



*МГУ имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии*

Перебоев Дмитрий Дмитриевич

*Научный руководитель:
к.б.н. Е.Н. Бубнова*

ЛАБИРИНТУЛОМИЦЕТЫ ДОННЫХ ГРУНТОВ ПРОЛИВА ВЕЛИКАЯ САЛМА БЕЛОГО МОРЯ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Цели и задачи:

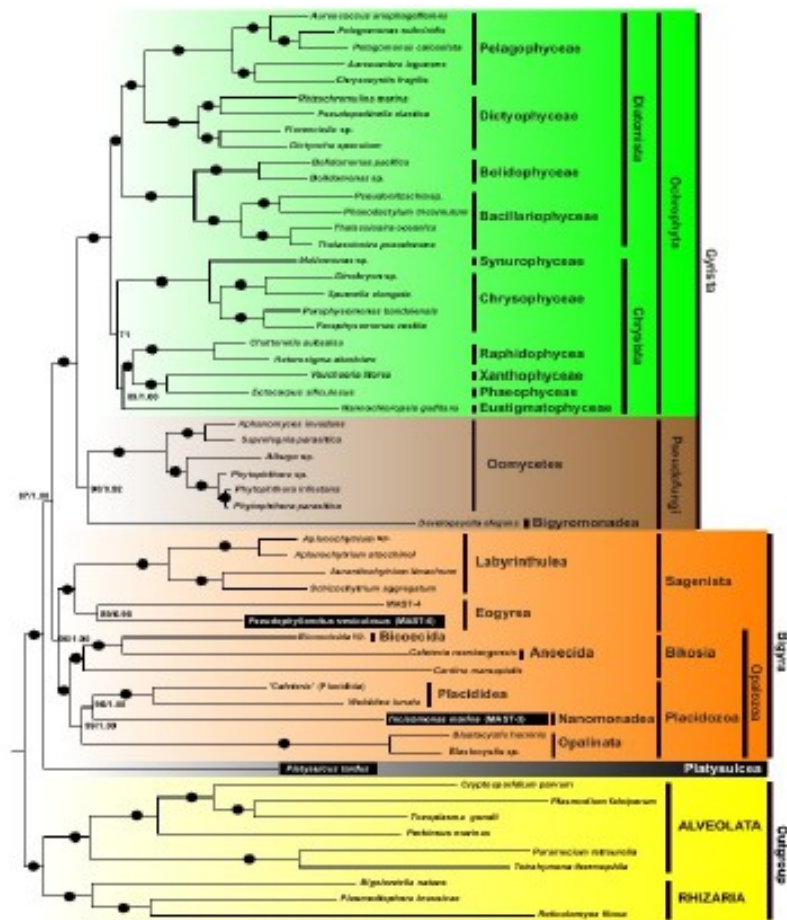
- **Цель работы:** изучение разнообразия лабиринтуломикетов донных грунтов пролива Великая Салма Белого моря.
- **Поставленные задачи:**
 - 1) Провести отбор проб грунта литоральной и сублиторальной зоны пролива Великая Салма Белого моря.
 - 2) Создать и поддерживать коллекцию чистых культур лабиринтуломикетов, выделенных из указанных проб.
 - 3) Подготовить образцы для секвенирования в специализированной лаборатории: наработать биомассу, экстрагировать тотальную ДНК, амплифицировать участок 18S rDNA.
 - 4) Провести молекулярную идентификацию изолированных штаммов по полученным данным.

Место лабиринтуломицетов среди эукариот:

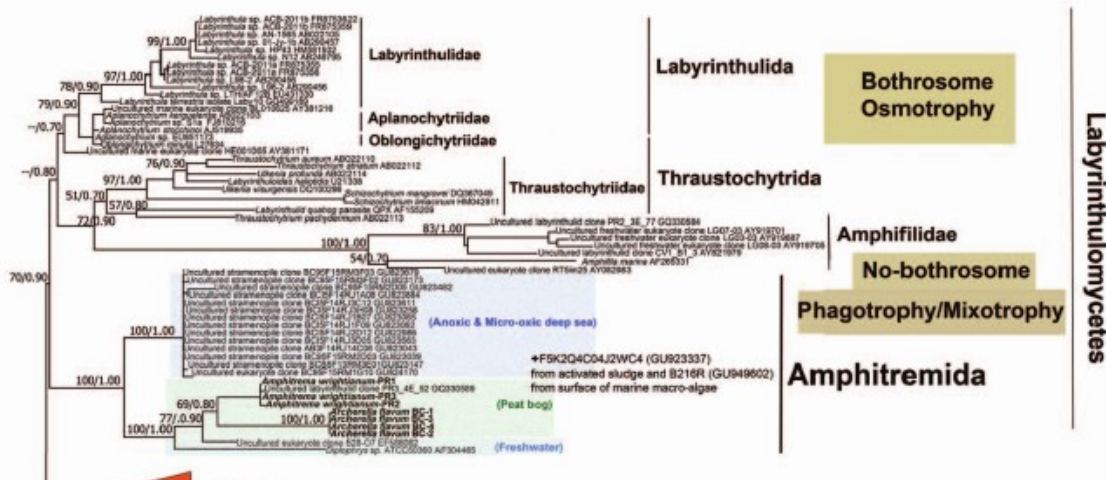
All these taxa are treated here under ICZN, not IBN, as none of them is a fungus or alga and they belong in the purely heterotrophic plastidless phylum Bigyra. Their closest relatives are the phagotrophic zooflagellate subphylum Opalozoa (recently revised to include Bicoecia: Cavalier-Smith and Scoble in press), and it is best to treat all Bigyra under ICZN for uniformity across the whole phylum and because ICZN does not intrusively recommend suffixes like -phyceae, -mycetes or -mycota that wrongly suggest that Labyrinthulea are algae or fungi.

Anderson et Cavalier-Smith 2012

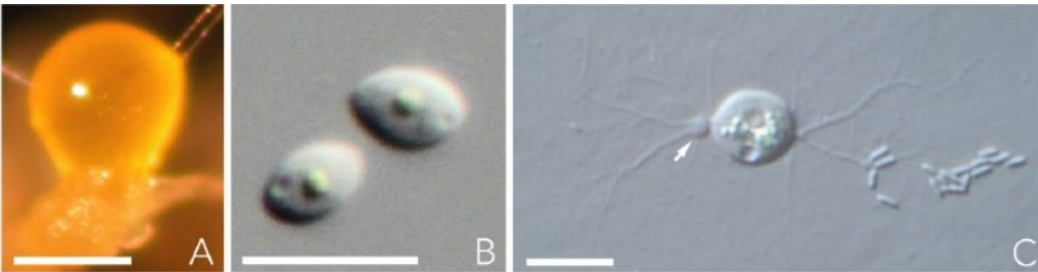
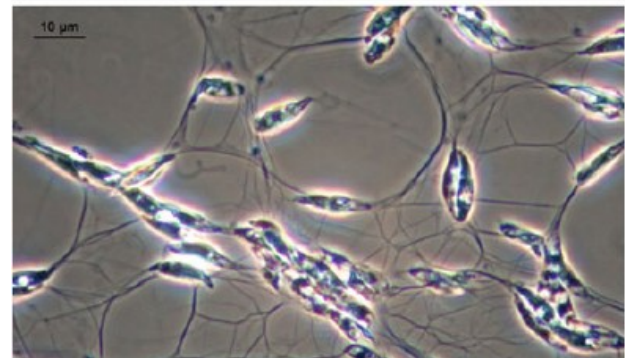
Лабиринтуломицеты - амбигрегальная группа гетероконтных эукариот, рассматриваемая разными исследователями как “животные” (ICZN), как “грибы” или как “водоросли” (ICN).



Разнообразии лабиринтуломитетов:



Филогения лабиринтуломитетов согласно Goma et al. 2013.



Sorodiplophrys stercorea.
Пример диплофриз-подобной морфологии (из Tice et al. 2016)

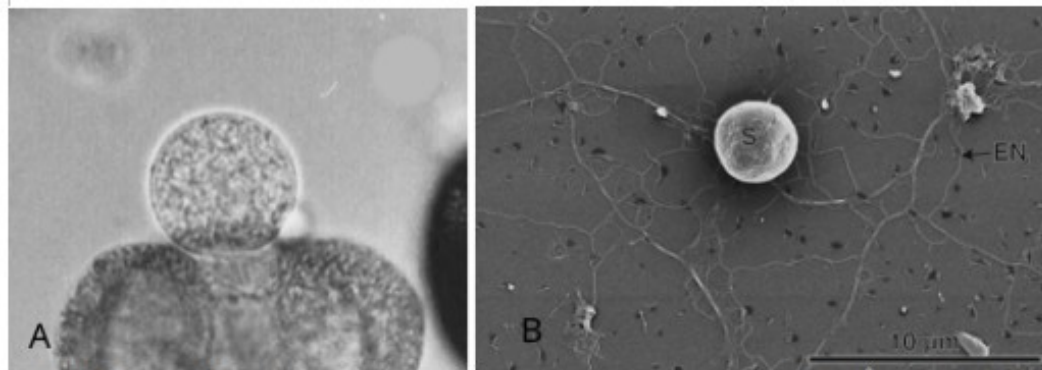
Траустохитридный (сверху) и лабиринтулидный (снизу) морфотип (из Raghukumar 2017).

Thraustochytriidae



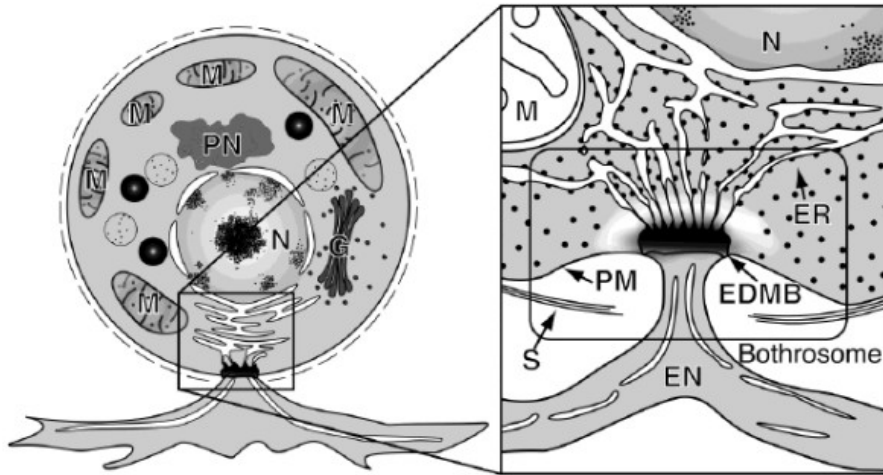
Зооспора траустохитрид.
AF - передний жгутик,
PF - задний жгутик (по
Bennett et al. 2017).

- Самое крупное семейство лабиринтуломицетов (описано около 35 видов). В Белом море известно 17 видов (всего там отмечено 22 вида лабиринтуломицетов).
- Важный компонент морских и эстуарных экосистем.
- Перспективный объект для биотехнологии (в первую очередь, как продуцент PUFA).

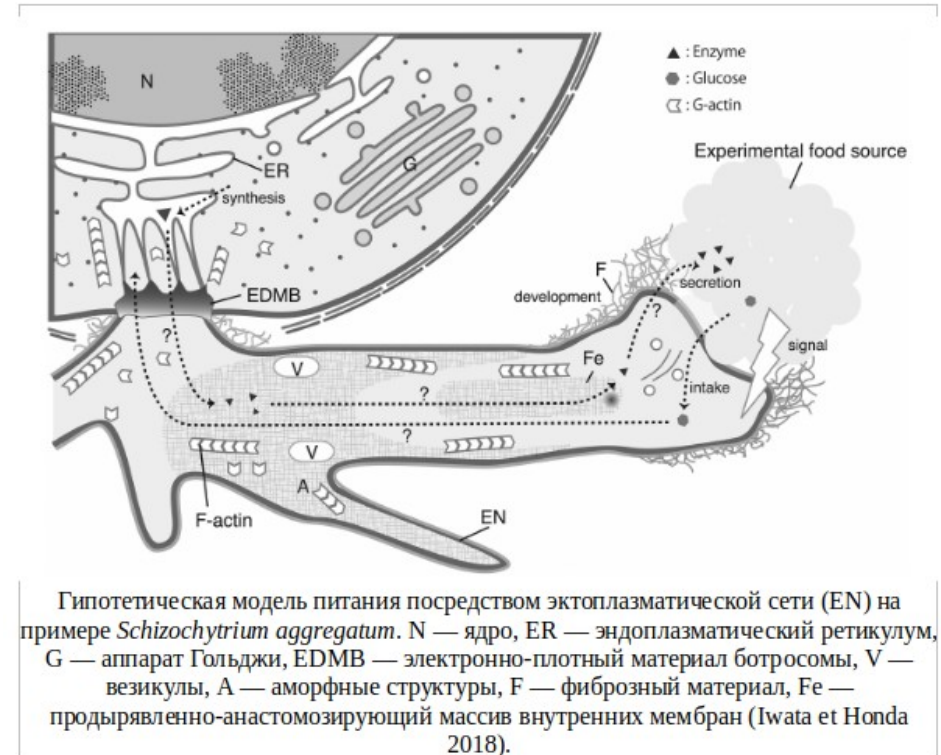


A) *Thraustochytrium gaertnerium* на пыльце сосны (Bongiorni et al. 2005).
B) *Schizochytrium aggregatum* (СЭМ) S - спорангий, EN -
эктоплазматическая сеть (Iwata et Honda, 2018).

Особенности биологии траустохитрид:



Таллом траустохитрид. N — ядро, PN — парануклеарное тело, M — митохондрии, G — аппарат Гольджи, ER — эндоплазматический ретикулум, EDMB — электронноплотный материал ботросомы, PM — плазматическая мембрана, S — чешуйки, EN — эктоплазматическая сеть (Iwata et al., 2017).



Гипотетическая модель питания посредством эктоплазматической сети (EN) на примере *Schizochytrium aggregatum*. N — ядро, ER — эндоплазматический ретикулум, G — аппарат Гольджи, EDMB — электронно-плотный материал ботросомы, V — везикулы, A — аморфные структуры, F — фиброзный материал, Fe — продырявленно-анастомозирующий массив внутренних мембран (Iwata et Honda 2018).

Отбор проб:

- Метод приманок
 - Малое количество грунта вносится в пробирку со стерильной морской водой, куда добавляется стерилизованная пыльца сосны
 - Спустя некоторое время (обычно около 7-9 суток), зерна пыльцы с талломами лабиринтуломицетов переносятся на твердую среду
- Суммарно 80 попыток выделения с помощью приманок. Вероятность удачи ~80%.
- Очистка колоний с помощью пересевов и методом штриха



- Во всех точках были собраны сублитеральные (глубина 7-9 м) пробы; в точках 3 и 5 также литеральные
- Пробы были смешанными и отбирались вручную с поверхностных слоев грунта

Коллекция культур:

- **Выделение**

- ВУ+ (пептон, дрожжевой экстракт — по 1 г/л, глюкоза — 5 г/л), на беломорской воде (25 ppt), 1.2% агар, с добавлением В12 (1.5 мкг/л)
- Цефтриаксон 400 мг/л, Гентамицин 65 мг/л, Амфотерицин В (фунгицид) 1.5 мг/л

- **Хранение**

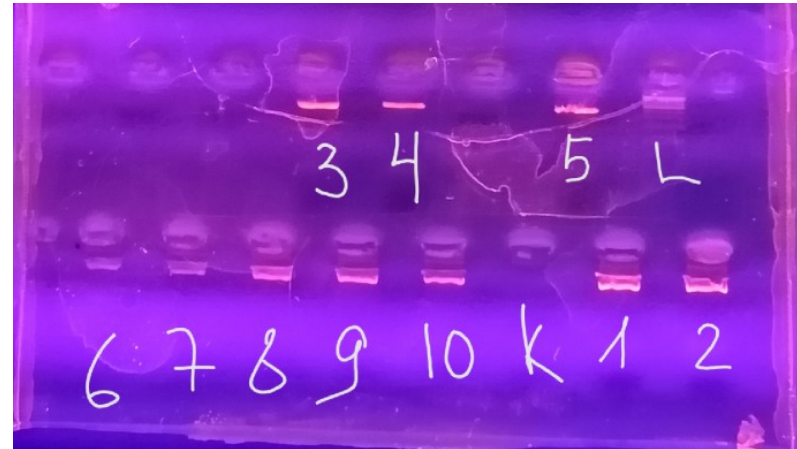
- ВУ+ на 50% искусственной морской воде, 1% агар, с добавлением В12 (1.5 мкг/л)
- Цефтриаксон 300 мг/л
- В темноте, при комнатной температуре, пересадка каждые 3-4 (5) недель

- Изначально (в августе 2019) было выделено 49 штаммов

- К марту 2020 осталось 19 штаммов, все из которых были отправлены в следующую стадию

Подготовка к молекулярным исследованиям:

- Нарботка биомассы:
 - Фальконы с 25 мл жидкой среды ВУ+ на качалочной установке, 9 дней в темноте при комнатной температуре
 - Хранение в замороженном виде
- Экстракция ДНК:
 - DNeasy ® Plant Pro Kit
 - Механическая гомегенизация
- Праймеры:
 - 1) «18S001 / 18S13» (Honda et al. 1999)
 - 2) «LABY-A / LABY-Y» (Stokes et al. 2002)
- Условия ПЦР согласно соответствующим праймерам источникам



Выводы:

- 1) Вручную отобранные смешанные пробы грунтов литорали и сублиторали подходят для последующего выделения лабиринтуломицетов.
- 2) В результате работы по подбору оптимальных условий для выделения чистых культур лабиринтуломицетов из грунтов Белого моря была разработана следующая схема. Для первичного выделения использовалась стерилизованная пыльца сосны в качестве приманки, и агаризованная среда ВУ+ с добавлением антибиотиков (цефтриаксон - 400 мг/л, гентамицин - 65 мг/л) и фунгицида (амфотерицин В - 1.5 мг/л). Полученные колонии пересеиваются и очищаются методом штриха. Для хранения культур хорошо подходит та же среда ВУ+ но с добавлением только цефтриаксона (300 мг/л).
- 3) Успешно была произведена подготовка образцов для секвенирования. Выбранные две пары праймеров подходят для амплификации 18S rDNA участка выделенных штаммов.
- 4) Секвенирование и последующие работы не удалось провести по причине пандемии коронавирусной инфекции.



Благодарю за Ваше Внимание!