

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ И МЕТАБОЛИЗМА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ГРИБОВ

Выпускная квалификационная работа магистра

Исполнитель:

Семенова М.А.

Руководители:

д.б.н., проф. Камзолкина О.В.

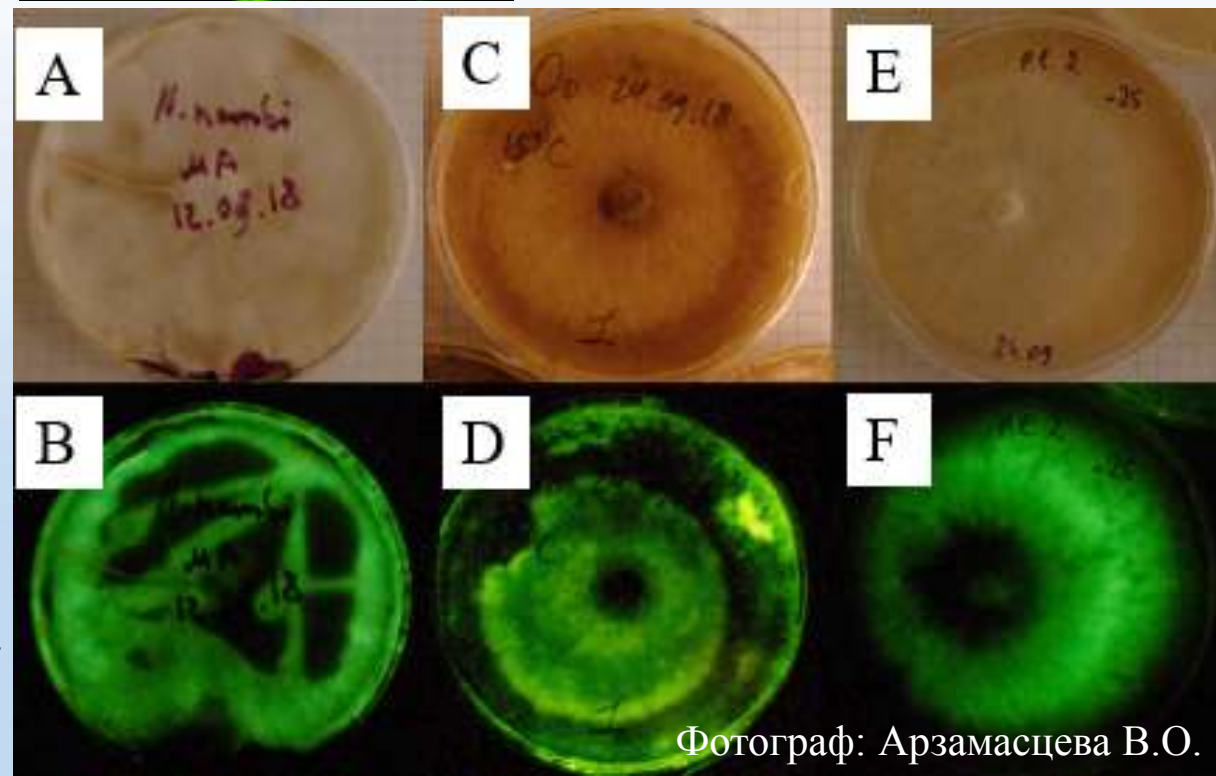
к.б.н. Мажейка И.С.

Введение

Все известные на данный момент светящиеся виды грибов относятся к одному порядку *Agaricales*. Они испускают зеленый свет с максимумом в диапазоне **520-530 нм**, образуют макроскопические плодовые тела и являются ксилотрофами. Светиться может только мицелий, либо и мицелий, и плодовые тела/их части (Desjardin et al., 2008; Stevani et al., 2013). Они вызывают белую гниль, за счет секреции внеклеточных ферментов, способных расщеплять лигнин (Deheyn, Latz, 2007, Stevani et al., 2013).



Свечение плодового тела *Neonothopanus gardneri*



Макроморфология культур светящихся грибов на мальт-агаре и их билюминесценция. А, В – *N. nambi*, 35 сутки роста, С, D – *Omphalotus olearius*, 23 сутки роста, Е, F – *Panellus luminescens*, 23 сутки роста.

Актуальность работы

- ❖ Внимание исследователей обращено прежде всего на механизмы свечения, тогда как последствия свечения для метаболизма грибов, особенности их физиологии изучены мало. Есть все основания полагать, что светящиеся грибы по своим энергетическим потребностям, по устойчивости к стрессам, по другим физиологическим параметрам могут отличаться от близких к ним видов несветящихся ксилотрофов. Например, есть гипотеза о том, что биологическая роль свечения грибов – детоксикация перекисей, образующихся в ходе деградации лигнина (Bermudes et al., 1992; Desjardin et al., 2008), защита от активных форм кислорода (Desjardin et al., 2005). Из данной гипотезы следует вывод, что светящиеся грибы могут быть более устойчивы к окислительному и другим стрессам по сравнению с несветящимися грибами белой гнили. Однако **отсутствуют работы, посвященные сравнению физиологии и метаболизма, в том числе, ответа на стресс, светящихся грибов и родственных им несветящихся ксилотрофов.** Изучение физиологии светящихся грибов важно не только для понимания влияния люминесцентных систем на клетки носителя этих систем, но и может в целом углубить наши знания о физиологии такой уникальной группы грибов как дереворазрушающие базидиомицеты.

Цель работы:

Сравнительный анализ определенных физиологических аспектов светящихся и несветящихся грибов, в том числе, связанных со стресс-устойчивостью.

Задачи:

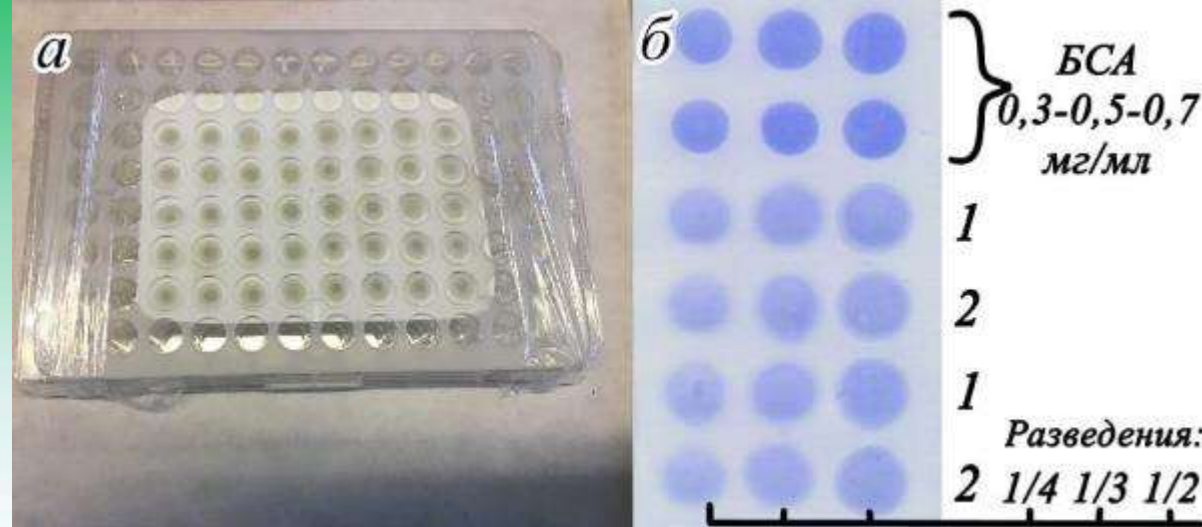
- ❖ Провести сравнительное исследование влияния условий культивирования (рН, температура, состав питательных сред) на рост светящихся и несветящихся ксилотрофных грибов, а также на интенсивность биолюминесценции грибов.
- ❖ Сравнить характер накопления карбонилированных белков, являющихся маркерами окислительного стресса, в мицелии светящихся и несветящихся ксилотрофных грибов.
- ❖ Оценить влияние обработки мицелия перекисью водорода на рост светящихся и несветящихся штаммов, на степень карбонилирования белков в их мицелии и на интенсивность свечения биолюминесцентных грибов.

Объекты исследования

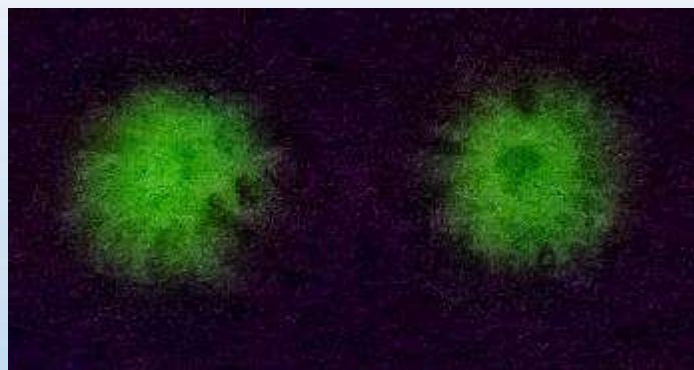
Порядок	Семейство	Штаммы
<i>Agaricales</i>	<i>Mycenaceae</i>	<u><i>Favolaschia manipularis</i> LE-BIN 3272,</u> <i>Panellus luminescens</i> LE-BIN 3351, <i>P. serotinus</i> MGU FM 0072, <i>P. stipticus</i> LE-BIN 4047, <i>P. stipticus</i> LE-BIN 4431
	<i>Omphalotaceae</i>	<i>Lentinula edodes</i> MGU FM, <i>Neonothopanus nambi</i> LE-BIN 3297, <i>Omphalotus olearius</i> LE-BIN 2082
	<i>Pleurotaceae</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> MGU FM 0161
<i>Polyporales</i>	<i>Polyporaceae</i>	<i>Trametes ochracea</i> MGU FM 0158
<i>Russulales</i>	<i>Stereaceae</i>	<i>Stereum hirsutum</i> MGU FM 0081

Методы работы:

- ❖ Культивирование на агаризованных средах
- ❖ Хранение в криопробирках под стерильной водой и на скошенной среде мальт-агар (МА) в пробирках при комнатной температуре
- ❖ Измерение интенсивности свечения мицелия (люминометр TD -20/20)
- ❖ Сухой иммунный дот-блоттинг для оценки степени карбонилирования белков в грибном мицелии



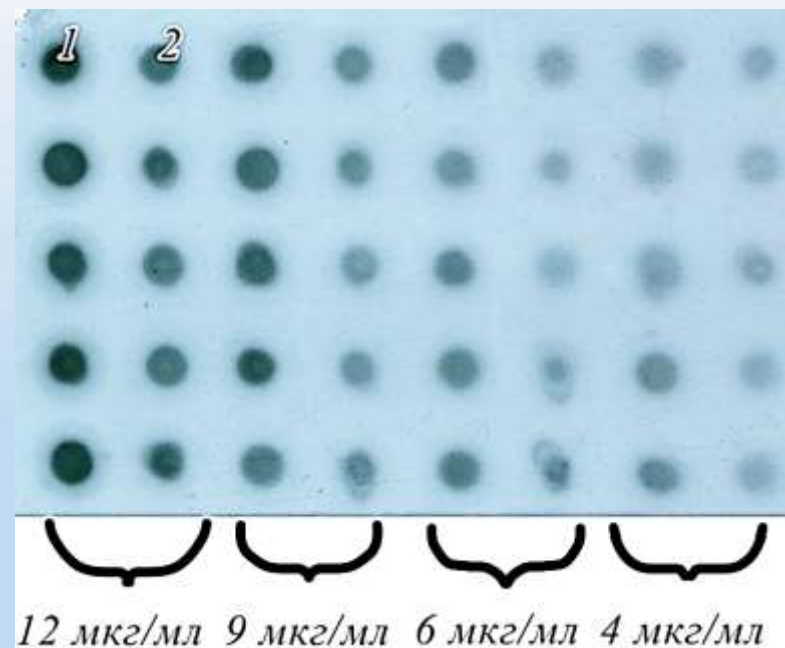
а – устройство с мембраной для нанесения дотов. б – внешний вид ПВДФ-мембраны, после окрашивания в Кумасси и высушивания.



Свечение мицелия *P. luminescens* на 16 сутки роста на мальт-агаре

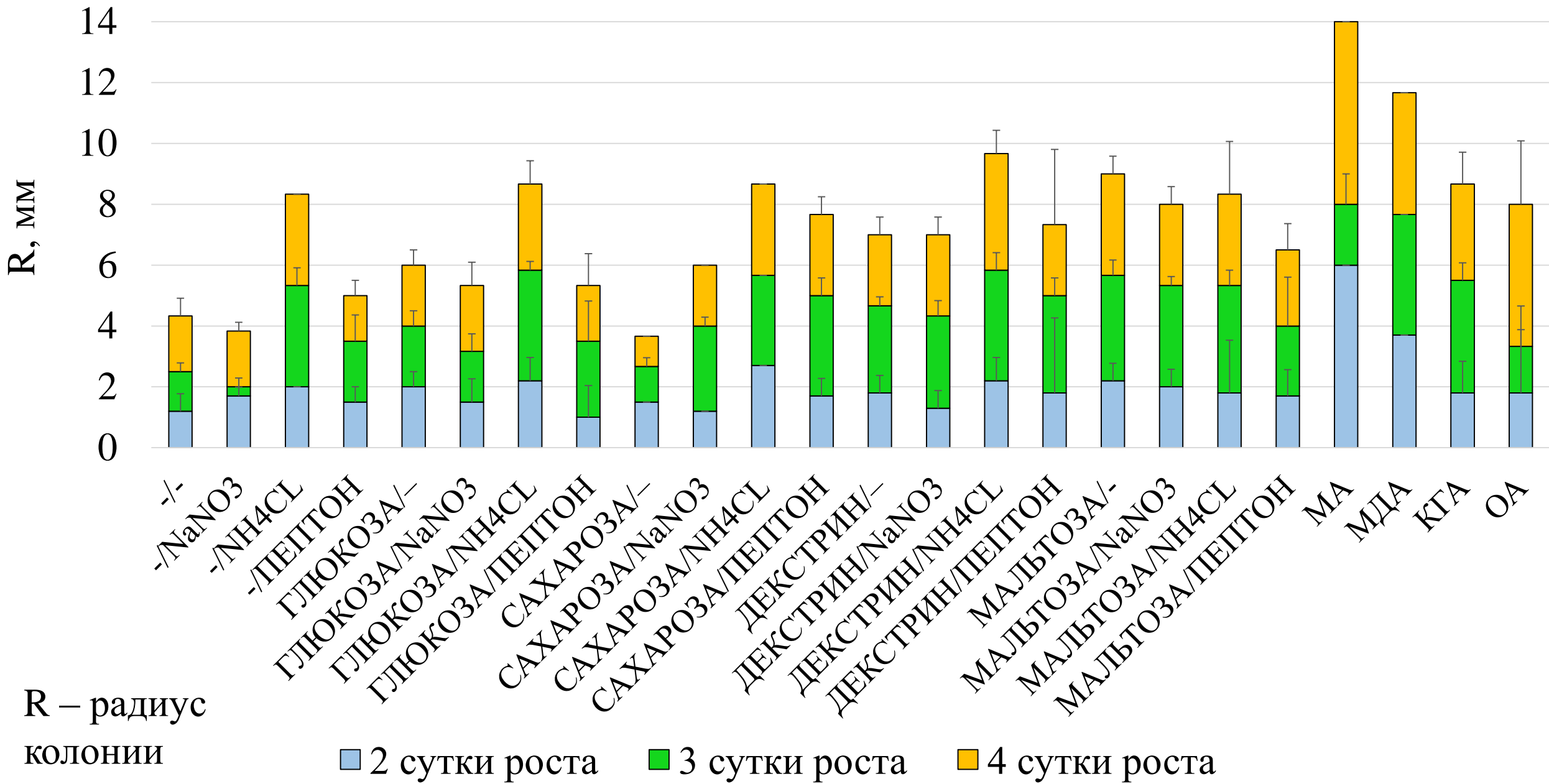


Люминометр TD-20/20



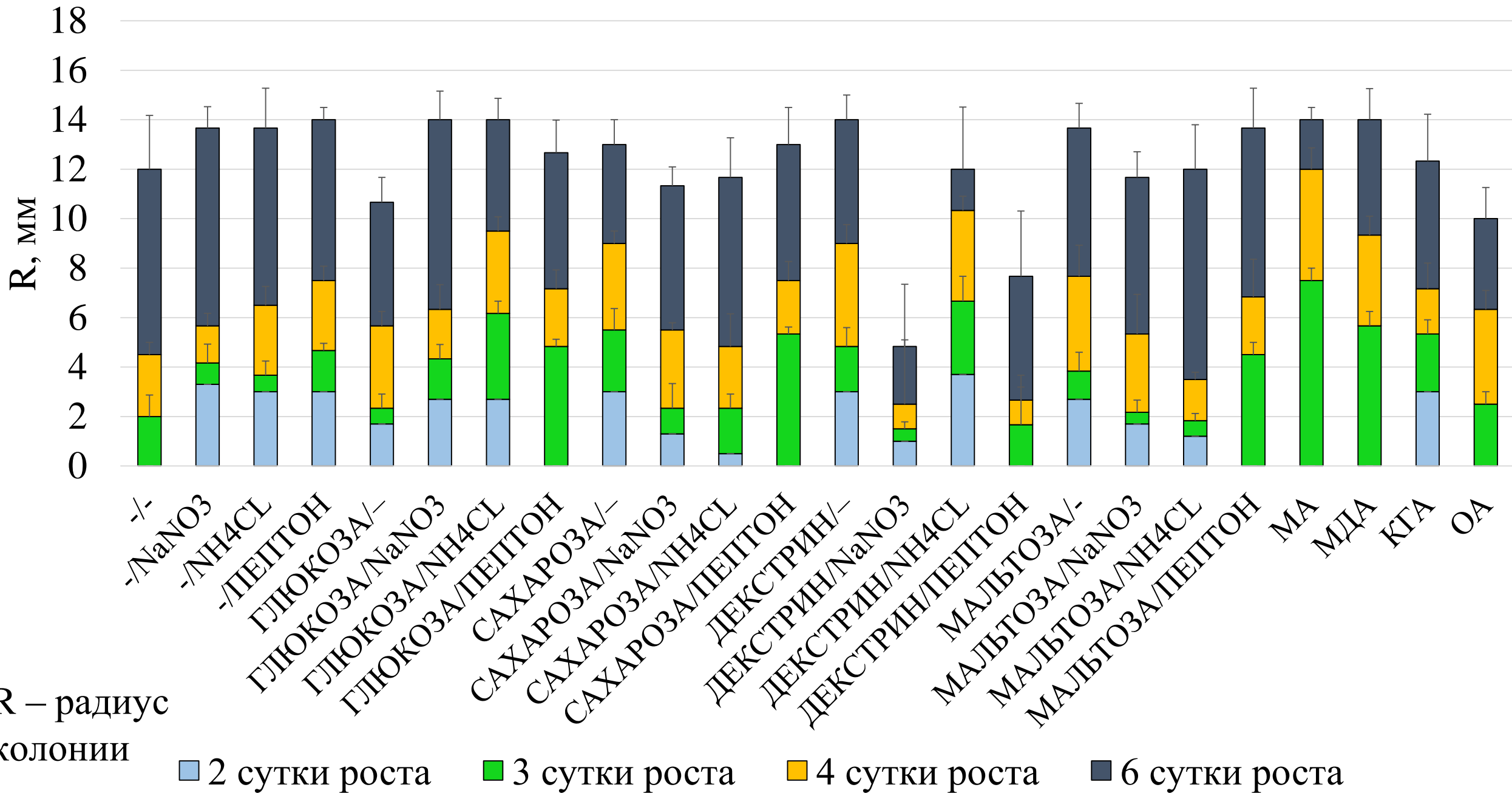
Иммунная ПВДФ-мембрана, экспонированная на рентгеновскую пленку

Динамика роста *N. pambii* на различных средах

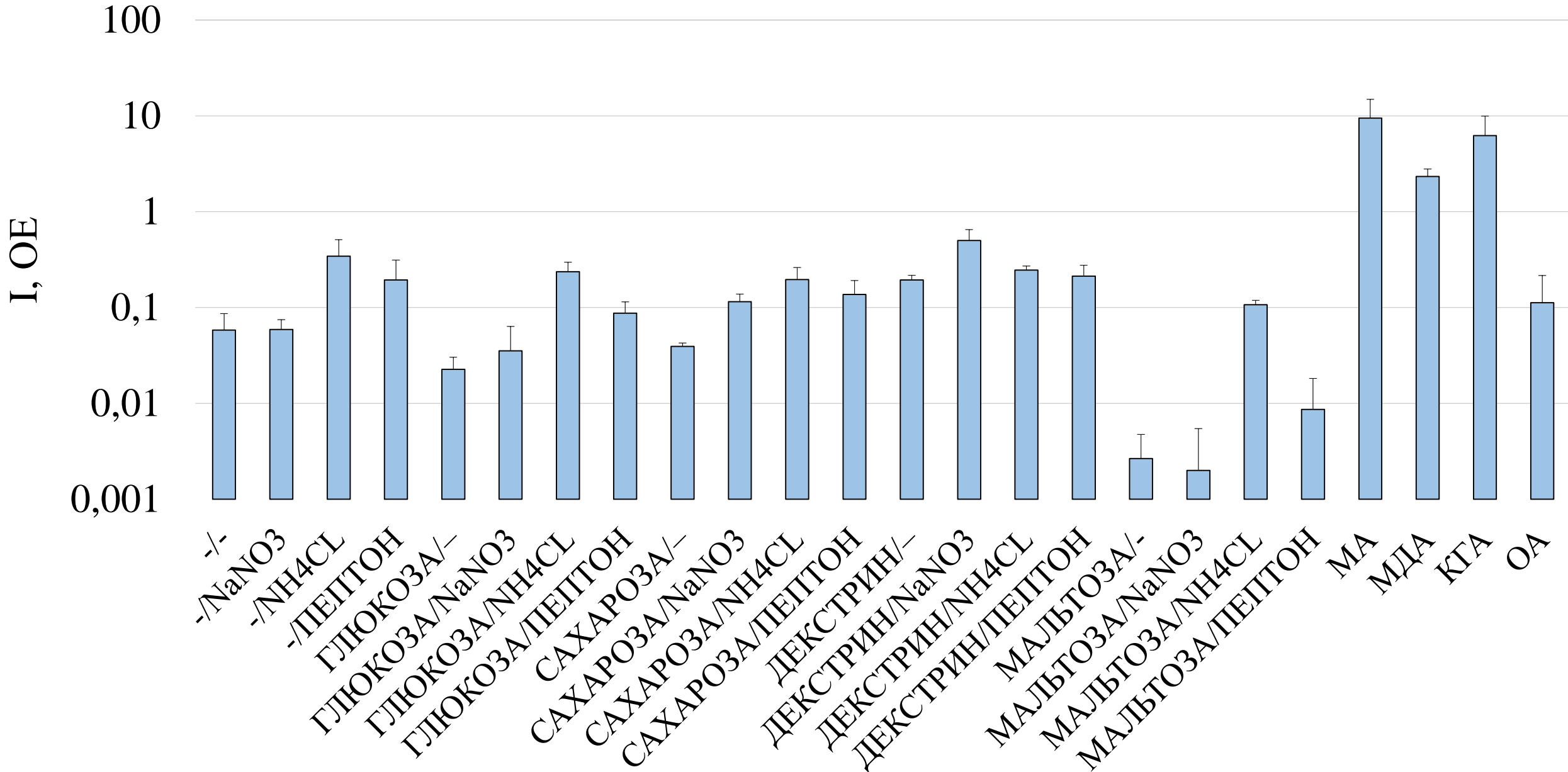


R – радиус
КОЛОНИИ

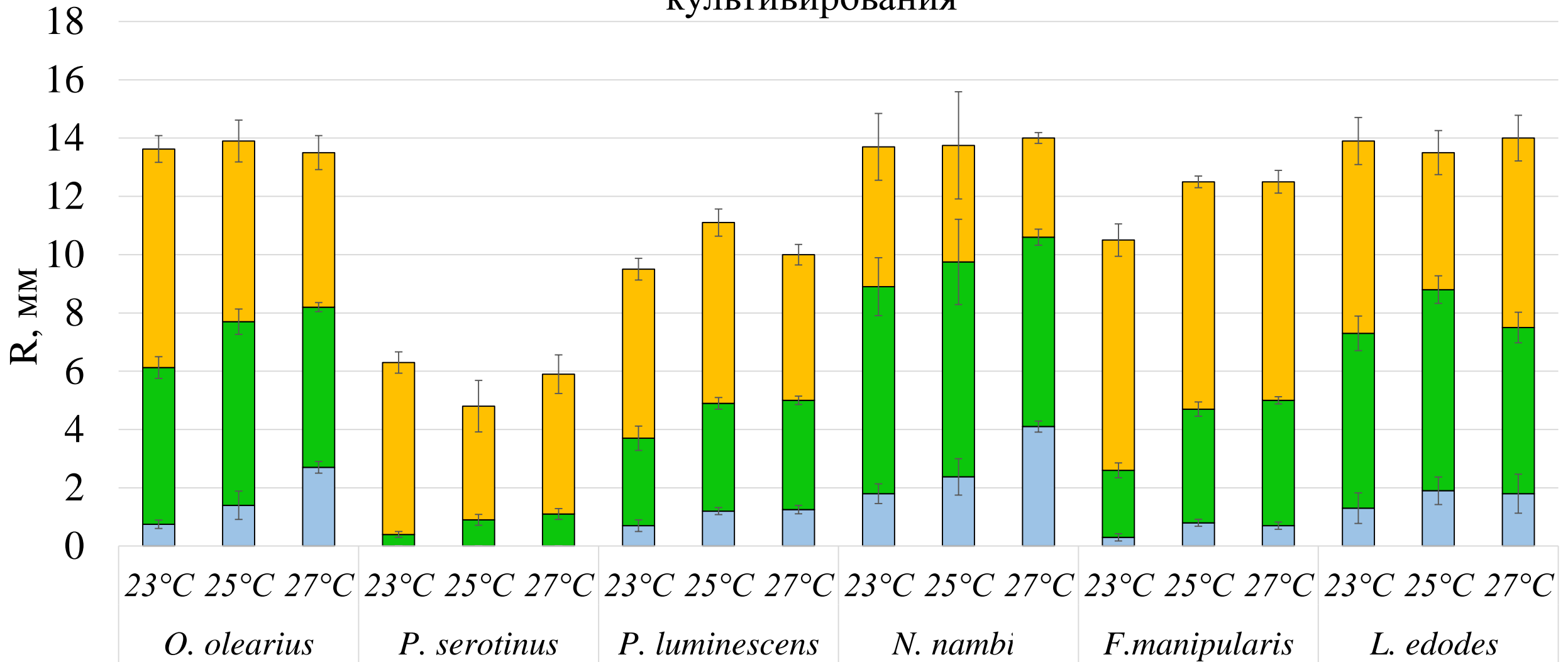
Динамика роста *L. edodes* на различных средах



Средние значения интенсивности биолюминесценции (I)
O. olearius из 3 проб на 6 сутки роста на различных средах



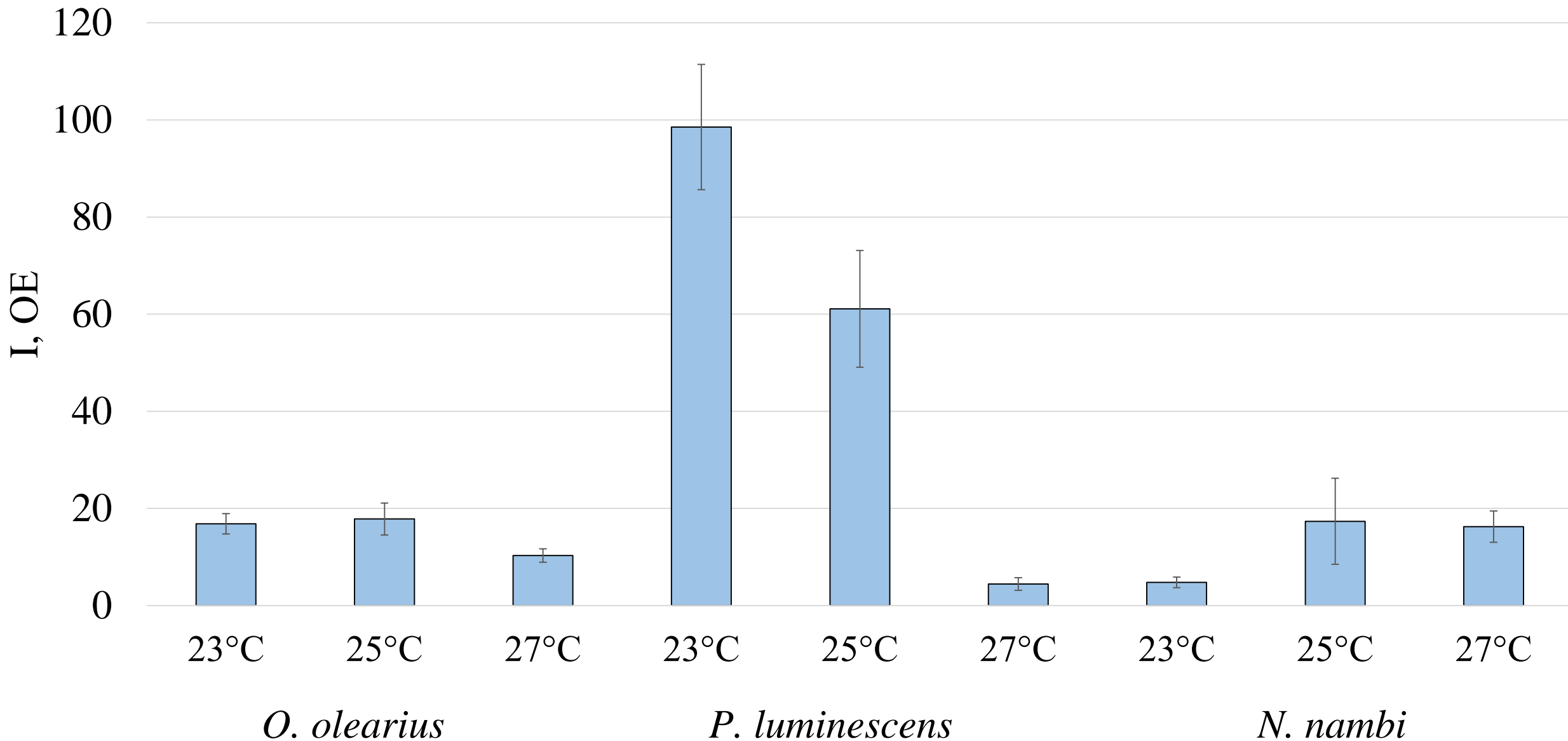
Динамика роста мицелия на МА при трех выборочных температурах культивирования



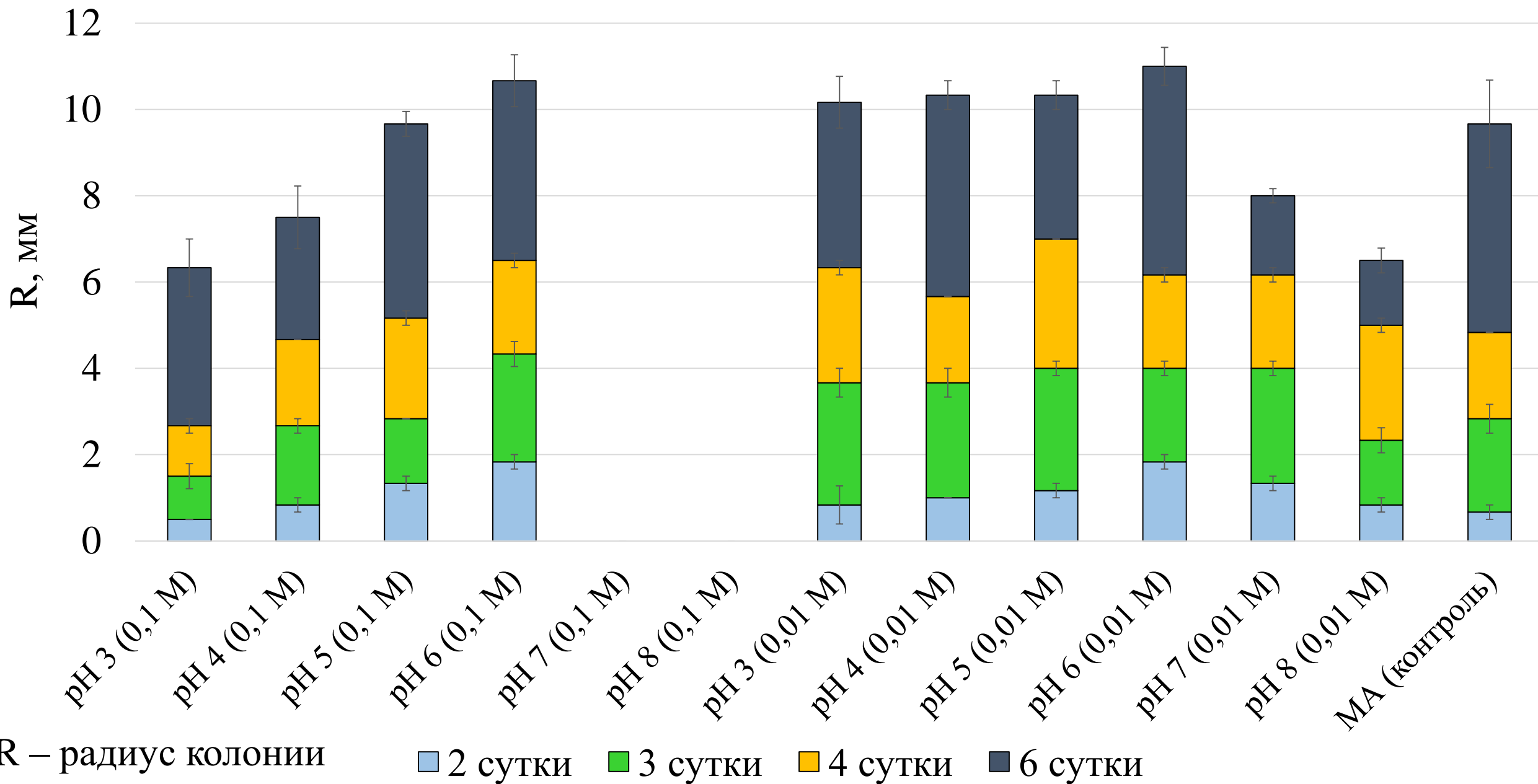
R – радиус колонии,
МА-мальт-агар

■ 2 сутки ■ 4 сутки ■ 7 сутки

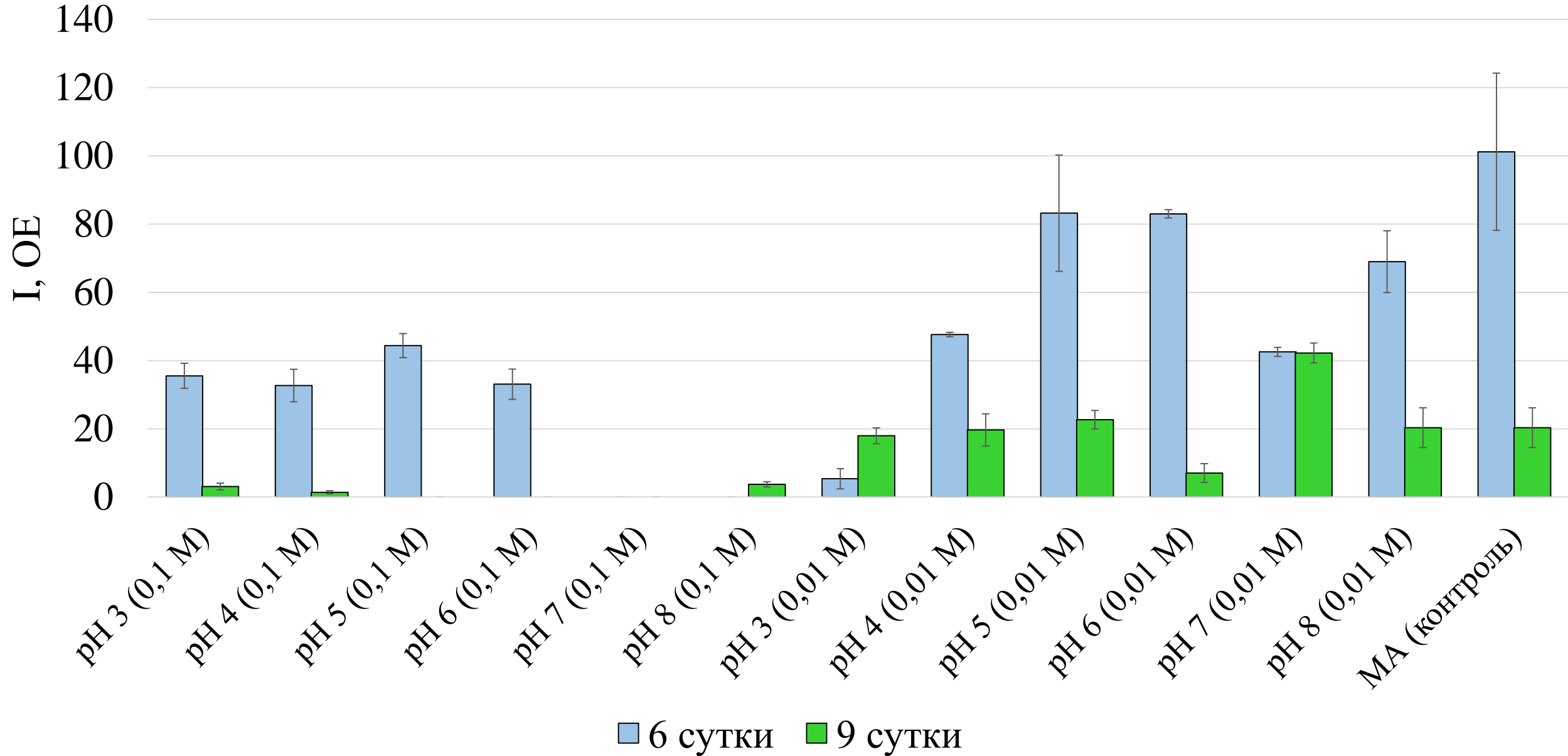
Средние значения интенсивности биолюминесценции (I) из 3 проб на 7 сутки роста при трех выборочных температурах культивирования



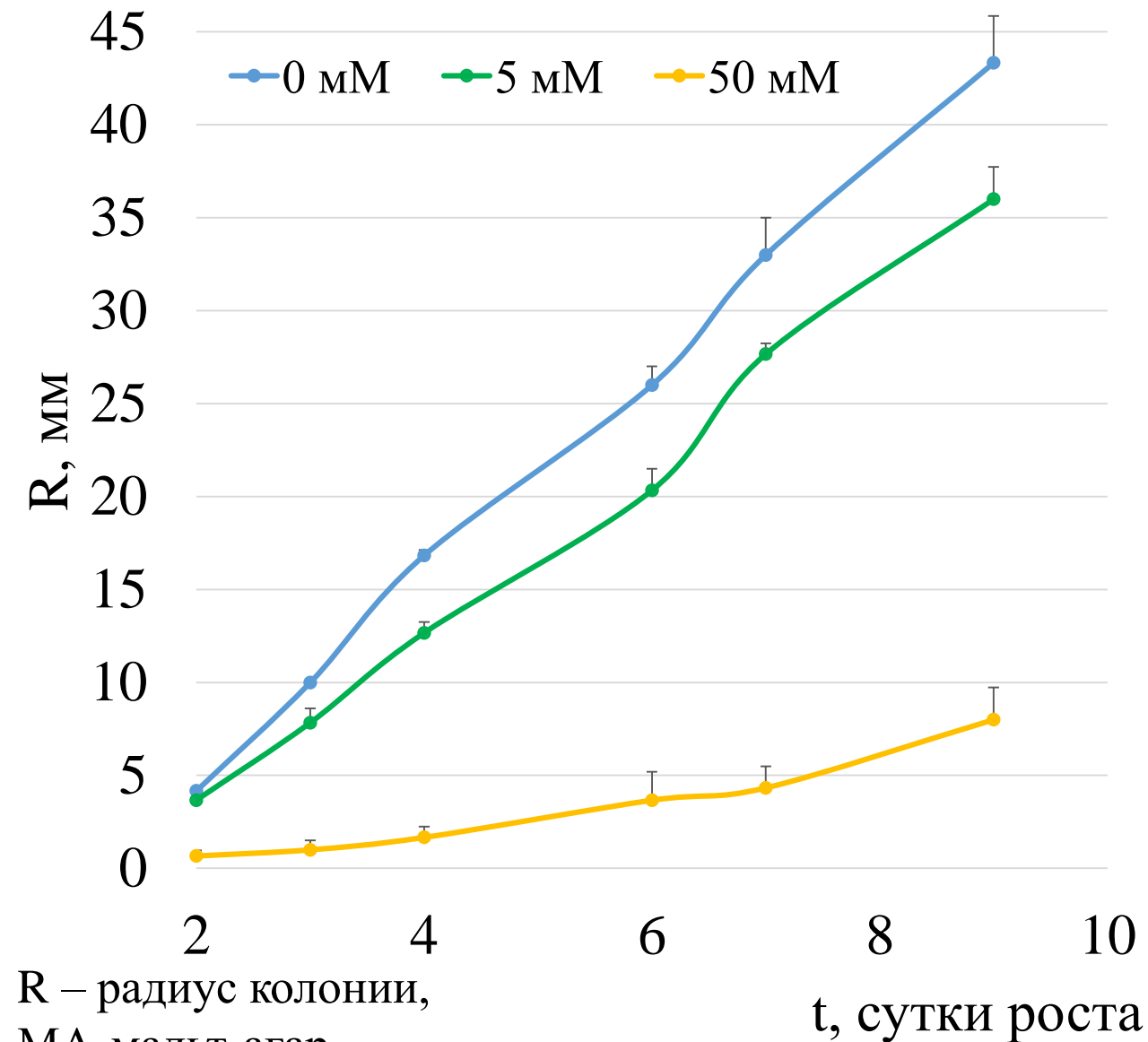
Динамика роста *P. luminescens* при разных значениях рН и силы буфера



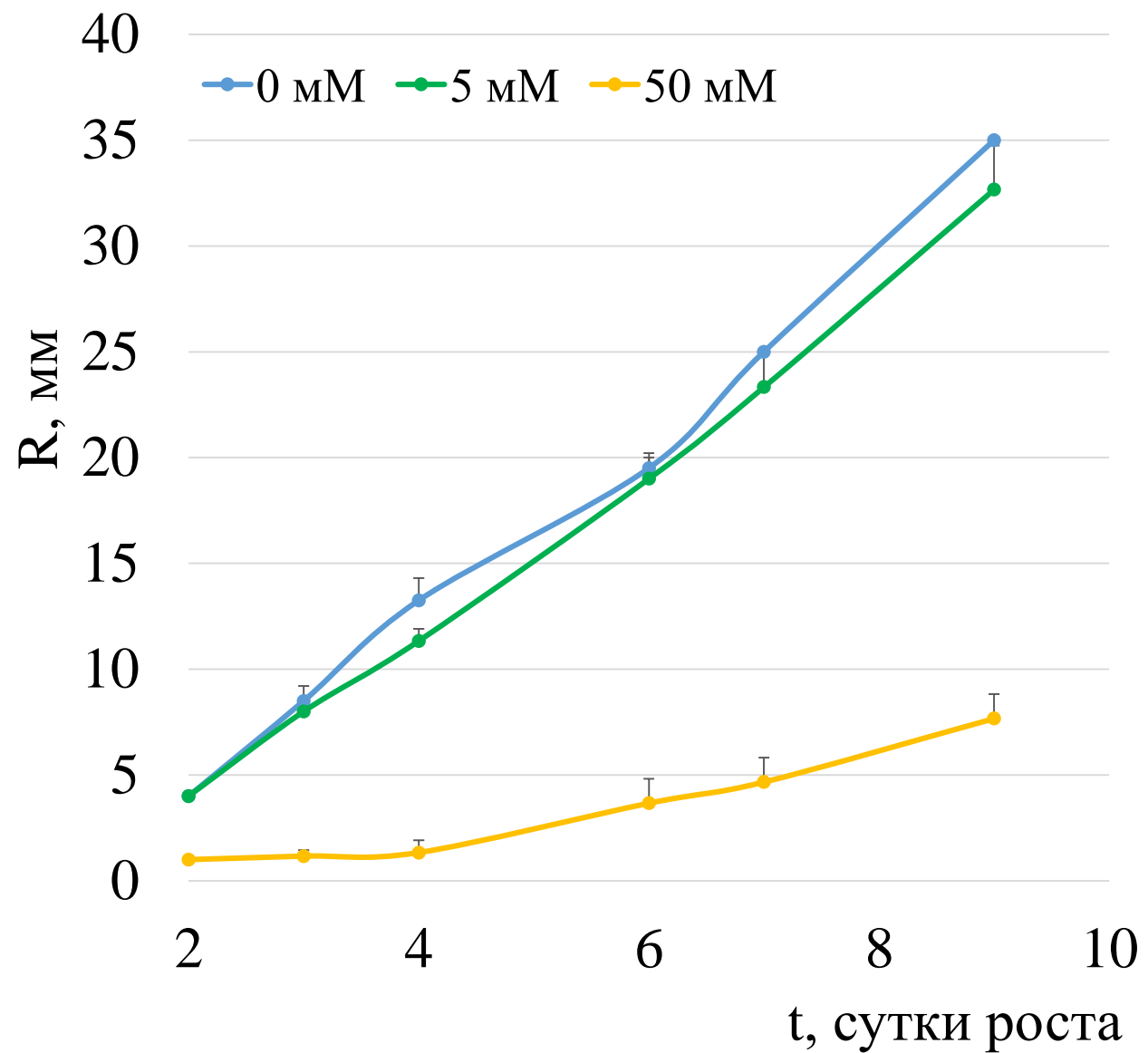
Средние значения интенсивности биолюминесценции (I) *P. luminescens* из
3 проб при разных значениях рН и силы буфера



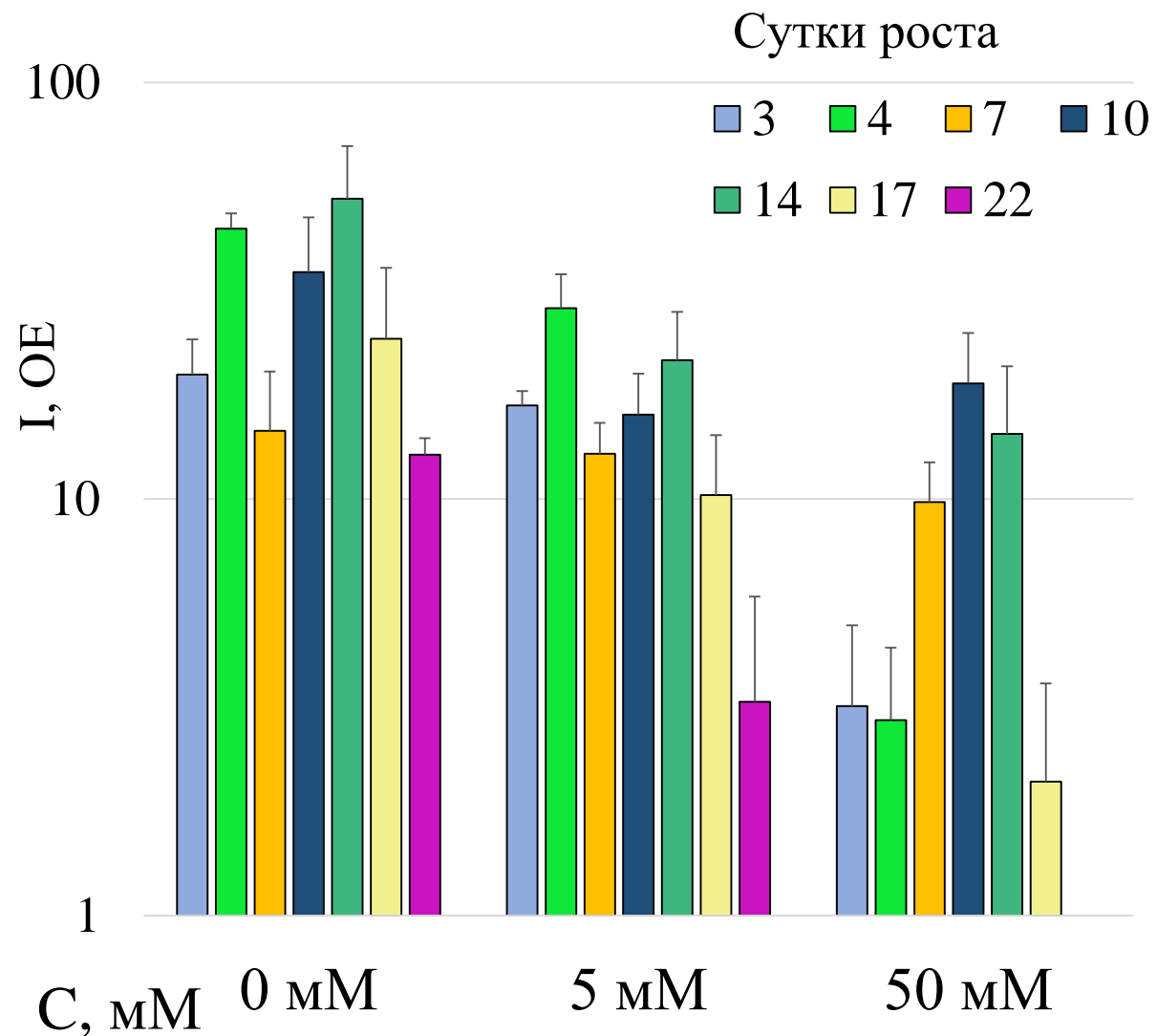
Динамика роста *O. olearius* на МА с
выборочными концентрациями
перекиси водорода



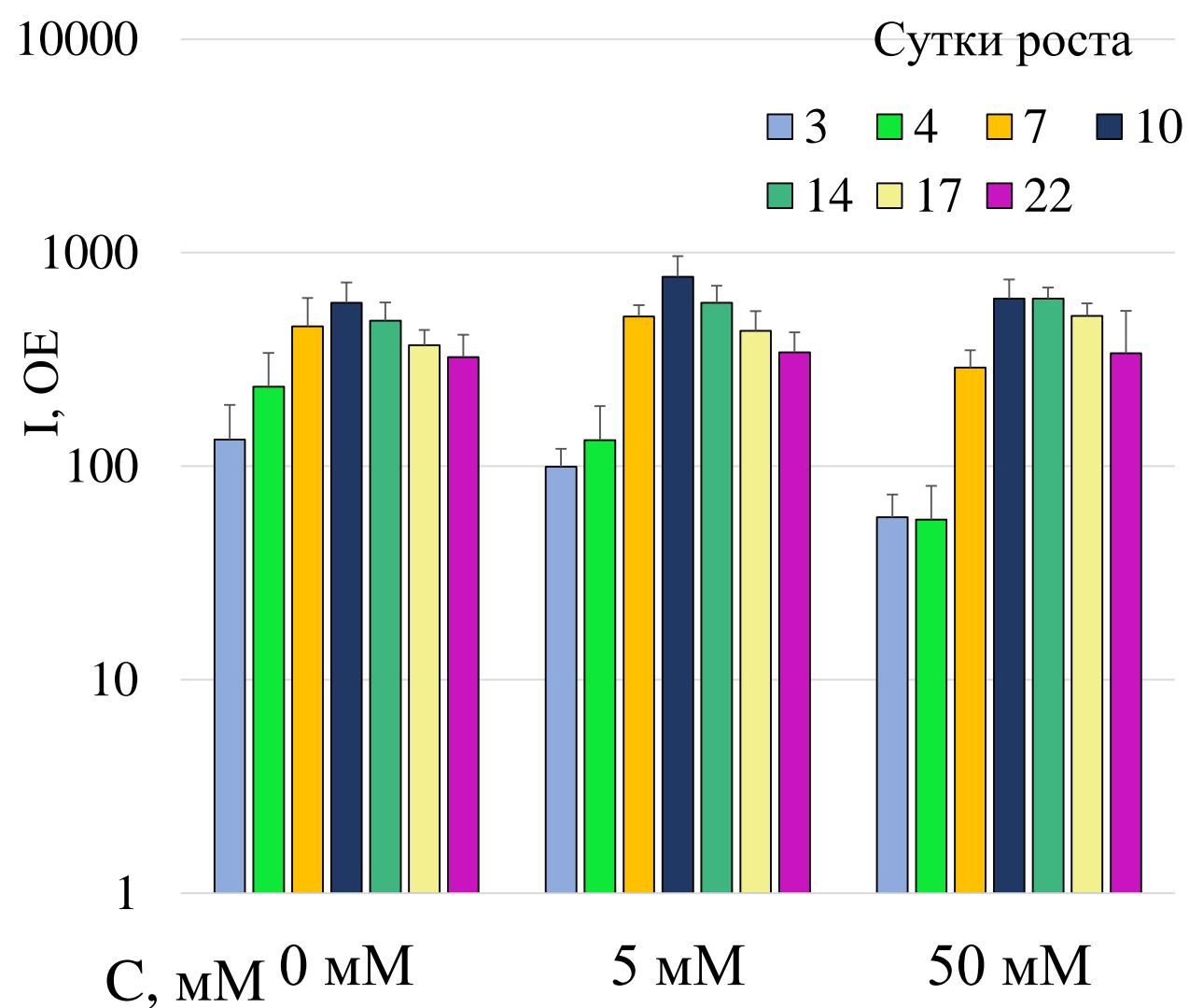
Динамика роста *N. nambi* на МА с
выборочными концентрациями
перекиси водорода



Средние значения интенсивности билюминесценции (I) *O. olearius* из 5 проб на МА с выборочными концентрациями перекиси водорода

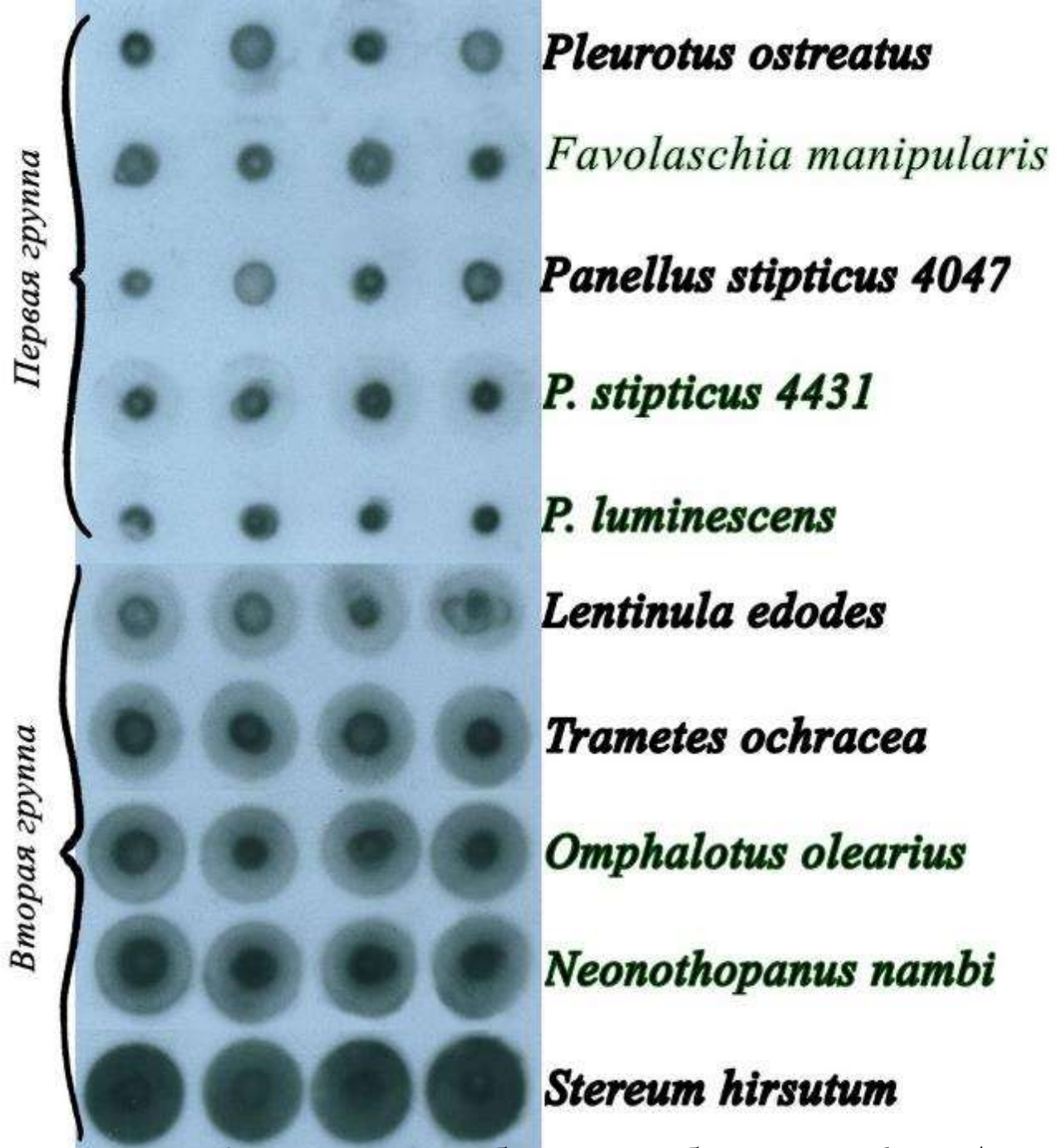


Средние значения интенсивности билюминесценции (I, OE) *P. stipticus* 4431 из 5 проб на МА с выборочными концентрациями перекиси водорода



Содержание карбонильных групп (СКГ) в мицелии светящихся и несветящихся ксилотрофных грибов

Таксономический уровень	Название видов/штаммов	СКГ2/СКГ1
Семейство	<i>N. nambi</i> / <i>L. edodes</i>	2,98
Род	<i>P. serotinus</i> / <i>P. luminescens</i>	1,54
Вид	<i>P. stipticus</i> 4047 / <i>P. stipticus</i> 4431	1,02±0,04

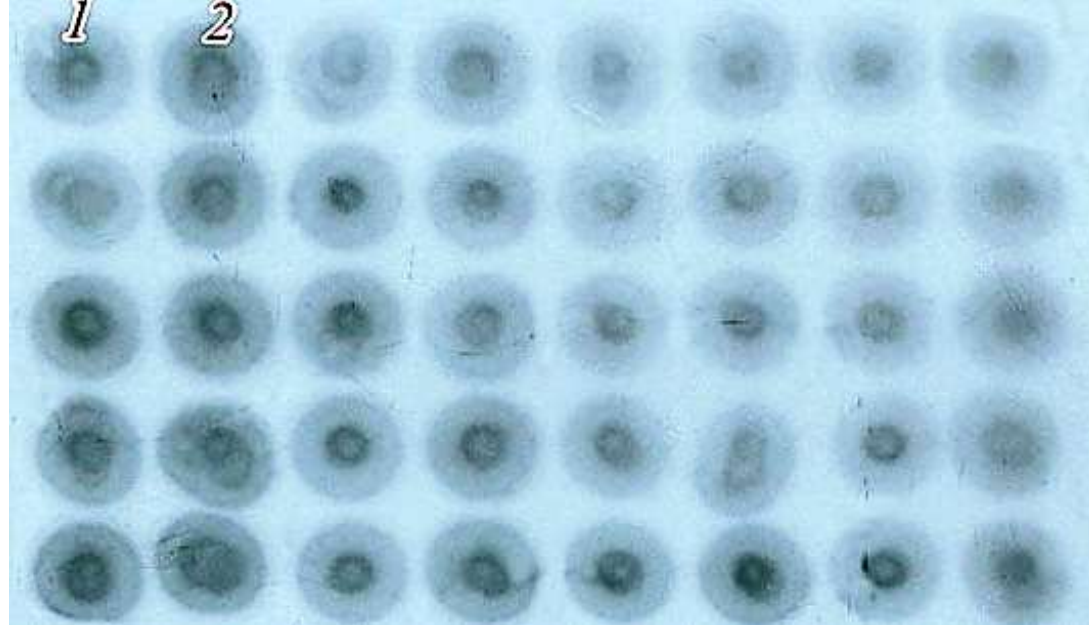


Концентрация белков в образцах – 6 мкг/мл.

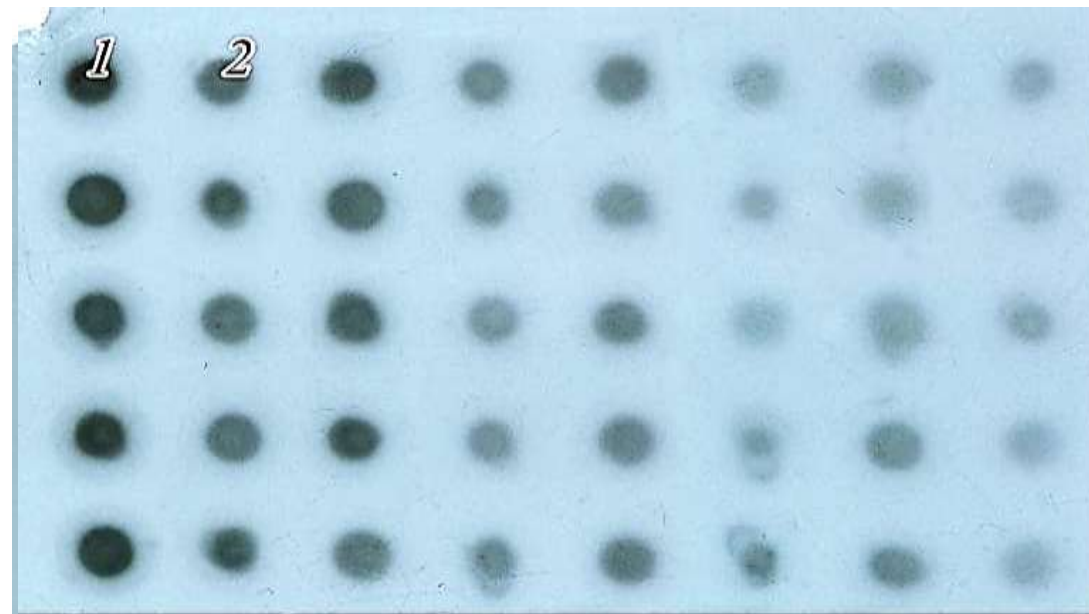
Влияние обработки перекисью водорода на содержание карбонильных групп (СКГ) в мицелии грибов

Название вида	СКГ2(вода) / СКГ1(перекись водорода)*
<i>N. nambi</i>	1,10
<i>O. olearius</i>	1,07
<i>P. luminescens</i>	1,19±0,31
<i>P. stipticus</i> 4047	1,00±0,29
<i>P. stipticus</i> 4431	1,68
<i>F. manipularis</i>	0,60

*0,83-1,2 - нет отличий



N. nambi



F. manipularis

1-после обработки перекисью водорода, 5 мМ, 30 мин
2 – контроль (вода)

12 мкг/мл 9 мкг/мл 6 мкг/мл 4 мкг/мл

Заключение

С одной стороны, светящиеся грибы оказались более требовательными к определенным условиям культивирования, чем близкие к ним несветящиеся ксилотрофные базидиомицеты, что может быть связано с повышенной потребностью светящихся грибов в энергетических ресурсах. С другой стороны, светящиеся виды не имеют какой-то своей отдельной стратегии защиты от стрессов среди других ксилотрофов. Они устойчивы к окислительному стрессу, но не отличаются по этому свойству от других дереворазрушающих грибов. Можно предположить, что защитные системы ксилотрофов настолько развиты и мощны, что дополнительное их усиление у светящихся грибов при условии достатка в ресурсах не требуется. Отсюда следует, что и биологические функции свечения не связаны напрямую с защитой от стрессов, и имеют другую природу.

Дальнейшие исследования светящихся грибов, в т.ч. направленных на выяснение функциональной роли свечения, могут быть связаны, например, с получением модифицированных штаммов нексилотрофных грибов со встроенной в геном люминесцентной системы. Также, перспективен анализ дифференциальной экспрессии на уровне транскриптома или протеома у грибов, подвергнутых световой экспозиции, имитирующей грибное свечение. Несомненно, представляет интерес изучение катаболизма лигнина у светящихся видов возбудителей белой гнили в сравнении с несветящимися видами на уровне транскриптома и протеома.

Выводы

- ❖ Для биолюминесцентных видов грибов характерен более узкий диапазон питательных сред, оптимальных для роста и свечения мицелия.
- ❖ Источник азота в среде роста мицелия влияет на скорость роста, развитие воздушного мицелия и интенсивность свечения в большей степени, чем источник углерода. Оптимальными источниками азота для всех перечисленных параметров являются хлорид аммония и пептон.
- ❖ Температура оказывала влияние на рост и свечение биолюминесцентных грибов, при этом, не оказывая в изучаемом диапазоне значимого влияния на рост нелюминесцентных штаммов. Оптимум люминесценции оказался смещенным в область низких температур, в сравнении с оптимумом роста.
- ❖ Среды с высокой молярностью буфера ингибируют рост и свечение грибов. На средах с 0,1М буфером наблюдается смещение оптимума рН для биолюминесценции в сторону более высокой кислотности, по сравнению с ростом.

Выводы

- ❖ Степень и характер накопления карбониллов в мицелии грибов связаны с систематическим положением. Прямая зависимость между способностью к свечению и стратегией накопления карбониллов не выявлена.
- ❖ Зависимость между способностью к свечению и ответом на окислительный стресс не показана. Умеренный окислительный стресс не вызывал накопления карбонилированных белков в мицелии большинства светящихся и несветящихся штаммов.
- ❖ Биолюминесценция представителей семейства *Omphalotaceae* проявляет повышенную чувствительность к воздействию перекиси водорода в среде культивирования, тогда как на интенсивность свечения *in vivo* грибов из семейства *Muscenaceae* перекись водорода оказывает минимальное влияние.



Спасибо за внимание!