

Лев Иванович Курсанов (1877-1954)

Курсановские чтения - 2020

Феноменальные митохондриальные системы у мицелиальных грибов

Проф. д.б.н. Камзолкина Ольга Владимировна o-kamzolkina@yandex.ru

Рис. 9. Строение клетки в мицелии Sclerotinia libertiana. 1—3 живые клетки; 4—6 фиксированные и окрашенные. 1 — правая клетка молодая (вторая от вершины гифы) — протоплазма с очень мелкими вакуолями; левая клетка—более взрослая с более крупными вакуолями в протоплазме; 2 — более взрослая стадия; вакуоли еще крупнее; 3 — еще более взрослая клетка, обильные крупные вакуоли придают протоплазме пенистый вил: 4 — окрашенные ядра в клетке, соответствующей по возрасту рис. 2; 5 — окраска хондриозом в клетке того же возраста; 6 — одновременная окраска ндер и хондриозом в клетке того же возраста.

История

«... В протоплазме (Sclerotinia libertiana) при соответствующей обработке обнаруживаются хондриозомы большей частью в виде изогнутых палочек (хондриоконты) (рис. 9). Согласно главным образом исследованиям Gullermond, много работавшего в этой области, хондриозомы у грибов несут некоторую функцию, аналогичную пластидам у высших растений....» (с. 14., Курсанов Л.И. Микология. 1940).

Митохондрии – Ахиллесова пята



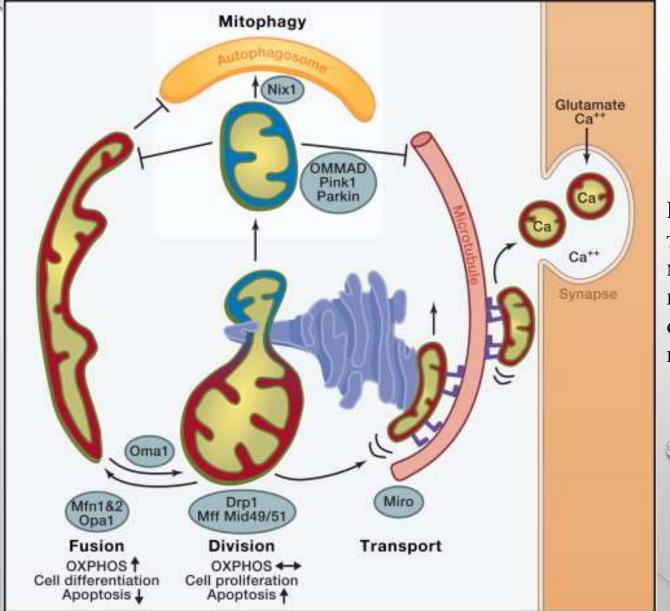
Фото: умирающий Ахилл.

Митохондрии выполняют разнообразные, но взаимосвязанные функции, они образуют АТФ и многие биосинтетические интермедиаты, а также участвуют в передаче стрессовых сигналов, контролируют жизнь и смерть клетки.

Функции митохондрий у многоклеточных организмов простираются за пределы клетки и влияют на физиологию организма, регулируя связь между клетками и тканями. Митохондриальная дисфункция стала ключевым фактором во множестве заболеваний, в том числе нейродегенеративных и метаболических расстройствах.

Роль динамики митохондрий в нейронах (Nunnari, Suomalainen, 2012)

Митохондрии с высоким трансмембранным мембранным потенциалом и высоким окислительным фосфорилированием (OXPHOS) обозначены красным цветом.



Митохондрии с низким трансмембранным мембранным потенциалом обозначены голубым цветом.

Исследования динамики митохондрий у грибов

Исследования динамики митохондрий проводят в основном на аскомицетах: модельные объекты и патогенные грибы: *Ashbya gossyipii* (Gerstenberger et al., 2012), *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* (Neubauer et al., 2012; Lee et al., 2014), *Neurospora crassa* (Потапова с сотр., 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (Westermann, 2010) и др.

Этот вопрос практически не изучен у базидиомицетов. Наши исследования по изучению митохондрий у базидиальных грибов начались более 10 лет назад на видах из родов *Agaricus* and *Pleurotus*. А позднее - на ксилотрофных грибах.

2009

цитология

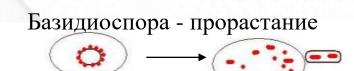
Tom 51, № 6

МОРФОГЕНЕЗ И УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОХОНДРИЙ БАЗИДИОМИЦЕТОВ РОДОВ AGARICUS И PLEUROTUS

© Е. В. Матросова, И. С. Мажейка, О. А. Кудрявцева, О. В. Камзолкина¹

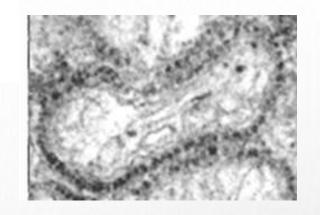
Кафедра микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; электронный адрес; o-kamzolkina@yandex.ru





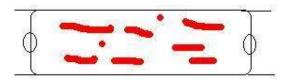
Agaricus bisporus

Динамика и структура митохондрий в мицелии

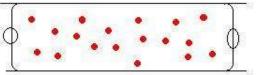


Благоприятные условия роста мицелия

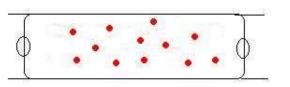
Голодание, высокие температуры, окислительный стресс



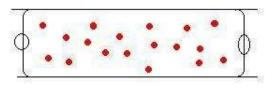
Субьапикальный район



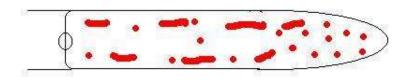
Удаленный район >500 мкм



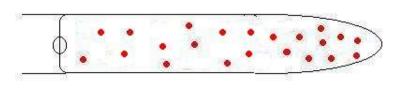
Субьапикальный район



Удаленный район >500 мкм

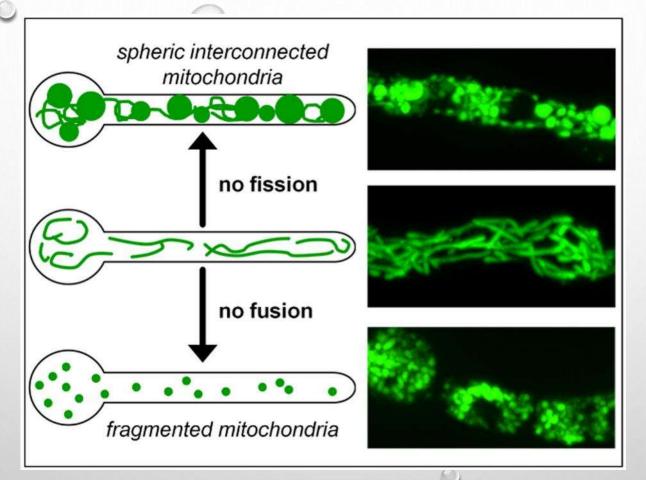


Апикальный район



Апикальный район

Динамика митохондрий у Aspergillus fumigatus



Neubauer M., Zhu Z., Penka M., Helmschrott C., Wagener N., Wagener J. Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications // Molecular Microbiology, 2015. Volume: 98, Issue: 5, Pages: 930-945

Наши исследования ксилотрофных базидиомицетов

Несколько лет назад мы обнаружили, что мицелиальные ксилотрофные базидиомицеты способны формировать не просто нитчатые или сетевые митохондрии, а очень длинные трубчатые митохондрии, тянущиеся вдоль длины всей грибной клетки (до 100 мкм и более).

Сегодня в докладе я расскажу о нашем исследовании морфологии, структуры и возможных функциях митохондрий дереворазрушающих грибов.

Задачи исследования

- Подбор методов окрашивания (потенциалзависимые и потенциалнезависимые флуорохромы в сочетании с разобщителями окислительного фосфорилирования)
- Изучение ультраструктуры
- Дифференцирование митохондриальной и вакуолярной систем и предполагаемые функции трубчатых митохондрий

Объекты исследования. Методы.









Fomes fomentarius

Fomitopsis pinicola

Pleurotus ostreatus

Stereum hirsutum



Coprinus comatus

Культивирование на агаризованных средах: мальт-агар, среда Чапека (Ch), Чапек без азота (Ch N-).

Световая микроскопия (Axioskop 40FL): прижизненное окрашивание.

Просвечивающая электронная микроскопия (Hitachi, JEOL 1010). Фиксация: глютар-параформ и OsO4.

Rhizoctonia solani



В микологии для мечения Результаты митохондрий часто используют высокие концентрации флюоресцентных проб

Rhodamine-123

Aspergillus nidulans, 50 MKM (Hickey, Read, 2009)

Для животных клеток используют наномолярные концентрации для мечения в режиме без гашения ——

Режимы мечения митохондрий

«Микологическая проблема» - сложно определить использующийся режим мечения митохондрий, к тому же, высокие концентрации проб, даже с учетом, видимо, их плохого поглощения грибными клетками, влекут за собой неспецифический сигнал

Без гашения – флюоресцентную пробу вносят в низкой концентрации, она накапливается в матриксе митохондрий пропорционально митохондриальному потенциалу – чем выше поляризованность митохондрии, тем мощнее флюоресценция, и наоборот

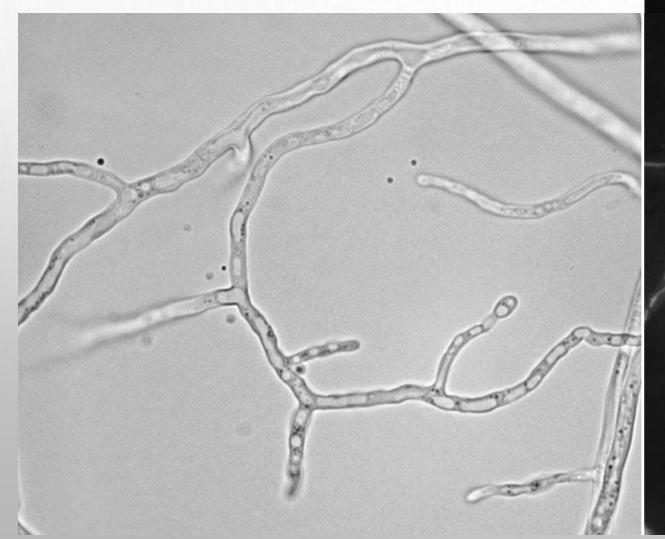
С гашением – используют высокие концентрации проб, молекулы пробы конгломерируют в матриксе митохондрий, что приводит к затуханию флюоресценции. Чем выше потенциал митохондрии, тем слабее флюоресцентный сигнал и наоборот

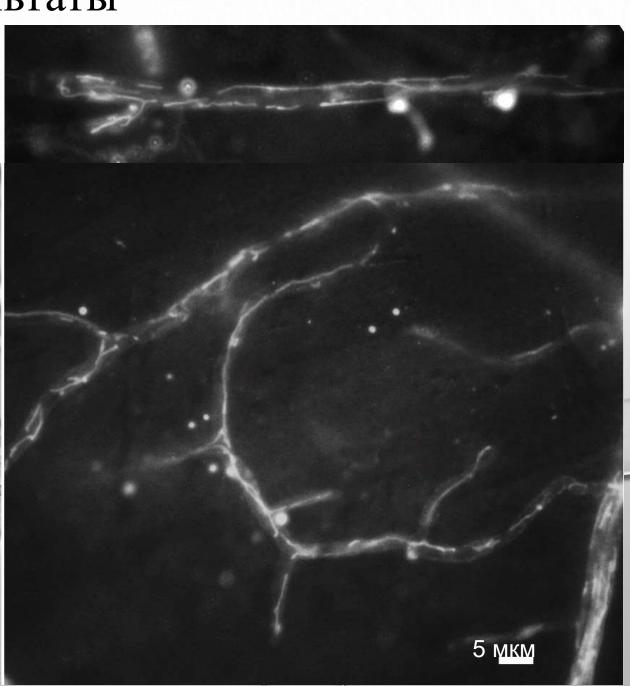
Мы разработали тест-систему из двух флюоресцентов и протонного разобщителя, позволяющую эффективно метить митохондрии базидимицетов в установленном режиме без гашения и качественно оценивать степень поляризации митохондрий

Родамин 6Ж

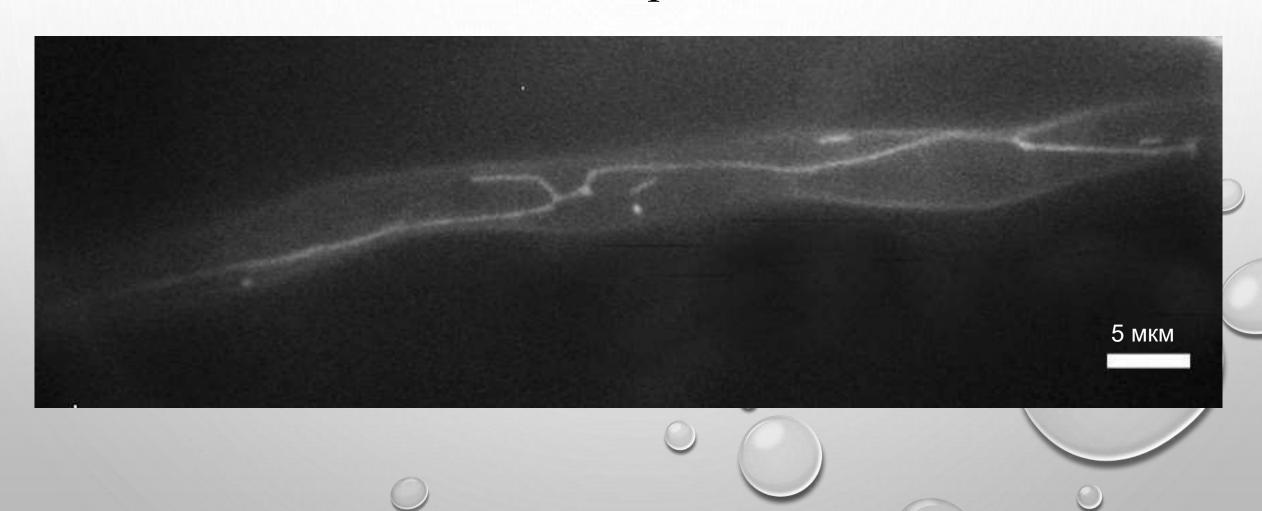
HAO BAM15

Stereum hirsutum родамин 6Ж, Ch N-

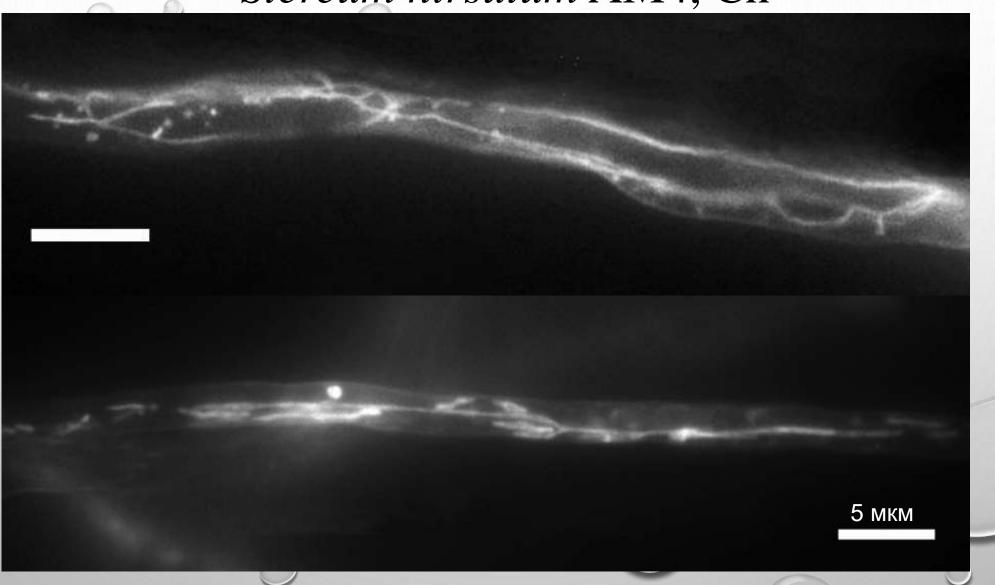




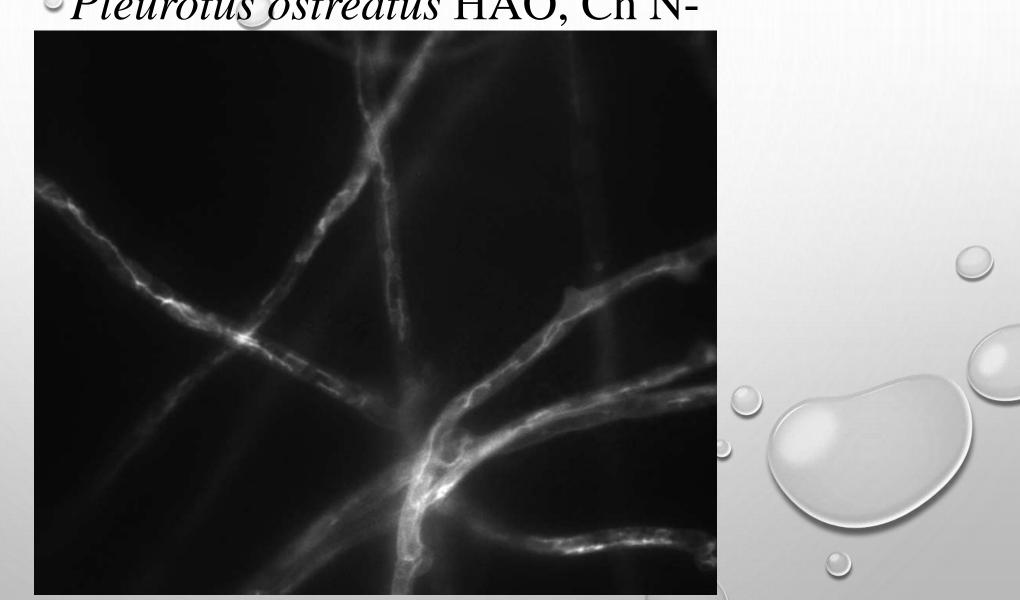
Stereum hirsutum, родамин 123, Ch

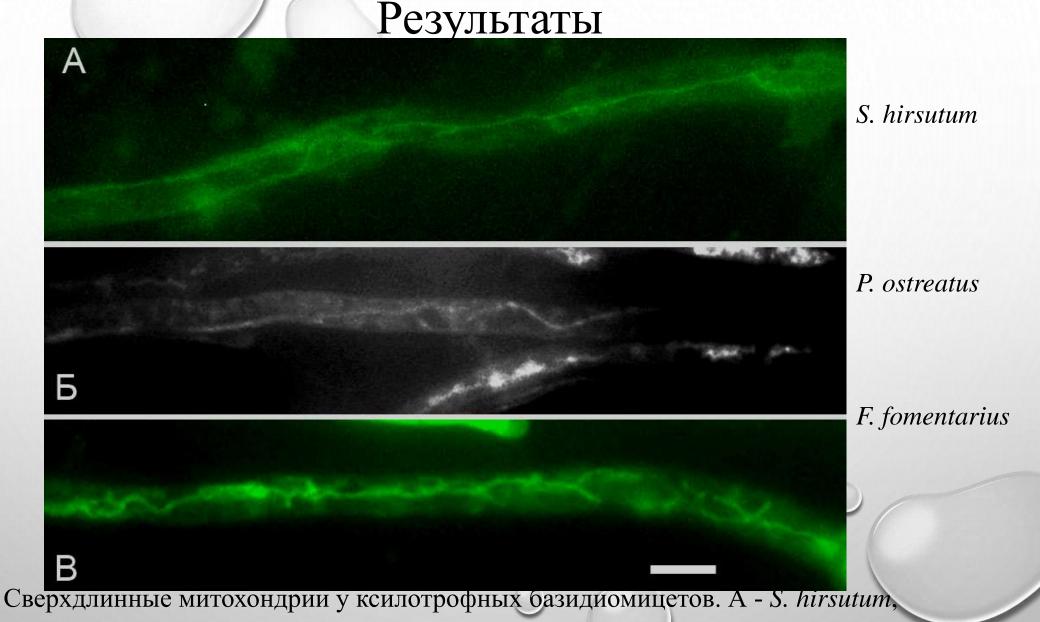


Результаты Stereum hirsutum AM4, Ch



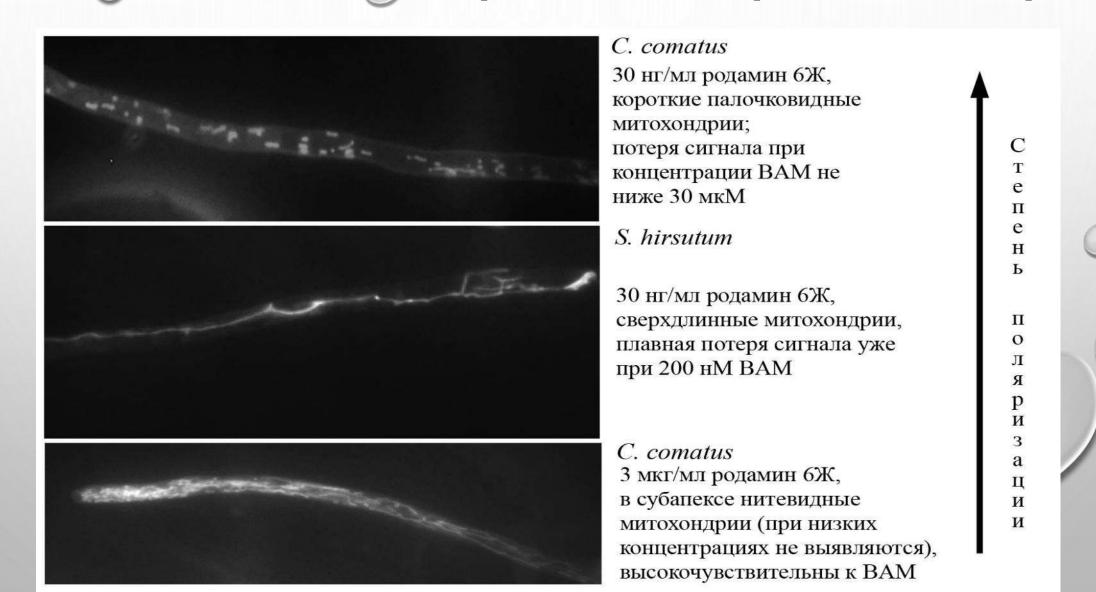
Pleurotus ostreatus HAO, Ch N-

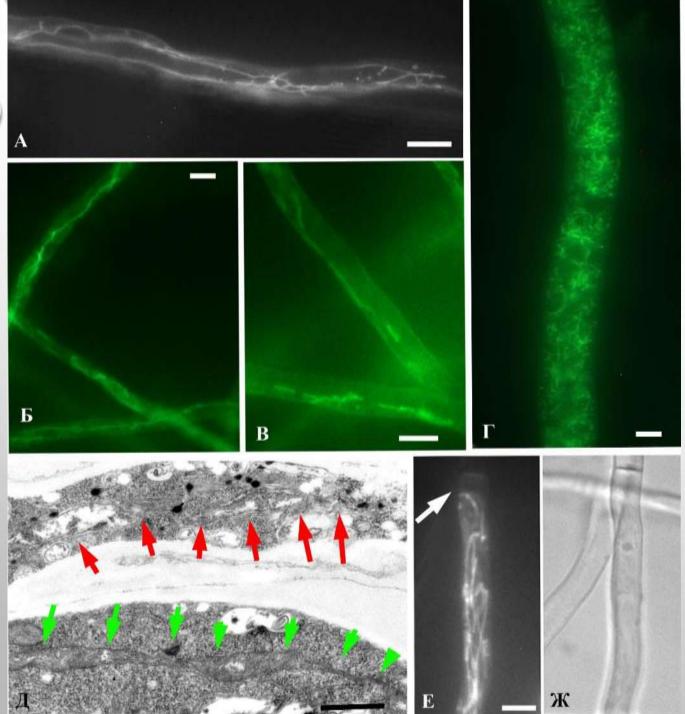




Сверхдлинные митохондрии у ксилотрофных базидиомицетов. А - *S. hirsutum*, среда Чапека без азота, НАО. Б - *P. ostreatus*, среда Чапека, родамин 6Ж. В - *F. fomentarius*, среда Чапека без азота, НАО. Масштабный отрезок 5 мкм

• Родамин 6Ж легко проникает в живые грибные клетки и работает в низких концентрациях в режиме без гашения, что положительно влияет на точность определения степени поляризованности митохондрий.

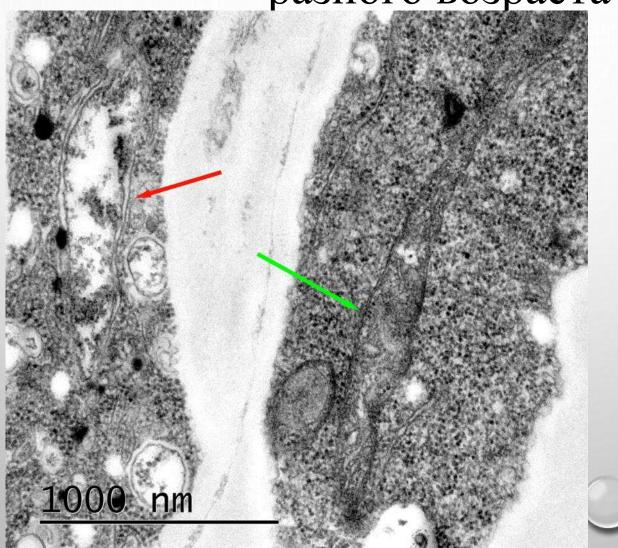




- Митохондрии разных видов грибов. Флуоресцентное мечение, кроме Д и Ж.
- A, Б. Сверхдлинные митохондрии у S. hirsutum и P. ostreatus, соответственно.
- В. Палочковидные и короткие нитевидные митохондрии у *C. comatus*.
- Г. Митохондриом R. solani.
- Д. ТЭМ-фотография S. hirsutum. Внизу срез через молодую клетку, вверху через более зрелую. Зелеными стрелками помечена длинная митохондрия с кристами, красными длинная полая митохондрия без крист.
- E. Разворот митохондрий около септы (стрелка) у S. hirsutum. Ж. Тот же участок мицелия на просвет.

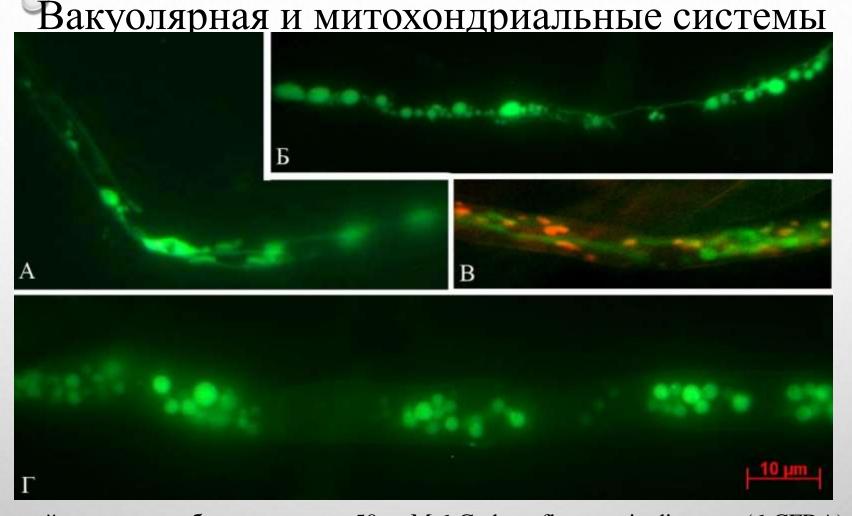
Масштабные отрезки 5 мкм, кроме Д – 0,5 мкм.

Ультратонкий срез через две клетки *S. hirsutum* разного возраста



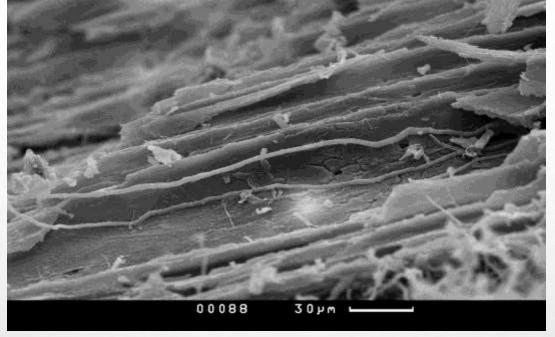
Ультратонкий срез через две клетки S. hirsutum разного возраста, мембраносохраняющая методика подготовки ТЭМ-препарата. Красная стрелка - фрагмент длинной митохондрии, потерявшей кристы и содержимое; зеленая стрелка фрагмент молодой длинной митохондрии, видны кристы и плотное содержимое





Мечение вакуолярной системы грибов с помощью 50 мкМ 6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA). А. *S. hirsutum*, видны крупные округлые вакуоли и соединяющие их трубчатые вакуоли. Б. *C. comatus*, обильные округлые вакуоли и хорошо выраженные трубчатые вакуоли. В. *С. comatus*, совместное мечение 6-CFDA и родамина 6Ж — сигнал от палочковидных митохондрий (красный) большей частью дифференцирован от сигнала от вакуолей, в т.ч. тубулярных (зеленый сигал). Г. *R. solani*, сигнал в округлых вакуолях, трубчатых вакуолей нет.

Заключение



Fomitopsis pinicola

Наличие митохондриально-тубулярной системы хорошо согласуется со специфической физиологией ксилотрофов, вынужденных жить в условиях азотного голодания в древесине (C: N = 1250: 1) (Watkinson et al., 2006). Ксилотрофы активно транспортируют ресурсы в пределах своих колоний (рециклинг) и митохондриальная система-трансформер может представлять собой экономный способ метаболизма, обеспечивая гифы АТФ и азотсодержащими молекулами.

Заключение

У базидиальных грибов тип митохондриома может служить «визитной карточкой» эколого-трофической принадлежности гриба:

У ксилотрофов выражены сверхдлинные митохондрии – можно предполагать, что они участвуют в дальнем транспорте клеточных ресурсов, в т.ч. азота – являются приспособлением для поиска и освоения древесины

У фитопатогена картофеля *Rhizoctonia* solani крупные клетки плотно заполнены сетью из тонких часто ветвящихся поляризованных митохондрий



В клетках копро-гумусового сапротрофа *Coprinus comatus* присутствуют одновременно две субпопуляции митохондрий: короткие палочковидные сильно поляризованные (дыхательные?) и нитевидные с низким потенциалом (запасные, для биосинтеза?)

Благодарности



Мажейка Игорь Стасисович

Воронко Оксана Васильевна

Спасибо за внимание!

