

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАСТЕНИЕВОДСТВА им. Н.И.ВАВИЛОВА»
(ГНУ ГНЦ РФ ВИР)

**ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ РОДА *NEOTYRHODIUM* – ВЫЯВЛЕНИЕ И
ИДЕНТИФИКАЦИЯ У ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ (*FESTUCA PRATENSIS* HUDS.)**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2007

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАСТЕНИЕВОДСТВА им. Н.И.ВАВИЛОВА»
(ГНУ ГНЦ РФ ВИР)

**ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ РОДА *NEOTYRHODIUM* – ВЫЯВЛЕНИЕ И
ИДЕНТИФИКАЦИЯ У ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ (*FESTUCA PRATENSIS* HUDS.)**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2007

Составители:

Канд.биол.наук Т.В. Шеленга, д-р биол.наук А.В., проф. Конарев, д-р биол.наук, проф. Н.И. Дзюбенко

Под редакцией:

д-ра биол. наук, проф. Н.И. Дзюбенко

В рекомендациях рассмотрены особенности строения, развития грибов-эндофитов злаковых трав рода *Neotyphodium*, а также преимущества, возникающие при естественной симбиотической ассоциации злаковых трав с грибами-эндофитами, которые могут быть использованы в селекции. Дана характеристика образцов *Festuca pratensis* Huds., содержащих грибы-эндофиты (*N. uncinatum*). Описаны методы обнаружения и идентификации грибов-эндофитов и продуктов их жизнедеятельности в растительном материале.

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАСТЕНИЕВОДСТВА ИМ. Н.И.ВАВИЛОВА
(ГНУ ГНЦ РФ ВИР), 2007

Содержание

Введение.	4
Общие сведения о грибах эндофитах.....	4
Характеристика продуктов метаболизма грибов-эндофитов.....	8
Эрготные алкалоиды.....	8
Индол-детерпены.....	9
Насыщенные аминопирролизидины.....	10
Методы обнаружения грибов-эндофитов и их алкалоидов.....	11
Приборы и оборудование.....	12
Для проведения микроскопических исследований.....	12
Для анализа алкалоидов.....	12
Реактивы.....	12
Отбор проб растительного материала.....	13
Проведение световой микроскопии.....	13
Выращивание колоний.....	14
Проведение стереомикроскопии.....	15
Проведение электронной трансмиссионной микроскопии.....	15
Методы исследования алкалоидов.....	16
Анализ алкалоидов грибов-эндофитов рода <i>Neotyphodium</i> в растениях овсяницы.....	17
Анализ индол-детерпенов(лолитрема).....	18
Анализ насыщенных пирролизидинов (лолина).....	18
Проведение световой микроскопии.....	19
Исследование колоний.....	22
Проведение стереомикроскопии.....	23
Проведение электронной трансмиссионной микроскопии.....	23
Обработка результатов анализа алкалоидов грибов <i>Neotyphodium</i>	24
Идентификация симбиотических грибов-эндофитов рода <i>Neotyphodium</i> в образцах овсяницы луговой из коллекции ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова.....	25
Влияние процесса репродукции и условий хранения образцов овсяницы луговой коллекции ВИР на сохранение жизнеспособности мицелия грибов-эндофитов рода <i>Neotyphodium</i>	27
Заключение.....	28
Литература.....	29
Приложение.....	35

Введение.

Общие сведения о грибах эндофитах. Среди многолетних кормовых злаковых трав видное место занимает овсяница луговая. Овсяница характеризуется высокой урожайностью, долголетием, выносливостью к многократному скашиванию, вытаптыванию и стравливанию. Это позволяет широко использовать ее на сенокосах, пастбищах и, в сырьевом конвейере для производства травяной муки, резки, силоса, сенажа и других кормов. Одновременно продолжаются всесторонние исследования многолетних злаковых трав для получения новых высокоурожайных и устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам сортов.

Наряду с традиционными подходами к созданию исходного материала для селекции и новых сортов кормовых злаковых трав в мировых науке и практике применяется новый подход. Он заключается в использовании преимуществ, возникающих при естественной симбиотической ассоциации злаковых трав с грибами-эндофитами. Симбиотическая селекция направлена на использование потенциала микробно-растительных взаимодействий, в том числе на поиск оптимальных сочетаний генотипов симбионта и растения хозяина

По данным зарубежных исследователей 95% образцов овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) и тростниковидной (*F. arundinaceae* Schreb.) в США, более 60 % в Новой Зеландии и до 52 % в Восточной Европе содержат мицелий грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* [53, 61, 64, 67].

В симбиоз с эндофитами вступают злаковые травы, которые согласно классификации Н. Н. Цвелева [5] являются представителями главным образом следующих триб семейства злаков (*Poaceae* Barnh.): *Triticeae* Dum. (роды *Elymus* L. и *Hystrix* Moench), *Bromeae* Dum. (род *Bromus* L.), *Aveneae* Dum. (роды *Agrostis* L., *Calamagrostis* Adans.), *Phleaeae* Dum. (род *Phleum* L.), *Poeae* R. Br. (роды *Dactylis* L., *Festuca* L., *Lolium* L. и *Poa* L.).

Для каждого вида многолетних злаковых трав характерен свой вид грибов-эндофитов:

- для овсяницы луговой (*F. pratensis* Huds) – *N. uncinatum* Gams [27];
- для овсяницы тростниковидной (*F. arundinaceae* Schreb.) – *N. coenophialum* Morgan-Jones & Gams [27];
- для райграса (*L. perenne* L.) – *N. lolii* Latch [41].

Термин «эндофит» в принципе применим к любому организму, живущему внутри растения. Например, к сапрофитным грибам и бактериям, живущим в растительных тканях. Определения: «овсяничные грибы», «эндофиты», «овсяничные эндофиты» используются для обозначения микроорганизмов, обнаруженных в семенах и межклеточных пространствах листовых влагалищ разных видов овсяницы. Среди них обнаружены грибы следующих родов: *Neotyphodium*, *Epichloë*, *Balansia* [4, 15, 18, 71, 73, 75].

Предполагается, что гаплоидные виды грибов-эндофитов *N. uncinatum* и *N. lolii* образовались в процессе совместной эволюции грибов рода *Epichloe* и многолетних злаковых трав. В ходе эволюции была утрачена способность грибов к половому или горизонтальному пути размножения и также внешние

признаки присутствия грибов в растении («чехловидная болезнь»), оказывающие негативное влияние на развитие самого растения-хозяина [72,73].

Мицелий грибов рода *Neotyphodium* прорастает между клетками растительных тканей, в семяпочках, семенах растений, за исключением корней и стеблей. В семенах он в основном располагается в алейроновом слое, а в зеленых тканях растения – в листовых влагалищах [20]. Развитие мицелия гриба-эндофита происходит в меристеме растения-хозяина, которая является благоприятной средой для развития мицелия грибов-эндофитов, т.к. там сосредоточены питательные вещества, в том числе сахара. «Заражение» семян растения-хозяина происходит следующим образом. Мицелий гриба развивается в нуклеарном слое яйцеклетки и инфицирует развивающиеся там семена [18, 21]. При развитии семени мицелий гриба-эндофита развивается вместе с ним. Ростовые факторы растения-хозяина оказывают влияние как на само растение, так и на присутствующий в нем мицелий гриба-эндофита. Такой способ размножения грибов-эндофитов называется горизонтальным. Гифы гриба, в основном, проникают в межклеточные пространства растения-хозяина, под давлением раздвигая межклеточные перегородки, так как выработка ферментов, разрушающих эти перегородки, может вызвать реакцию иммунной системы растения и вызвать последующий некроз ткани, «пораженной» грибом. Проникновение грибов-эндофитов не вызывает реакции со стороны иммунной системы растения-хозяина, что позволяет грибному мицелию развиваться беспрепятственно [17, 20] (рис.1).

Таким образом, растение-хозяин является для гриба «убежищем», снабжает его питательными веществами и возможностью размножения, а гриб, в свою очередь, повышает адаптационные возможности растения [18, 20, 22].

Данный тип симбиотических отношений относится к категории мутуалистических (взаимовыгодных) [1, 2, 4, 18, 20, 72, 74]. Примерами таких симбионтов являются азотфиксаторы *Acetobacter* и *Azoarcus*, а также грибы-эндофиты рода *Neotyphodium* и др.

В реальных экологических условиях, когда растения испытывают дефицит основных элементов питания и подвергаются действию различных стрессов, их выживание в большей степени зависит от образования симбиозов с микроорганизмами [3]. Показано, что E+ (далее многолетние злаковые травы, содержащие грибы-эндофиты рода *Neotyphodium*, будут обозначаться как E+) злаковые травы характеризуются повышенной семенной продуктивностью, ускорением срока колошения, увеличением выхода зеленой массы растений. По данным зарубежных исследований, грибы-эндофиты увеличивают фенотипическое разнообразие своих растительных хозяев, повышая возможность их адаптации к условиям окружающей среды [19, 30, 34, 56, 58,73].

Наряду с улучшением ряда хозяйственно-ценных признаков, эти симбионты могут придавать растениям-хозяевам и отрицательные свойства. Грибы-эндофиты синтезируют ряд алкалоидов, которые наряду с положительным для самого растения эффектом могут вызвать интоксикацию у травоядных животных [17, 42].

Характеристика продуктов метаболизма грибов-эндофитов. Алкалоиды грибов-эндофитов можно разделить на четыре группы:

1. Эрготные алкалоиды (эрговалин, эргоновин и др.);
2. Индолдетерпены (паксиллин, лолитрем В);
3. Пирролоперазины (перамин);
4. Насыщенные аминопирролизидины, так называемые лолины (лолин, норлолин, N-ацетиллолин, N-формиллолин).

Для каждого вида грибов-эндофитов характерно определенное сочетание алкалоидов:

- лолины для *N. uncinatum* (симбионт овсяницы луговой);
- эрготные алкалоиды, лолины и перамины для *N. coenophialum* (симбионт овсяницы тростниковидной);
- эрготные алкалоиды и лолитремы и перамин для *N. lolii* (симбионт многолетнего райграса).

Алкалоиды являются специфическими продуктами обмена грибов-эндофитов (рис. 2 приложения). Алкалоиды перамины и лолины воздействуют в основном на насекомых-вредителей [25, 37]. Эрготные алкалоиды и лолитремы являются токсичными для травоядных животных [28, 35, 44, 54].

Эрготные алкалоиды. Эрготные алкалоиды являются результатом сложной цепи метаболических процессов, проходящих у гриба-симбионта. Особенностью строения молекул эрготных алкалоидов является наличие в их структуре эрголинового кольца (рис.2). К эрготным алкалоидам относятся эрготептины (эрговалин), клавины (ханоклавины, пенниклавины, элимоклавины, агроклавины) и простые амиды лизергиновой кислоты (эргин, эргоновин). Эргозин, эргонавин и эрготамин характерны также для других грибов семейства *Clavicipitaceae (Sclerotia)* [16, 57]. Эрговалин и эргин являются основными алкалоидами, определяемыми в растениях, «пораженными» грибами рода *Neotyphodium* [44,48,51,66]. Эрготные алкалоиды могут образовывать стереоизомеры. Образование стереоизомеров усиливается под воздействием света, полярных растворителей и температуры, превышающей 25°C. Изомеры эрготалкалоидов обозначаются окончанием **-инин** (эрговалин–эрговалинин). Процесс образования изомеров необходимо учитывать при приготовлении растительных экстрактов в процессе анализа эрготных алкалоидов. Для замедления процесса образования изомеров процедуру экстрагирования рекомендуется проводить в определенных условиях: при ослабленном искусственном освещении или освещении желтыми лампами, при температуре не выше 25°C, а готовые экстракты хранить в темноте, при t° = -4°C. Срок хранения готовых экстрактов эрготных алкалоидов около 12 месяцев. Попадая в организм травоядных животных, эрготные алкалоиды могут вызывать симптомы токсикозов, если содержание алкалоидов превышает предельно допустимый уровень (ПДУ) 0,3-0,5 мкг/г сухого веса корма (для лошадей), 0,5-0,825 мкг/г (для крупного рогатого скота), 0,8-1,2 мкг/г (для овец) [45, 49, 51].

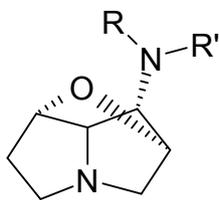
Механизм действия эрготных алкалоидов на организм животных связан с воздействием на дофаминовые и α-алренорецепторы. Употребление корма, имеющего высокий уровень этих алкалоидов, вызывает у животных нарушения, объединенные под понятием «летнего синдрома». Токсикоз характеризуется нарушением процессов терморегуляции, пищеварения, влиянием на уровень гормонов

в крови, в том числе пролактина, вследствие чего животные теряют в весе, у животных снижается репродуктивная способность, уменьшается лактация, вплоть до его исчезновения. Под влиянием эрготных алкалоидов сужение сосудов в конечностях может в холодное время года привести к их некрозу («овсяничная стопа») [51, 62, 66,68].

Индол-детерпены. Следующая группа алкалоидов, токсичных для травоядных животных – это индол-детерпены. Всего в грибах-эндофитах обнаружено 17 соединений этого класса, среди них наиболее распространенными являются паксиллин и лолитрем В. Ключевой реакцией в синтезе этой группы алкалоидов является преобразование паксиллина в лолитрем В через ряд промежуточных веществ. Отличительной чертой индол-детерпенов является наличие в их структуре индольного кольца (рис.2) [46]. Лолитремы – это липофильные нейротоксины, которые вызывают «райграссовую дрожь» у травоядных животных, что выражается в дискоординации движений животных, дрожи в конечностях. Лолитрем В и его предшественник паксиллин вызывают нарушение функции ЖКТ, отдышку, тахикардию, повышают кровяное давление. Токсические явления объясняются воздействием лолитремов на холинэргические рецепторы организма животных и блокадой калиевых (K⁺) каналов. Симптомы токсикоза исчезают, если животных переводят на Е- корма. Негативные явления сопровождаются повышением концентрации аспартат-аминотрансферразы в крови, что свидетельствует о повреждении клеток печени и мышечной ткани. Токсикоз наступает, если содержание лолитрема В кормах превышает ПДУ, равный 2-2,5 мг/г сухого веса кормов [43, 52].

Насыщенные аминопирролизидины. Алкалоиды, относящиеся к насыщенным аминопирролизидинам или "лолинам" обеспечивают защиту растений от насекомых вредителей: личинок аргентинского стебелькового долгоносика *Listonotus bonariensis*, Ruschel, совки травяной *Balanococcus proae*, тли семейства *Homoptera*, *Phopolosium padi* L. и от злаковой тли *Schizapis graminum*, черного таракана *Heteronychus arator* и гусеницы озимой совки *Graphania mutans* [19,25,39]. Содержание лолинов, достаточное для защиты растений от насекомых-вредителей, считается равным 0,6 мкг/г [39].

Среди насыщенных аминопирролизидинов выделяют лоллин, норлолин, N-ацетиллолин и N-формиллолин. Самыми распространенными из них являются N-ацетиллолин и N-формиллолин [37]. Эту группу алкалоидов характеризует наличие кислородного мостика между 2 и 7 атомами углерода пирролизидинового кольца (рис.3). Насыщенные аминопирролизидины с короткой (1-2 атома углерода) и длинной (10-14 атомов углерода) углеродной цепью наиболее активны в отношении насекомых-вредителей по сравнению с насыщенными аминопирролизидинами со средней углеродной цепью (4-9 атома углерода) [39, 50].



	R	R'
лолин	CH ₃	H
N-ацетиллолин	CH ₃	COCH ₃
N-формиллолин	CH ₃	CHO
N-ацетилнорлолин	CH ₃	COCH ₃
N-метиллолин	CH ₃	CH ₃

Биосинтез насыщенных аминопирролизидинов (лолинов) наименее изучен. Наличие пирролизидинового кольца – характерный признак аминопирролизидинов. Синтез лоллинов осуществляется путем N-метилирования, окислительного дезаминирования и циклирования молекулы путресцина (рис.3) [19, 69].

Как было указано выше, лолитремы и эрготные алкалоиды вызывают тяжелые токсикозы у домашних животных, а лоллины и перамин негативно воздействуют на насекомых-вредителей злаковых трав [19].

В связи со всем выше сказанным можно заключить, что перспективным направлением деятельности исследователей, работающих с мировым генофондом многолетних кормовых злаковых культур, является всестороннее изучение явления симбиоза многолетних злаковых трав с грибами-эндофитами рода *Neotyphodium* для использования его положительных свойств в селекции. В этой связи на передний план выходят методы выявления грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* в растениях.

Экспериментальной основой для написания настоящих методических рекомендаций явился опыт нашей работы с грибами-эндофитами овсяницы луговой на Хоккайдской сельскохозяйственной экспериментальной станции (Япония) и в ВИР им. Н.И. Вавилова. Теоретической базой послужили сведения, почерпнутые в ходе анализа мировой литературы по рассматриваемому вопросу.

Методы обнаружения грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* и анализ алкалоидов.

Для изучения симбиотических отношений многолетних злаковых трав с грибами-эндофитами рода *Neotyphodium* и более эффективного использования этого феномена в селекции нужны надежные методы обнаружения и идентификации гриба-эндофита. В настоящее время используют различные способы обнаружения и идентификации грибов-эндофитов у растений.

Присутствие эндофитных грибов рода *Neotyphodium* в зеленой массе и семенах позволяет установить метод иммуноблотинга. Для этого нитроцеллюлозную мембрану предварительно обрабатывают «эндофитной антисывороткой». Грибные антигены в растительных тканях и семенах можно обнаружить, используя метод энзим связанного иммуноферментного анализа – ELISA [45]. В ряде случаев исследователи использовали антисыворотки, дающие перекрестную реакцию с разными представителями семейства *Clavicipitaceae* [29], что существенно сужает возможности применения методов.

Одним из косвенных способов определения присутствия грибов-эндофитов в растении является использование тли – *Rhopalosiphum padi* L. Алкалоиды грибов (лолины, перамины) негативно влияют на развитие тлей. Число имаго *R. padi* L. на рассаде Е+ растений, как правило, значительно меньше, чем на Е– растениях. Кроме того, на Е+ растениях отсутствуют нимфы. По количеству находящихся на разных стадиях развития особей *R. padi* L, можно судить о присутствии или отсутствии грибов-эндофитов в данном растении [31, 75].

Для обнаружения и идентификации грибов-эндофитов в растительных тканях используют:

- различные виды микроскопии – световая, стерео и электронная;
- наблюдение за особенностями роста колоний грибов, выращенных на питательной среде;
- определение состава и количества алкалоидов.

Приборы и оборудование.

Для проведения микроскопических исследований грибов-эндофитов пригоден световой микроскоп типа Olympus В О61 с объективами x10, x20, x40, стереомикроскоп марки Olympus SM 101 с объективом x20 и трансмиссионный электронный микроскоп Cambridge 250 Mk III ТЕМ. Необходимы также: автоклав PRSt 56, термостат ТС-80, модуль для лиофильной сушки LABCONCO, холодильник (0 – 4°C).

Для анализа алкалоидов необходимо следующее оборудование: мельница, горизонтальный шейкер S-3.02, жидкостной хроматограф типа Shimadzu (Columbia, MD, Model LC-600), оснащенный спектрофотометром и флюорометром, газовый хроматограф типа Hewlett Packard, 5980A, оснащенный пламенно-ионизационным детектором, центрифуги типа ОС 6М и ЦЛМ1-12, вакуумный насос типа НВР-1, термостат TDB-A-400 типа dry-block с подводкой инертного газа, рефрижератор для хранения проб MBR-107D Sanyo (Япония).

Для анализа алкалоидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии используют универсальные хроматографические колонки типа column Wacosil II C₁₈ RS 4,6 мм, 250 мм (C₁₈ модифицированный силикагель с размером пор 120 Å). В варианте газовой хроматографии – типовые колонки CP-Sil (основа – полисилоксан) или CP-Wax (основа – полиэтиленгликоль).

Реактивы

Для подготовки проб к световой микроскопии необходимы: краситель розовый бенгальский, 70% этиловый спирт, предметные стекла, покровные стекла, гидроксид натрия, емкость с крышкой для замачивания семян.

Для приготовления питательной среды: картофель, глюкоза, агар-агар, окситетрацилин, дистиллированная вода, чашки Петри, фильтр Ватман № 6.

Для подготовки проб к электронной микроскопии: 2% раствор четырехоксида осмия (OsO_4), 0,1М раствор какодилата натрия (рН – 7,4), этиловый спирт (40°C, 70°C, 96°C, 100°C), 100°C ацетон, платиновая проволока.

Для экстрагирования эрготных алкалоидов: уксусная кислота, контейнеры для проб объемом 20 и 10 мл, шприцы на 10 мл, бумажный фильтр Ватман № 5А, разделительные колонки C_{18} 3,5-4 см, метанол, дистиллированная вода, раствор аммиака 10%, мембранный фильтр с ячейками размером 0,22 мкм,

Для экстрагирования лолитрема: хлороформ, метанол, азот, кремниевые разделительные колонки 3,5-4 см, дихлорметан, ацетонитрил.

Для экстрагирования лолиновых алкалоидов: нейлоновый мембранный фильтр с ячейками 0,45 мкм, флаконы для хранения хроматографических проб.

Стандарты лолитрема В, эрговалина (Sigma Chemical Co.) и N-ацетиллолина.

Отбор проб растительного материала

При проведении светового микроскопического исследования рекомендуется анализировать не менее 50 семян одного образца и не менее 50 растительных проб из листовых влагалищ каждого образца, в семенах которых был обнаружен грибной мицелий.

Выращивание колоний осуществляют из листовых влагалищ растений, у которых был предварительно обнаружен грибной мицелий (см. световая микроскопия). Для стерео и электронного микроскопирования колоний берут часть питательной среды размером 1x1см с расположенной на ней колонией гриба.

Для анализа алкалоидов семена предварительно измельчают на мельнице и тщательно перемешивают полученную муку.

Проведение световой микроскопии.

Для первичной диагностики грибов-эндофитов в семенах овсяницы луговой и в зеленых частях растений используют метод световой микроскопии. Для более точного определения видовой принадлежности гриба-эндофита используют стерео и электронную микроскопию.

Подготовку растительных образцов для светового микроскопического исследования проводят по

методу D.C. Saha [59]. Окраску препаратов семян проводят с использованием красителя розового бенгальского. Для приготовления раствора красителя берут равные части 10%-го раствора NaOH и 0,5%-го спиртового раствора бенгальского розового, которые затем смешивают. Раствор бенгальского розового может храниться при комнатной температуре в темноте в течение месяца. Семена замачивают в 0,5% щелочном растворе розового бенгальского на 16-18 часов при температуре 20 – 22°C. Готовность образцов к микроскопии проверяют путем раздавливания семян между предметными стеклами (семя должно раздавливаться без усилий). Готовые к микроскопии семена помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом, раздавливают и исследуют под световым микроскопом при увеличении в 200 – 400 раз.

Для световой микроскопии зеленых частей E+ растений берут эпителий листовых влагалищ проростков и окрашивают по методу D.C. Saha [59]. Материал помещают на предметное стекло, сверху наносят 0,5% раствор бенгальского розового и через 5-7 мин исследуют под микроскопом.

Выращивание колоний.

Для выращивания колоний грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* используют селективную для *Neotyphodium* среду – картофельно-декстрозный агар (КДА) с добавлением окситетрациклина (метод M.J. Christensen'a) [23, 24].

Для приготовления 1 литра питательной среды берут 200 г картофеля, 13,5 г глюкозы, 13,5 г агара, 5мкг окситетрациклина и дистиллированную воду. Картофель нарезают кусочками величиной 1х1см и варят в течение 1 часа. Полученный отвар гомогенизируют, добавляют глюкозу и агар. Общий объем раствора доводят дистиллированной водой до 1 литра и помещают в термостойкую колбу нужного объема. Затем исходную смесь стерилизуют в автоклаве при 220°C и давлении пара 2 атм. Стерильную среду разливают в стерильные чашки Петри до уровня 0,5-0,7см высотой. Непосредственно перед разливом среды в нее добавляют стерильный порошок окситетрациклина. После остывания среда готова для использования.

Для получения посевного материала семена E+ образцов предварительно высевают в грунт при естественном освещении в достаточный объем высокопитательной почвы (толщиной примерно 9 см) и выращивают до стадии трех листьев. Перед посевом листовые влагалища исследуют микроскопически для подтверждения жизнеспособности мицелия гриба. Полученные проростки исследуют под световым микроскопом для подтверждения наличия мицелия гриба-эндофита по методу D.C. Saha [59].

Для посева колоний гриба используют сегменты листового влагалища длиной примерно 6 см. В целях профилактики против прорастания на питательной среде посторонних микроорганизмов посевной материал подвергают специальной обработке: промывают в 95% спиртовом растворе в течение 1 мин, затем 1 мин в 10% растворе хлорамина и 1 мин в стерильной воде. Обработанный материал сушат на стерильной фильтровальной бумаге, затем нарезают на части шириной 1мм и помещают на питательную среду. Всю процедуру посева необходимо проводить в стерильном боксе для предотвращения загрязнения питательной среды другими микроорганизмами. Чашки Петри, с посевным материалом помещают в термостат при температуре 25°C (температурный оптимум роста

Neotyphodium). Колонии выращивают примерно 10 дней [23,24].

Проведение стереомикроскопии.

Для изучения морфологии конидий и фиалид (конидиофор) колонии исследуют с помощью стереомикроскопа. Для этого берут часть питательной среды размером 1x1см с расположенной на ней колонией гриба, помещают ее на предметное стекло и исследуют под микроскопом при увеличении в 200 раз без окрашивания по методу M.J. Christensen'a [23,24].

Проведение электронной трансмиссионной микроскопии.

Детальное изучение морфологических особенностей грибов-эндофитов (форма и размеры фиалид, конидий) проводят при помощи электронной микроскопии. Для этого берут 4-х недельные колонии грибов-эндофитов, выращенные на КДА. Готовят материал к исследованию по методу H. Koga [40]. Выбранные для микроскопии колонии извлекают из чашек Петри вместе с частью питательной среды размером 1x1см. Материал фиксируют в 2% растворе четырехоксида осмия в 0,1М какодилатном буфере (pH – 7,4) в течение 2 часов. Образец дважды промывают путем последовательного погружения в 0,1М какодилатный буфер. Материал обезвоживают. Обезвоживание проводят в следующем порядке:

- 40° этиловый спирт – 2 раза по 10 минут;
- 70° этиловый спирт – 2 раза по 10 минут;
- 96° этиловый спирт – 2 раза по 10 минут;
- 100° этиловый спирт – 10 минут;
- 100° этиловый спирт – 2 раза по 15 минут;
- абсолютный ацетон – 2 раза по 15 минут.

Процедуру обезвоживания проводят при температуре 0 – 4°C, для чего флаконы с пробой помещают в холодильник. Пробу подсушивают на фильтровальной бумаге, помещают в вакуумный испаритель, где напыляют тонкий слой платины, для чего платиновую проволочку помещают в вольфрамовую лодочку, При прохождении тока порядка 100 А платина накаляется и переходит в парообразное состояние [38, 47]. Пробу изучают с использованием трансмиссионного электронного микроскопа с увеличением – 8300х.

Методы исследования алкалоидов.

Существует большое количество методов определения алкалоидов. Например, лолитрем В первоначально анализировали при помощи биопробы на мышах, основанной на визуальной оценке силы судорог у животных. Оценка нейротоксической дозы для мышей позволяет определить токсичность пастбищ для крупного рогатого скота на образцах меньших размеров. Однако биопроба требует 25 г сухого веса образца травы на одно определение, а результаты становятся известными лишь через несколько дней. Метод не применим для большого количества анализов и является довольно дорогостоящим [76].

В 1988г. Дж.И. Роттингхаус и Г.Б. Гарнер и др. разработали чувствительный, и быстрый метод количественного определения эрговалина в семенах овсяницы, основанный на применении

высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и газожидкостной (ГЖХ) хроматографий с флюоресцентным детектором [28, 32, 58, 65]. Метод применим также для определения количественного и качественного состава других алкалоидов грибов-эндофитов. ВЭЖХ используют для обнаружения алкалоидов в других культурах (ржи и пшенице и др.) [16, 30, 63, 67], фармацевтических препаратах [58], плазме [32, 75]. Пределом чувствительности метода является содержание эрговалина 0,05 мкг [32, 49]. Недавние исследования показали, что аминопирролизидины являются флюоресцирующими молекулами. Метод флюоресценции применим для рутинного исследования большого количества образцов злаковых трав, как для растения в целом, так и для семян [26, 69, 70].

Уникальный по своим характеристикам спектр поглощения индолдетерпенов дает возможность их надежного определения при помощи ВЭЖХ с УФ детектором при длине волны 268нм. Однако, существует множество других сильных поглотителей УФ, присутствующих в экстрактах злаковых трав и служащих помехой для достоверного определения лолитремов при низком уровне их содержания (менее 0,05 мкг) [54].

Для определения эрговалина может быть применен метод инфракрасной спектроскопии. Инфракрасное сканирование образцов осуществляется при длине волны 1110-2490 нм. Инфракрасная спектроскопия позволяет определять содержание эрговалина в растительных образцах с точностью, получаемой при высокоэффективной жидкостной хроматографии [33, 36, 55].

Способность эрготных алкалоидов образовывать с *p*-диметиламинобензальдегидом комплекс, имеющий голубой цвет, дает возможность определять общее количество эрготных алкалоидов колориметрическим методом [36].

При скрининге коллекций на содержание алкалоидов чаще всего применяется метод хроматографии. При этом, для анализа эрготных алкалоидов и индолдетерпенов предпочтителен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а для анализа пирролизидинов (лолинов) — метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Приведенные выше методы могут быть использованы для выявления грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* в образцах овсяницы для последующего использования их в селекции на повышенную продуктивность, а также устойчивость к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды [6-13, 20, 60].

Анализ алкалоидов грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* в растениях овсяницы

Для анализа эрготных алкалоидов и индол-детерпенов используют ВЭЖХ. Для определения эрговалина можно использовать методику G.E. Rottinghaus [58]. До опытов необходимо установить, что образцы семян овсяницы луговой не поражены *Claviceps purpurea*, т.к. присутствие этого гриба влияет на результаты анализа эрготных алкалоидов.

Для экстракции алкалоида берут 1 г семян овсяницы луговой (предварительно помолотые), смешивают с 20 мл 20% уксусной кислоты. Затем, пробирки со смесью помещают в защищенное от

света место (для торможения процесса образования стереоизомеров) на 2 часа (содержимое пробирок периодически перемешивают). Полученный экстракт центрифугируют в течение 10 мин при – 10 000 об/мин. Полученную после центрифугирования надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр Ватман № 5А. 10 мл фильтрата очищают и концентрируют на разделительных колонках с твердым носителем C₁₈. Колонку перед нанесением фильтрата промывают 1мл метанола и 4мл воды, затем, используя шприц емкостью 10 мл, на нее наносят 10 мл экстракта. Примеси удаляют путем последовательного промывания колонки 4 мл 20% уксусной кислоты и 4 мл воды. Эрготные алкалоиды выходят из колонки вместе с 0.04% раствором аммония в метаноле. Полученный экстракт фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр. 1 мл фильтрата переносят в специальный контейнер. Процедуру экстрагирования проводят при ослабленном освещении и температуре 20°C. Готовые экстракты хранят до начала анализа в темноте при -4° С.

Для анализа используют ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором. Объем экстракта образца, вводимого в хроматограф, равен 5 мкл. Параметры спектрофотометра 250 нм и 420 нм. Подвижная фаза – 38% раствор ацетонитрила в 0,001 М растворе карбоната. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Стандарт эрговалина разводят и хранят согласно прилагаемой к нему инструкции.

Анализ индол-детерпенов(лолитрема).

Из группы индол-детерпенов определяют лолитрем В как наиболее распространенный и значимый из этой группы алкалоидов, для чего используют методику R. T. Gallanger [26].

Для извлечения лолитрема В применяют смесь хлороформа с метанолом (2:1). К измельченному растительному материалу весом 0,4 г прибавляют 6 мл раствора вышеуказанной смеси, которую перемешивают на горизонтальном шейкере в течение 2 часов. Полученный экстракт центрифугируют 5 мин при 3800 об/мин, затем 0,5 мл надосадочной жидкости переносят в отдельную пробирку. Эту часть экстракта высушивают при температуре 40°C в атмосфере азота, поступающего под давлением 1,5 атм. Полученный осадок смывают в чистую пробирку дихлорметаном, 3-хкратно по 0,5 мл. Полученный раствор разделяют на кремниевой колонке. Колонку предварительно промывают 2 мл дихлорметана и 1 мл смеси ацетонитрила с дихлорметаном (20:80). Лолитрем В выделяется вместе с раствором ацетонитрила в дихлорметане (3 мл). 1 мл полученного раствора помещают в контейнеры для проведения хроматографического исследования.

ВЭЖХ проводят при следующих условиях: объем экстракта образца, вводимого в хроматограф, – 5 мкл. Параметры флюорометра – 268 нм и 440 нм. Подвижная фаза – раствор ацетонитрила в дихлорметане (20:80). Скорость мобильной фазы – 1,8 мл/мин.

Стандартом является коммерческий препарат лолитрема В, разведенного в дихлорметане в 1000 и 10000 раз. Концентрация лолитрема В в растворах стандарта – 0,406 мкг/мл и 0,0406 мкг/мл соответственно. Растворы стандарта хранят при температуре -10°C.

Анализ насыщенных пирролизидинов (лолина).

Для анализа лоллина используют метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Определяют чаще N-ацетиллолин как наиболее распространенный алкалоид этой группы.

Экстрагирование лоллиновых алкалоидов проводят по методике S.G. Yates и др.[77]. Она аналогична приготовлению экстракта лолитрема В до момента растворения сухого осадка (см. выше). Полученный сухой осадок растворяют в 1 мл метанола. Раствор дополнительно очищают фильтрацией через нейлоновый мембранный фильтр Нейлон 66 с ячейками размером 0,45 мкм. Весь полученный экстракт переносят в специальные контейнеры для проведения хроматографического исследования. Готовые экстракты хранят при $t = -4^{\circ}\text{C}$. Для обнаружения и количественного определения лоллинов используют капиллярную ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором.

Хроматографию проводят при следующих условиях: газ-носитель – азот – давление 0,5 атм. Скорость тока газа-носителя в колонке – 20 мл/мин, вспомогательного газа (воздух) – 10 мл/мин. В пламенном ионизаторе газом-реагентом является водород при скорости тока – 30 мл/мин, скорость тока воздуха – 4000 мл/мин. Объем экстракта образца равен 1 мкл. Технические параметры печи: начальная температура – 180°C и конечная температура – 220°C , скорость подъема температуры печи – $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Температура введения пробы 220°C , температура детектора – 250°C .

Стандартом служит коммерческий препарат N-ацетиллолина, разведенный в дихлорметане в 100 раз. Концентрация N-ацетиллолина в растворе стандарта – 1,60 мкг/мл. Растворы стандарта хранят при температуре -10°C .

Проведение световой микроскопии.

У E+ образцов выявляются гифы гриба-эндифита, которые видны в виде полупрозрачных извитых тяжей с редкими ответвлениями, расположенными между алейроновыми зернами (рис. 4) [6-13,23, 27]. Эти морфологические особенности характерны для мицелия грибов *N. uncinatum*. В семенах можно обнаружить мицелий, принадлежащий так называемым р-эндифитам. Мицелий этих грибов обычно интенсивнее окрашен в коричнево-красный цвет и имеет более частое ветвление (рис.5).

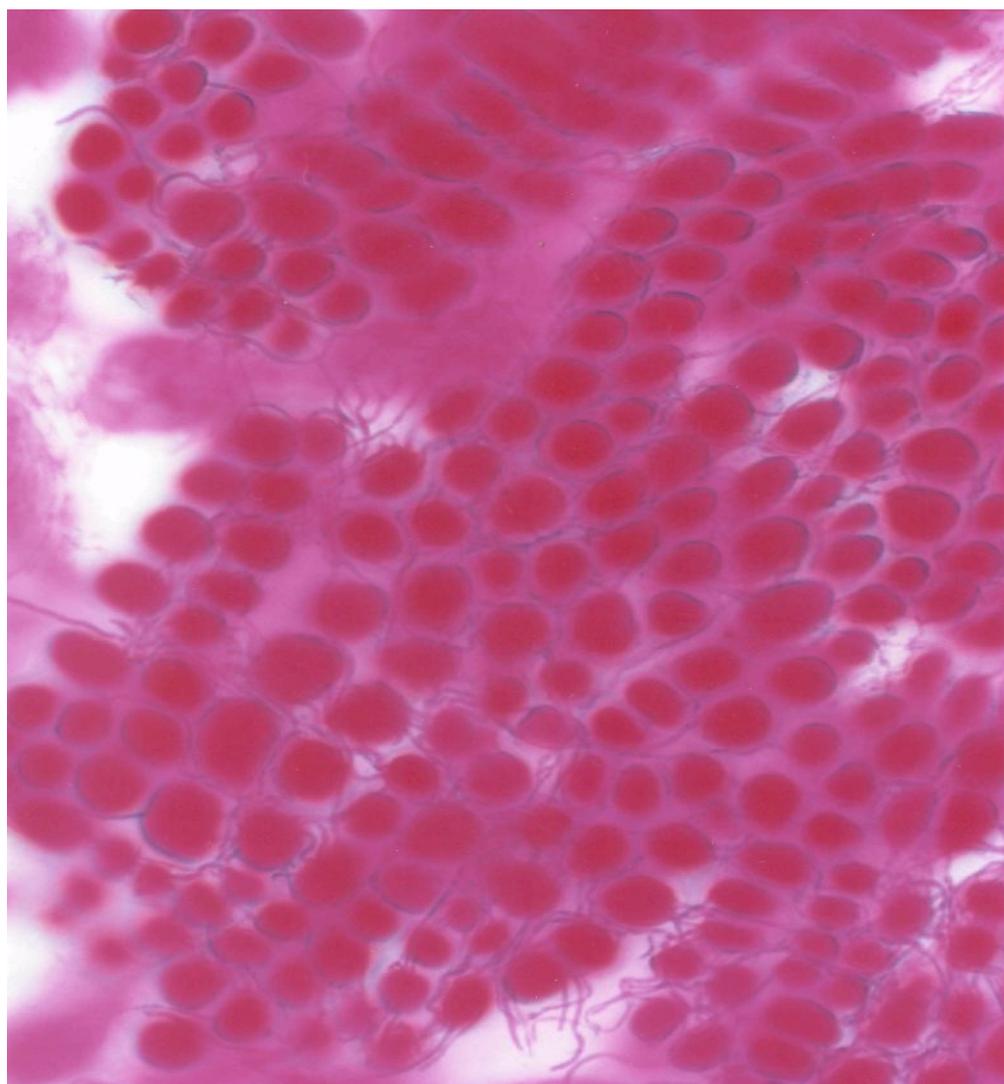


Рис. 4. Мицелий гриба *N. uncinatum* между алейроновыми зёрнами в семени E+ образца овсяницы луговой (световая микроскопия, x 200).

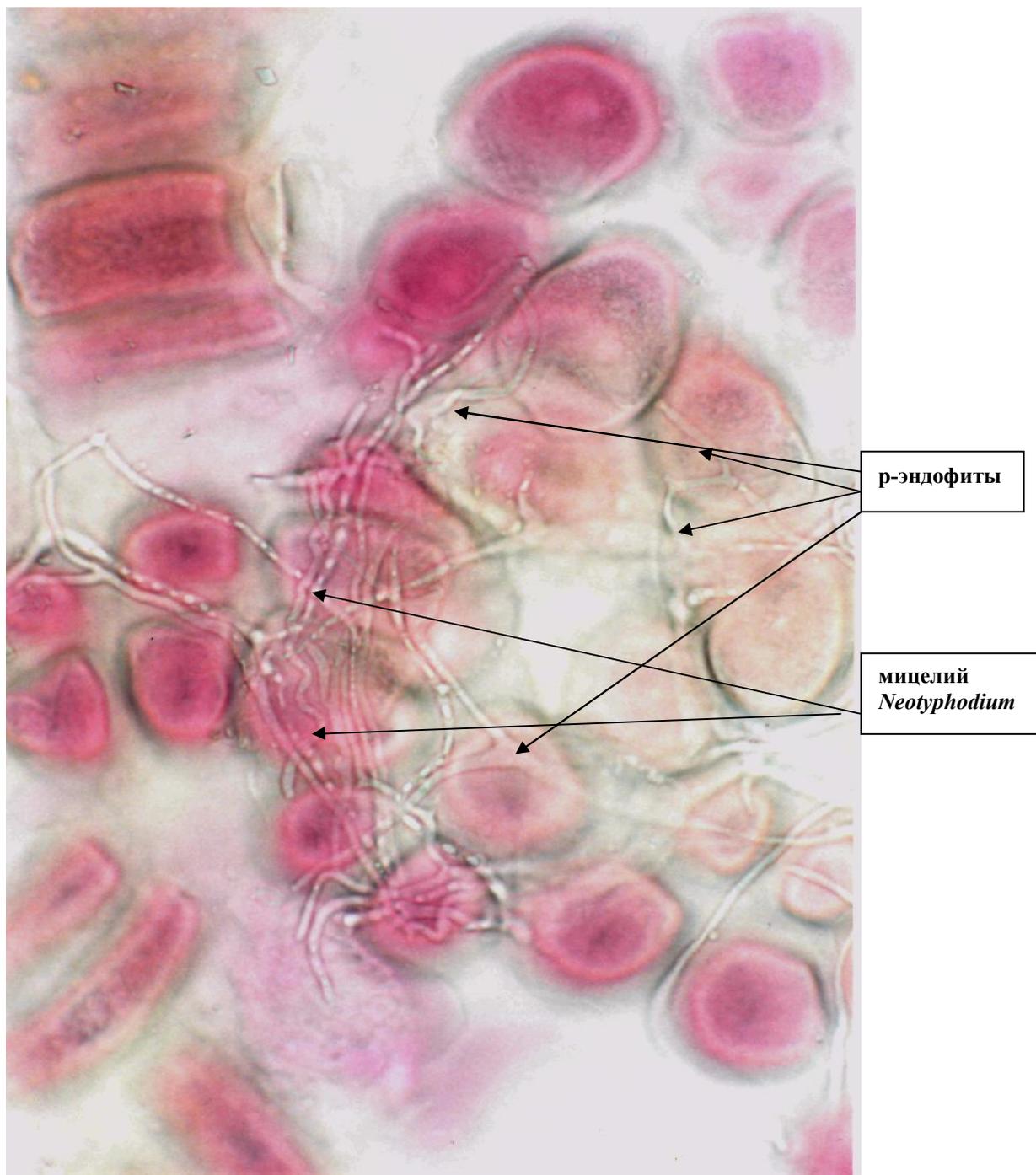


Рис. 5. Мицелий р-эндифитов между алейроновыми зёрнами в семени Е+ образца овсяницы луговой (световая микроскопия, х 200).

При микроскопии зеленых частей растения мицелий гриба-эндифита определяется в межклеточных пространствах в виде прозрачных извитых тяжей, идущих параллельно сосудистым структурам растения и имеющих редкие ответвления, что как было сказано выше, характерно для мицелия гриба *N. uncinatum* (рис. 6).

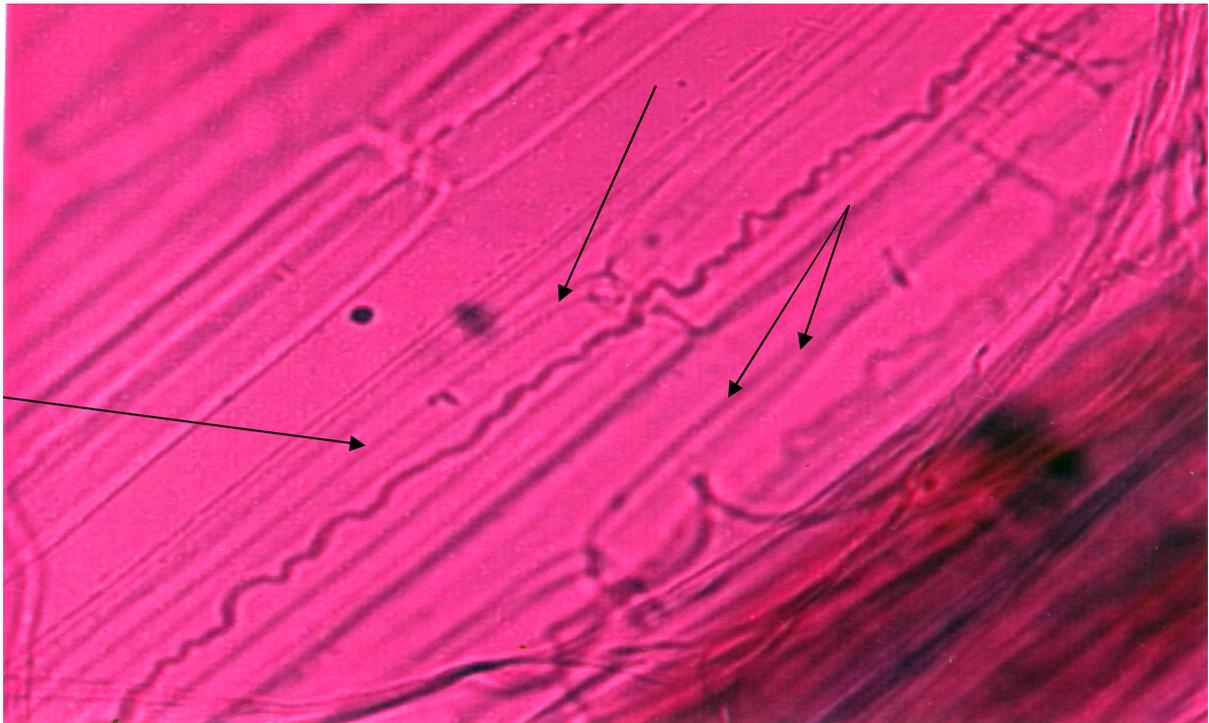


Рис. 6. Мицелий (указан стрелками) грибов-эндофитов *Neotyphodium uncinatum* в листовом влагалище овсяницы луговой (световая микроскопия, x400).

По результатам световой микроскопии можно предварительно заключить, что мицелий в семенах образцов овсяницы луговой принадлежит виду *N. uncinatum*, или так называемым р-эндофитам.

Для более надежной идентификации видовой принадлежности грибов-эндофитов необходимо исследовать особенности роста колоний гриба и морфологию мицелия гриба-эндофита с использованием стерео и электронной микроскопии.

Исследование колоний.

Колонии грибов-эндофитов выращивали по методу M.J. Christensen [23, 24]. Первые признаки роста колоний обнаруживают, как правило, на 2-3 день после посева материала. Колонии гриба растут очень медленно 0,2-0,5 мм/сутки. Через 10-15 дней диаметр колоний достигает примерно 2 – 7,5 мм. Колонии гриба-эндофита – круглые непрозрачные выпуклые волокнистые (хлопкообразные) (рис. 7). Колонии в основном белого цвета, но могут встречаться розовые и темно-желтые. Все эти признаки являются характерными для колоний грибов-эндофитов [15].

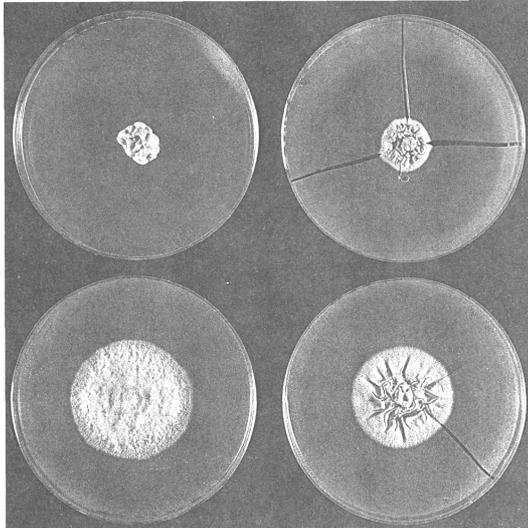


Рис. 7. Колонии грибов-эндофитов *Neotyphodium uncinatum*, выращенные на КДА.

Проведение стереомикроскопии.

Выращенные колонии изучают под стереомикроскопом. Грибной мицелий колоний формирует воздушные гифы, которые дают начало многочисленным отросткам – фиалидам – прямым и изогнутым, постепенно сужающимся к концу. Каждая фиалида образует единичную «крючковатую» конидию, наличие которой является характерным признаком мицелия *N. uncinatum* [6-13,23, 27].

Проведение электронной трансмиссионной микроскопии.

Детальное изучение морфологических особенностей грибов-эндофитов, определение размеров фиалид и конидий проводят при помощи электронной микроскопии. Измерение параметров мицелия дает возможность отнести обнаруженный гриб-эндофит к тому или иному виду рода *Neotyphodium*. Диаметр гиф грибов-эндофитов равен 0,9-1,7мкм, фиалиды прямые и слегка изогнутые – 4-17 мкм длиной, 0,8-1,6 мкм шириной, постепенно сужающиеся до 0,6-0,9 мкм. Каждая фиалида образует единичную «крючковатую» конидию 5-12 мкм длиной и 1,0-1,6 мкм шириной. Часть конидий может образовывать вторичные фиалиды, которые вновь образуют конидии (рис. 8) [6-13,23,40]. Такие особенности морфологии дают основание утверждать, что мицелий изучаемого гриба-эндофита принадлежит виду *N. uncinatum*.

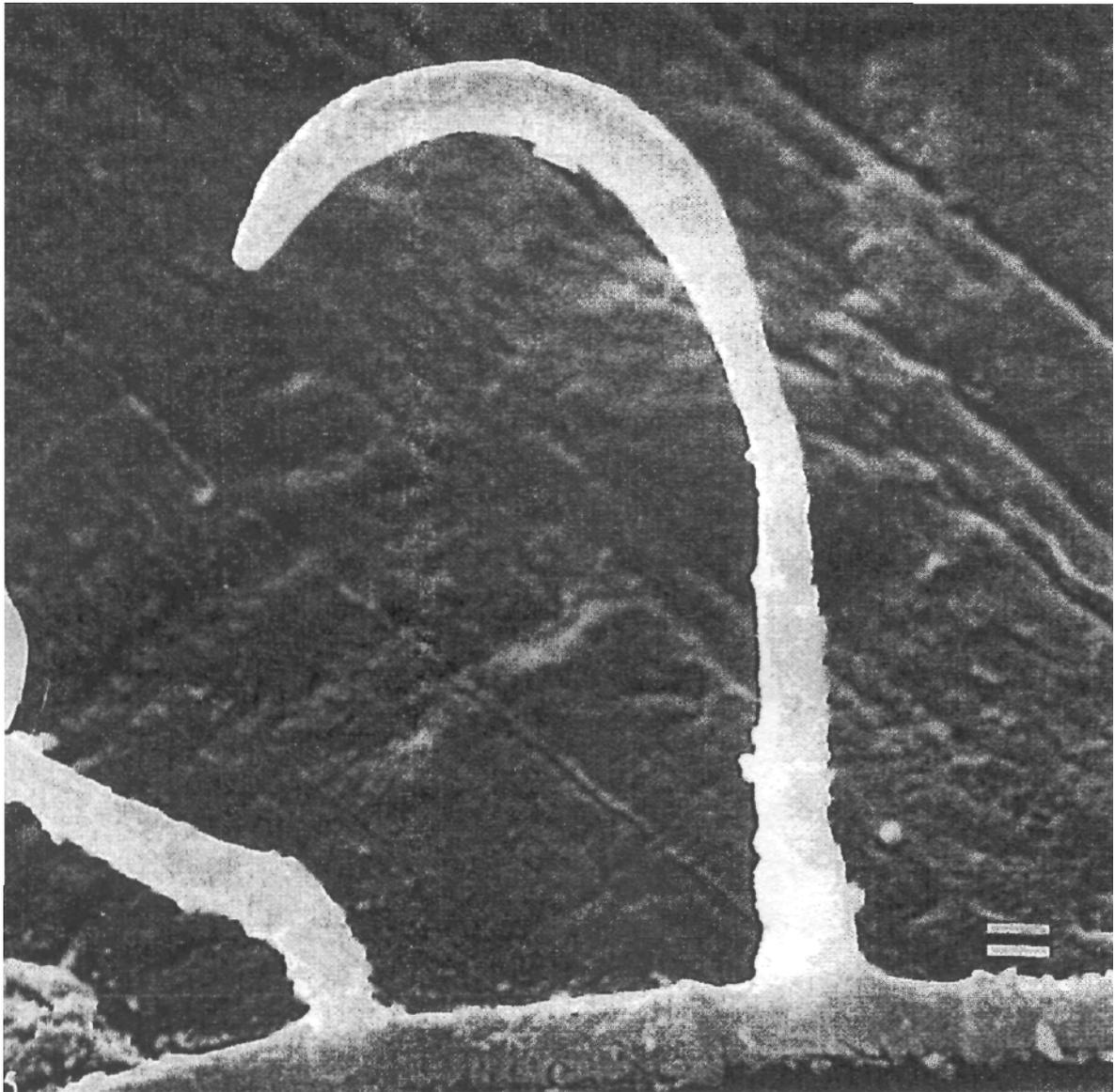


Рис. 8. Гифы гриба *N. uncinatum* («крючковатая» конидия) под электронным микроскопом (x 8300).

Обработка результатов анализа алкалоидов грибов *Neotyphodium*.

Содержание эрговалина в образцах семян овсяницы луговой рассчитывают по формуле:

$$y=13,4 \cdot 10^6 \cdot x+0,45, \text{ где}$$

y – концентрация эрговалина в образце, в мкг/г сухого веса семян образца.

$13,4 \cdot 10^6$ и $0,45$ – стандартные коэффициенты, устанавливаемые экспериментально.

x – площадь пика эрговалина анализируемого образца.

При подсчетах необходимо учитывать возможность образования изомеров, поэтому конечный результат представляет собой сумму изомеров эрговалина (эрговалина и эрговалинина).

Концентрацию лолитрема В рассчитывают по формуле: $y=3,2 \cdot 10^6 \cdot x+4486,4 \cdot 10^6$, где

y – концентрация лолитрема В в образце, в мкг/г (сухого веса семян образца).

$3,2 \cdot 10^6$ и $4486,4 \cdot 10^6$ – стандартные коэффициенты, устанавливаемые экспериментально.

x – площадь пика лолитрема В анализируемого образца.

Концентрацию N-ацетиллолина в образцах семян овсяницы луговой рассчитывают формуле: $y=2214,5 \cdot 10^6 \cdot x + 116,5 \cdot 10^6$, где

y – концентрация N-ацетиллолина в образце, в мкг/г (сухого веса семян образца).

$2214,5 \cdot 10^6$ и $116,5 \cdot 10^6$ – стандартные коэффициенты, устанавливаемые экспериментально.

x – площадь пика N-ацетиллолина анализируемого образца (рис.9).

Время выхода алкалоидов при хроматографии образцов определяется по соответствующим стандартам. При анализе содержания алкалоидов необходимо учитывать следующее. Предельно допустимый уровень (ПДУ) для эрговалина и лолитрема В – 1,8–2,0 мкг/г, т. е. концентрации превышающие эти значения токсичны для травоядных животных. Содержание же лоллина считается значимым, если оно превышает 0,6 мкг/г, т.к. эта концентрация обеспечивает надежную защиту растений-хозяев от насекомых-вредителей [60].

Идентификация симбиотических грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* в образцах овсяницы луговой из коллекции ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова.

Исследования грибов-эндофитов проводили на образцах овсяницы луговой из коллекции отдела генетических ресурсов многолетних кормовых культур ВНИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова (ВИР). Анализировали семена 270 образцов, 214 из которых были представлены образцами разных лет репродукции Павловской опытной станции (ПОС) ВИР, а 56 – оригинальными образцами, собранными экспедициями ВИР в разных регионах России и мира. Мицелий гриба-эндофита был найден в семенах 53 образцов, что составило 20% от общего числа изученных образцов [6-13,65].

Уровень “эндофитной” инфекции у изученных образцов (процент семян в образце, содержащих мицелий гриба) овсяницы луговой варьировал от 2% до 100%. По этому показателю E+ образцы разделили на три группы (рис.10), что соответствует распределению образцов по уровню «инфицированности», приведенному в ряде публикаций [6-13,21,24,35,65]:

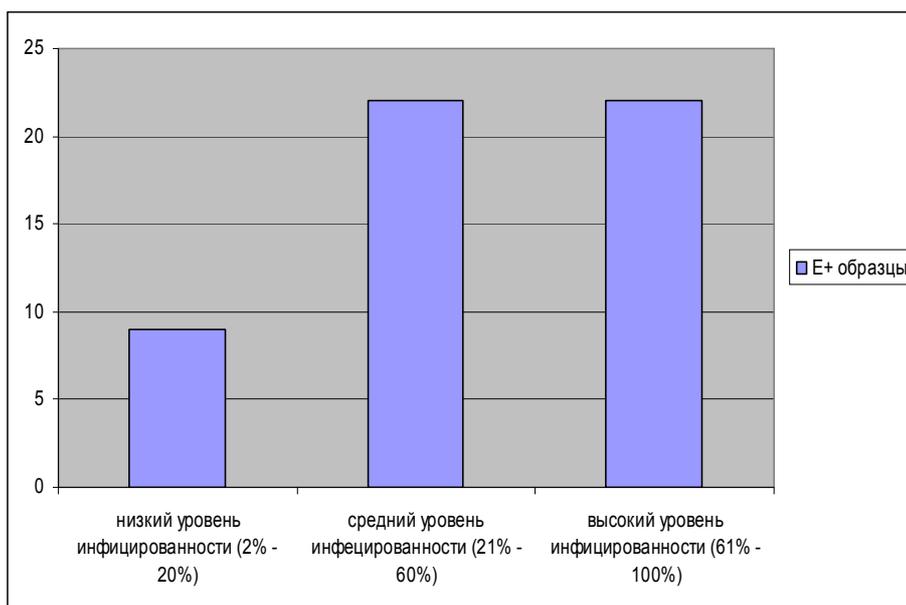


Рис.10 Распределение эндофитсодержащих образцов овсяницы луговой по уровню инфицированности.

- группа с низкими показателями «инфицированности» (2% – 20%);
- группа со средними показателями «инфицированности» (21% – 60%);
- группа с высокими показателями «инфицированности» (61% – 100%).

Группа образцов с низким уровнем «инфицированности» состояла из девяти E+ образцов. Группы со средним уровнем «инфицированности» и с высоким уровнем «инфицированности» содержали по двадцать два E+ образца.

Анализ распределения E+ образцов по природным зонам показал, что большинство (78%) происходило из таёжной, лесной и лесостепной зон (рис.11). За исключением одного, все E+ образцы произрастали в природных зонах с умеренным климатом (рис.11).

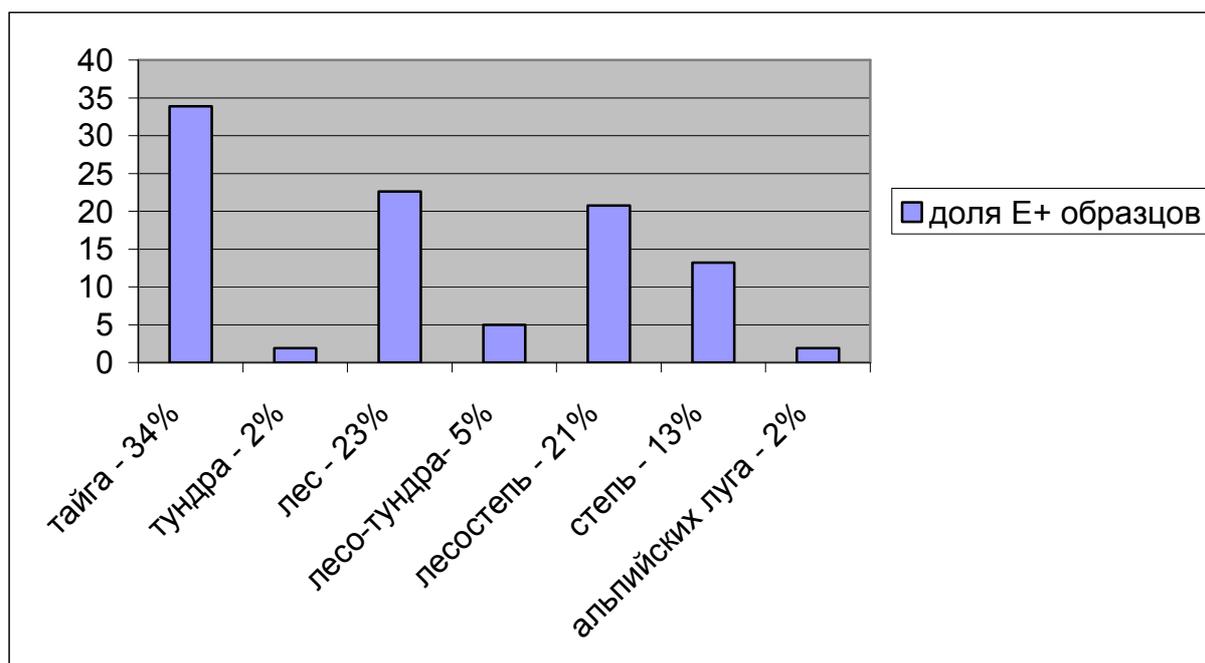


Рис.11. Распределение E+ образцов овсяницы луговой по природным зонам.

Анализ содержания и состава алкалоидов у E+ образцов овсяницы луговой коллекции ВИР показал, что в семенах этих образцов в значительных количествах содержался только лолин – алкалоид, наиболее характерный для *N. uncinatum* [6-13,16,60,65]. В семенах образцов, не содержащих эндофитов (E-), лоллина обнаружено не было. Концентрация других алкалоидов лолитрема В и эрговалина у E+ образцов была менее 0,50мкг/г и 0,70мкг/г соответственно, что гораздо ниже порогового уровня токсичности для травоядных животных – 1,80-2,00мкг/г [6-13,16,60,65].

Содержание лоллина в E+ образцах овсяницы коллекции ВИР варьировало от 0,11мкг до 2,32мкг на один грамм сухой массы семян. При этом количество алкалоида не зависело от уровня «инфицированности» образца грибом-эндофитом.

Влияние процесса репродукции и условий хранения образцов овсяницы луговой коллекции ВИР на сохранение жизнеспособности мицелия грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* .

Из литературы известно, что условия хранения семян сказываются на жизнеспособности мицелия грибов-эндофитов рода *Neotyphodium* [6-13,23,24,65]. Для того, чтобы оценить как повлияли условия хранения образцов овсяницы луговой на жизнеспособность гриба-эндофита, были изучены 10 оригинальных длительно хранившихся образцов овсяницы, в семенах которых был найден мицелий *N. uncinatum* и 10 этих же образцов, репродуцированных на ПОС ВИР в 2000 г. (таблица 1).

Таблица 1. Уровень инфицированности (в %) оригинальных образцов овсяницы луговой и их репродукций (ПОС).

№ по каталогу	Дикорастущие или культурные виды	Происхождение	Уровень "инфицированности" (%)	
			Оригинальные образцы	Репродуцированные образцы
1	2	3	4	5
27872	Дотнува-1	Литва	80	0
31747	дикорастущий	Россия	96	0
36204	Приангарская	-«-«-	90	0
37107	дикорастущий	-«-«-	100	96
37112	-«-«-	-«-«-	96	0
40884	Кубанская-2	-«-«-	60	38
41547	дикорастущая	-«-«-	100	0
39144	Пензенская-1	-«-«-	86	0
39398	дикорастущий	-«-«-	100	0
40255	Симлинская	-«-«-	100	0

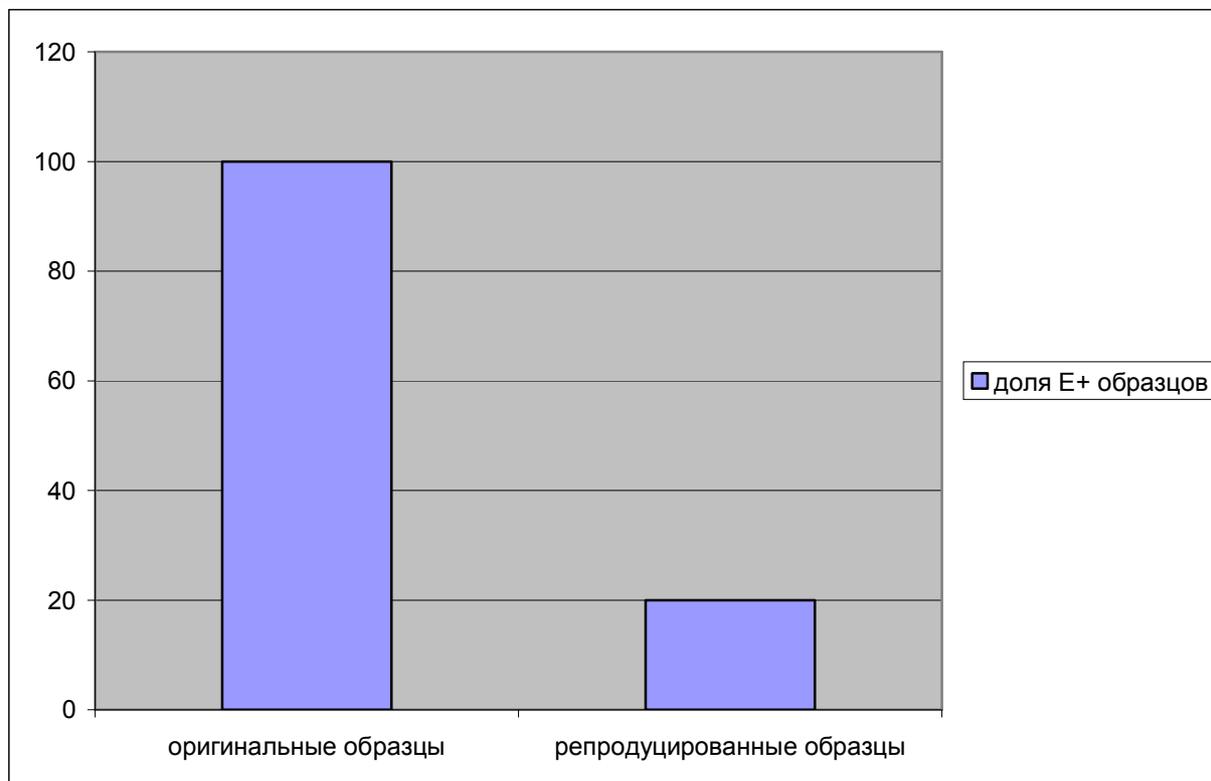


Рис.12. Изменение показателей «инфицированности» E+ образцов овсяницы луговой после репродукции.

В результате установлено, что из десяти исходно «инфицированных» и хранившихся в коллекции образцов мицелий сохранился только в двух. Полученные результаты можно объяснить тем, что на жизнеспособность грибов-эндофитов существенно (в данном случае – негативно) повлияли условия хранения семян [6-13,21,65]. Известно, что для поддержания жизнеспособности мицелия грибов-эндофитов в семенах необходимо соблюдение ряда условий хранения, в частности влажность не должна превышать 6% [24]. При несоблюдении этих условий мицелий грибов-эндофитов может потерять свою жизнеспособность уже через 6 месяцев. При оптимальных условиях мицелий может оставаться жизнеспособным гораздо дольше [21,24]. Таким образом, результаты нашего эксперимента подтверждают вывод о том, что при несоблюдении условий хранения мицелий гриба-эндофита теряет свою жизнеспособность и доля E+ образцов может сокращаться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведены основные сведения о грибах-эндофитах рода *Neotyphodium*: об их распространении и локализации в злаковых травах (на примере овсяницы луговой из коллекции ВИР им. Н.И.Вавилова), о методах их выявления и идентификации, включая методы анализа продуктов жизнедеятельности грибов – алкалоидов. Все сказанное свидетельствует в пользу актуальности и целесообразности изучения имеющегося в России генофонда (исходного и селекционного материала) многолетних злаковых трав в аспекте их симбиотических отношений с грибами-эндофитами в связи с перспективами более широкого использования этого феномена в отечественной селекции. Симбиотическая селекция, направленная на использование потенциала микробно-растительных взаимодействий, очевидно, должна осуществляться в направлении поиска оптимальных сочетаний генотипов гриба и растения хозяина [4,6-13,65]. При этом для идентификации и характеристики таких генотипов должен быть применен весь комплекс методов: от классических – до молекулярных.

Литература:

1. Выскребенцева Э.И., Шугаев А.Г., Алексидзе Г.Я. Физиология растений. //Москва – 1990 – Т. 37 – Вып. 5 – с. 318
2. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н., Тихонович И.А. Генетика развития растения.//Санкт-Петербург – Наука – 2000 – с.344-387.
3. Мюллер.Э.Ф., Леффлер В.М. Микология.// Москва – Мир – 1995 – сс.148-151, 192-193, 216-257.
4. Проворов Н.А. Тихонович И.А. Эколого-генетические принципы селекции растений на повышение эффективности взаимодействия с микроорганизмами. //Сельскохозяйственная биология – 2003 – №3 – с.11-25.
5. Цвелев Н. Н. Злаки СССР.//Ленинград – Наука – 1976 – с.788.
6. Шеленга Т.В. Анализ эндофитной инфекции и алкалоидов в связи с проявлением хозяйственно-ценных признаков у овсяницы.//Бюл. ВИР.– СПб.– 2002–Вып. 241–с.32-34.

7. Шеленга Т.В., Конарев А.В., Дзюбенко Н.И. Роль эндофитных грибов в селекции кормовых злаковых трав.//Тезисы международной научно-практической конференции–СПб.– 2001.–с.480-481.
8. Шеленга Т.В., Конарев А.В., Дзюбенко Н.И.Влияние качества кормов на качество молочной продукции. //Тезисы международной научно-практической конференции –СПб.– 2002.–с.38.
9. Шеленга Т.В.Роль эндофитных грибов в селекции кормовых злаковых культур.//Материалы 11 съезда Русского ботанического общества. – Новосибирск.– 2003.–с.71-72.
10. Шеленга Т.В., Конарев А.В., Дзюбенко Н.И. Грибы рода *Neotyphodium* –эндофиты овсяницы луговой.//Тезисы VIII молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге–СПб.– 2004.– с.75-76.
11. Шеленга Т. В., Конарев А. В., Дзюбенко Н. И., Малышев Л. Л.и Такаи Т. Характеристика образцов овсяницы луговой из коллекции ВНИИ растениеводства имени Н.И.Вавилова, содержащих симбиотические грибы-эндофиты рода *Neotyphodium*.//Аграрная Россия, № 2, 2005 – с.36-42.
12. Шеленга Т.В. Характеристика эндофитсодержащих образцов овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) из коллекции ВИР им. Н. И. Вавилова. Автореферат дисс. на соиск. уч. степ. Канд. биол. наук. СПб, ВИР, 2005.
13. Шеленга Т. В., Конарев А. В., Дзюбенко Н. И., Малышев Л.Л. и Такаи. Т. Изучение образцов овсяницы луговой из коллекции ВНИИ растениеводства имени Н.И.Вавилова, содержащих симбиотические грибы-эндофиты рода *Neotyphodium*.// Доклады РАСХН, № 1, 2006. – с.20-22.
14. Aldrich C.G., Rhodes M.T., Miner J.L., Kerley M.S. The effects of endophyte-infected Tall Fescue consumption and use of a dopamine antagonistic intake, digestibility, body temperature, and blood constituents in sheep.//J.Anim.Sci. – 1993 – 71 – pp.158-163.
15. Blankenship J.D., Spiering M.J., Wilkinson H.H., Fannin F.F., Bush L.P., Schardl C.L. Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media.// Phytochemistry – 2001Oct – 58(3) – pp.395-401.
16. Berde B.L., Schild H.O. Ergot Alkaloids and related compounds.//Handbook of experimental Pharmacology – New York – 1978 – Vol.49 – pp.47-54.
17. Bray E.A. Molecular responses to water deficit.//Plant physiology – 1993 – v.103 – pp.1035-1040.
18. Bultman T.L., White F.L., Bowdish T.I., Welch A.M., Johnston J.K. Mutalistic transfer of *Epichloe* spermatia by Phobia flies.//Mycoiogia - V.87 – 1995 – pp.182-189.
19. Bush L.P., Wilkinson H.H., Schardl C.L. Bioprotective Alkaloids of Grass Fungal Endophyte Symbioses.//Plant Physiol. – 114 – 1997 – pp.1-7.
20. Casler M.D., Petersonb P.R., Hoffmanc L.D, Ehlkeb N.J, Brummerd E.C., Hansene J.L., Mlynarekf M.J., Sulcg M.R., Henningh J.C., Undersandera D.J., Pittsi P.G., Bilkeyj P.C., Rose-Fricker C.A. Natural Selection for Survival Improves Freezing Tolerance, Forage Yield, and Persistence of *Festucolium*.//Crop Science – 2002 – 42 – pp.1421-1426.

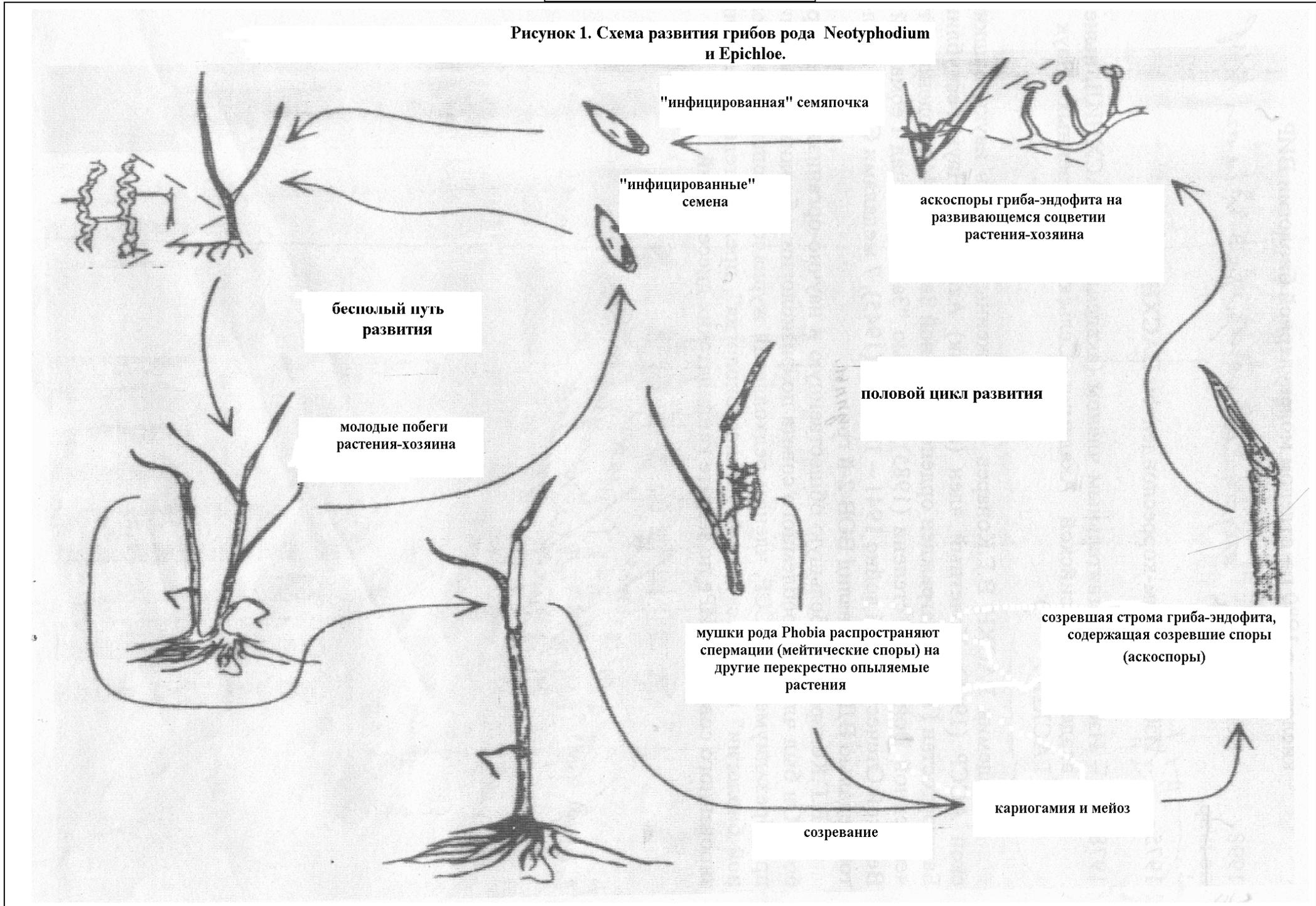
21. Christensen M.J. Host specificity of grass endophytes.//Proceeding of the 1th International Symposium of the Mycological Society of Japan. –Tsukuba–2000 – pp.41-44.
22. Christensen M.J., Easton H.S., Simpson W.R., Tapper B.A. Occurrence of the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* in leaf blade of tall fescue and implications for stock health.//N.Z. Journal of agricultural research – 1998 – v.41 – pp.595-602.
23. Christensen M.J., Hopcroft D.H., Rowan D.D, Tapper B.A. Conidial morphology, alkaloid production, and host specificity of *Acremonium uncinatum*, an endophyte of *Festuca pratensis*.//Proceeding of the second Int. Symp. on *Acremonium*/Grass Interaction – 1993 – pp.39-41.
24. Christensen M.J., Latch G.C. Variation among isolates of *Acremonium* endophytes (*A.coenophialum* and possibly *A.typhinum*) from tall fescue (*F.arundinaceae*).//Mycol.Res. – v.95(9) – 1991 – pp.1123-1126.
25. Dahlman D.L., Eichenseer H., Siegel M.R. Chemical perspectives on endophyte-grass interactions and their implications to insect herbivory.//Microbial Mediation of Plant- Herivore Interactions. – New York – 1991 – pp.227-252.
26. Gallanger R.T., Hawkes A.D., Stewart J.M. Rapid Determination of the neurotoxin Lolitrem B in perennial ryegrass by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence detection.//J. of Chromatography. – v.32 – 1984 – pp.217-226.
27. Gams W.A. Cephalosporium – like Hyphomycetes.//Stuttgart – 1971 – p.110-114.
28. Garner G.B., Rottinghaus G.E., Cornell C.N., Testereci H.Y. Chemistry of compounds associated with endophyte/grass interaction: Ergovaline- and ergopeptine-related alkaloids.//J.Agric. Ecosyst. & Environ. – v.44 – 1993 – pp.65
29. Gwinn K.D., Collins-Shepard M.H., Reddick B.B. Tissue Print- Immunoblot an Accurate Method for the Detection of *Acremonium coenophialum* in Tall Fescue.//J.Phytopathology – v. 81 – N-7 – 1991 – pp.747-748.
30. Gwinn K.D., Friborg H.A., Waller J.C. Changes in *Neotyphodium coenophialum* infestations levels in Tall Fescue pastures due to different grazing pressures.//J.Crop Sci. – v.38 – 1998 – pp.201-204.
31. Gwinn K.D., Gavin A.M. Relationship between endophyte infection level of tall festuca lots an *Rhizoctinia zae* seedling disease.//J.Plant Dis – v.76 – 1992 – pp.911-914.
32. Hill N. S., Rottinghaus G.E., Agee C.S., Schultz L. M. Simplified Sample Preparation for HPLS Analysis of Ergovaline in Tall Fescue.//J.Crop Science – v. 33 – 1993 – pp.331-333.
33. Hill N.S., Studemann J.A., Ware G.O., Petersen J.C. Pasture Sampling Requirement for Near Infrared Reflectance Spectroscopy Estimates of Botanical Composition.//J.Crop Sci. – v.29 – 1989 – pp.774-777.
34. Hoveland C.S., Schmidt S.P., King C.C. and ot. Steer performance and association of *Acremonium coenophialum* fungal endophyte on tall fescue pasture.//Agronomy journal – v.75 – 1983 – pp.821-824.
35. Joost R.E. *Acremonium* in Fescue and Ryegrass: Boon or Bane? A Review.// J. Anim. Sci. – 1995 – v.73 – pp.881-888.
36. Joost R.E., Rottinghaus G.E. Quantification of Ergovaline in Tall Fescue by near Infrared Reflectance

- Spectroscopy.//J.Crop Science - v. 37 – 1997 – pp.281-284.
37. Justus M.D., White L.K., Hartman T.O. Levels and tissue distribution of loline alkaloids in endophyte-infected *Festuca pratensis*.//J.Phytochemistry – v.44 – 1997 – pp.151-57.
 38. Karnovsky M.J. A formaldehyde-glyteraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.//J.Cellular Biol. – v.27 – 1965 – pp.137-138.
 39. Kieckhefer W.E., Petroski R.E., Powell R.J. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity.//J. Entomol. Sci. – 26 – 1991 – pp.122-129.
 40. Koga H., Kimigafukuro T., Tsukiboshi T., Uematsu T. Incidence of endophytic fungi in perennial ryegrass in Japan.//J. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. – v.59 – 1993 – pp.180-184.
 41. Latch G.C., Christensen M.J. Artificial infection of grass with endophytes.//J. Am. Appl. Biol. – v.107 – 1985 – pp.17-24.
 42. Leuchtman A.B., Schardl L.C., Siegel M.R. Sexual compatibility and taxonomy of new species of *Epichloe* symbiotic with fine fescue grasses.//J.Mycologia – v.86(6) – 1994 – pp.802-812.
 43. Lewis G.C. Significance of endophyte toxicosis and current practices in dealing with the problem in Europe.//Plenum press «*Neotyphodium*/Grass interactions» – New York – 1997 – pp.377-381.
 44. Lyons P.C., Plattner R.D., Bacon C.W. Occurrence of Peptide and Clavine Ergot Alkaloids in Tall Fescue Grass.//J.Sci. – Vol.232 – 1986 – pp.487-489.
 45. Moubarak Ali S., Piper Ed.L., West, C.P., Johnson Z.J. Interaction of Purified Ergovaline from Endophyte-Infected Tall Fescue with Synaptosomal ATPase Enzyme System//J.Agric. Food Chem. – v.41 – 1993 – pp.407-410.
 46. 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. – v.45 – 1997 – pp.199-204.
 47. Nemoto N., Myazawa S., Kume H.A. Observation method of freezing dry to fungi.//J. Technic. Res. Conf. Med. and Biol. Electron. Microscop. – v.6 – 1992 – pp.78-79.
 48. Panaccione D.G., Johnson R.D., Wang J., and other. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte.//J.Plant Biology – v.98(22) – 2001 – pp.12820-12825.
 49. Petroski R.J., Powell R.J. Preparative separation of complex alkaloid mixture by high-speed countercurrent chromatography.//J. Am. Chem. Soc. Symp. Series. – 1991 – p.426-449.
 50. Popay A.G., Townsend R.G., Fletcher L.R. The effect of endophyte (*Neotyphodium uncinatum*) in meadow fescue on grub larvae.//Plenum press. 56th conference proceeding of New Zealand Plant protection society incorporated – 2003 – pp.123-128.
 51. Porter J.K. Analysis of endophyte toxins: Fescue and other grasses toxic to livestock.//J. Anim. Sci. – 73 – 1995 – pp.871-880.
 52. Porter J.K., Stuedemann J.A., Thompson F.N., Lipham L.B. Neuroendocrine measurements in steers

- grazed on endophyte-infected fescue.//J.Anim.Sci. –v.68 – 1990 – pp.3285-3292.
53. Read J.C., Camp B.J. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in fall fescue on animal performance, toxicity and stand maintenance.//Agron. J. – v.78 – 1986 – pp.848-850.
 54. Rex.T., Gallagner A.D., Hawkes J. M. Rapid Determination of the Neurotoxin Lolitrem B in Perennial Ryegrass by High- Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.//Journal of Chromatography – v.321 – 1985 – pp.217-226.
 55. Roberts C.A., Joost R.E., Rottinghaus G.E. Quantification of Ergovaline in Tall Fescue by near infrared reflectance spectroscopy.//J.Crop Sci. – v.37 – 1997 – pp.281-284.
 56. Roberts C.A., Marek S.M., Wang Lei, Karr A.L. Determination of Chitinase Activity in T.F. by near Infrared Reflectance Spectroscopy.//J.Crop Science – v.34 –1994 – pp.1070-1073.
 57. Ronald D.P., Yates S.G., Porter J.K. Quadruple mass Spectrometry/Mass Spectrometry of Ergot Cycle Alkaloids.//J.Agric. Food Chem. – v.31 – 1983 – pp.785-789.
 58. Rottinghaus G.E., Garner G.B., Cornell C.N., Ellis J.L. HPLC Method for Quantization Ergovaline in Endophyte-Infested Tall Fescue: Seasonal Variation of Ergovaline Levels in Stems with Leaf Sheaths, Leaf Blades and Seed Heads.//J. Agric. Food Chem. – v.39 – 1991 – pp.112-115.
 59. Saha D.C., Jacson M.A., Johnson J.M. A Rapid Staining Method for Detection of Endophytic Fungi in Turf and Forage Grasses.//J.Phytopathology –v. 78(2) – 1988 – pp.237-239.
 60. Schardl C.L., Phillips T.D. Protective grass endophytes & plant disease.//J.Phytopathology – v.81(5) – 1997 – pp.430-438.
 61. Schoberlein W., Eggestein St., Pfannmoller M. Effects of endophyte - infected varieties of *Festuca pratensis* on seed production.//3rd Intern. Herbage. Seed Conference, Germany, Halle – 1995 – pp.438-442.
 62. Scott B., Young C., Mcmillan L. Molecular biology of *Ephloe* endophyte toxin biosynthesis.//Grassland Reseach and practice series – 1997 – pp.77-102.
 63. Shelby R.A. Improved Method of Analysis for Ergovaline in Tall Fescue by High-Performance Liquid Chromatography. //J.Agric. Food Chem. – v.45 – 1997 – pp.1797-1800.
 64. Shelby R. A., Dalrymple L.W. Incidence and distribution of Tall Fescue endophyte in the US.//J.Plant Disease - v.71(9) – 1987 – pp.783-786.
 65. Shelenga T.V.,KonarevA.V.,DzybenkoN.I. Analysis of endophyte infection & alkaloid production in the seeds of meadow fescue & tall fescue.//Material of 11-th International congress on Molecular Plant-Microbe Interactions.– SPb – Russia–2003 – p.7.
 66. Shelly G.Y., Powell R.G. Analysis of Ergopeptine Alkaloids in Endophite-Infected Tall Fescue.//J. Agric. Food Chem. – 1988 – v.36 – pp.337-340.
 67. Shelly G.Y., Plattner R.D., Garner G.B. Detection of Ergopeptine Alkaloids in EI, Toxic KY-31 T.F. by Mass Spectrometry.//J.Agric. Food Chem. – v.33 – 1985 – pp.719-722.
 68. Sosic H.G. Biosynthesis and physiology of ergot alkaloids.//J. Fungal Biotechnology – 1992 – pp.123-155

69. TePaske M.R., Powell R.G. Analyses of endophyte-infected grasses for the presence of loline-type and ergot-type alkaloids.//J.Agric.Food Chem. – v.41 – 1993 – pp.2299-2303.
70. TePaske M.R., Powell R.G., Petroski R.J. Quantitative analyses of bovine urine and blood plasma for loline alkaloids.//J.Agric.Food Chem. – v.41 – 1993 – pp.231-234.
71. West C.P., Izevor E., Oosterhuis D.M.,Robbins R.T. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue.//J.Plant and Soil – v.112 – 1988 – pp.3-6.
72. White J.F., Endophyte-host associations in grasses. XVII. Ecological and physiological features characterizing *Epichloe typhina* and some anamorphic varieties in England.//J.Mycologia – v.84(3) – 1997 – pp.431-441.
73. White J.F., Endophyte-host associations in grasses. XVII. Ecological and physiological features characterizing *Epichloe typhina* and some anamorphic varieties in England.//J.Mycologia – v.84(3) – 1997 – pp.431-441.
74. Wilkinson H., Scharld C. The evolution of mutualism in grass-endophyte associations.//Plenum press– New York – 1997 - pp.13-23.
75. Wilson A.D., Clement S.L., Survey and Detection of Endophytic Fungi in *Lolium* Germ Plasm by Direct Staining and Aphid Assays.//J.Plant Disease –v.2– 1991 – pp.169-173.
76. Yates L., Breen J. Assay alkaloids production of *Acremonium* endophyte.// Annu. Rev. J. Entomol. J. Phytopath. – 1990 – v. 39 – pp.401-423.
77. Yates S.G., Petroski R.J., Powell R.G. Analysis alkaloids in endophyte-infected tall fescue by capillary gas chromatography.//J. Agric. Food Chem. – v.38 – 1990 - p182.

Рисунок 1. Схема развития грибов рода *Neotyphodium* и *Eriophloe*.



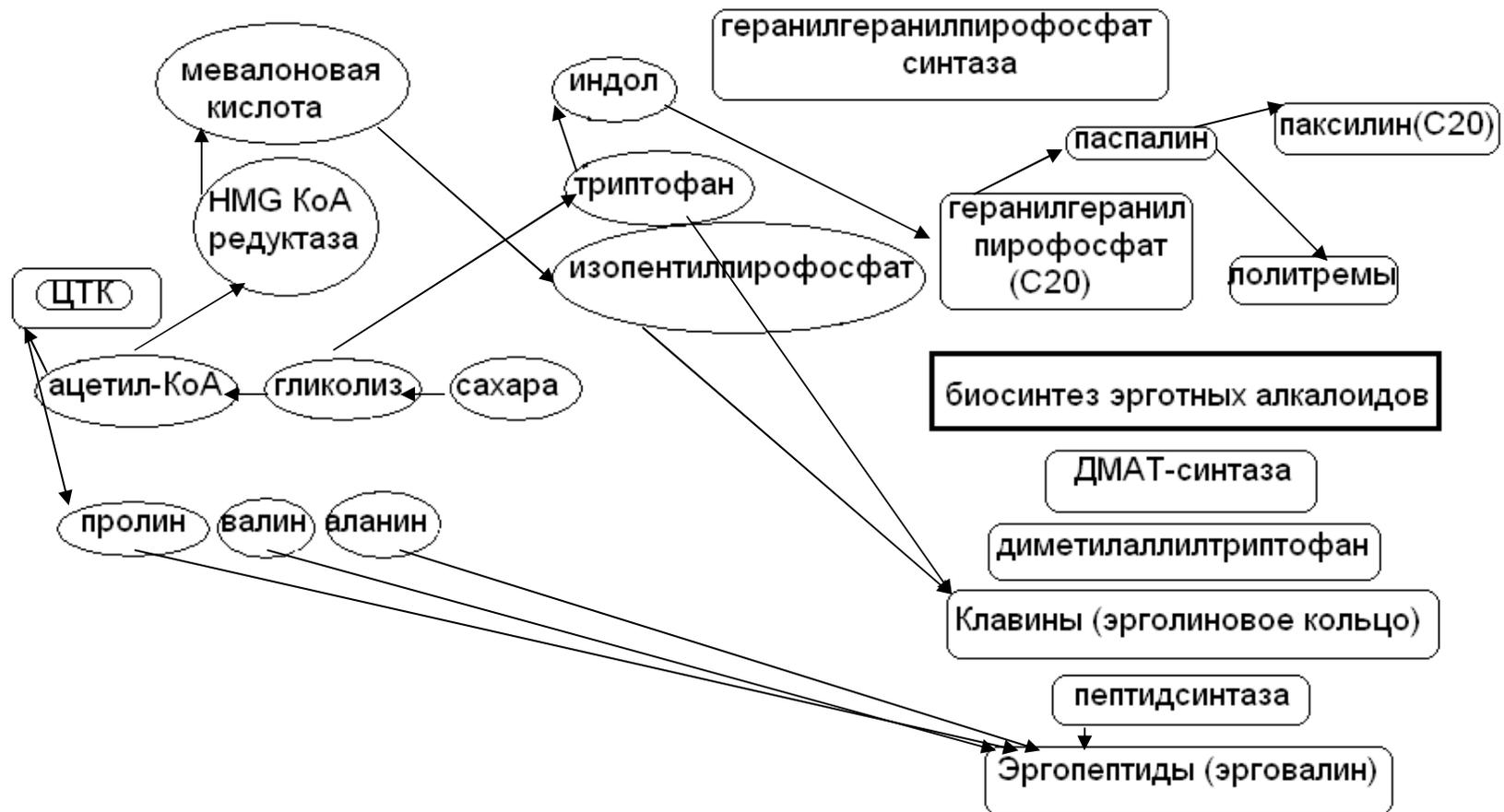
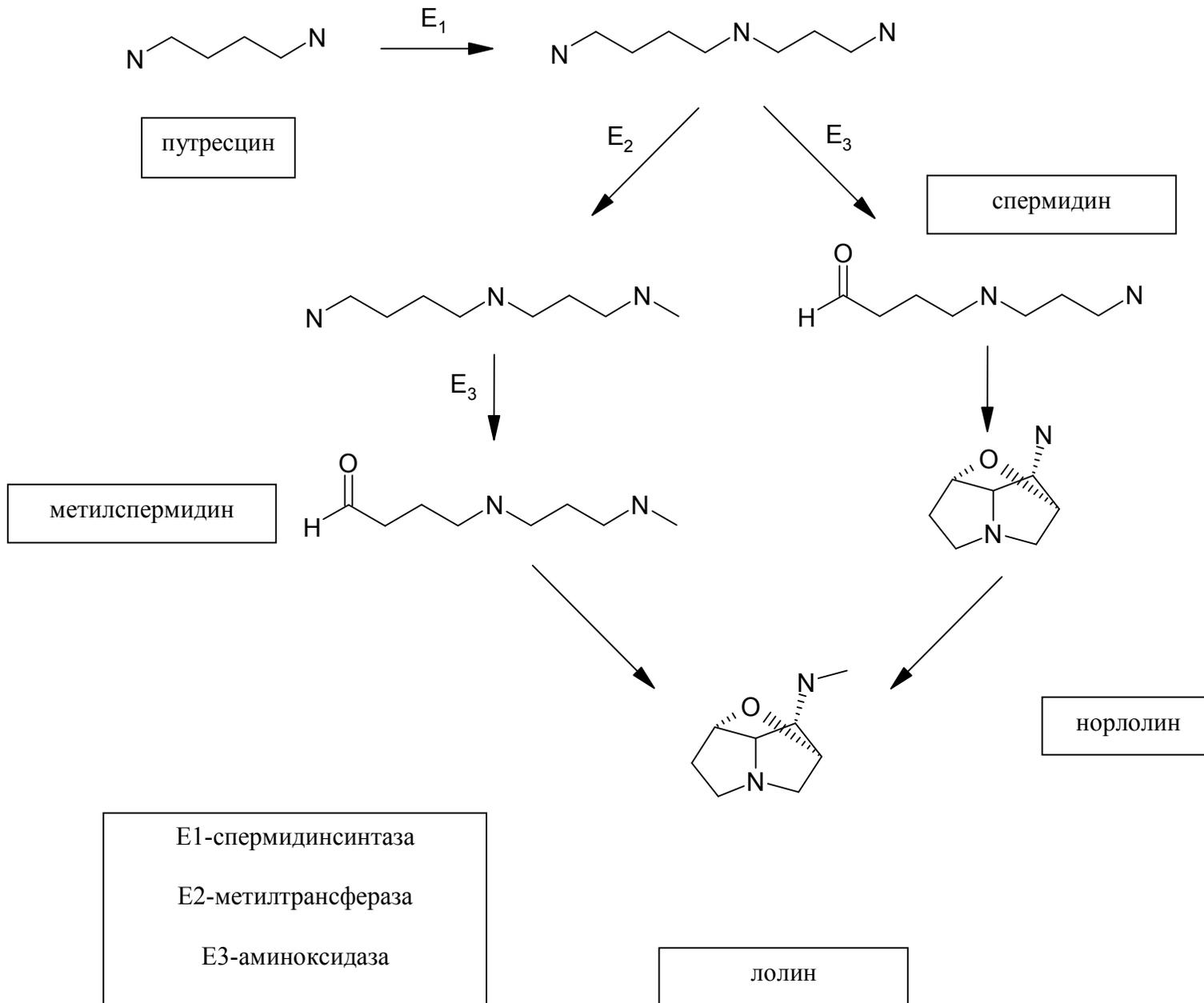


Рисунок 2. Схема синтеза алкалоидов грибов-эндофитов.

Рисунок 3. Основные этапы синтеза лолинов.



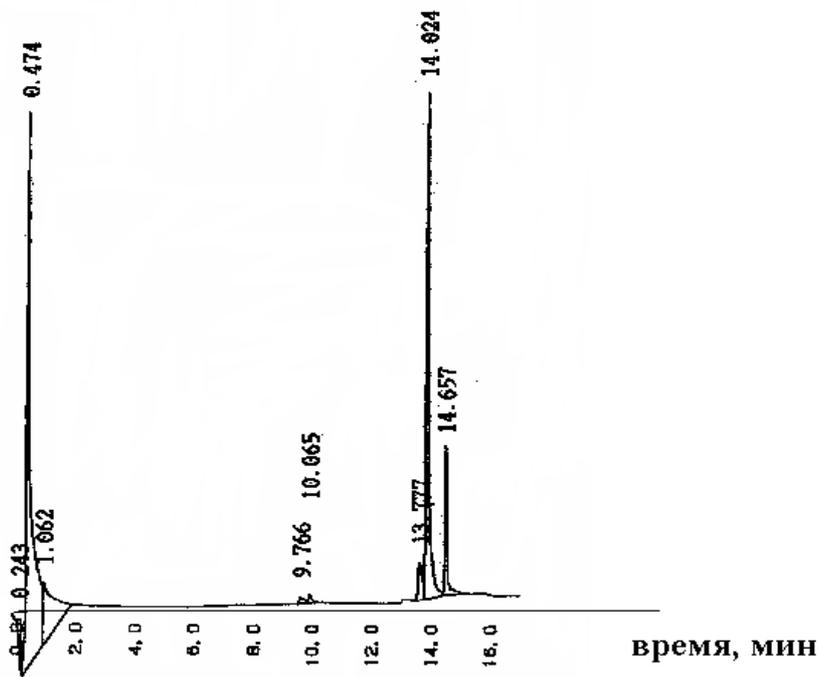


Рис. 9. Хроматограмма алкалоида лоллина, полученная при помощи ВЭЖХ.