

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ГРИБОВ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Исполнитель:

Семенова М.А.

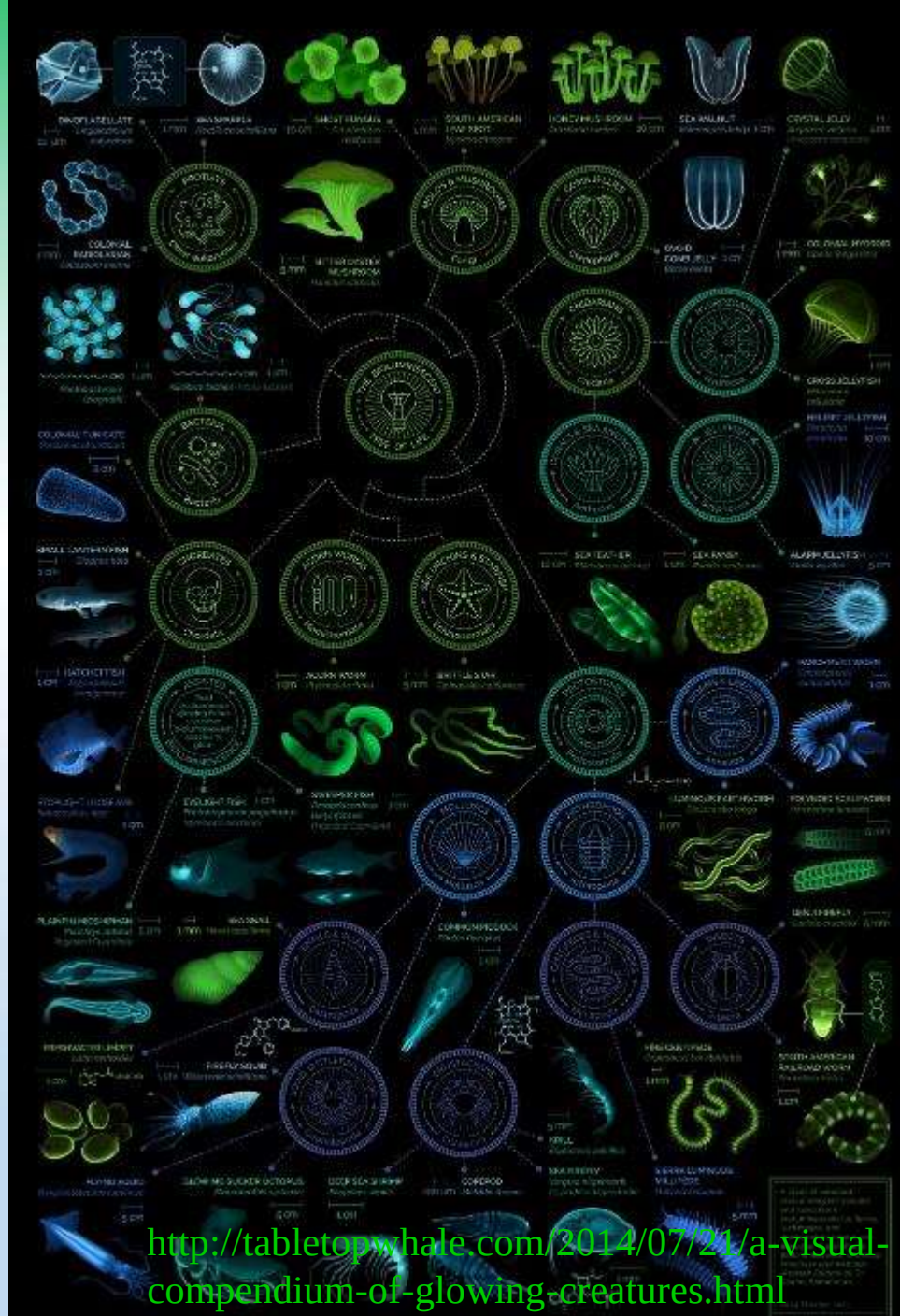
Руководитель:

д.б.н., проф. Камзолкина О.В.

Введение

Биolumинесценция — это природное явление, проявляющееся в испускании **видимого света** живыми организмами в результате **реакции окисления** субстрата **люциферина** в присутствии фермента **люциферазы**, либо же реакция люциферина с фотопротеинами, которые, иногда рассматривают как подкласс люцифераз (Wilson, Hastings, 1998).

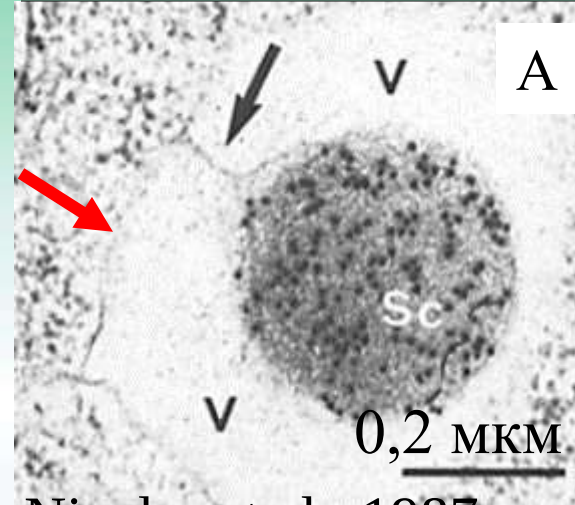
Все **биolumинесцентные грибы**, описанные на данный момент, являются **сапротрофами**, растущими на **древесном субстрате**, за исключением нескольких фитопатогенных видов (*Armillaria mellea* и *Mycena citricolor*). Они вызывают **белую гниль**, образуют **макроскопические плодовые тела** и секретируют **внеклеточные ферменты** (лакказы, лигнин-пероксидазы), способные **расщеплять лигнин** (Stevani et al., 2013)



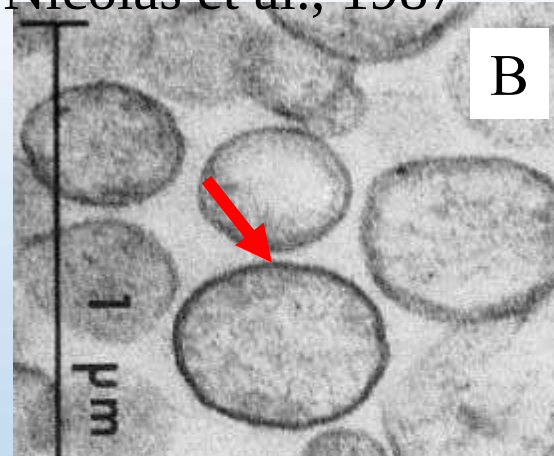
Актуальность работы

- ❖ На данный момент **недостаточно данных по физиологии** светящихся грибов и особенностям их **культивирования**, тогда как эти данные могут лечь в основу создания **биосенсоров для биолюминесцентного анализа** (Weitz et al., 2001; Выдрякова и др., 2009; Stevani et al., 2013)
- ❖ **Цитологические основы** биолюминесценции грибов ранее **не изучали**, однако известно, что грибная люцифераза является **мембраносвязанным белком** (Desjardin et al., 2008). Также было показано, что **эндомембранные структуры** образуют внутриклеточные источники люминесценции у водорослей, стрекающих, насекомых, и, возможно, у некоторых других организмов (Sweeney, 1980).

Gonyaulax polyedra
(Dinophyta)

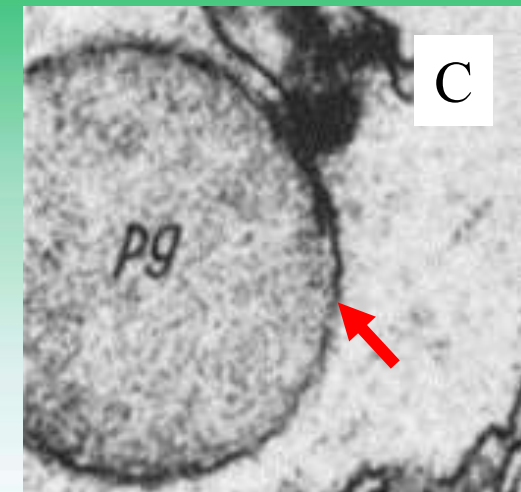


Nicolas et al., 1987



Renilla reniformis
(Cnidaria)

Barber, Dilly, 1966



Lampyris noctiluca
(Insecta)

Anderson,
Cormier, 1973

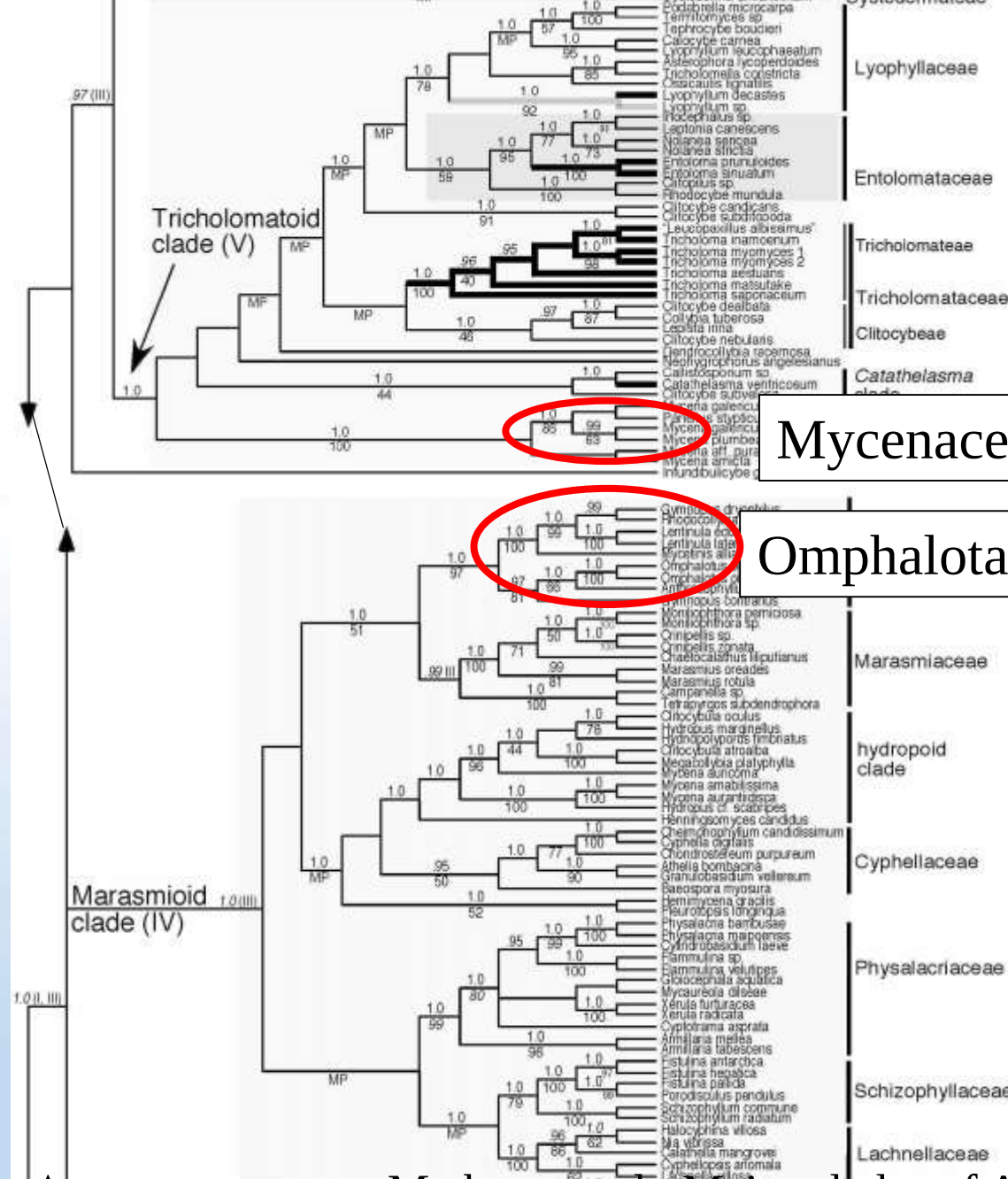
А – сцинтиллон
В – люмисомы
С – фотоцитарные
гранулы
(пероксисомы)

Цель работы:

Провести сравнительное изучение влияния условий культивирования на рост и люминесценцию четырех штаммов биолюминесцентных грибов, а также выявить корреляцию структуры клеток мицелия с уровнем биолюминесценции.

Задачи:

- ❖ Подобрать оптимальные условия культивирования для роста, развития мицелия и биолюминесценции светящихся грибов: температуру, pH, состав среды культивирования;
- ❖ Оценить кинетические константы развития биолюминесценции у разных видов во время инкубации при свободном доступе атмосферного кислорода;
- ❖ Изучить динамику свечения мицелия грибов и определить минимум и максимум световой эмиссии;
- ❖ Исследовать структуру клеток мицелия биолюминесцентных грибов в двух временных точках (минимум и максимум световой эмиссии) на уровне световой микроскопии;
- ❖ Составить описание ультраструктуры мицелия биолюминесцентных грибов в двух временных точках (минимум и максимум световой эмиссии).



Из коллекции культур базидиомицетов (LE-BIN)

Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН были получены следующие штаммы:

Favolaschia manipularis LE-BIN 3272,

Panellus luminescens LE-BIN 3351

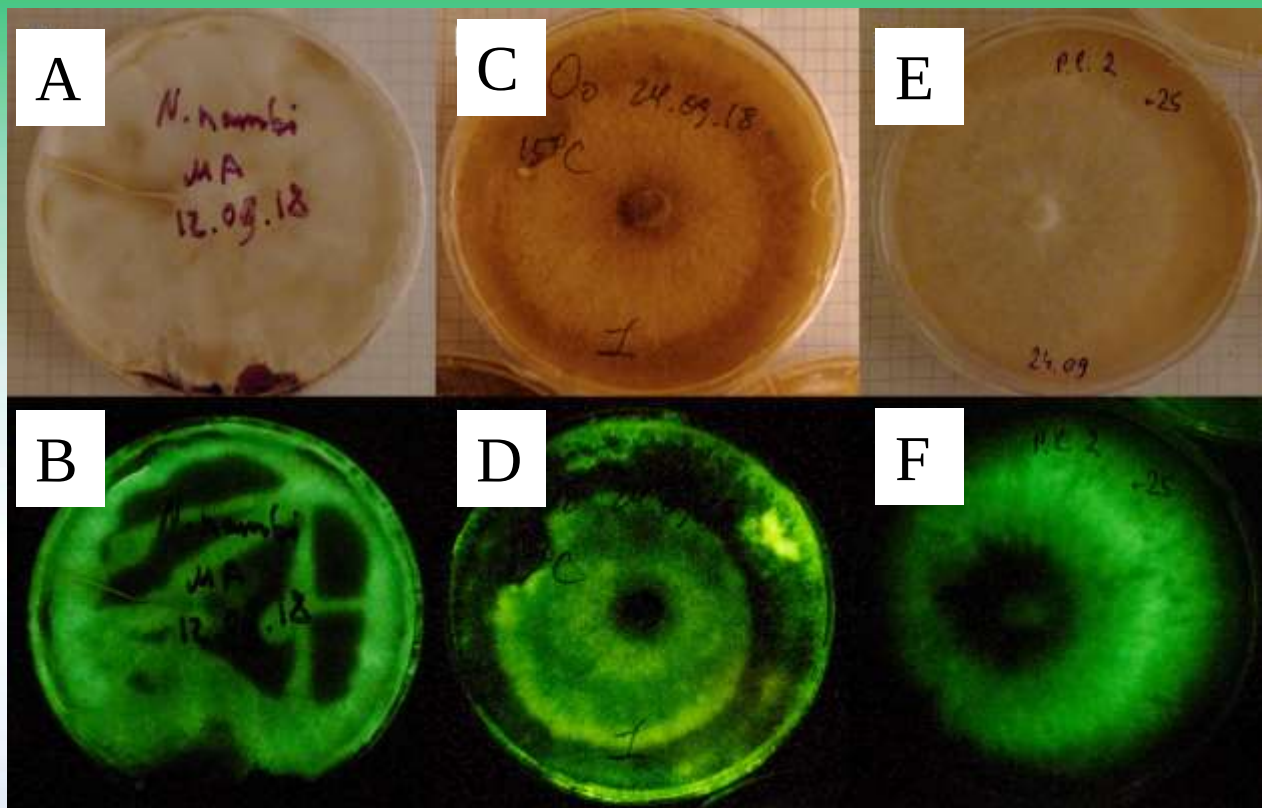
Neonothopanus nambi LE-BIN 3297,

Omphalotus olearius LE-BIN 2082,



Методы работы:

- ❖ Культивирование на агаризованных средах
- ❖ Хранение в криопробирках под стерильной водой и на скошенной среде мальт-агар (МА) в пробирках при комнатной температуре
- ❖ Визуальная оценка свечения в темноте
- ❖ Измерение свечения мицелия на агаризованных средах (люминметр RTF)
- ❖ Световая микроскопия (Axioskop 40FL; нейтральный красный, ДАПИ, родамин 6Ж, нильский красный)
- ❖ Просвечивающая электронная микроскопия (JEOL JEM 1011, двойная фиксация: 2,5% глutarовый альдегид, 2% параформальдегид на 0,1 М HEPES буфере (pH 6,8), 1:1; постфиксация в 2% OsO₄)



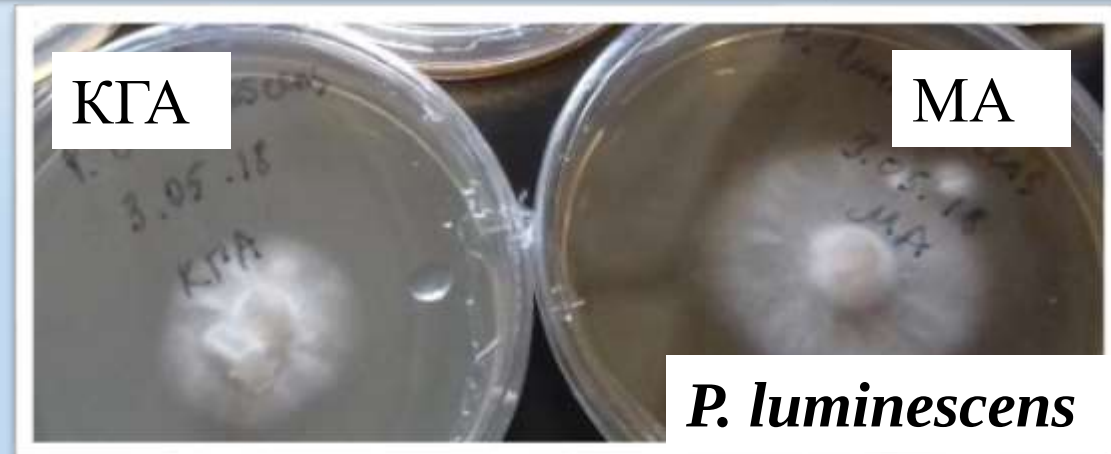
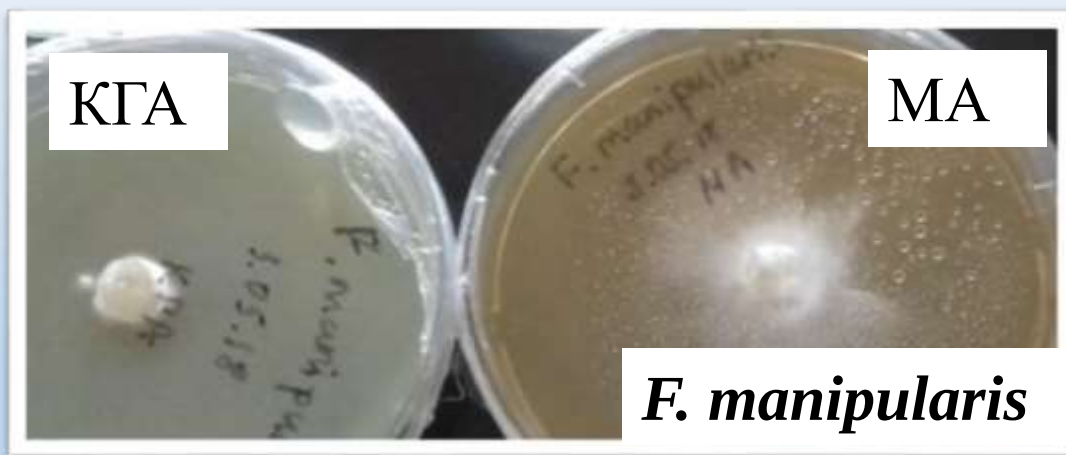
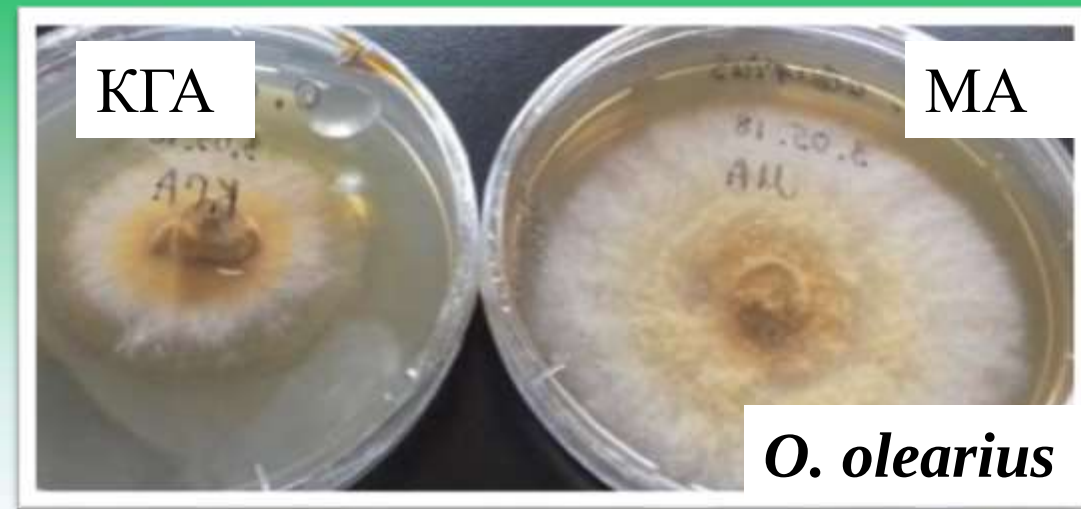
Макроморфология культур светящихся грибов на МА и их биолюминесценция. А, В – *N. namibi*, 35 сутки роста, С, D – *O. olearius*, 23 сутки роста, Е, F – *P. luminescens*, 23 сутки роста.

Фотограф: Арзамасцева В.О.

Результаты

Скорость роста мицелия (V, мм/сут) на средах: МА (мальт-агар) и КГА (картофельно-глюкозный агар)

	МА	КГА
<i>N. nambi</i>	12	6,9
<i>O. olearius</i>	11,3	8,9
<i>F. manipularis</i>	8,6	6,5
<i>P. luminescens</i>	6,3	4,3



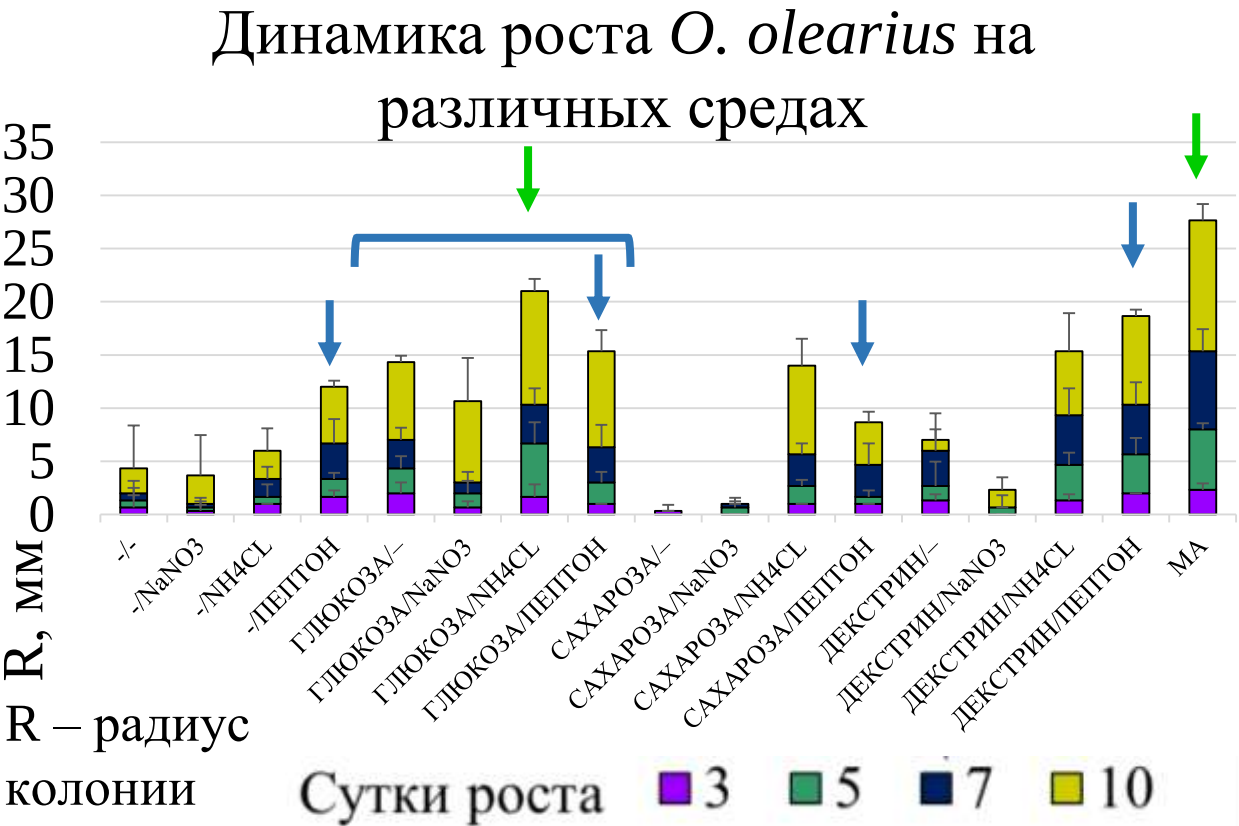
Культуры биOLUMиНесцентных грибов на 9 сутки роста

Оптимальные для роста и развития воздушного мицелия источники углерода и азота

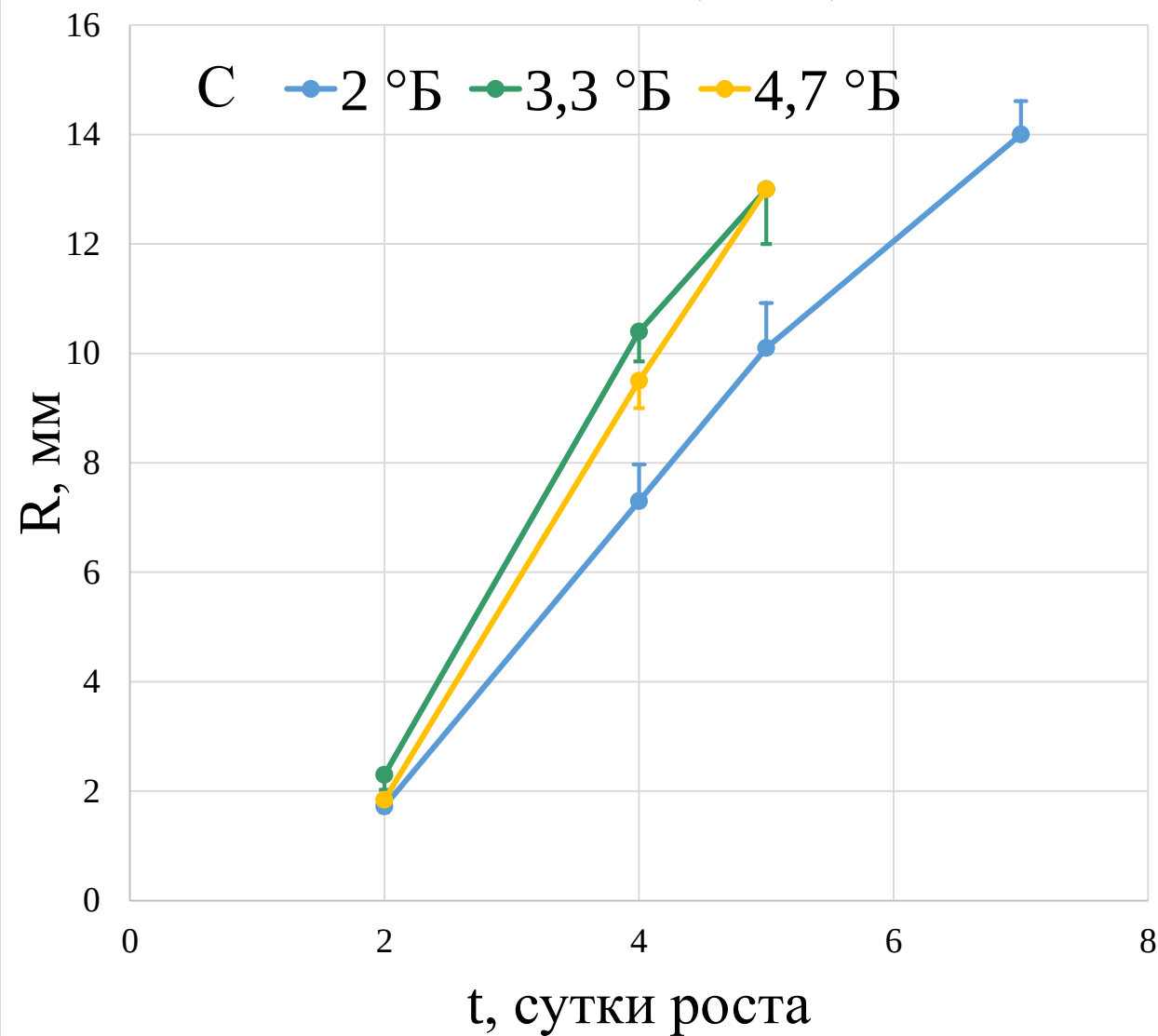
	<i>N. nambí</i>	<i>O. olearius</i>	<i>P. luminescens</i>
Источник углерода	Декстрин	Глюкоза	-
Источник азота	NH4Cl	Пептон	Пептон
Сочетание источника углерода и азота	Декстрин-NH4Cl	Глюкоза-NH4Cl	Глюкоза-Пептон



Культуры *O. olearius* на средах с разными сочетаниями источников углерода и азота на 9 сутки роста

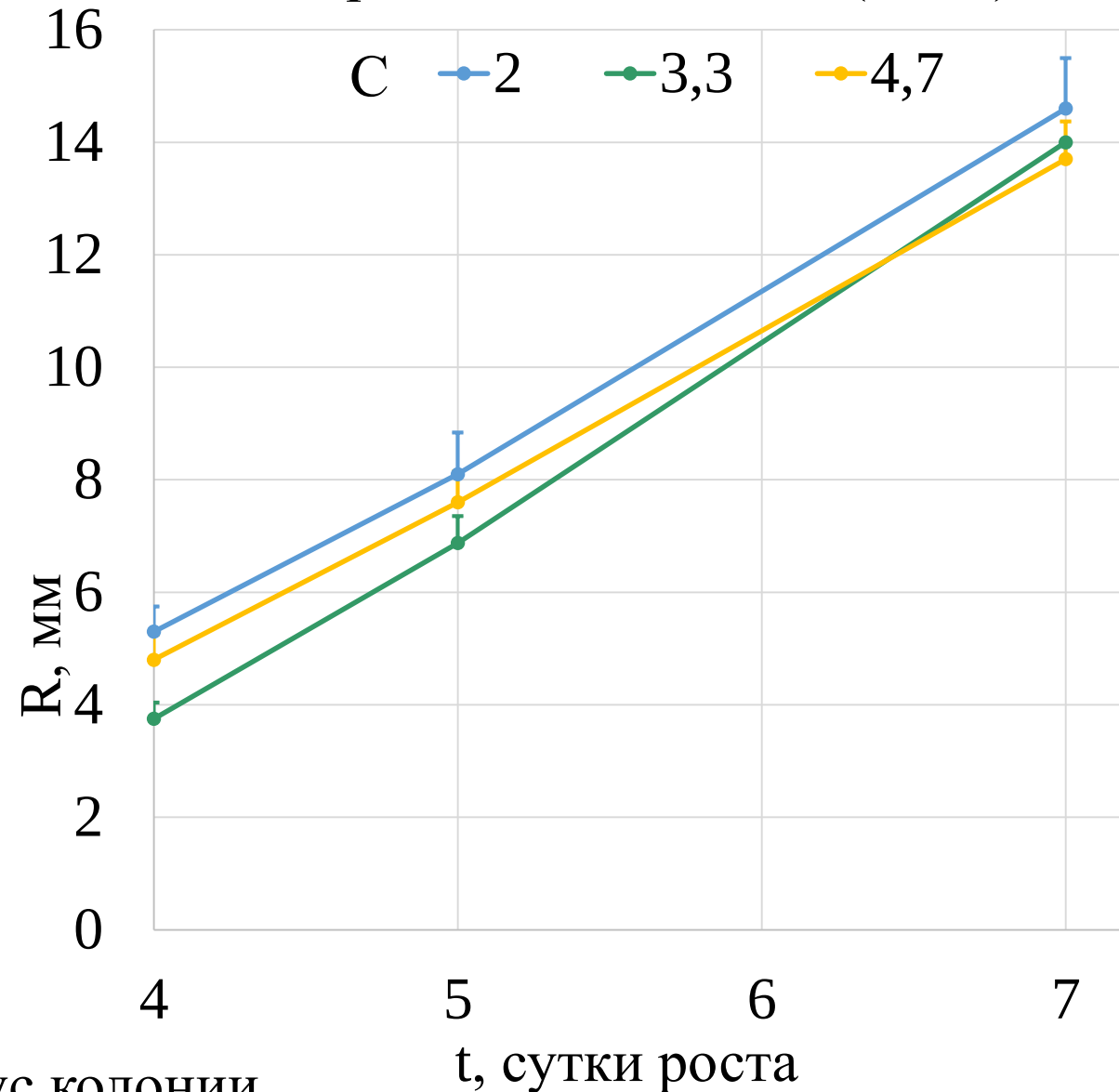


Динамика роста *O. olearius* на МА с
выборочными концентрациями
мальтакса (С, °Б)



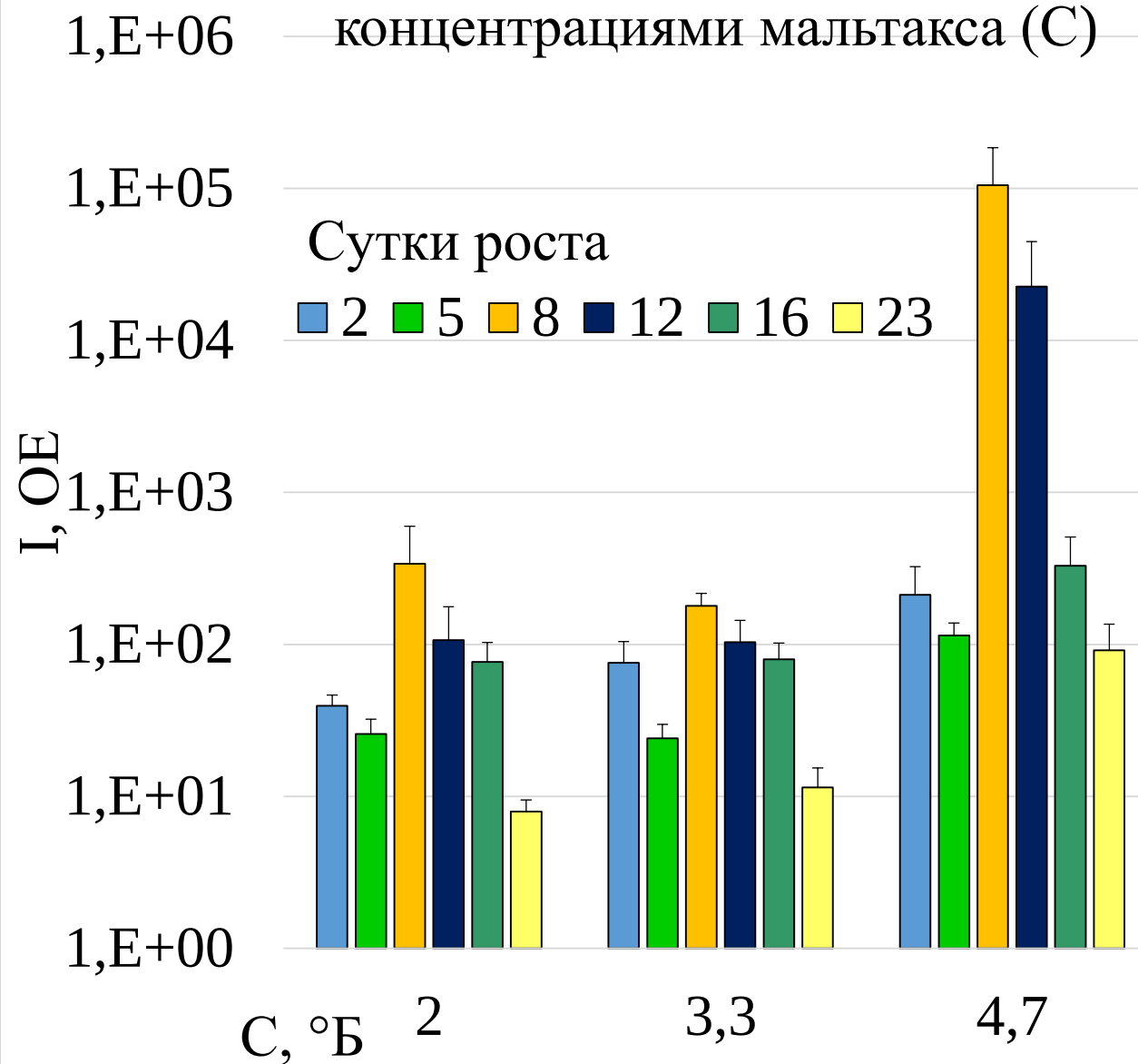
R – радиус колонии

Динамика роста *F. manipularis* на
МА с выборочными
концентрациями мальтакса (С, °Б)



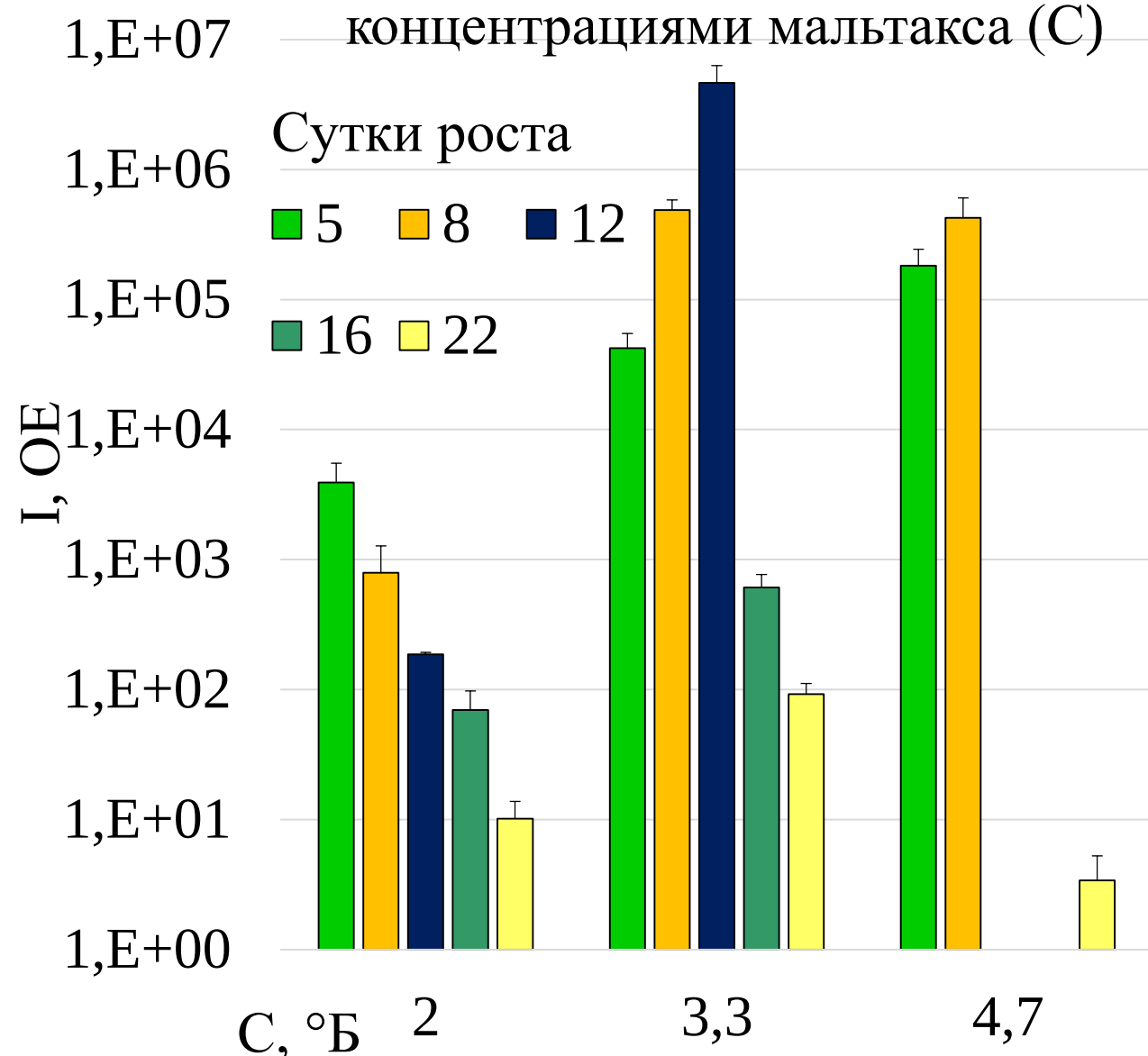
Средние значения интенсивности
билюминесценции (I)

N. pambí на МА с выборочными
концентрациями мальтакса (С)



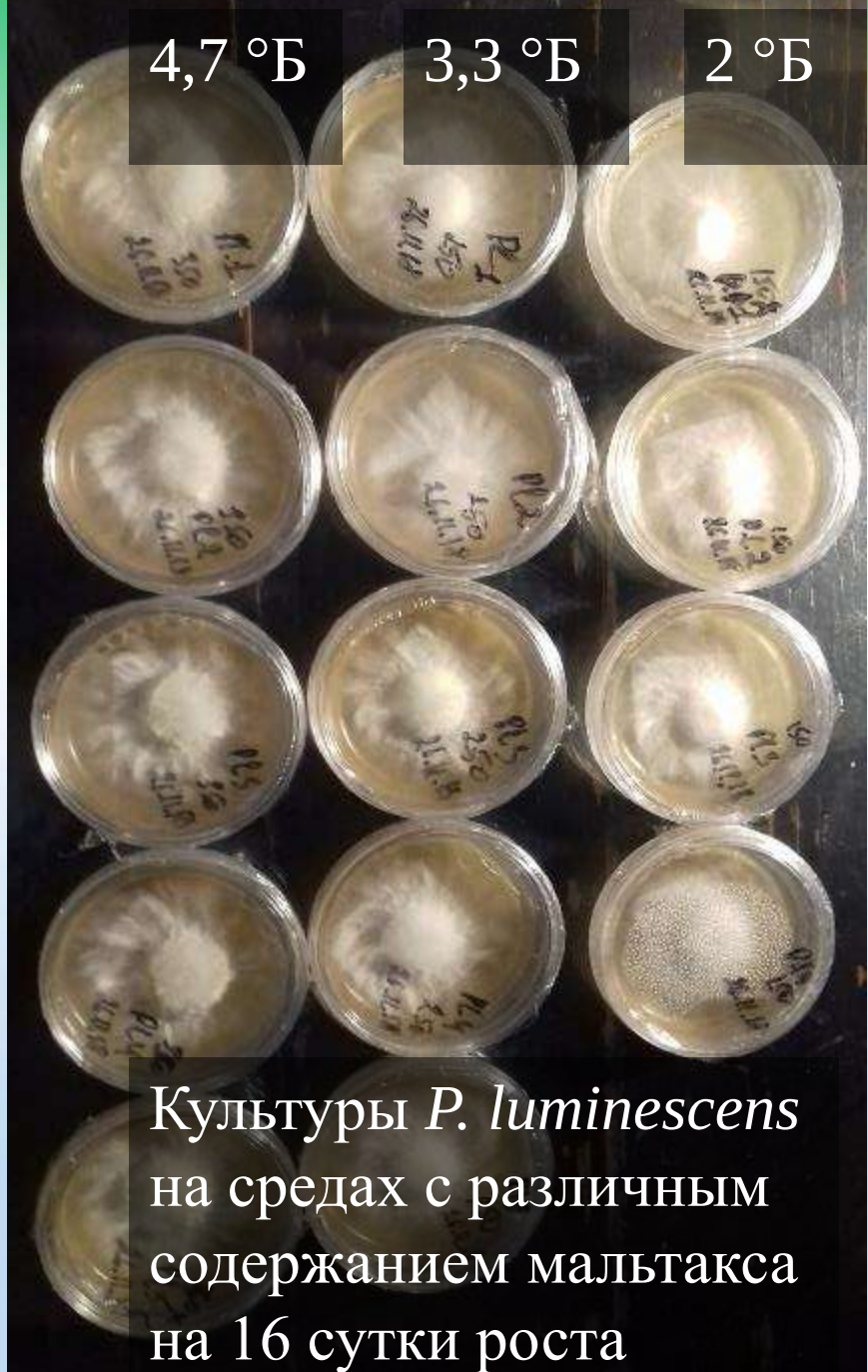
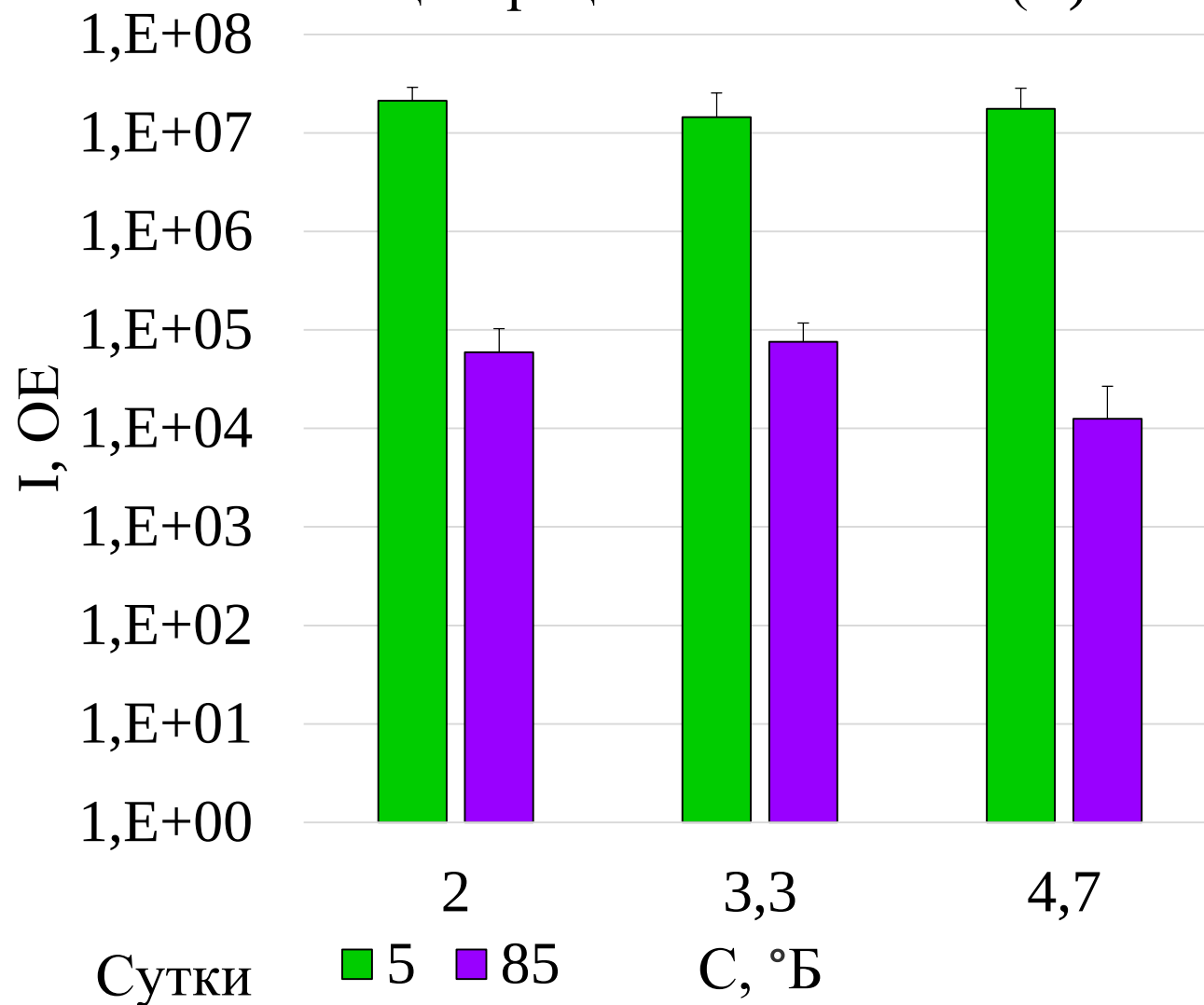
Средние значения интенсивности
билюминесценции (I)

O. olearius на МА с выборочными
концентрациями мальтакса (С)

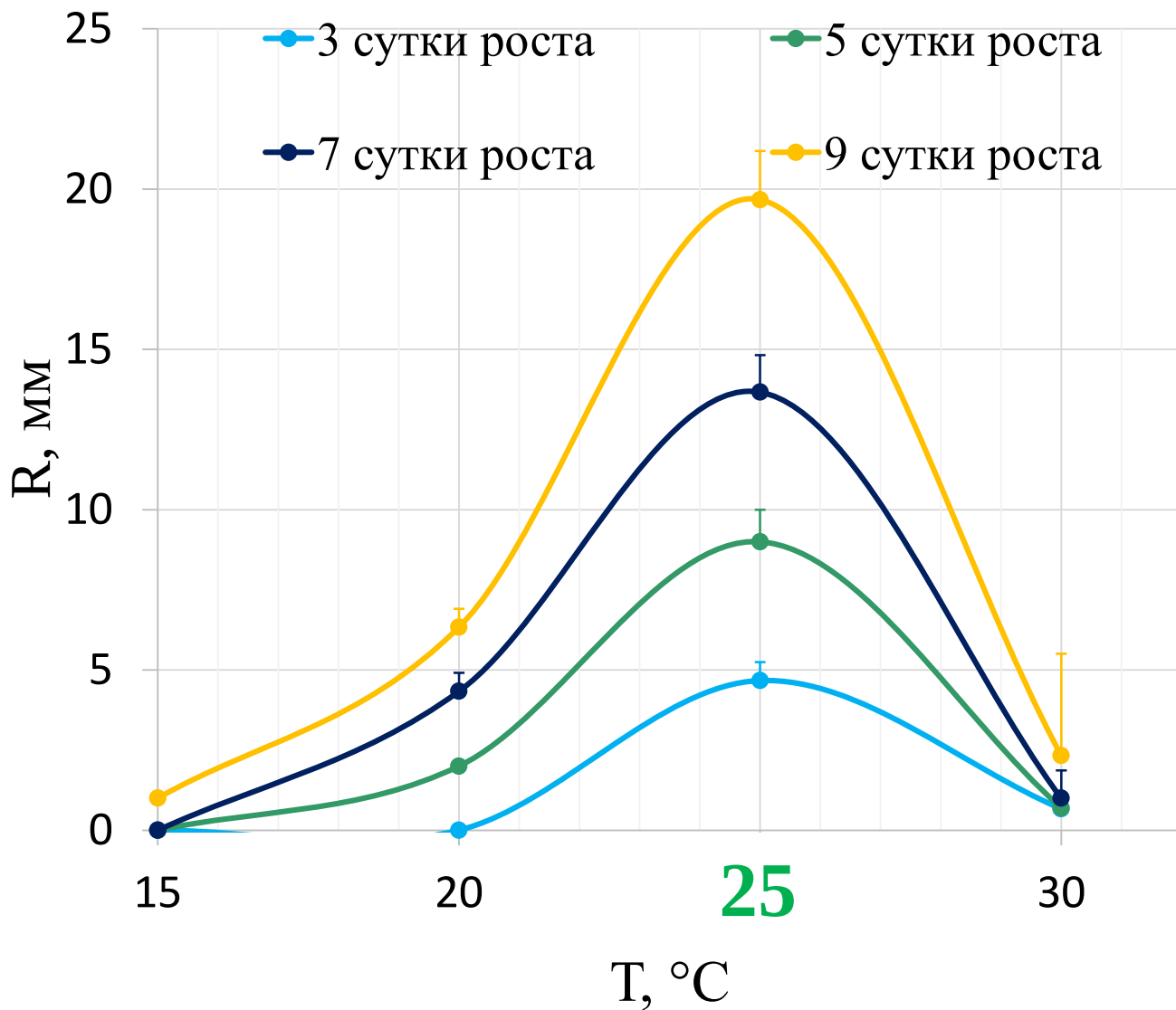


Средние значения интенсивности
биolumинесценции (I)

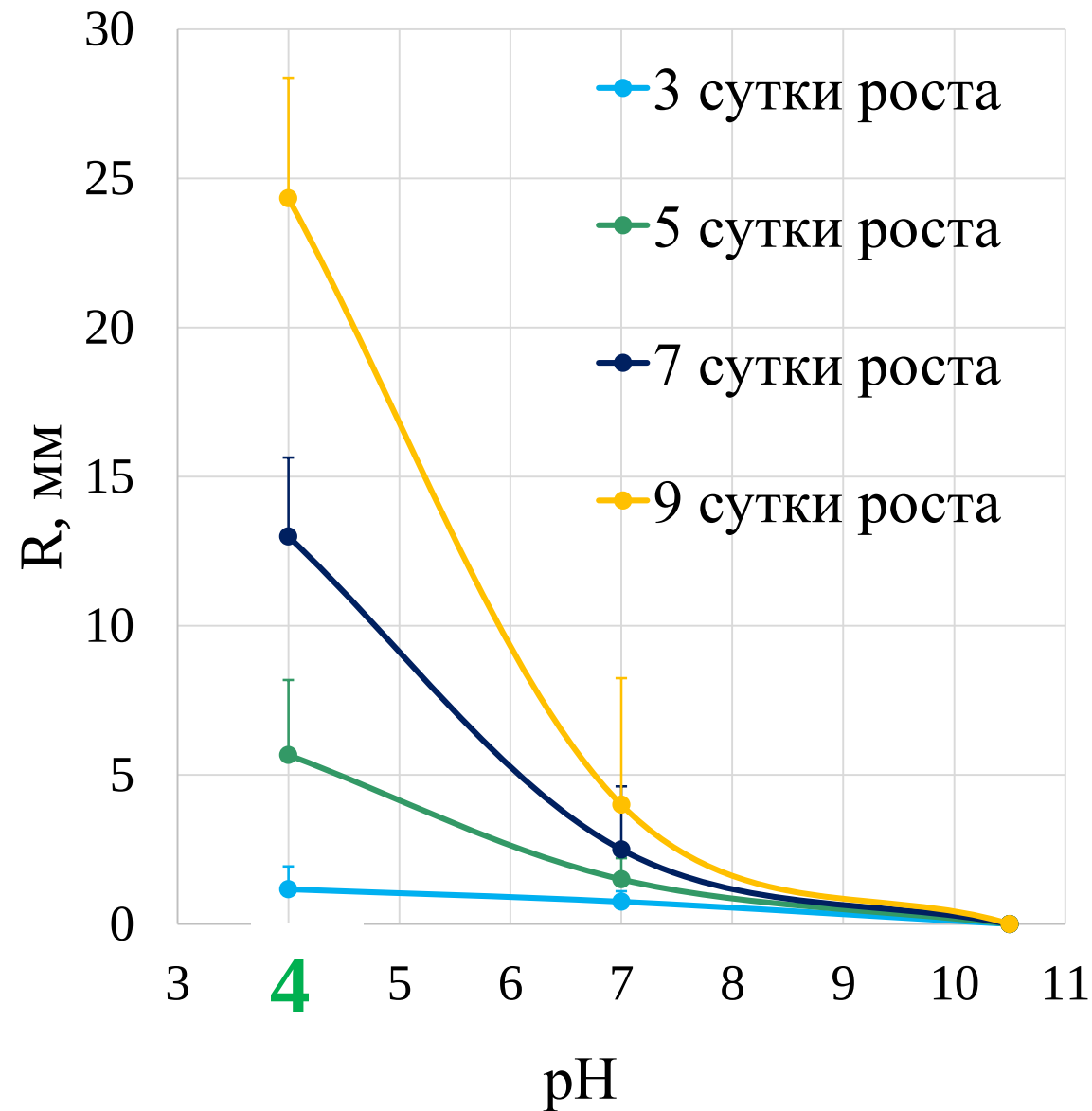
P. luminescens на МА с выборочными
концентрациями мальтакса (С)



Влияние температуры на рост мицелия
P. luminescens на МА

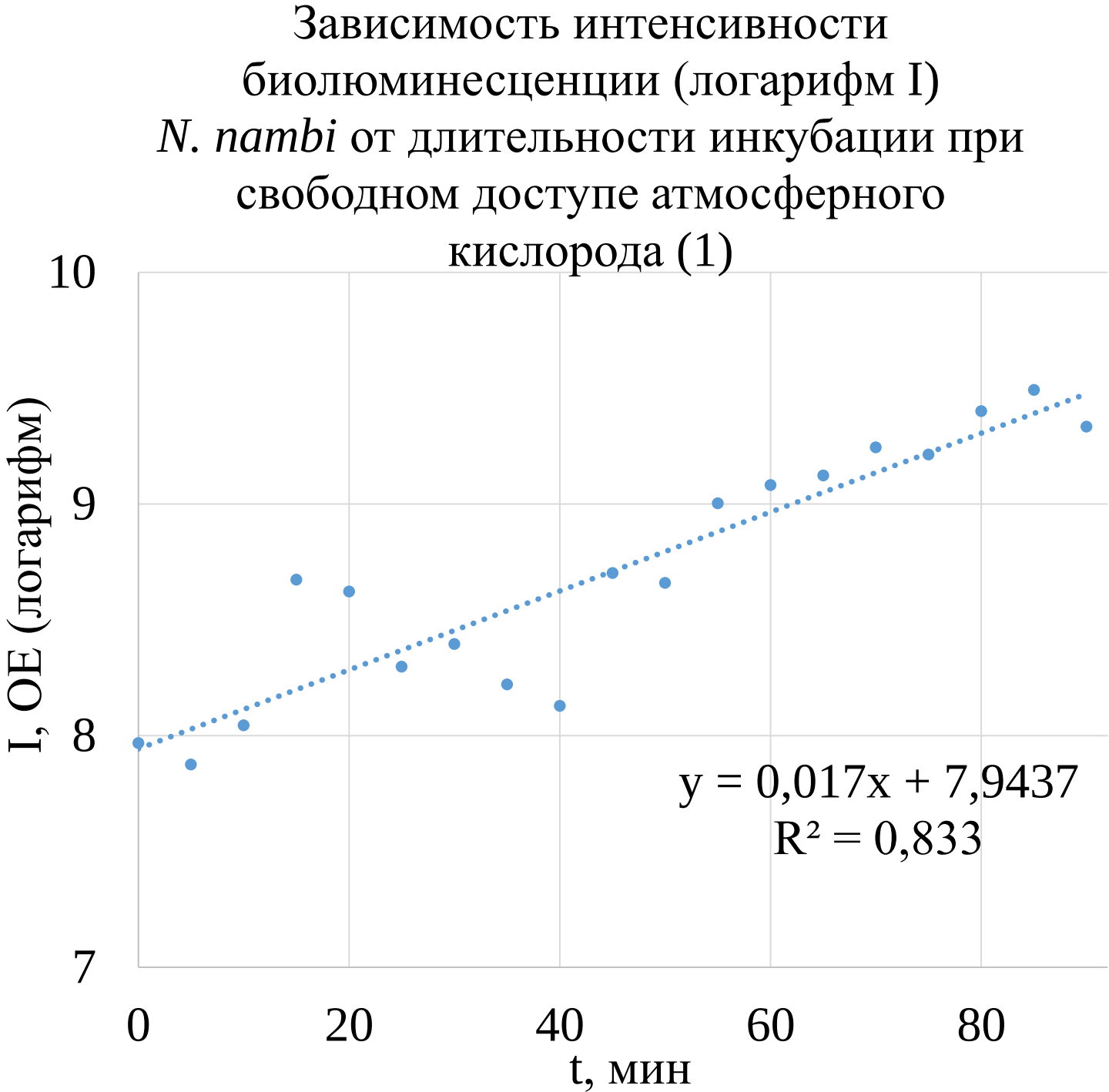


Влияние pH на рост мицелия
O.olearius на МА

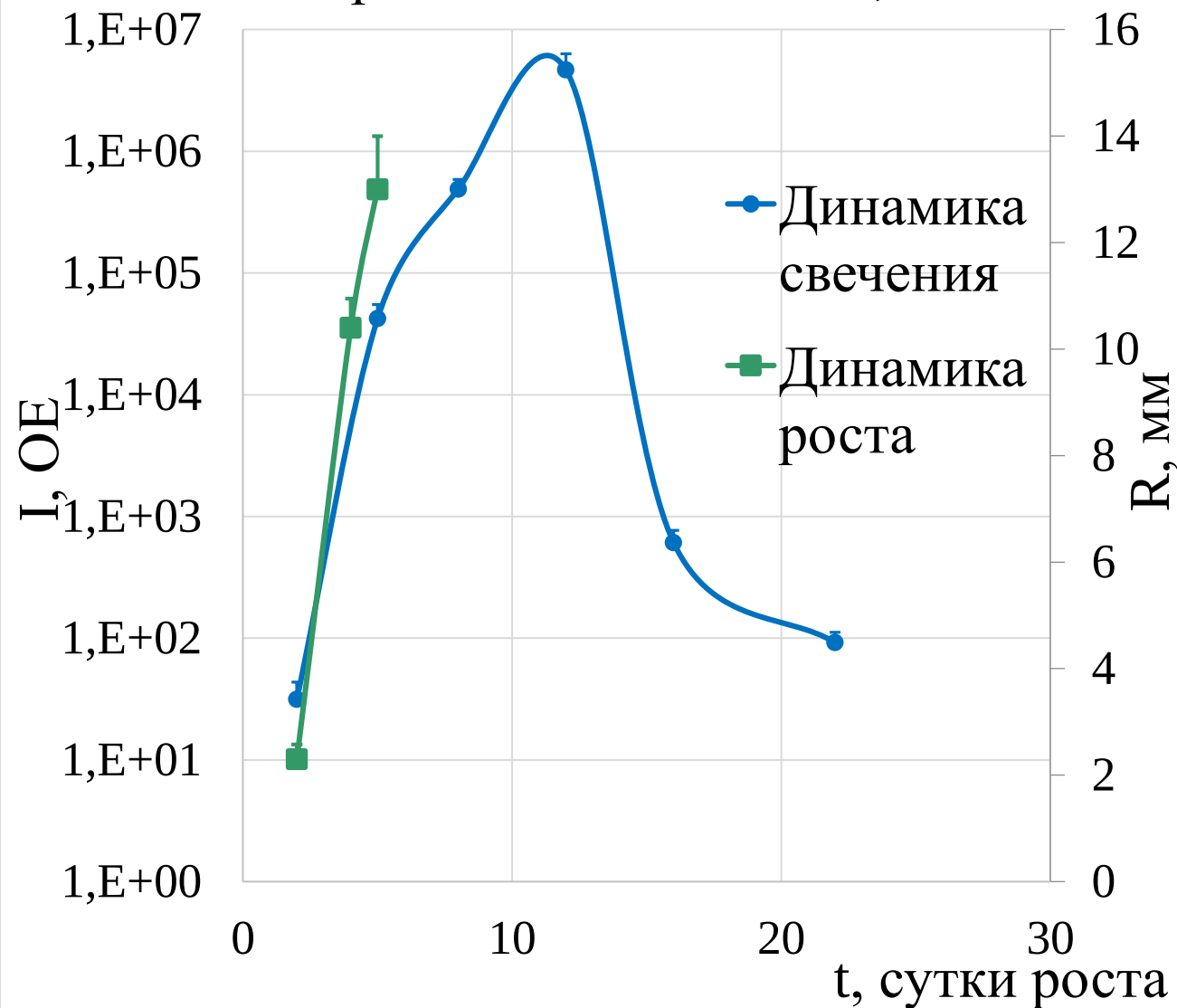


Кажущиеся константы скорости
реакции первого порядка

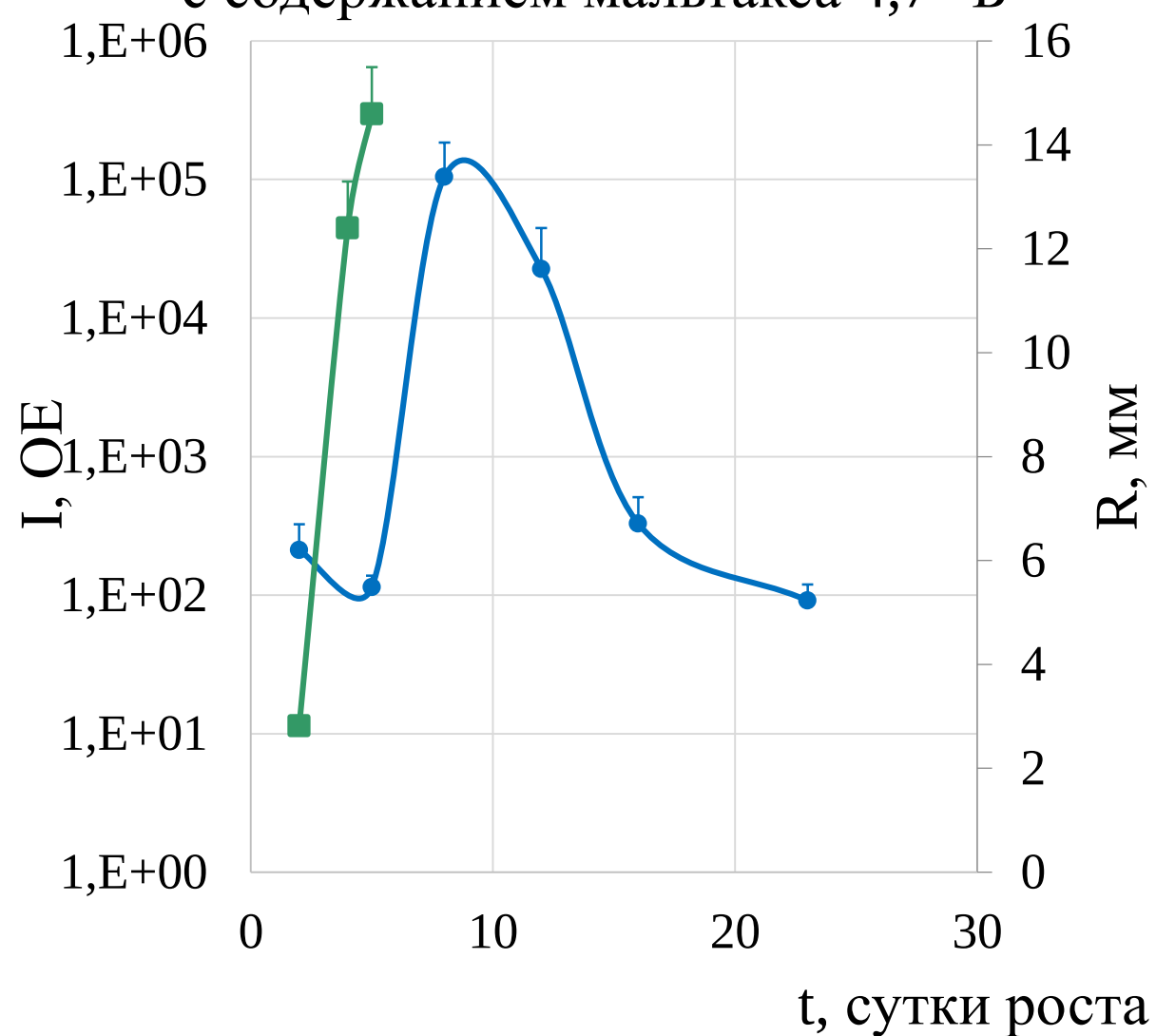
<i>F. manipularis</i>	0,01
<i>O. olearius</i>	0,03
<i>N. nambi</i>	0,02
<i>P. luminescens</i>	0,09



Динамика свечения *O.olearius* на МА
с содержанием мальтакса 3,3 °Б

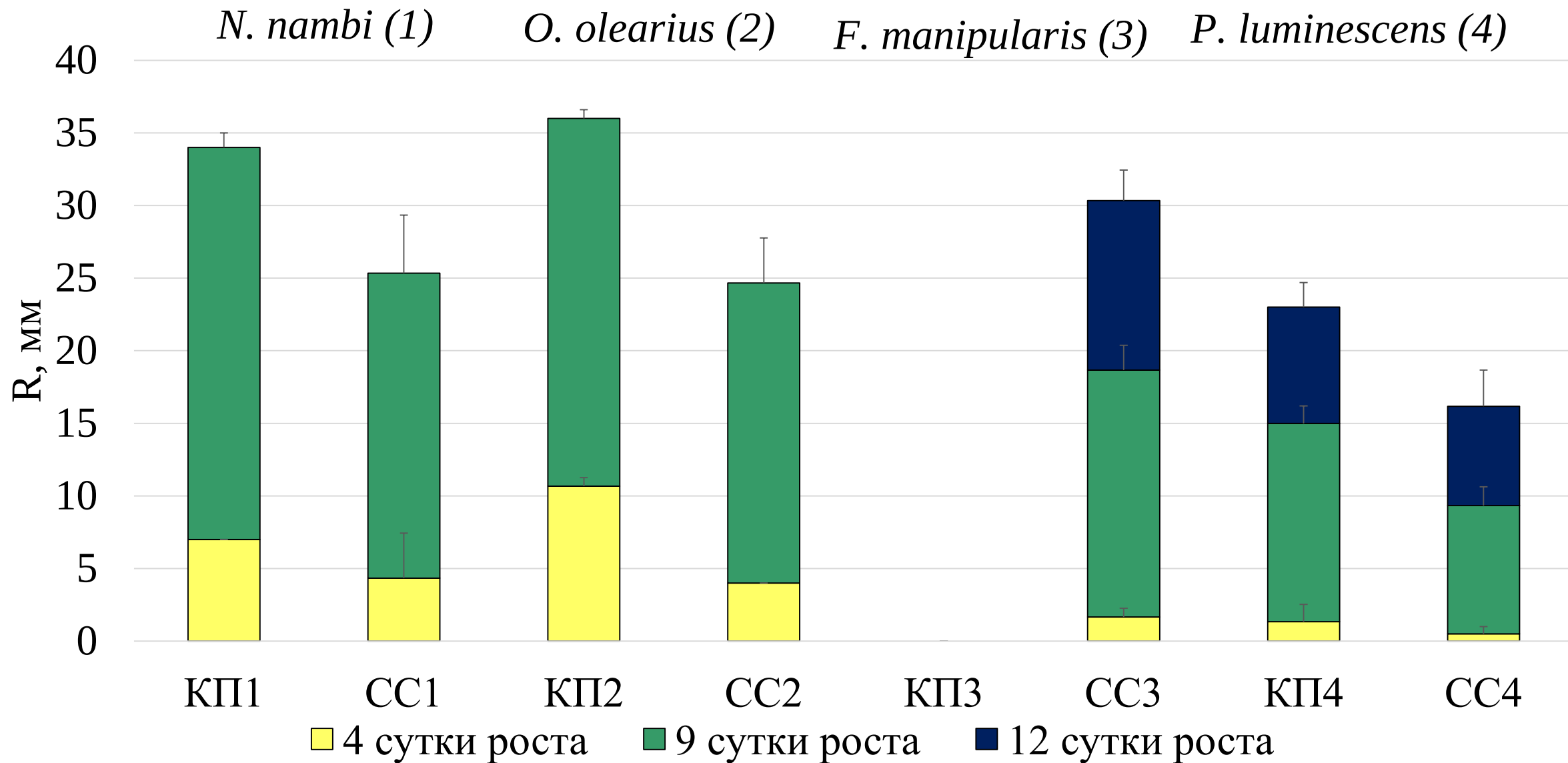


Динамика свечения *N.pambii* на МА
с содержанием мальтакса 4,7 °Б

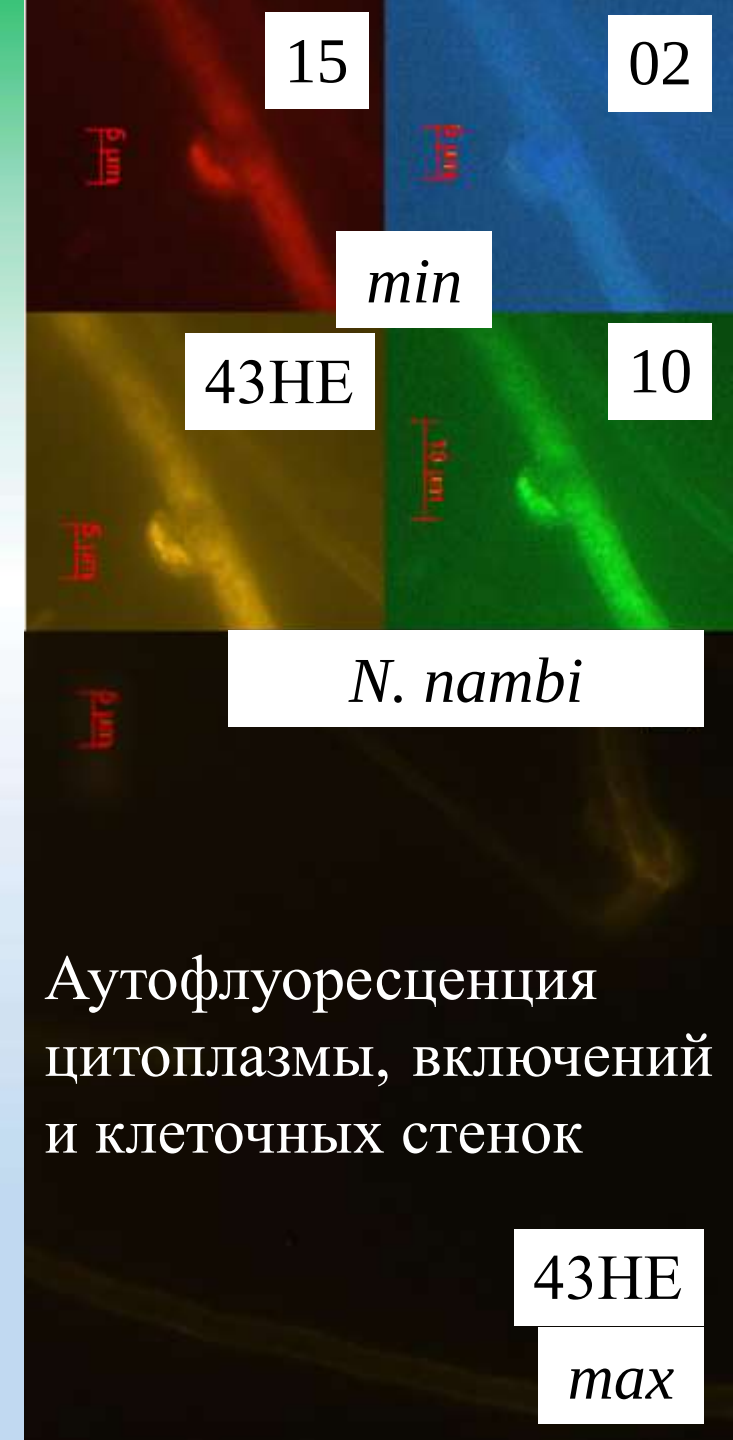
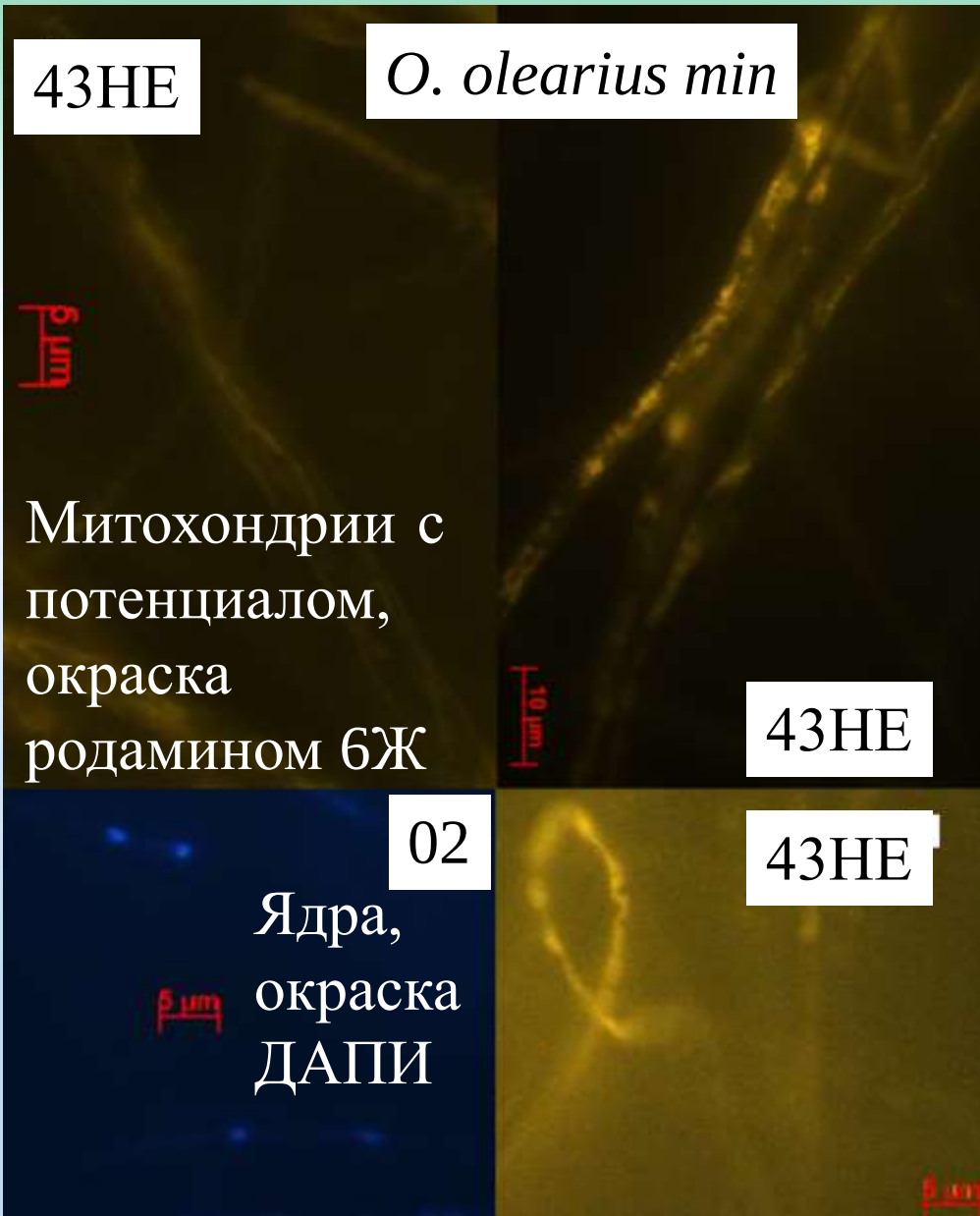


Максимум световой эмиссии на **8** сутки роста для *N. pambii* (все выборочные концентрации), на **5** (2°Б) либо **12** (3,3 и 4,7 °Б) сутки роста для *O. olearius*.

Динамика роста билюминесцентных грибов на МА после периода хранения в криопробирках (КП) и пробирках со скошенной средой МА (СС)



Результаты: световая микроскопия



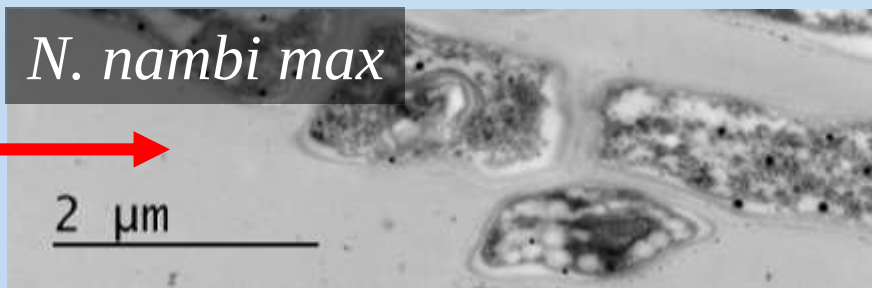
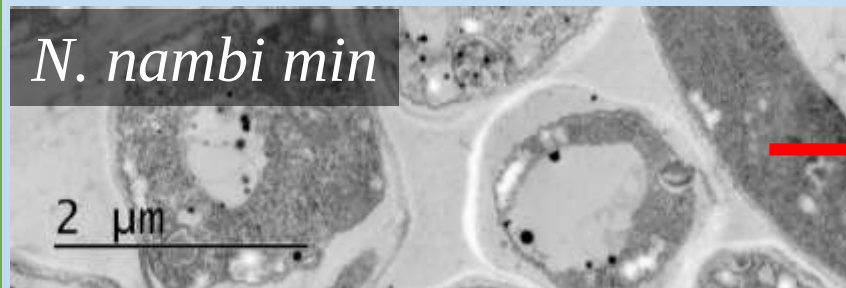
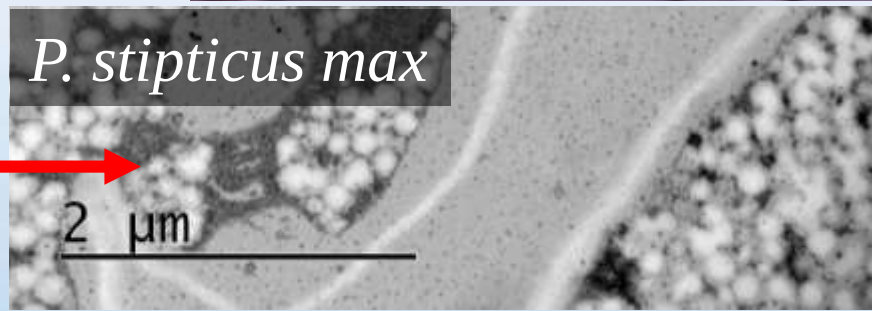
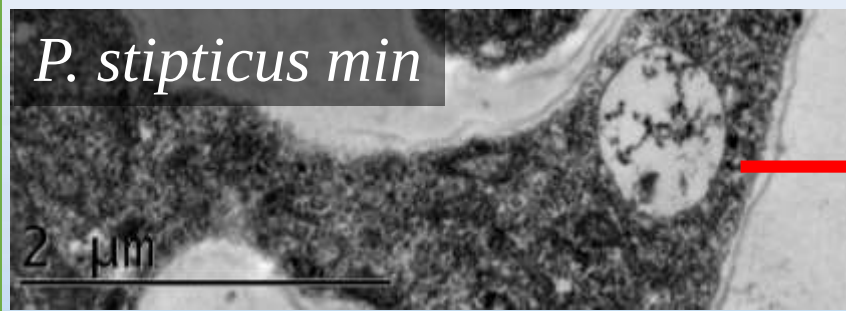
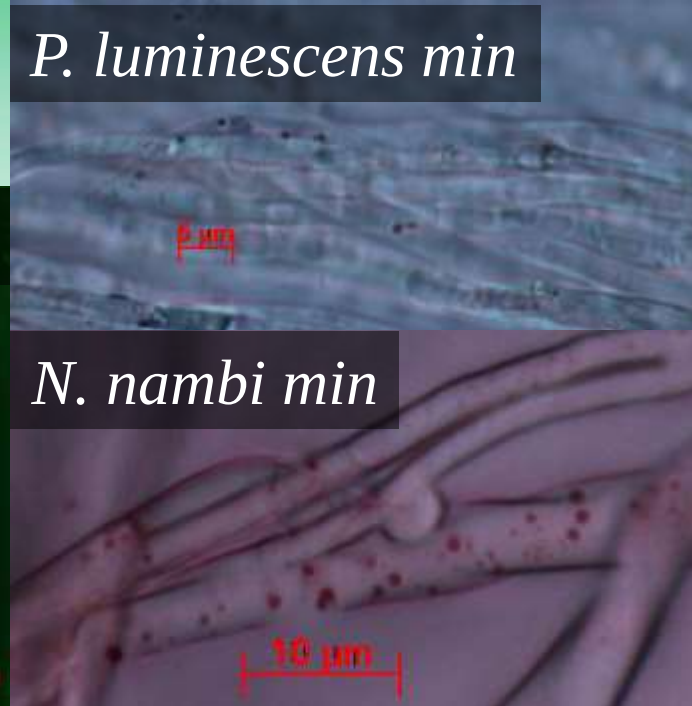
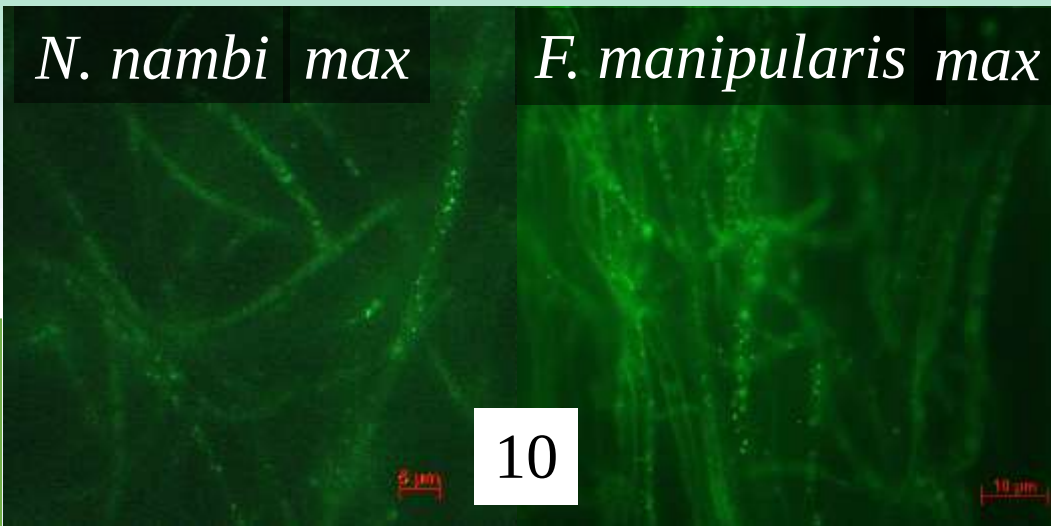
Результаты: световая и просвечивающая электронная микроскопия

Нейтральные липиды, окраска
нильским красным →

Полифосфаты, окраска
нейтральным красным →

Увеличение количества
липид-подобных включений

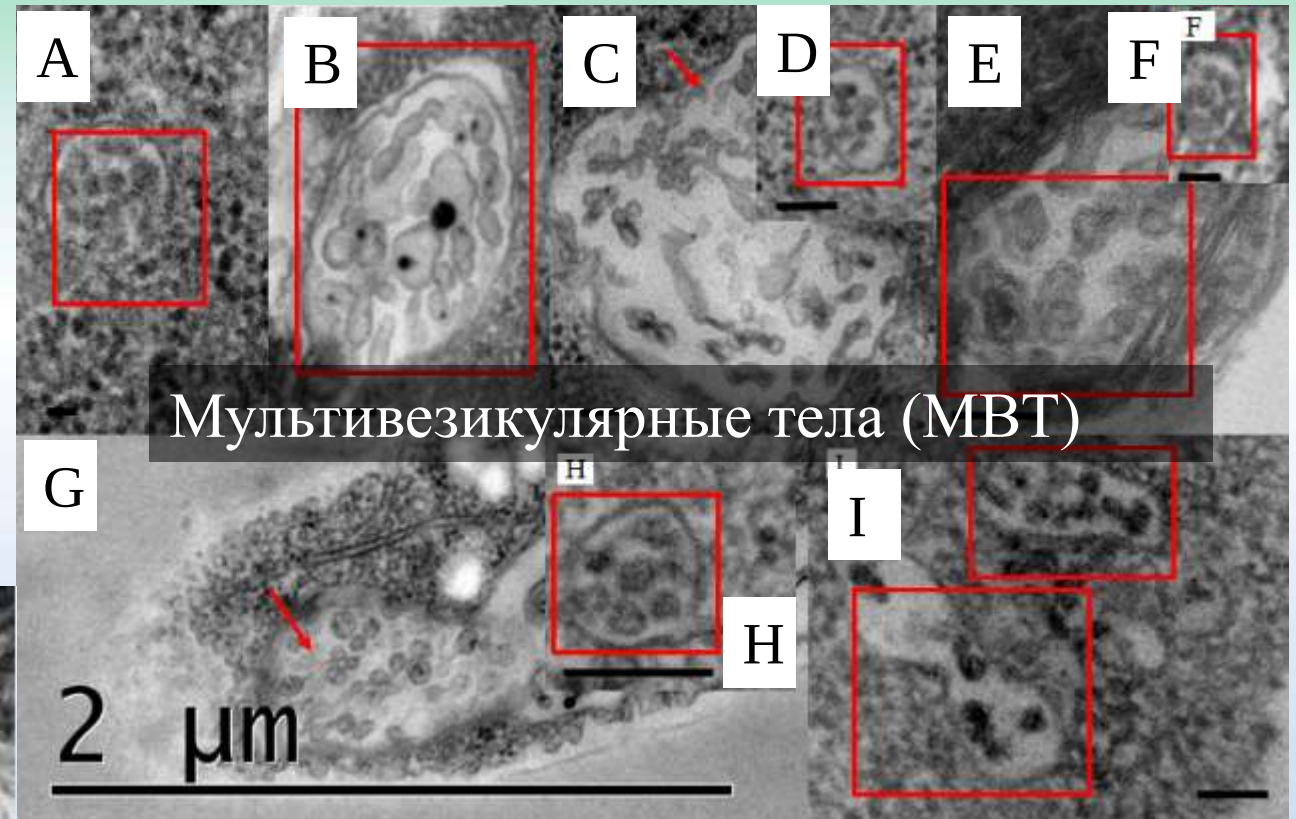
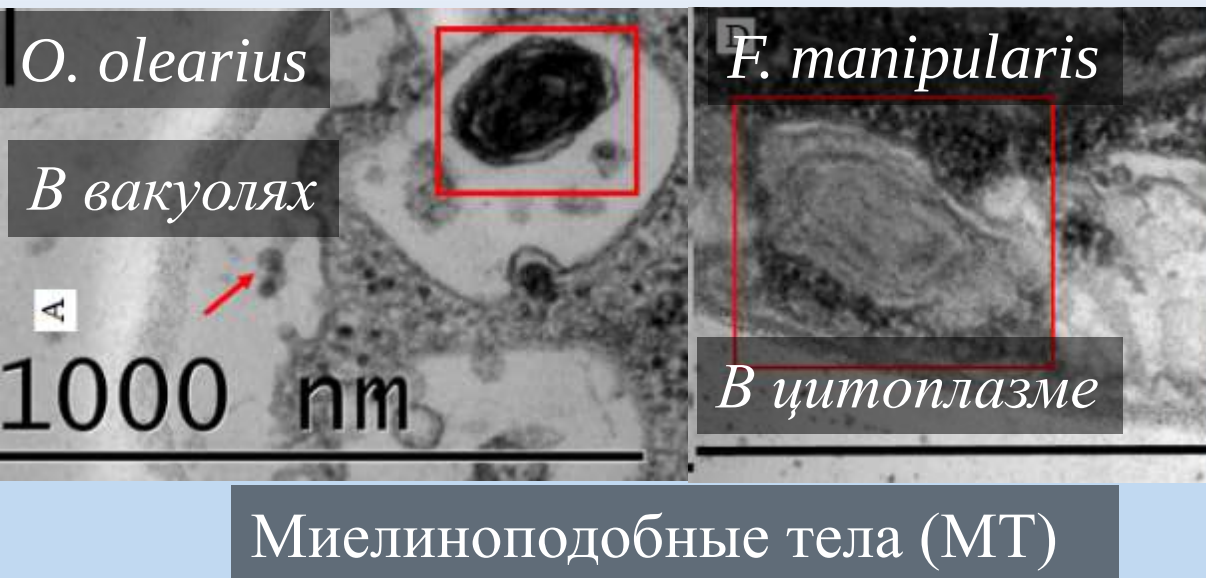
<i>F. manipularis</i>	В 3,4 раза (на 29%)
<i>N. nambi</i>	В 2 раза (на 9%)
<i>O. olearius</i>	-
<i>P. luminescens</i>	В 6 раз (на 35%)
<i>P. stipticus</i>	В 7,2 раза (на 56%)



Результаты: просвечивающая электронная микроскопия

Изменение доли клеток, содержащих мультивезикулярные и миелиноподобные тела со временем (%)

	MBT	MT
<i>P. luminescens</i>	+27	+24
<i>N. nambi</i>	+21	+35
<i>O. olearius</i>	+11	+13
<i>F. manipularis</i>	-11	-23
<i>P. stipticus</i>	-59	-26



A, B – *N. nambi*, C, D – *O. olearius*, E, F – *P. stipticus*, G, H – *F. manipularis*, I – *P. luminescens*. Масштабный отрезок 100 нм (A- F, H- I), 2 мкм (G).

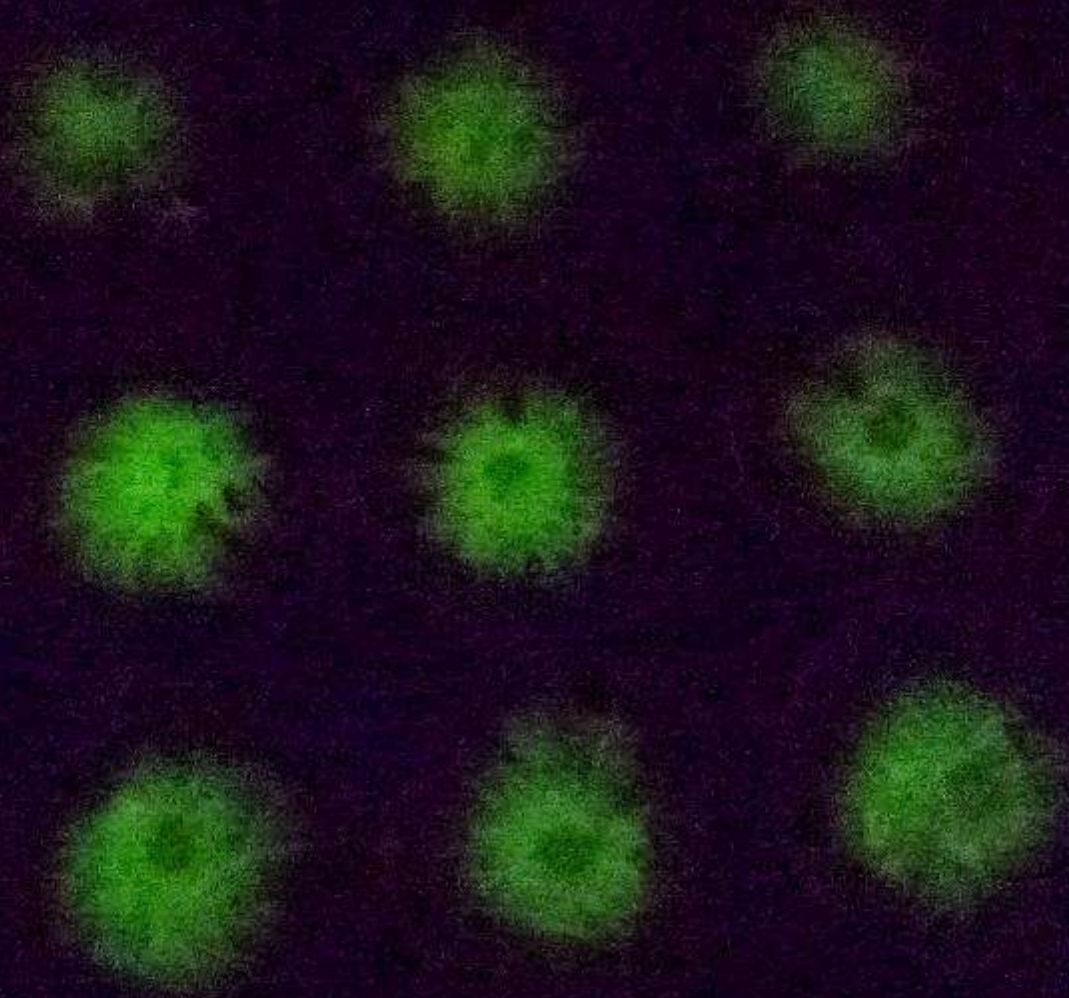
Выводы

- ❖ Наиболее благоприятные условия культивирования для роста, развития воздушного мицелия и биолюминесценции оказались сходными для всех исследуемых штаммов: температура **25°C**, **pH 4** (цитратный буфер), среда **мальт-агар** (4,7 °Б для *N. pambí* и 3,3 °Б для других видов).
- ❖ Развитие биолюминесценции разных видов во время инкубации при свободном доступе атмосферного кислорода происходит с **близкими по величине кинетическими константами**, т.е. скорости нарастания их свечения также сходны. Исключение – *P. luminescens*, обладающий наиболее высокой интенсивностью свечения.
- ❖ Цикл свечения составляет около **30** дней для *N. pambí*, *O. olearius* и более **85** дней для *P. luminescens*, с максимумом световой эмиссии в период между **5 и 12** сутками роста для *N. pambí*, *O. olearius* и минимумами в начале (**1-3** сутки роста) и конце цикла.
- ❖ Хранение в **криопробирках** под стерильной водой более оптимальный способ хранения для всех видов, за исключением *F. manipularis*, для которой рекомендуется хранение в пробирках на скошенной среде мальт-агар при комнатной температуре.

Выводы

- ❖ Между грибами двух разных эволюционных линий не было обнаружено значительных отличий в физиологии, за исключением **скорости роста**, которая была выше у представителей линии *Omphalotus* при 25 °C (мальт-агар, картофельно-глюкозный агар). Таким образом, схожая трофика и природные условия обитания имеют в данном случае больший вес, чем систематическое положение.
- ❖ Грибы двух эволюционных линий различались по **локализации аутофлуоресценции** и по **основному запасному веществу**. Внутриклеточная аутофлуоресценция и накопление полифосфатов было характерно для грибов линии *Omphalotus*, а свечение внеклеточных секреторных структур и накопление большого количества липидов для грибов линии *Mycenoid*.
- ❖ Сравнительный анализ ультраструктуры мицелия грибов в двух временных точках показал увеличение доли клеток, содержащих **мультивезикулярные и миелиноподобные тела**, с увеличением уровня световой эмиссии для светящихся штаммов и уменьшение для несветящегося штамма *P. stipticus* и утратившего свечение *F. manipularis*, что может свидетельствовать о возможном участии в процессе биолюминесценции **эндомембранных структур**.

Спасибо за внимание!



Культуры
P. luminescens на
16 сутки роста
на МА
Фотограф:
Арзамасцева В.О.