морфологии сильно напоминающий тот, который мы обнаруживали в корнях растений из предыдущего опыта (рис. 8, А). 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. 8, Б), и, по всей видимости, антагонизма между ними не происходит.

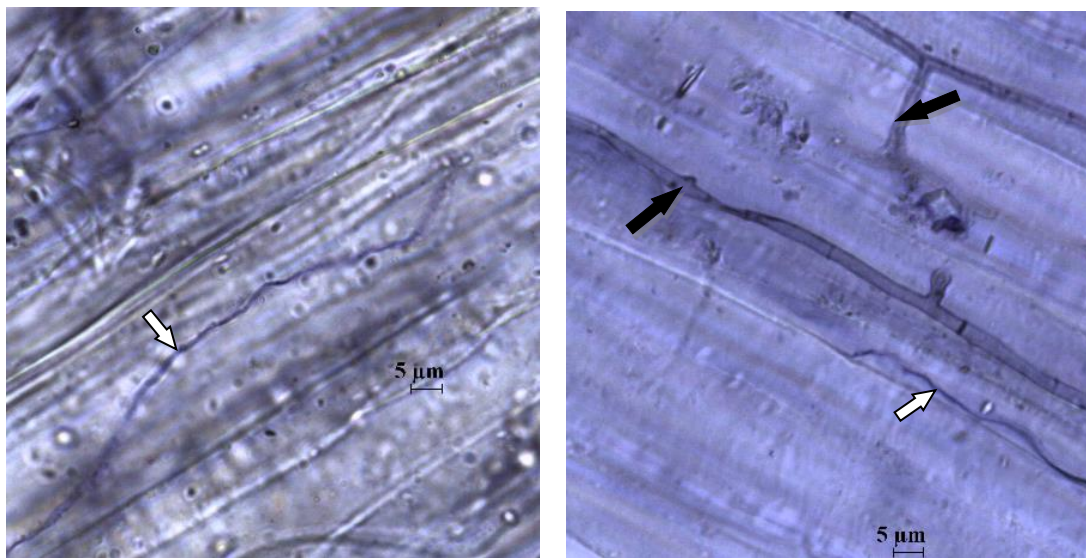


Рисунок 8. Мицелий в корнях овсяницы гигантской. Слева – эндофитный мицелий (белая стрелка); справа – эндофитная гифа (белая стрелка), растущая рядом с гифами микоризного гриба (черные стрелки)

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.

Результаты эксперимента по искусственному заражению злаков полученными изолятами эндофитных грибов. Из 98 семян за время инкубации 2 не проросло, следовательно, для анализа на наличие инфекции получили 96 растений, у которых на момент снятия опыта было как минимум 3 развитых листа. Анализ зеленых частей полученных растений показал, что ни одно из 40 контрольных растений не несло эндофитов, в то время как у 9 растений из 56, развивавшихся в присутствии гриба, в межклетниках обнаружено наличие гиф (рис. 9), то есть искусственное инфицирование

тростниковой овсяницы было успешным в 16% случаев (95%-ный доверительный интервал: 14,8 – 17,4%). При этом мицелий ветвился, анастомозировал и местами залегал слегка беспорядочно.

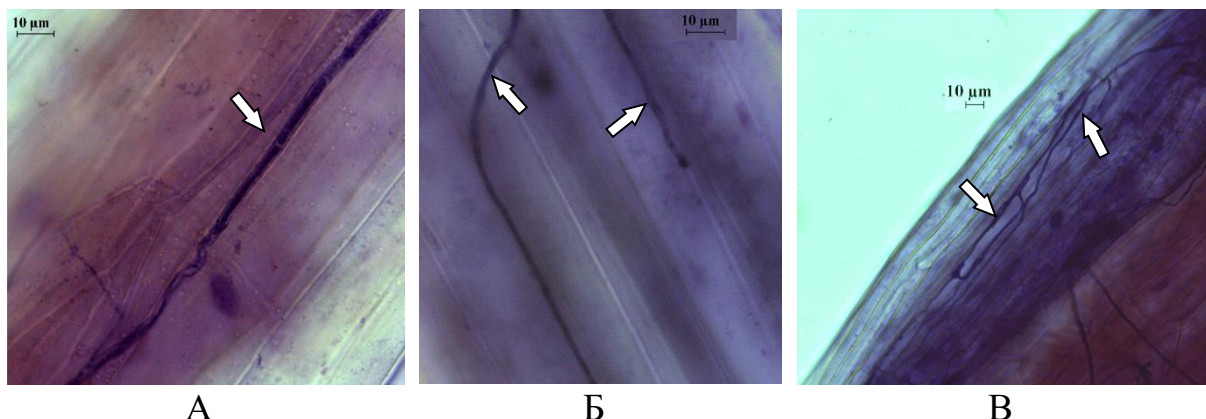


Рисунок 9. Мицелий в тканях искусственно зараженной изолятом 201FA17 тростниковой овсяницы сорта Лира (эндофитный мицелий указан белыми стрелками, длина масштабной линейки 10 мкм). А – септированный мицелий типичного для эндофитов строения; Б – более тонкий мицелий в листовой пластинке; В – ветвящийся мицелий

Влияние дефицита фосфора и/или азота на E+ и E- растения. 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). 160 «E+» растений содержали в основании 1-го листа типичный эндофитный мицелий. Многофакторный дисперсионный анализ показал, что на длину 1-го листа влияет только наличие в питательной среде источников фосфора: в среднем, длина больше для тех растений, которые росли на среде с фосфором. При этом никакой разницы между «E+» и «E-» растениями не обнаружено.

На длину корня влияет только присутствие эндофитных грибов: у «E+» растений корень в среднем длиннее, чем у «E-» (рис. 10).

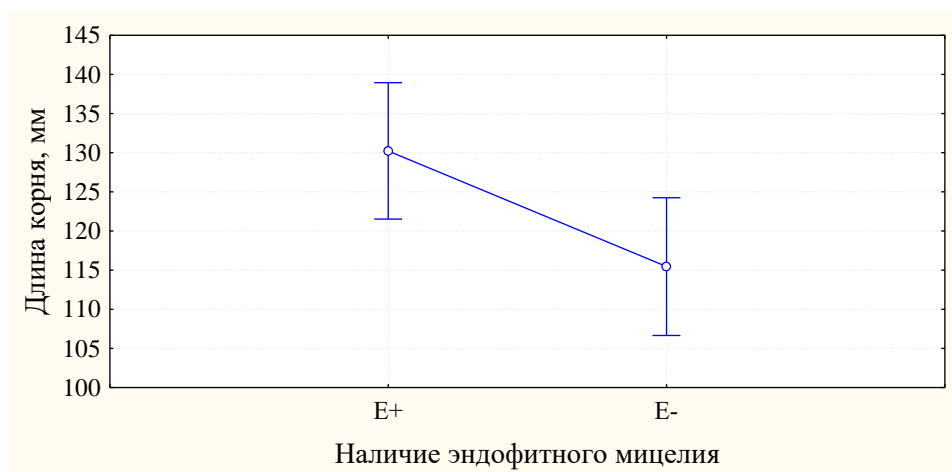


Рисунок 10. Зависимость длины корня от наличия в растении эндофита

Длина 2-го листа зависит 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. 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.

На биомассу оказывает влияние сочетание всех факторов. 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 рисунка 10, 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.

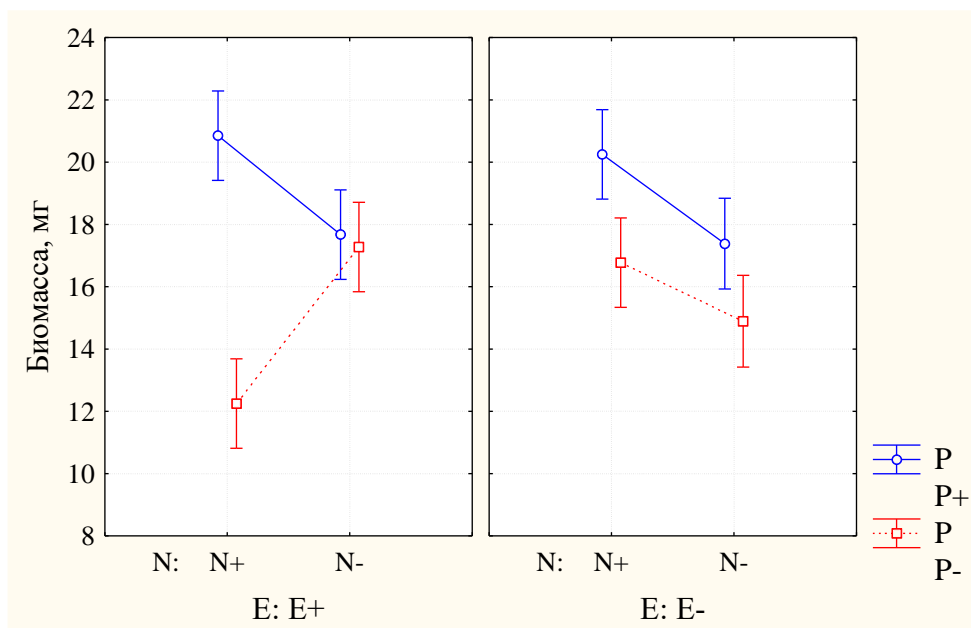


Рисунок 10. Зависимость биомассы растений от наличия эндофитной инфекции и состава питательной среды

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. Всего эндофитная инфекция была обнаружена у 6 видов злаков (*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. 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). 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. Изучение распределения мицелия эндофитов в растениях показало, что эндофитные грибы способны колонизировать как надземные, так и подземные органы растений, причем при развитии в корне гифы заметно тоньше, чем в надземных органах. Проведенный эксперимент по изучению влияния дефицита фосфора и/или азота в питательной среде на молодые проростки овсяницы гигантской 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 одновременном 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 спораношений.

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 клавиципитальных 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 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. Zabalgoitia. — 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.