

ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 582.28 : 581.557

© Е. Ю. Благовещенская, Н. Ю. Костенко, Н. В. Разгуляева

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛИВА НА ЗАРАЖЕННОСТЬ ОВСЯНИЦЫ ЛУГОВОЙ (*FESTUCA PRATENSIS*) ЭНДОФИТНЫМ ГРИБОМ *NEOTYPHODIUM UNCINATUM*

BLAGOVESHCHENSKAYA E. Yu., KOSTENKO N. Yu., RAZGULIAEVA N. V.
THE INFLUENCE OF WATERING CONDITIONS ON ENDOPHYTE INFECTION LEVEL
OF MEADOW FESCUE (*FESTUCA PRATENSIS*) BY *NEOTYPHODIUM UNCINATUM*

Эндофитные грибы злаков — очень интересная группа, имеющая большое теоретическое и практическое значение. Преимущественно это анаморфные грибы рода *Neotyphodium*, не образующие полового спороношения. Тем не менее показано их близкое родство с трибой *Balansiae* семейства *Clavicipitaceae* (отдел *Ascomycota*, порядок *Hypocreales*). Некоторые из них имеют телеоморфные стадии, относящиеся к роду *Epichloë* (Schardl, Moon, 2003). Мицелий эндофитных грибов локализован в надземной части растений, где он распространяется по межклетникам различных органов.

Растение обеспечивает гриб питанием и стабильной средой обитания. В свою очередь алкалоиды, выделяемые грибом, защищают растение как от насекомых-вредителей, так, частично, и от травоядных млекопитающих (Richmond, Shetlar, 1999; Maejima et al., 2000; Vazquez de Aldana et al., 2001). Показано, что эндофитный гриб может увеличивать устойчивость растения к болезням и неблагоприятным условиям (Malinowski et al., 1997), хотя существует ряд работ, в которых его влияние на развитие растения-хозяина не отмечено или оно отрицательное (Hesse et al., 1999; Faeth, 2002). Распространение эндофита происходит только вертикально, вместе с семенами растения-хозяина (Philipson, Christey, 1986).

Зараженность полей и пастбищ эндофитными грибами может меняться: повышаться в условиях сухой и жаркой погоды (Saiga et al., 2001), а также при усиленной пастбищной нагрузке (Gwinn et al., 1998). Изменение уровня зараженности в ряде случаев может происходить очень быстро (Funk et al., 1983; по: Clay, 1998). Так как распространение эндофитных грибов происходит вместе с растением-хозяином, то изменение зараженности объясняется конкурентным взаимодействием зараженных и незараженных растений (Clay, 1998; Gwinn et al., 1998). Если условия среды благоприятны для развития зараженных растений, то происходит вегетативное размножение, тогда как незараженные растения не выдерживают конкуренции и элиминируются. В результате доля зараженных растений в природных условиях увеличивается.

Несмотря на то что эндофитные грибы в настоящее время привлекают внимание исследователей, остается много невыясненных вопросов. Отсутствуют точные данные о распространении эндофитного мицелия в растении-хозяине, в то время как это очень важно для изучения динамики зараженности полей и пастбищ. Данные о влиянии условий увлажнения на зараженные и незараженные растения противоречивы (Arachevaleta et al., 1989; Malinowski et al., 1997, 1999; Hesse et al., 1999).

Целью настоящей работы было исследование влияния условий полива на зараженность отдельных растений овсяницы луговой эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на базе Лаборатории иммунитета Института кормов (ГНУ ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса). Для опыта использовали семена овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) сорта ВИК 5 с искусственно зараженных эндофитным грибом *N. uncinatum* растений, растущих в открытом грунте (Благовещенская и др., 2005). В качестве контроля были взяты незараженные семена того же сорта.

Анализировали зараженность 40 семян, которые обрабатывали по методике, предложенной в работе Г. К. М. Лача с соавторами (Latch et al., 1987), с небольшими изменениями. Семена выдерживали в 5%-м водном растворе гидроксида натрия (NaOH) в течение 14 ч. Затем их тщательно промывали водопроводной водой для удаления щелочи и помещали в фарфоровую кастрюлю с красителем следующего состава: 0.325 г анилинового синего, 100 мл воды, 50 мл 85%-й молочной кислоты. Семена кипятили в красителе 3—5 мин, после этого их помещали на предметное стекло, расплющивали покровным и микроскопировали. О зараженности семян эндофитом судили по наличию окрашенных гиф среди алейроновых клеток. Для эксперимента использовали образец со 100%-й зараженностью семян.

Все семена поверхность стерилизовали и поместили в стерильные чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу. Поверхностную стерилизацию проводили концентрированной серной кислотой и препаратом доместос (Благовещенская и др., 2005). Чашки оставили при естественном освещении и комнатной температуре (23 °С). Через неделю полученные стерильные проростки пересадили в сосуды с субстратом, по одному растению на стакан (в семи случаях — по два растения в стаканчик). В эксперименте использовали субстрат из смеси торфа и песка в соотношении 1 : 1, пропаренной в течение 1 ч. Субстрат набивали в стандартные пластиковые стаканчики объемом 200 мл, по краям дна которых были сделаны по два надреза.

Растения выращивали при комнатной температуре и нерегулярном световом дне (от 7 до 14 ч). По условиям полива опыт был проведен в двух вариантах. Примерно половину растений выращивали в засушливых условиях и поливали только при достижении почвой влажности завядания (когда листья растений теряли тургор). Другую половину растений выращивали во влажных условиях и поливали с такой частотой, чтобы в поддоне постоянно присутствовала вода, т. е. поддерживалась влажность наименьшей влагоемкости. При постановке эксперимента исходили из рекомендаций А. В. Соколова (1967) по проведению вегетационных опытов.

Первый анализ растений проводили в мае 2006 г. в фазу кушения. Растения срезали на высоте 1.5—2.0 см от почвы, взвешивали и изучали зараженность каждого побега каждого растения. Для этого использовали срывы адаксиального эпидермиса влагалища листа. Для получения срыва эпидермиса (Наумов, 1937) лезвием бритвы делали небольшой надрез, затем пинцетом отделяли фрагмент эпидермиса, который помещали в каплю красителя (100 мл 0.1%-го водного раствора анилинового синего и 50 мл 80%-й молочной кислоты) на предметное стекло. Для ускорения окрашивания препарат аккуратно прогревали в пламени горелки или спиртовки в течение 10 с. При исследовании большого количества образцов готовили партии по 100—200 препаратов, которые оставляли для окрашивания на ночь. Это позволяло существенно уменьшить временные затраты по обработке материала.

После окрашивания препараты микроскопировали при увеличении 100×. В случае присутствия эндофитного мицелия были заметны темно-синие гифы среди бледно-голубых клеток эпидермиса.

Повторный анализ проводили в июне (на пятый месяц) после отрастания новых побегов (массу растений не определяли).

Результаты и обсуждение

Все контрольные растения были свободны от мицелия, их заражения не происходило. При анализе растений, выращенных в одном стаканчике, были обнаружены все три возможных сочетания: два зараженных растения, зараженное и незараженное, два незараженных. Следовательно, можно предположить, что заражения через почву не происходило.

Среди анализируемых растений были и зараженные растения, и растения, в которых эндофитный мицелий обнаружен не был. В разных вариантах опыта доля растений без мицелия оказалась значимо различной (табл. 1). Для сравнения долей использовали критерий Стьюдента.

Кроме того, оказалось, что у небольшого числа растений (24 штуки) были как зараженные, так и незараженные побеги. Доля таких растений среди общего числа, если учитывать результаты обоих анализов, составляла немногим более 12 %, 17 таких растений (9 % от общего числа проанализированных) обнаружено при первом анализе и 12 (6 %) — при втором (табл. 2).

Особенно интересны случаи, когда в одном из анализов все побеги растения оказываются незараженными. Такие растения могут законным образом попасть в группу незараженных, если руководствоваться только однократным анализом. Так, например, у растений № 19 и 91 в первом анализе было только по одному зараженному побегу, а во втором — ни одного. Растения № 83 и 166 были при первом анализе отнесены к незараженным, а при втором имели 3 зараженных побега из 13 и 4 из 6 соответственно. Растение № 106 при первом анализе имело все зараженные побеги, а при втором — ни одного.

Зараженные растения практически не отличались от незараженных по биомассе и количеству побегов. Влияние на эти показатели оказывали только условия полива (табл. 3). При сильном поливе растения имели биомассу надземной части около 5 г и в среднем по 7 побегов на растение, а при слабом поливе биомасса того же числа побегов составляла около 4 г. При сравнении зараженных и незараженных растений не учитывались те из них, которые имели те и другие побеги.

Ситуация, в которой из зараженных семян иногда вырастают незараженные проростки, достаточно обычна. Традиционно это объясняют тем, что в некоторых семе-

Таблица 1

Влияние условий полива на зараженность растений эндофитом

| Состояние растений | Количество растений | |
|---------------------------|---------------------|---------------|
| | слабый полив | сильный полив |
| Первый анализ | | |
| Зараженные | 56 | 43 |
| Незараженные | 37 | 56 |
| Всего | 93 | 99* |
| Доля незараженных | 0.40 | 0.57 |
| Доверительная вероятность | 0.9805 | |
| Второй анализ | | |
| Зараженные | 55 | 44 |
| Незараженные | 38 | 57 |
| Всего | 93 | 101 |
| Доля незараженных | 0.41 | 0.56 |
| Доверительная вероятность | 0.9619 | |

* Побеги от двух растений при первом анализе не учитывали.

Таблица 2

Результаты анализа побегов опытных растений (выборка)

| Номер растения | Первый анализ | | Второй анализ | |
|----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | всего побегов | из них заражено | всего побегов | из них заражено |
| 19 | 7 | 1 | 9 | 0 |
| 34 | 10 | 9 | 11 | 9 |
| 41 | 4 | 4 | 10 | 9 |
| 49 | 5 | 1 | 11 | 4 |
| 58 | 10 | 10 | 11 | 10 |
| 65 | 6 | 5 | 9 | 8 |
| 69 | 7 | 6 | 7 | 7 |
| 72 | 7 | 6 | 9 | 9 |
| 75 | 6 | 5 | 8 | 8 |
| 82 | 8 | 7 | 12 | 8 |
| 83 | 7 | 0 | 13 | 3 |
| 91 | 4 | 1 | 6 | 0 |
| 92 | 6 | 5 | 8 | 7 |
| 93 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| 106 | 5 | 5 | 5 | 0 |
| 108 | 12 | 12 | 13 | 12 |
| 117 | 7 | 7 | 7 | 6 |
| 121 | 5 | 4 | 5 | 5 |
| 151 | 7 | 6 | 9 | 9 |
| 155 | 7 | 6 | 8 | 8 |
| 166 | 5 | 0 | 6 | 4 |
| 176 | 14 | 6 | 15 | 6 |
| 196 | 10 | 9 | 10 | 10 |
| 208 | 12 | 11 | 12 | 12 |

Примечание. В таблице приведены данные только для растений, имеющих как зараженные, так и незараженные побеги хотя бы в одном из анализов.

нах мицелий был нежизнеспособным, а методика окрашивания не позволяет различать живой и мертвый мицелий (Latch et al., 1987). Однако в нашем эксперименте показано, что в разных вариантах опыта доля растений без мицелия оказалась значимо различной (табл. 1). Таким образом, в более засушливых условиях мы получили боль-

Таблица 3

Биомасса и количество побегов у растений, выращенных в условиях разного полива

| Варианты | Состояние растений | Статистические характеристики | Масса надземной части, г | Количество побегов, штук/растение | Всего растений, штук |
|---------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Слабый полив | Зараженные | Среднее | 3.801 | 6.8 | } 45 |
| | | Стандартное отклонение | 1.373 | 1.8 | |
| | Незараженные | Среднее | 3.805 | 6.4 | } 37 |
| | | Стандартное отклонение | 1.573 | 2.2 | |
| Сильный полив | Зараженные | Среднее | 4.952 | 7.0 | } 37 |
| | | Стандартное отклонение | 2.207 | 2.7 | |
| | Незараженные | Среднее | 5.386 | 6.9 | } 57 |
| | | Стандартное отклонение | 2.439 | 3.2 | |

ше зараженных растений, чем в условиях повышенной влажности. Это говорит о том, что на развитие мицелия в проростке влияют внешние условия и теоретически из одного и того же семени может вырасти как зараженное, так и незараженное растение. Вероятно, подобные изменения могут происходить и со злаками, растущими в открытом грунте. В пользу этого предположения говорит и то, что были обнаружены растения, имеющие зараженные и незараженные побеги, что согласуется с наблюдениями за развитием растений в полевых условиях (Благовещенская и др., 2008). Возможно, что при развитии проростка происходит выбор между двумя вариантами — образованием зараженных или незараженных побегов. При дальнейшем развитии, в зависимости от возникающих факторов, может происходить изменение программы. В таких случаях наличие на проростке зараженных и незараженных побегов является отклонением. Доля таких случаев в природной популяции, вероятно, невелика, поэтому на указанное явление никто не обратил внимание.

Полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что зараженность растений в природных условиях может меняться не в результате конкурентного взаимодействия, а в результате изменения числа зараженных побегов в отдельном растении (Благовещенская и др., 2008).

При изменении внешних условий среды или в ответ на определенный сигнал растения-хозяина развитие мицелия может активизироваться. В злаке начинают образовываться зараженные побеги. При наступлении других условий происходят обратные процессы, вероятно, мицелий сохраняется в зоне роста. Такая модель предполагает более быстрое реагирование на условия окружающей среды и объясняет появление эндофитов на полях, которые в предшествующих исследованиях были отмечены как незараженные.

Хотя условия увлажнения и оказывали значительное влияние на развитие грибного мицелия в растении, видимых преимуществ у зараженных и незараженных растений замечено не было (табл. 3). В условиях более сильного полива растения имели в среднем большую биомассу при сохранении того же числа побегов (доверительная вероятность — 0.9714). Это вполне логичный результат, который не нуждается в дополнительных пояснениях. В такой ситуации различий между зараженными и незараженными растениями не обнаружено.

Наше исследование показывает, что эндофит выступает в данном случае как компонент безразличный для растения-хозяина. Возможно, под влиянием условий ситуация может измениться. В связи с вышесказанным мы предлагаем следующую гипотезу.

Присутствие эндофитного гриба в растении — это во многом случайное явление. Более внимательного изучения здесь заслуживает именно гриб, который мы рассматриваем как компонент, нашедший новую экологическую нишу. При неблагоприятных условиях он может находиться в латентном, неактивном состоянии. В ряде случаев происходит активизация гриба и развитие мицелия в новообразующихся побегах. Далее в зависимости от ряда факторов взаимоотношения одного и того же эндофита с хозяином могут проходить как мутуализм, антагонизм или комменсализм (Благовещенская, 2008).

Тот факт, что дефицит воды положительно влияет на развитие мицелия в растении, можно объяснить по-разному. Возможно, происходит ослабление растения, поэтому оно не может сопротивляться заселению. В этом случае гриб выступает как антагонист, и можно было бы ожидать, что зараженные растения в условиях дефицита воды будут иметь худшие показатели развития. Однако этого, как видно из табл. 3, не происходит. Мы полагаем, что существуют другие факторы, стимулирующие развитие мицелия, не связанные напрямую с иммунной системой растения, например снижение активности воды в межклеточном пространстве (Bruehl, Kaiser, 1996).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Благовещенская Е. Ю. Эндофит-растение как сложная динамическая система // Современная микология в России. Т. 2 / Матер. II съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 396.

Благовещенская Е. Ю., Костенко Н. Ю., Разгуляева Н. В. Искусственное заражение овсяницы луговой эндофитным грибом // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39, вып. 5. С. 64—72.

Благовещенская Е. Ю., Костенко Н. Ю., Разгуляева Н. В. Динамика зараженности эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* отдельных растений овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42, вып. 3. С. 278—286.

Науумов Н. А. Методы микологических и фитопатологических исследований. Л.: Сельхозгиз, 1937. 272 с.

Соколов А. В. Вегетационный метод // Методика полевых и вегетационных опытов с удобрениями и гербицидами. М.: Наука, 1967. С. 104—124.

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

Buehl G. W., Kaiser W. J. Some effects of water potential upon endophytic *Acremonium* spp. in culture // *Mycologia.* 1996. Vol. 88. P. 809—815.

Clay K. Fungal endophyte infection and the population dynamics of grasses / Ed. G. P. Chep-lik. Population biology of grasses. Cambridge university press, 1998. P. 255—285.

Faeth S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? // *Oikos.* 2002. Vol. 98. P. 25—36.

Gwinn K. D., Fribourg H. A., Waller J. C., Saxton A. M., Smith M. C. Changes in *Neotyphodium coenophialum* infestation levels in tall fescue pastures due to different grazing pressures // *Crop. Sci.* 1998. Vol. 38. P. 201—204.

Hesse U., Schöberlein W., Diepenbrock W., Wittenmeyer L., Merbach W. Untersuchungen zu Wachstum und Entwicklung von *Lolium perenne*-Genotypen mit und ohne *Neotyphodium*-Endophyten unter Wasserstress // *Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss.* 1999. Bd 12. S. 227—228.

Latch G. C. M., Potter L. R., Tyler B. F. Incidence of endophytes in seeds from collections of *Lolium* and *Festuca* species // *Ann. appl. Biol.* 1987. Vol. 111. P. 59—64.

Maejima A., Saiga S., Inoue T., Tsuiki M. Endophyte infection rate and alkaloid concentrations in seeds of commercial cultivars of perennial ryegrass // *Grassland Sci.* 2000. Vol. 46. P. 52—57.

Malinowski D. P., Leutchmann A., Schmidt D., Nosberger J. Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes // *Agron. J.* 1997. Vol. 89. P. 673—678.

Malinowski D. P., Brauer D. K., Belesky D. P. The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency // *J. Agron. Crop. Sci.* 1999. Vol. 183. P. 53—60.

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

Richmond D. S., Shetlar D. J. Larval survival and movement of bluegrass webworm in mixed stands of endophytic perennial ryegrass and Kentucky bluegrass // *J. Econ. Entomol.* 1999. Vol. 92. P. 1329—1334.

Saiga S., Maejima A., Yoshida S., Tsuiki M. Changes of endophyte infection frequency in turf of northeastern Honshu, Japan // *Grassland Sci.* 2001. Vol. 47. P. 478—483.

Schardl C. L., Moon C. D. Processes of species evolution in *Epichloë/Neotyphodium* endophytes of Grasses / Eds J. F. White, jr. et al. // *Clavicipitalean fungi: evolutionary biology, chemistry, biocontrol and cultural impacts.* New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. P. 273—310.

Vazquez de Aldana B. R., Garcia Ciudad A., Zabalgoceazcoa I., Garcia Criado B. Ergovaline levels in cultivars of *Festuca arundinacea* // *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001. Vol. 93. P. 169—176.

Р Е З Ю М Е

Цель данной работы — изучить распределение эндофитного мицелия в отдельных растениях. Для эксперимента использовали семена овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) сорта ВИК 5, зараженные эндофитным грибом *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin. Показано, что засушливые условия положительно влияют на зараженность растений. Доля незараженных растений значительно отличалась в условиях слабого и сильного полива (40 и 57 % незараженных растений соответственно). Некоторые растения имели как зараженные, так и незараженные побеги. Данный факт подтверждает возможность несистемного поражения растений. Мы предполагаем, что в зараженном проростке происходит выбор между формированием зараженных или незараженных побегов. Более того, в некоторых условиях возможно «переключение программы», в результате чего исследователь будет наблюдать «появление» или «исчезновение» эндофита, в то время как это может означать просто его «активацию» или «анактивацию». Предложенная модель позволяет объяснить быстрые изменения зараженности растений эндофитными грибами в природных условиях.

Ключевые слова: *Neotyphodium*, эндофиты, мутуализм.

S U M M A R Y

This study is devoted to the problem of fungal distribution in individual plants. We used seeds of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) cultivar VIK 5 infected with *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C. W. Bacon et Hanlin. Draught conditions increased the part of infected plants got from infected seeds. The part of non-infected plants significantly differed in the cases of draught and humid conditions (40 and 57 % non-infected plants respectively). Some plants had both infected and non-infected tillers. This fact verified the possibility of non-systemic infection. It seems that an infected seedling has a choice between forming infected and non-infected tillers. In some conditions the program can change, so researcher will observe «elimination» of endophyte or its «appearance», but perhaps it will mean just activation or inactivation of endophyte. This model allows more rapid change of infection level in fields and pastures. Also this model explains the appearance of endophyte infection plants in fields considered to be endophyte-free.

Key words: *Neotyphodium*, endophyte, mutualism.