

**ПИНОЦИТОЗ У
ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА
*RHIZOSTONIA SOLANI***

ВЫПОЛНИЛА:

**СТУДЕНТКА 2-ГО КУРСА
МАГИСТРАТУРЫ**

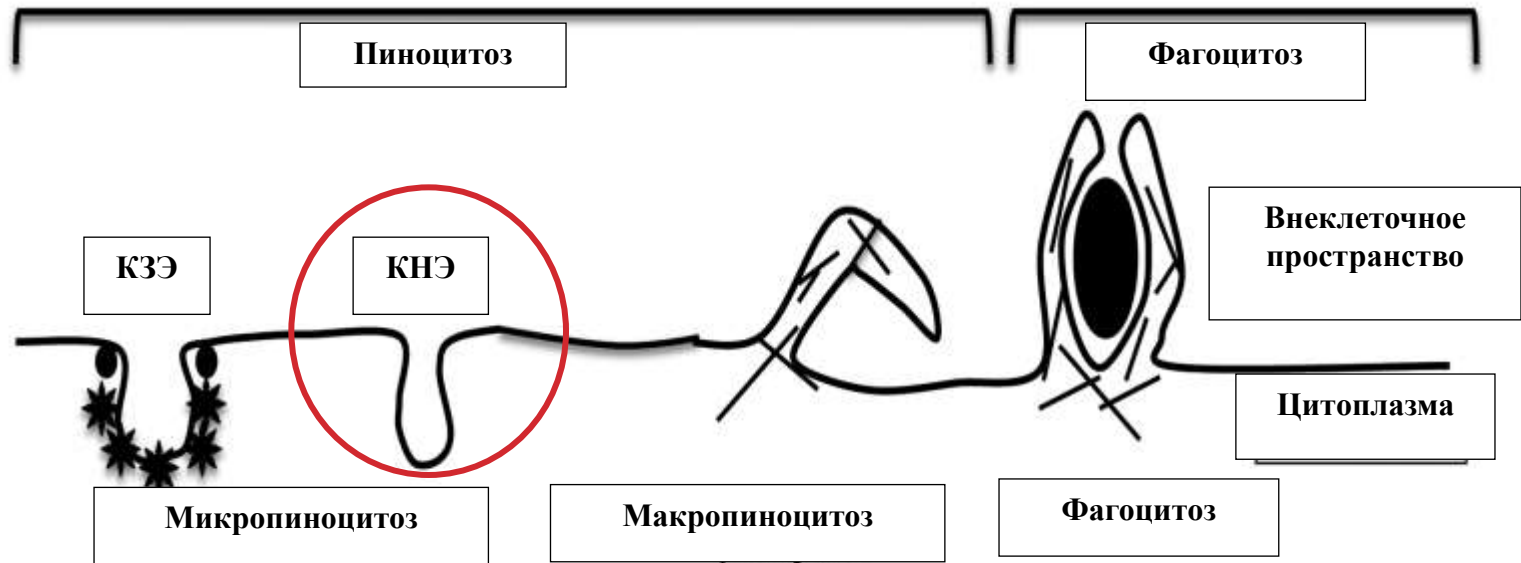
**КИСЕЛИЦА МАРИНА
АЛЕКСЕЕВНА**

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Проф. О.В. КАМЗОЛКИНА

Эндоцитоз представляет собой поглощение клеткой воды, веществ, частиц и микроорганизмов.

У мицелиальных грибов на примере *Aspergillus nidulans* описан механизм клатриннезависимого эндоцитоза (Martzoukou et al., 2017; Schultzhaus et al., 2016-2017).



КЗЭ – клатрин–зависимый эндоцитоз

КНЭ – клатрин–независимый эндоцитоз

Цель работы:

Охарактеризовать пиноцитоз *Rhizoctonia solani* в присутствии органических веществ разного спектра действия.

Задачи:

- 1.Рост и динамика поглощения мицелия *R. solani* флуоресцентного маркера эндоцитоза АМ4-64 в присутствии разных источников азота и углерода.**
- 2.Влияние ингибитора полимеризации актиновых филаментов цитохалазина D на рост мицелия и динамику поглощения клетками *R. solani* флуоресцентного маркера эндоцитоза АМ4-64.**
- 3.Скорость роста мицелия штаммов *R.solani* при разных температурах и устойчивость к фунгицидам.**
- 4.Влияние фунгицида Максим «Дачник» на динамику эндоцитоза.**
- 5.Исследование ультраструктуры клеток мицелия *R. solani* при разных условиях преинкубации в углерод-/азотсодержащих веществах, фунгициде и цитохалазине D.**

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм	Год и место сбора
(103)R13M2PT3	2013 г, Московская обл, клубень картофеля
(102) R13M2PT1	2013 г, Московская обл, клубень картофеля
(K3.3)R12S2PT3	2012 г, Смоленская обл., клубень картофеля

Влияние на поглощение флуоресцентного маркера эндоцитоза AM4-64

Времени суток утром (11:00) и вечером (20:00)
Флудиоксонил (2 мг/л)
Цитохалазин D (5, 10, 50 и 100 мкМ)
Углерод-/азотсодержащие питательные растворы

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Флудиоксонил (2 мг/л)
Цитохалазин D (10 и 100 мкМ)
Углерод-/азотсодержащие питательные растворы

Определение линейной скорости роста мицелия

Влияние температуры (10, 15, 20, 25, 30 и 35 °C)	Контроль – стандартная среда Чапекa
Флудиоксонил (2; 4; 8; 10; 100; 400 и 800 мг/л)	
Влияние цитохалазина D (5, 10, 50 и 100 мкМ)	
Влияние разных источников углерода и азота	Контроль - H ₂ O

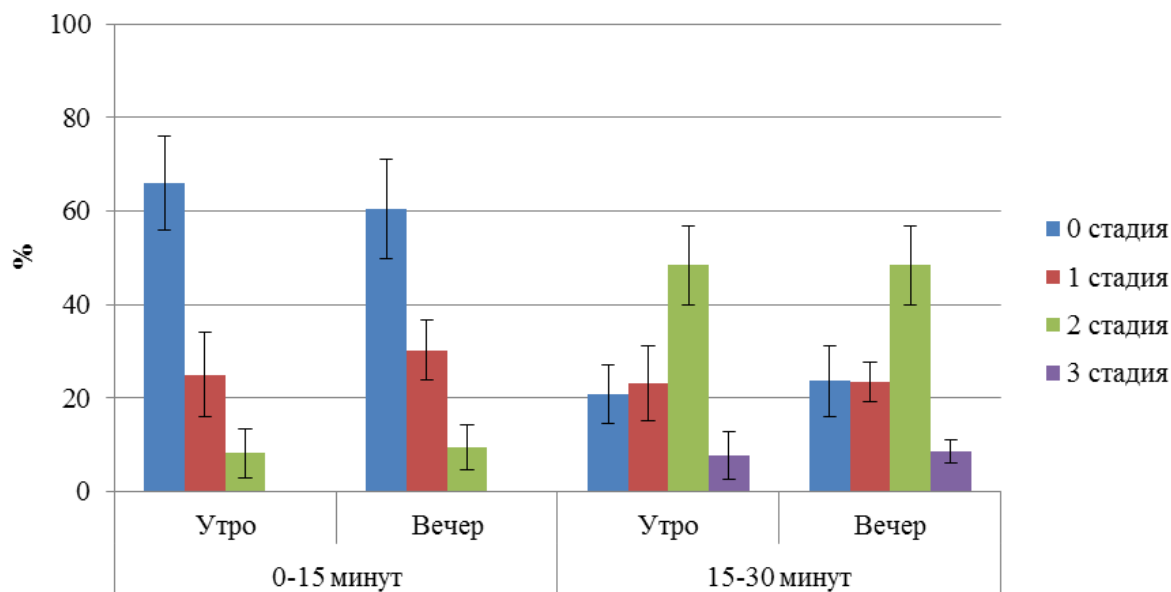
Углерод- содержащие вещества (30 г/л)	Глюкоза
	Фруктоза
	Сахароза
	Декстрин
	Декстран*
	Крахмал
	Na-КМЦ целлюлоза
Азот- содержащие вещества (10 г/л)	Маннит
	Сорбитол 0,6 М
	L-Аспарагин
	L-Фенилаланин
	Пептон
	Триптон
	Казеин
	BSA

*меченый декстран 10 кДа, конъюгирован с меткой CF488A

Влияние времени суток на динамику эндоцитоза

0 стадия

Сравнение динамики эндоцитоза *R. solani*
шт. (К 3.3)R12S2PT3 утром и вечером



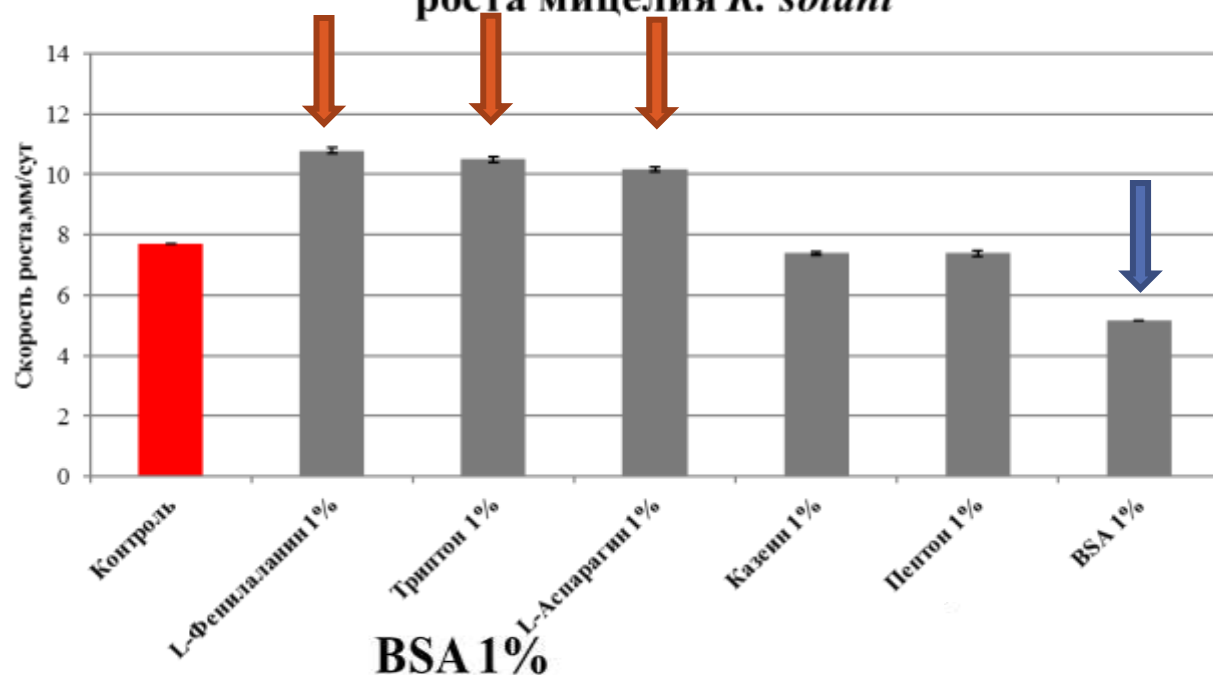
3 стадия



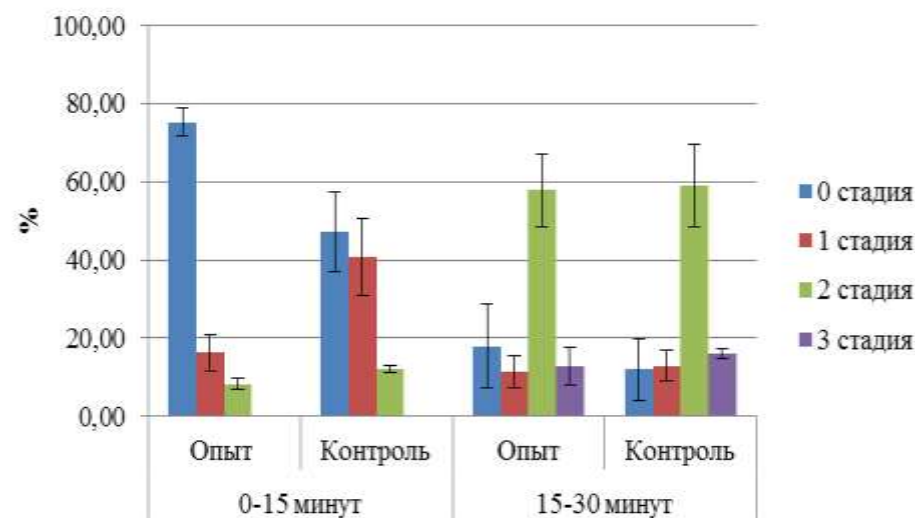
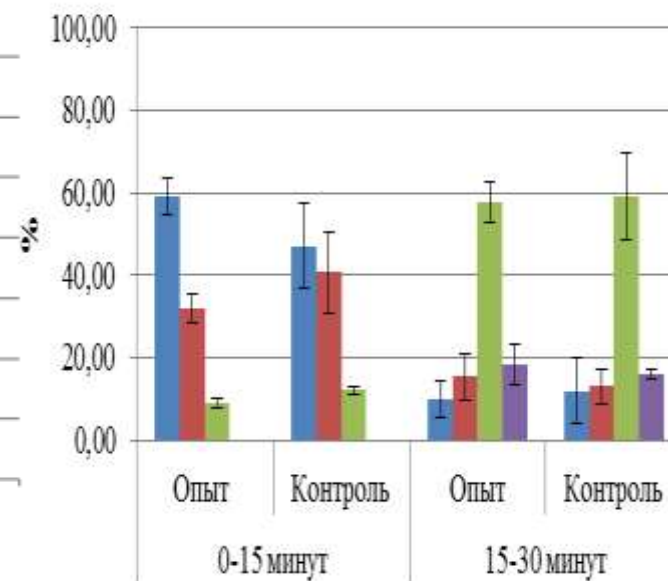
Влияние источников азота на скорость роста и динамику

ЭНДОЦИТОЗА

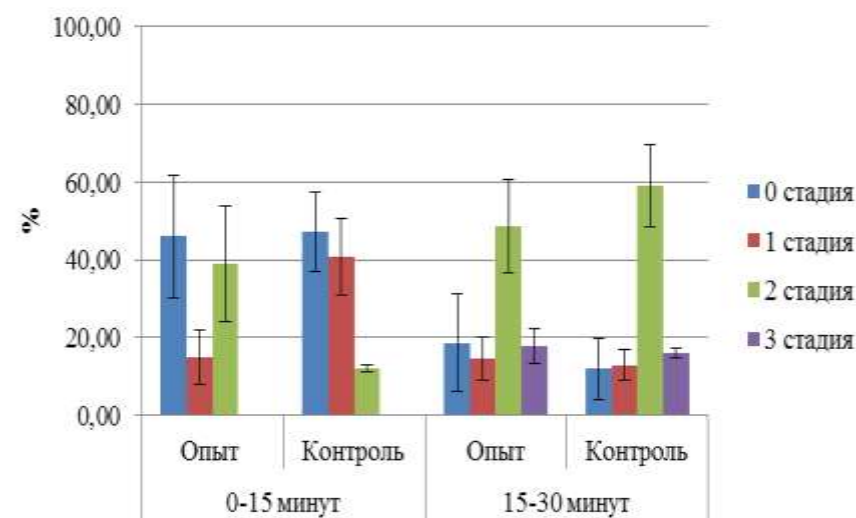
Влияние разных источников азота на скорость роста мицелия *R. solani*



L-Фенилаланин 1%

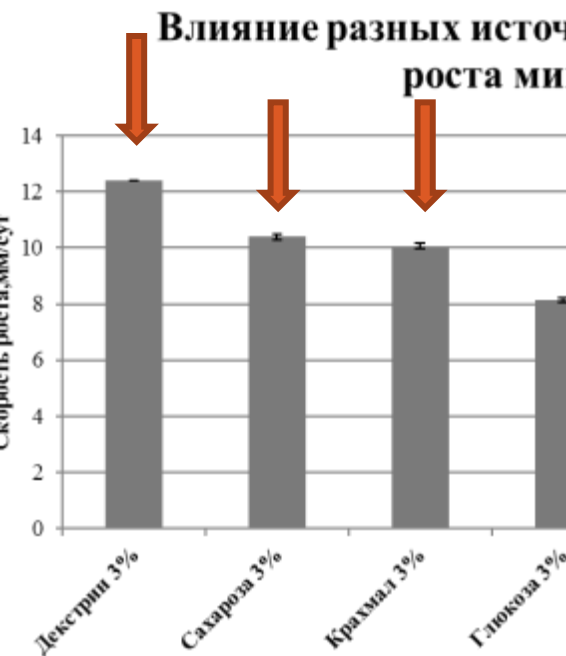


Казеин 1%

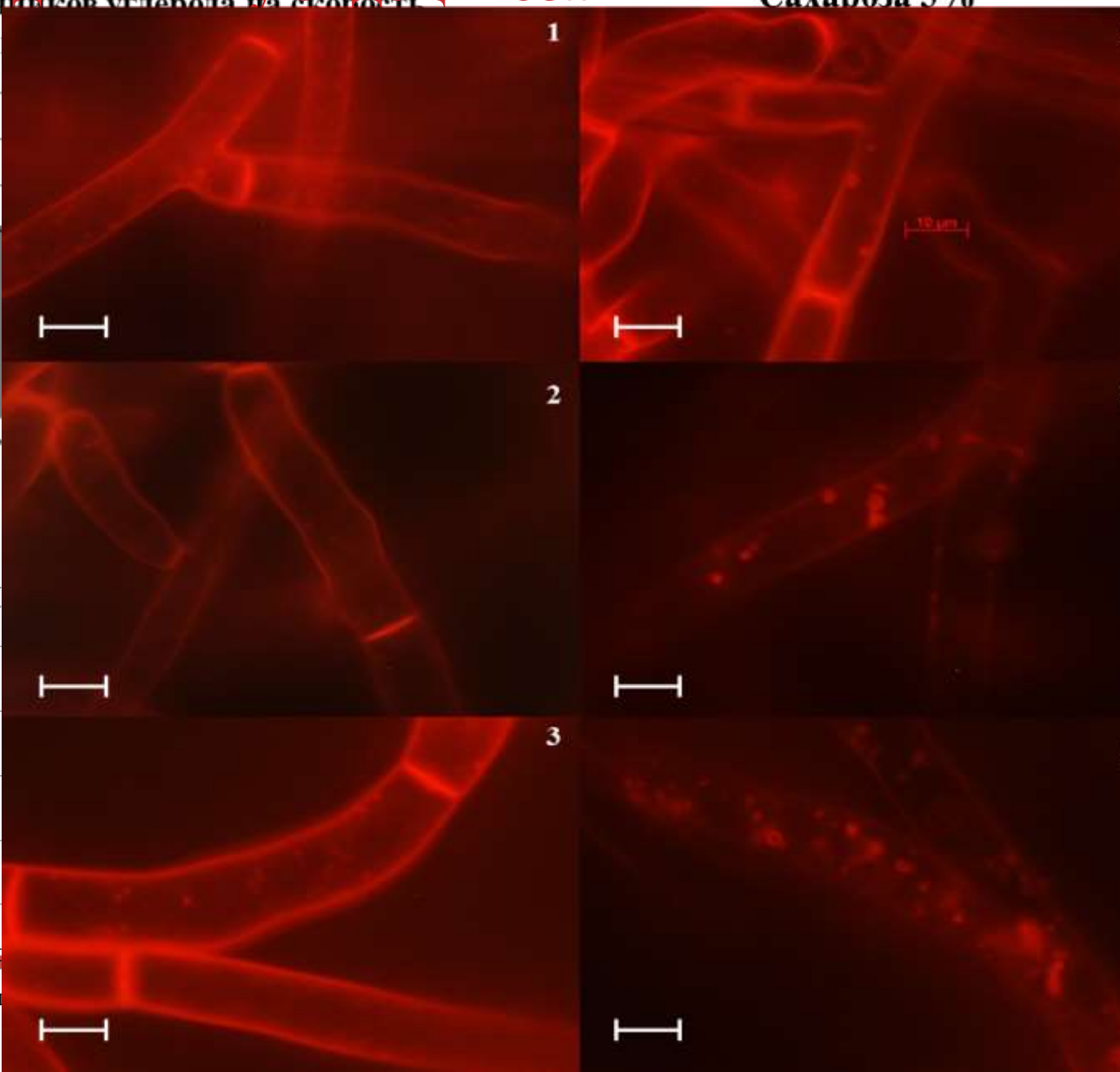
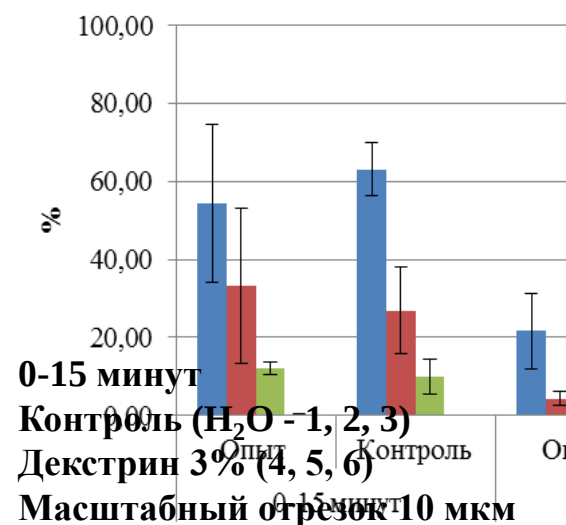


Влияние источников углерода на скорость роста и динамику эндоцитоза

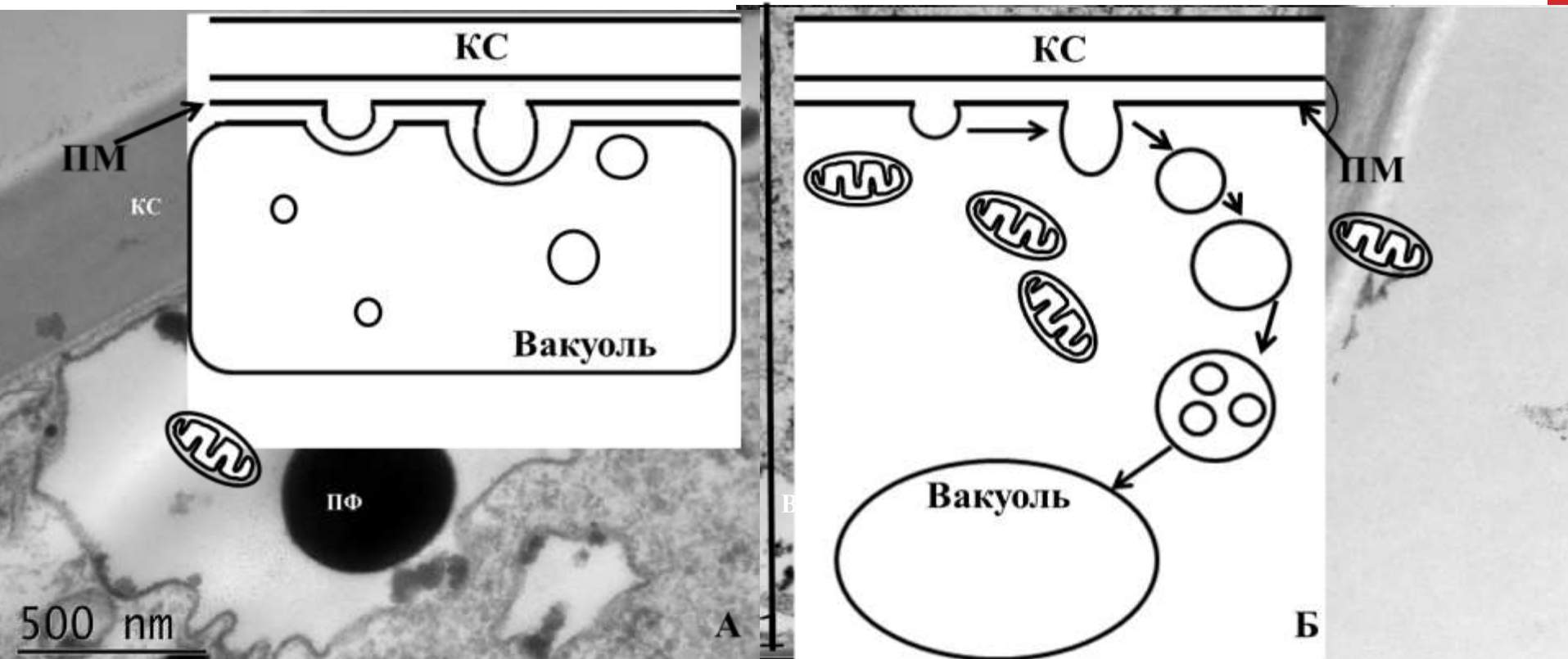
Сахароза 3%



Декстрин

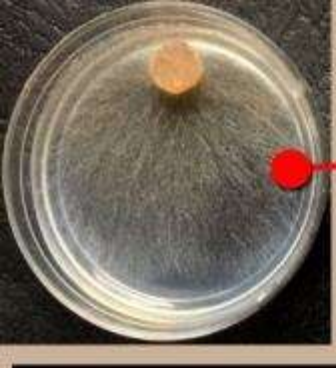


ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ С ПРЕИНКУБАЦИЕЙ В УГЛЕРОД-/АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВАХ



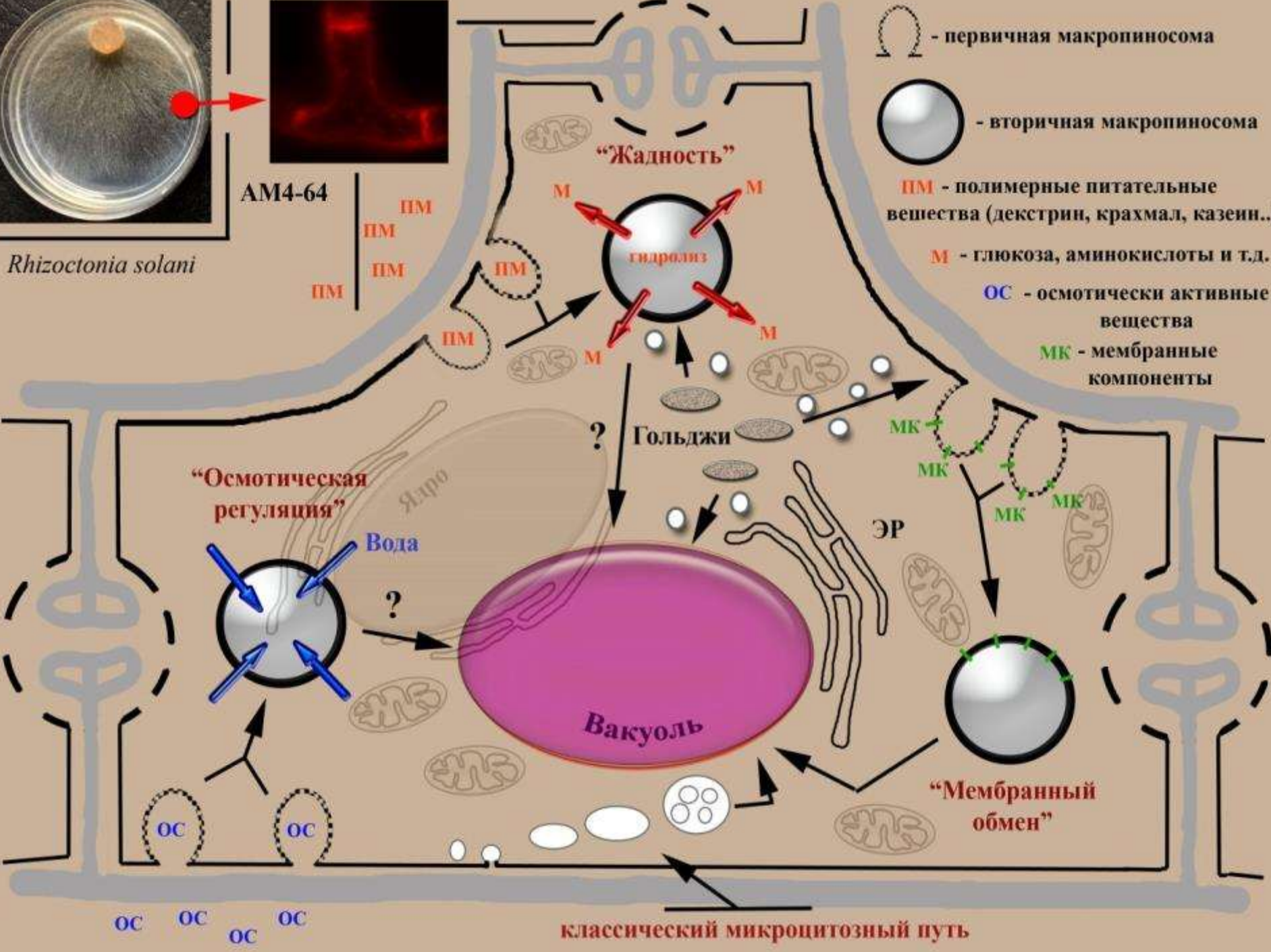
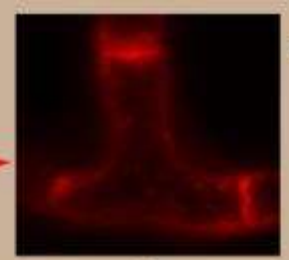
Обозначения: А – «короткий путь дегративного эндоцитоза» – стратегия, при которой вакуоль находится в пристеночной области. Б – «классический путь. Преинкубация крахмалом. Преинкубация в казеине. Обозначения: В – плазматическая мембрана, ВМ – вакуоль, ПМ – полифосфат, ПЧ – полисахаридный/гликопротеиновый чехол. клеточная стенка, ПМ – плазматическая мембран, ПФ – полифосфат, Р – рибосомы.

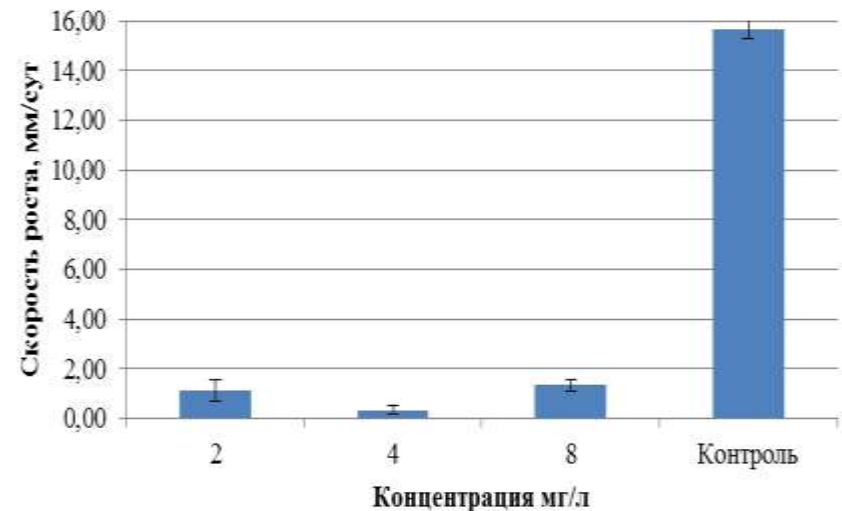
Обозначения: В – вакуоль, ВЗ – везикулы, КС – клеточная стенка, Л – липидное включение, М – митохондрия, ПМ – плазматическая мембран, ПФ – полифосфат, Р – рибосомы.



Rhizoctonia solani

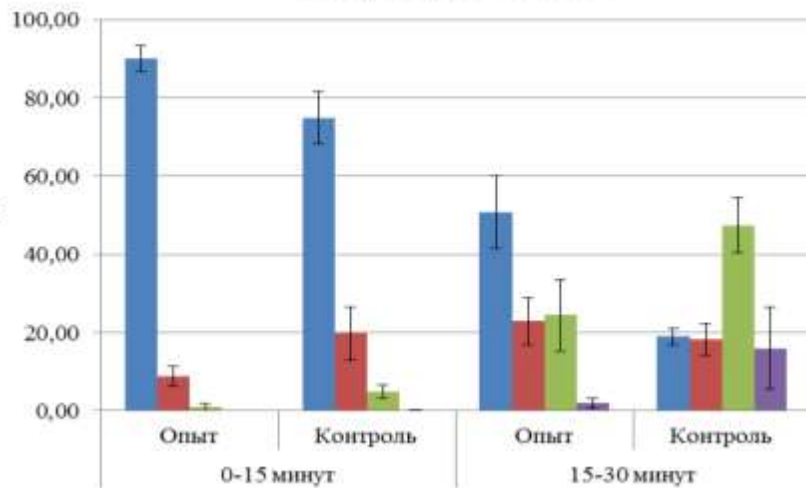
AM4-64



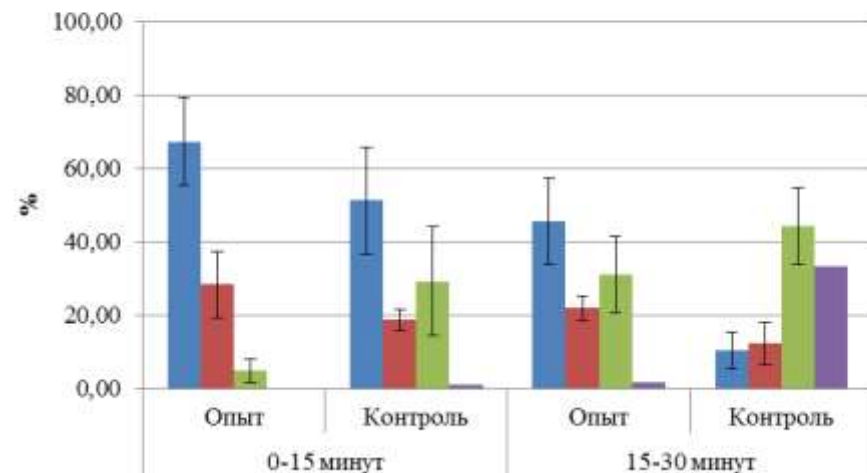


Влияние флудиоксанила на динамику эндоцитоза и ультраструктуру клеток мицелия

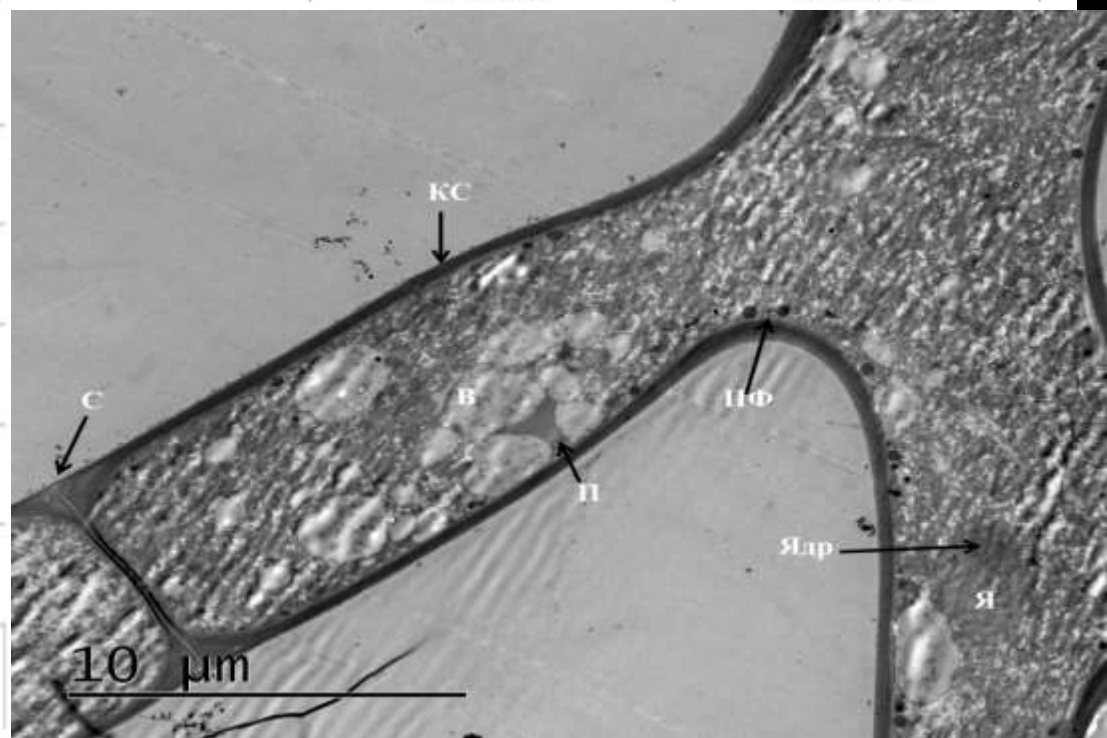
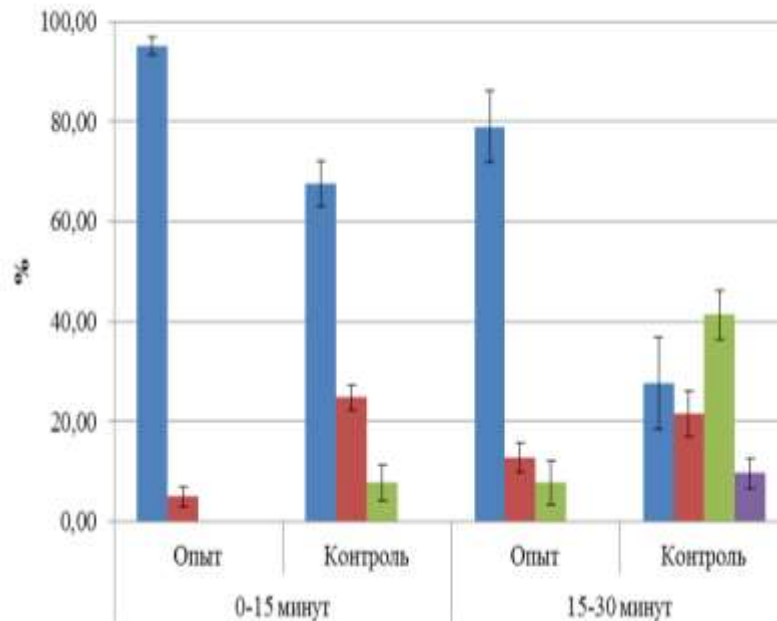
шт. (103)R13M2PT3



шт. (102)R13M2PT1



шт. (K3.3)R12S2PT3

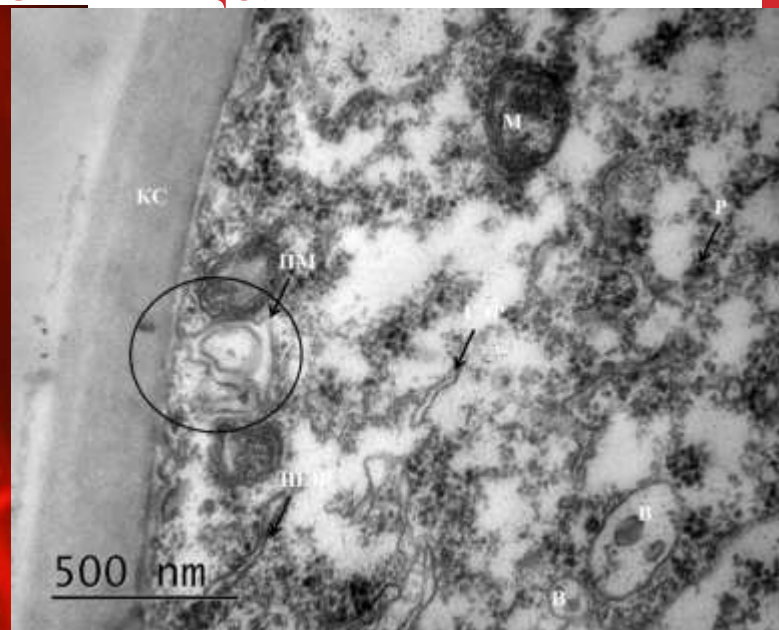
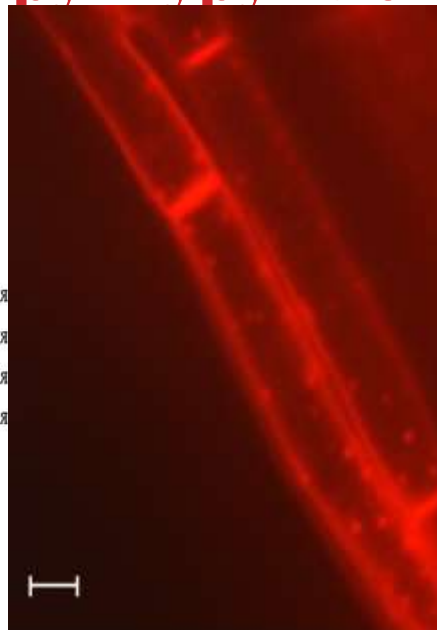
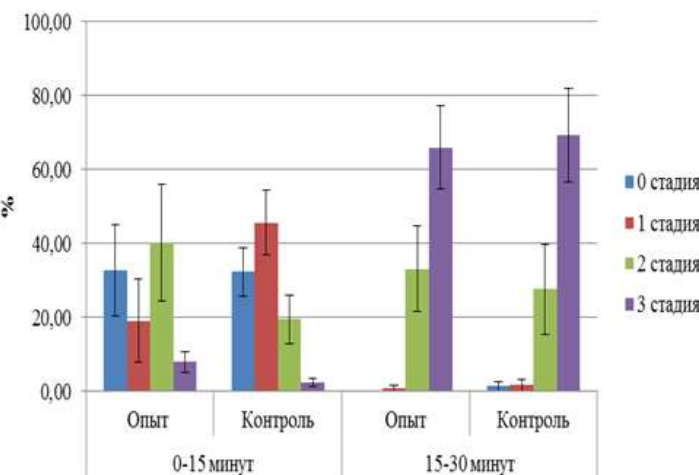


Заключение:

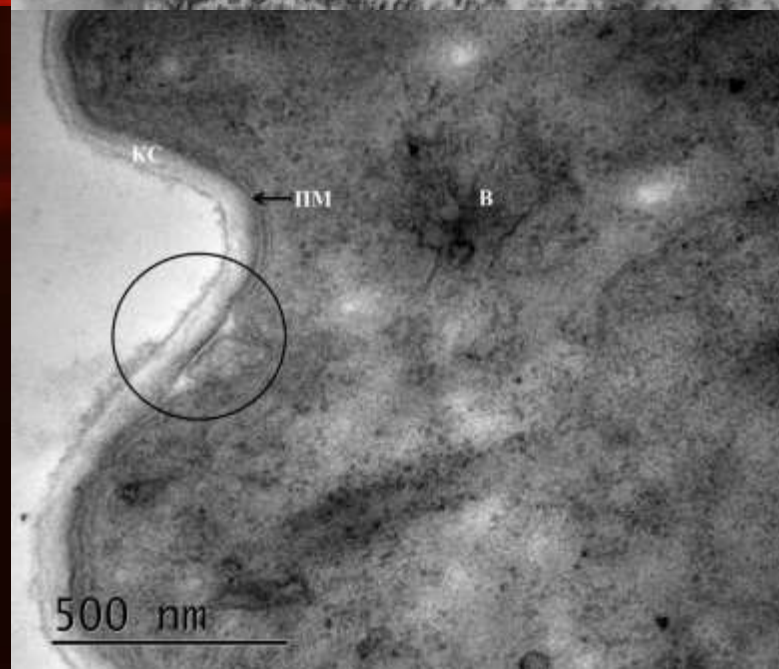
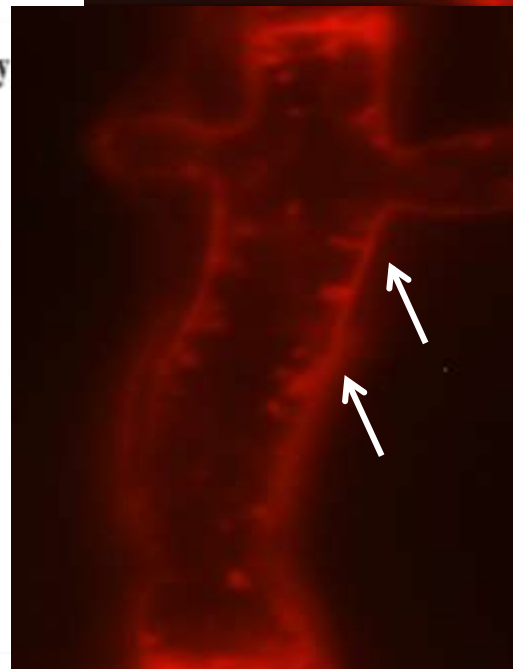
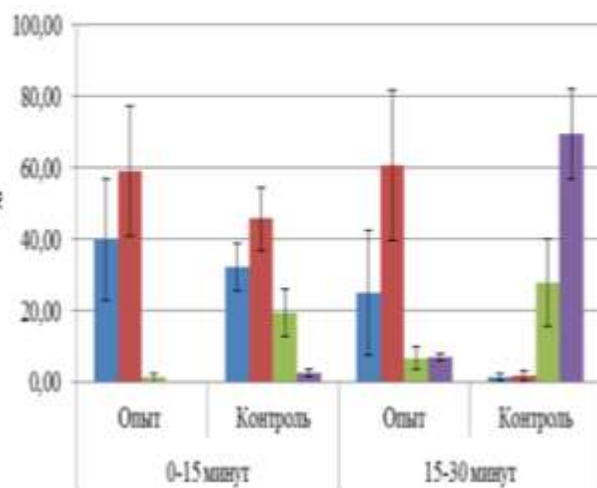
Штаммы	Температура	Рост	Динамика эндоцитоза
(102)R13M2PT1 Слабоустойчивый	термотолерантный	при низких концентрациях	замедление
(103)R13M2PT3 Устойчивый	мезофил	при всех концентрациях	замедление
(K3.3)R12S2PT3 Чувствительный		отсутствует	ингибирование

Влияние цитохалазина D на рост, динамику эндоцитоза и ультраструктуру клеток мицелия

Влияние цитохалазина D (10 мкМ) на динамику эндоцитоза *R. solani* шт. (K3.3)R12S2PT3

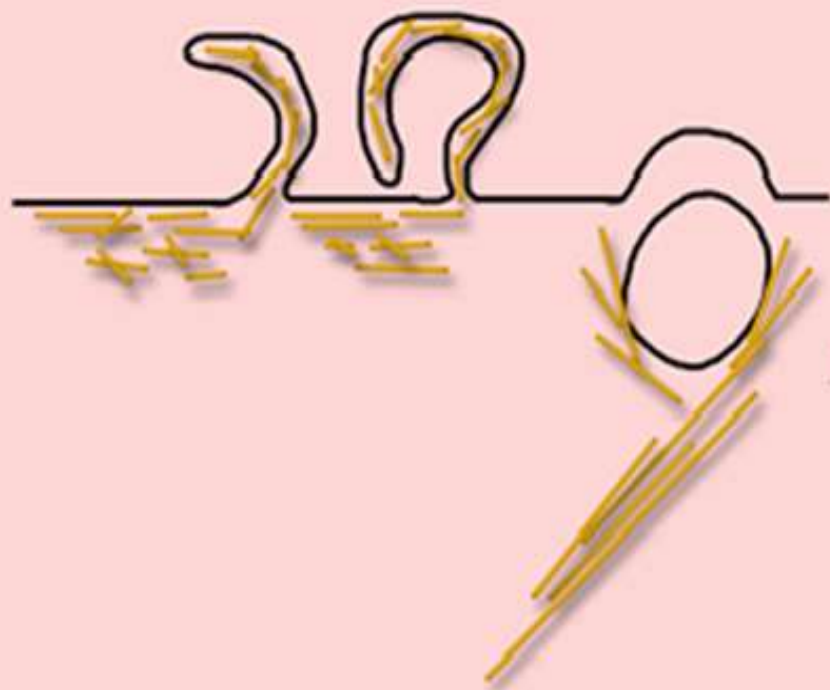


Влияние цитохалазина D (100 мкМ) на динамику эндоцитоза *R. solani* шт. (K3.3)R12S2PT3

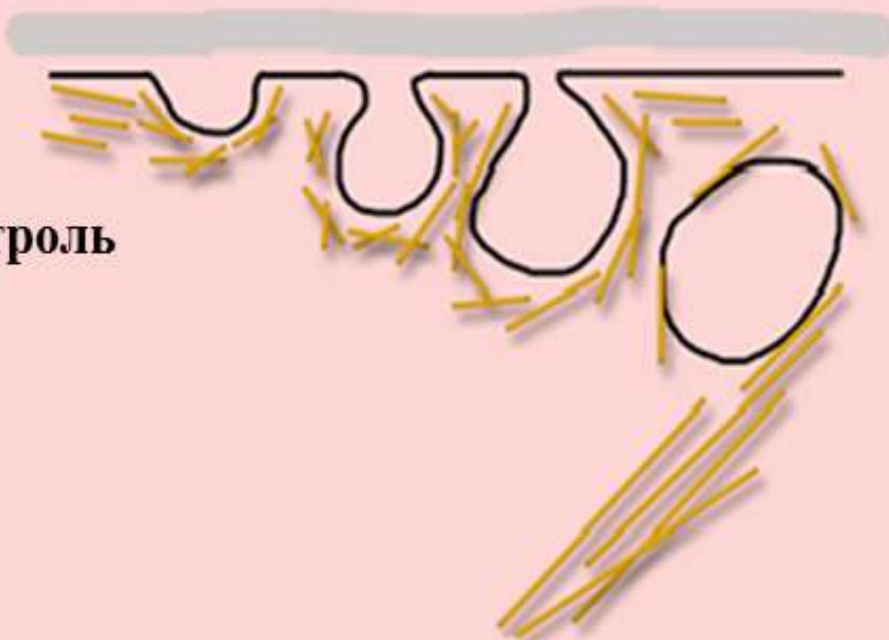


“Активный” макропиноцитоз у животных

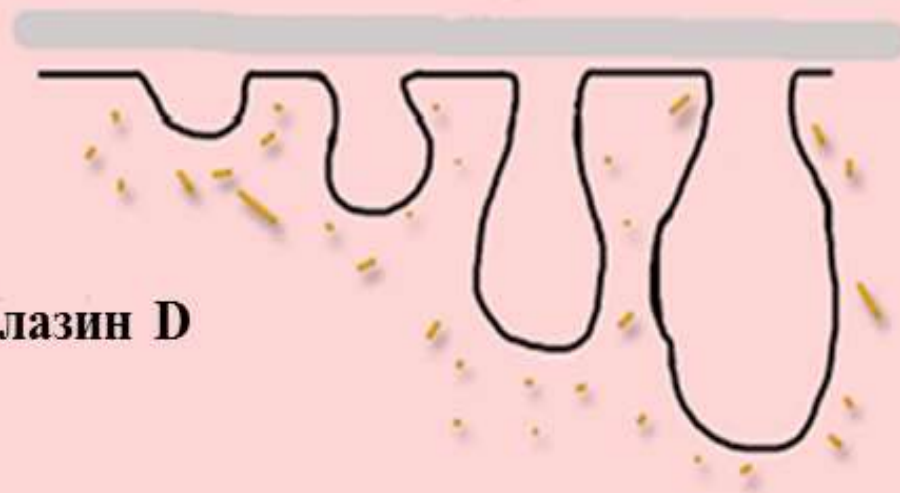
“Пассивный” макропиноцитоз у грибов



контроль



цитохалазин D



ВЫВОДЫ:

1. Углеродсодержащие вещества оказывают бóльшее влияние на рост и эндоцитоз мицелия *R. solani*, чем азотсодержащие. Добавление декстрина, крахмала и сахарозы в среду культивирования мицелия *R. solani* в 1,5-2 раза увеличивали скорость роста и ускоряли поглощение маркера эндоцитоза АМ4-64 на этапе отшнуровывания везикул от ПМ и транспортировки в вакуоли. Добавление триптона и аминокислот (L-фенилаланина, L-аспарагин) стимулировали рост мицелия в 1,5 раза, но не оказывали значительного влияния на эндоцитоз.
2. Меченый декстран с молекулярной массой 10 кДа не проникал через клеточные покровы мицелия *R. solani* при сохранении способности клеток к поглощению маркера эндоцитоза АМ4-64.
3. Цитохалазин D ускорял динамику поглощения маркера эндоцитоза АМ4-64 мицелием *R. solani* при низких концентрациях (5 и 10 мкМ) и ингибировал при высоких (50 и 100 мкМ), что указывает на его возможное участие в создании скелета макровезикул, их отшнуровывания от плазматической мембраны и транспорта к вакуолям.
4. По устойчивости к фунгициду Максим «Дачник» исследованные штаммы *R. solani* были разделены на три типа: устойчивый (103)R13M2PT3 (растет при любых концентрациях), слабоустойчивый (102)R13M2PT1 (способен к росту при низких концентрациях) и чувствительный (K3.3)R12S2PT3 (не растет в присутствии фунгицида). Слабоустойчивый штамм оказался термотолерантным: был способен к росту при температуре 35 °С.

5. Максим «Дачник» в низкой концентрации (2 мг/л) ингибировал эндоцитоз AM4-64 у чувствительного штамма (K3.3)R12S2PT3, замедлял эндоцитоз у слабоустойчивого шт. (102)R13M2PT1 и устойчивого штамма (103)R13M2PT3.

6. Время суток не оказало влияния на динамику поглощения маркера эндоцитоза AM4-64.

7. Исследование ультраструктуры клеток мицелия *R. solani* шт. (K3.3)R12S2PT3, инкубируемых в различных питательных растворах, показало присутствие многочисленных эндомембранных структур (цистерны ЭПР, Гольджи, МВТ, везикулы, вакуоли, плазмалеммосомы и др.), которые свидетельствуют об активном протекании процессов эндоцитоза.

8. Преинкубация в цитохалазине D (100 мкМ) и фунгициде Максим «Дачник» (2 мг/л) изменяла ультраструктуру клеток мицелия *R. solani* шт. (K3.3)R12S2PT3: наблюдали практически полное отсутствие эндомембранных структур.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!