

Разнообразие лабиринтуломицетов в литоральных грунтах Баренцева моря

Дмитрий Перебоев, BSc

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

dm.pereboev@gmail.com

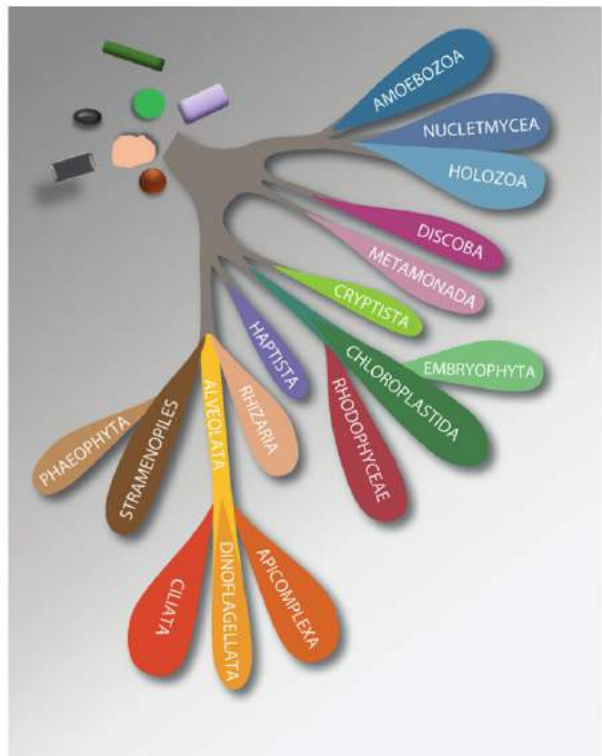
Научный руководитель: к.б.н. Екатерина Николаевна Бубнова

Цель:

Изучение разнообразия лабиринтуломикетов в грунтах литорали Баренцева моря

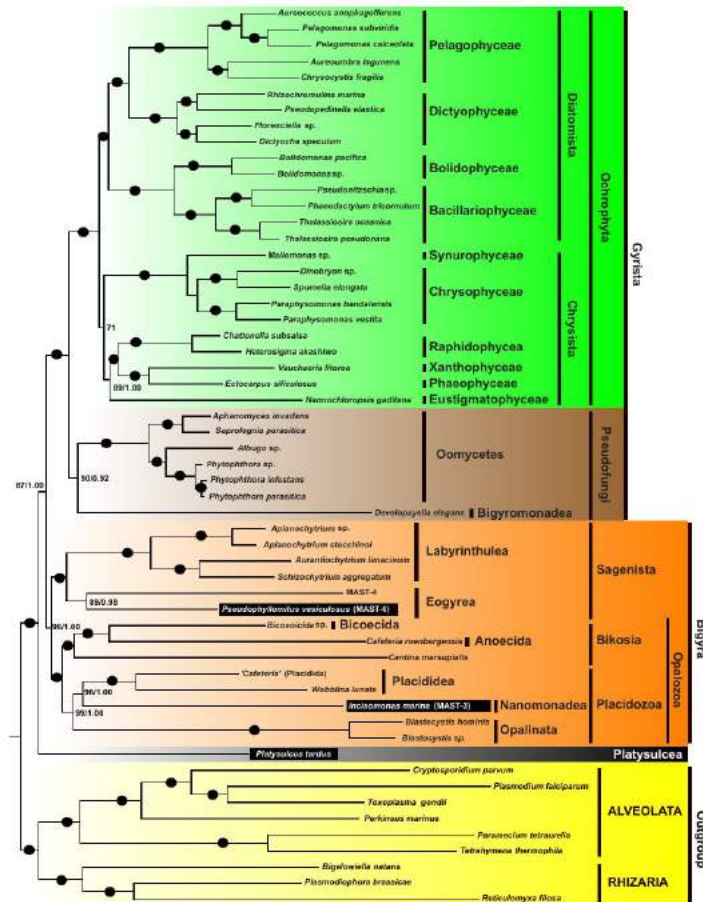
Задачи исследования:

- 1) Выделить чистые культуры лабиринтуломикетов из грунтов литорали побережья Баренцева моря. Создать и поддерживать коллекцию штаммов.
- 2) Изучить морфологические и культуральные свойства культур из коллекции. Изучить ультраструктурные особенности изолятов.
- 3) Для каждого штамма выделить тотальную ДНК, амплифицировать участок гена 18S rDNA для последующего секвенирования в специализированной лаборатории и идентифицировать изолированные штаммы на основании полученных последовательностей.



Филогенетическое родство основных эукариотических линий

[1]



[2]

Филогения строменил

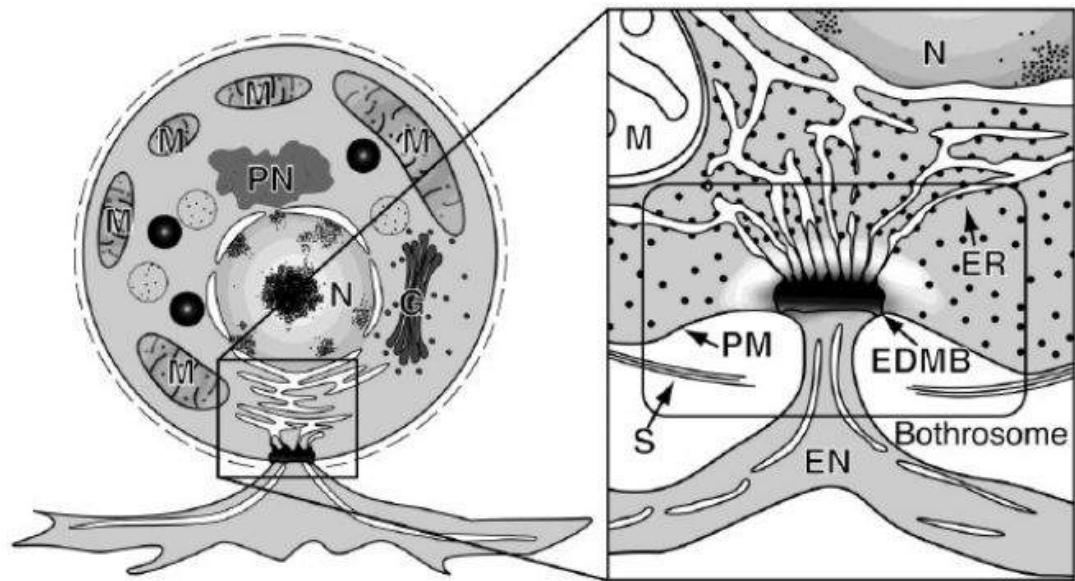


Рисунок 1. Таллом траустохитриевого лабиринтуломицета. N — ядро, PN — парануклеарное тело, M — митохондрии, G — аппарат Гольджи, ER — эндоплазматический ретикуллум, EDMB — электронноплотный материал ботросомы, PM — плазматическая мембрана, S — чешуйки, EN — эктоплазматическая сеть (Iwata et al., 2017).

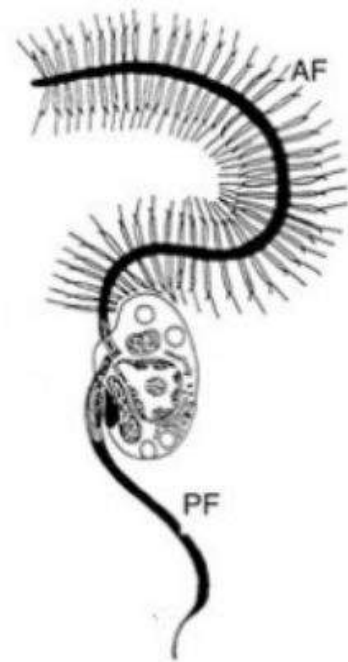


Рисунок 2. Зооспора траустохитрида. AF - передний жгутик, PF - задний жгутик (по Bennett et al. 2017).

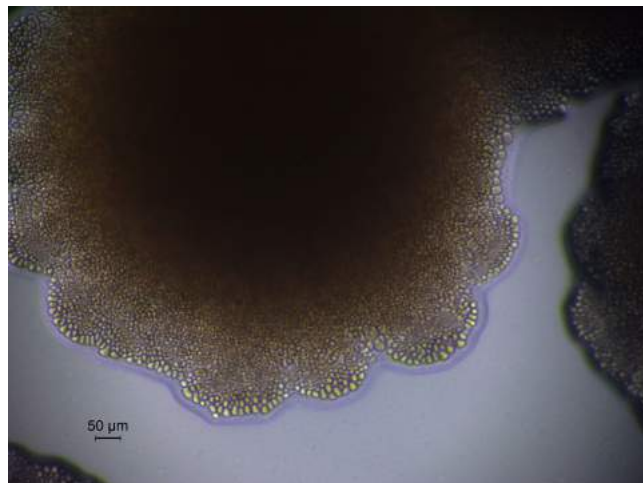
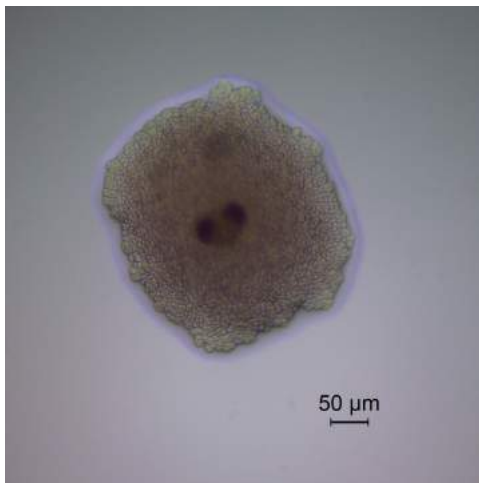
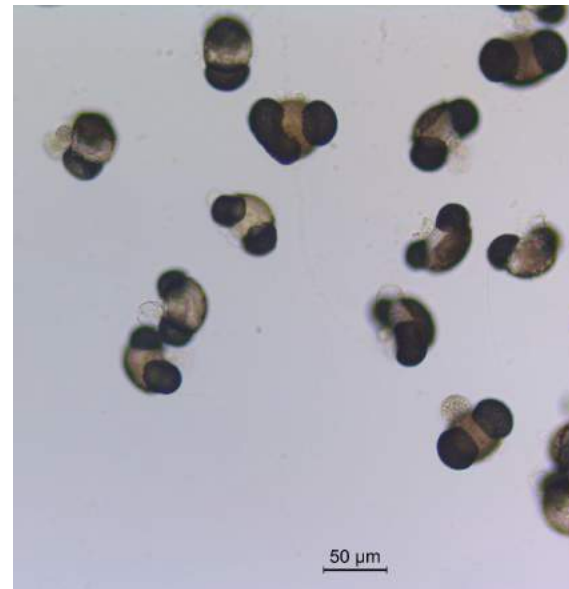


Расположение районов отбора образцов в прибрежной зоне Баренцева моря в августе 2020 года

1 - Мурманск (две локации); 2 - Териберка (три локации)



Некоторые локации на Баренцевом море, в которых отбирали образцы

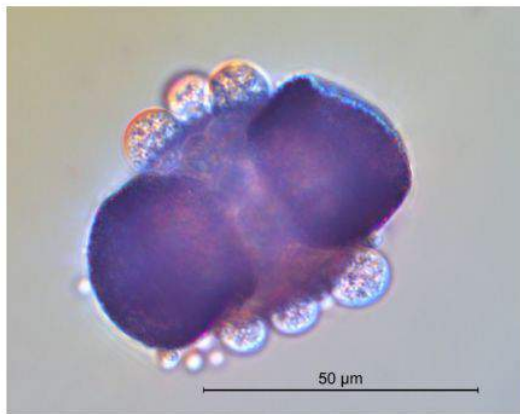


Получение
первичных культур

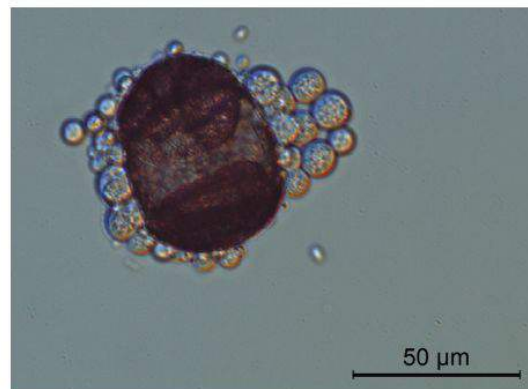
Результаты работ по выделению чистых культур:

Точка	Населенный пункт	Соленость, ppt	Содержание органического углерода, %	Тип грунта	Выделено штаммов в коллекцию
BS-01	Мурманск	13,3	3,56	песок заиленный	10
BS-02	Мурманск	13,1	3,45	песок заиленный	15
BS-03	Териберка	11,9	2,89	песок слабозаиленный	12
BS-04	Териберка	20,0	1,82	песок	0
BS-05	Териберка	23,7	2,53	песок	3

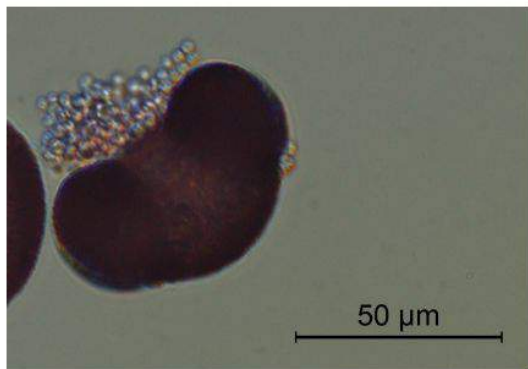
Морфология (светлое поле)



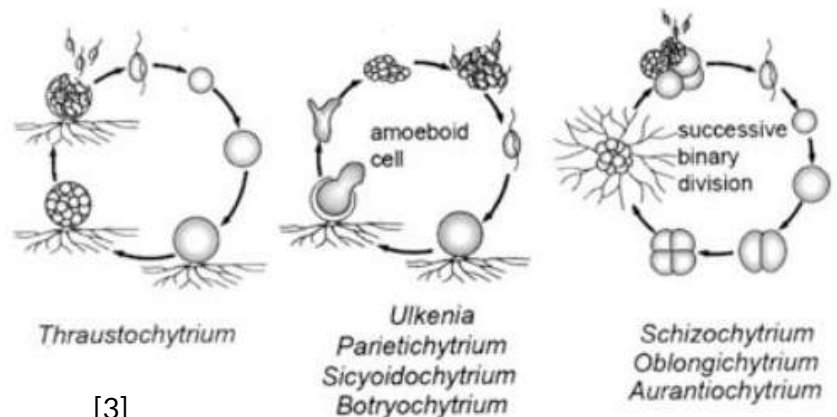
Талломы штамма ВЕФ
(*Ulkenia visurgensis*) на пыльце сосны



Талломы штамма ВВА
(*Thraustochytrium aureum*) на пыльце сосны

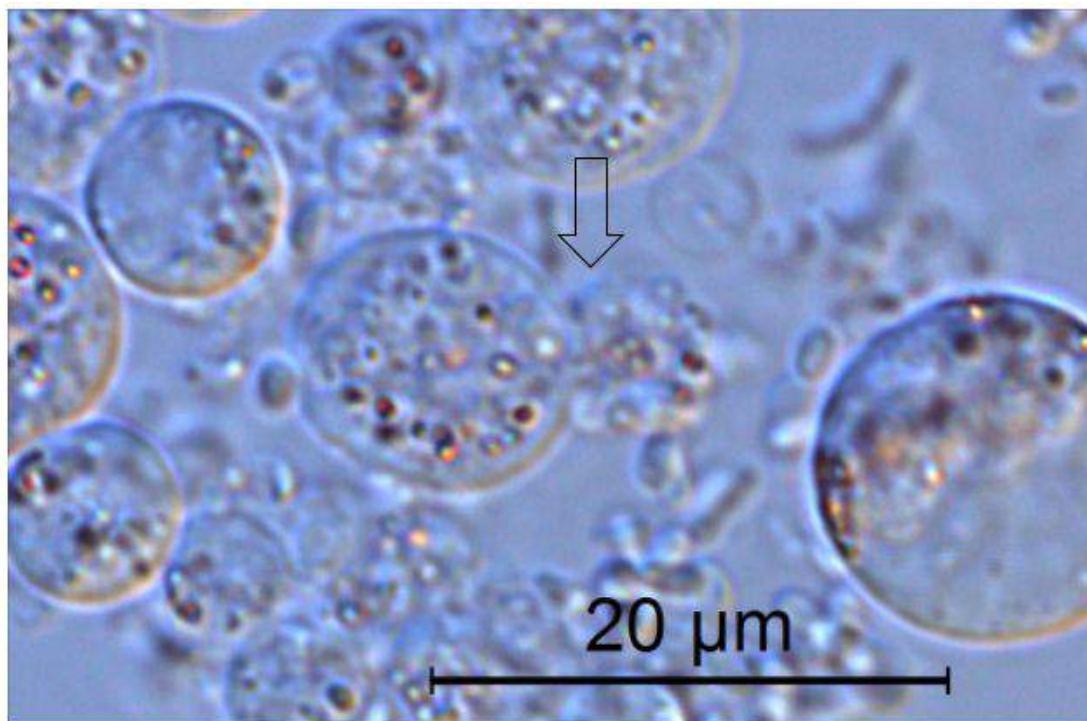


Талломы штамма ВВЕ
(*Aurantiochytrium* sp.) на пыльце сосны



[3]

Дифференциально-интерференционный контраст



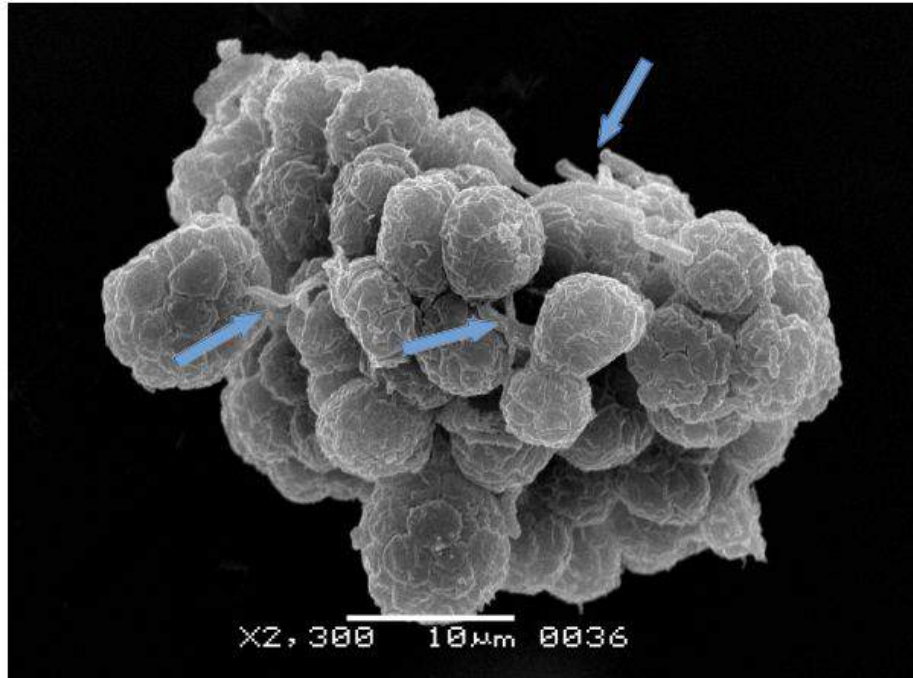
Выход зооспороплазмы. Штамм ВСВ
(*Ulkenia visurgensis*). ДИК

Дифференциально-интерференционный контраст

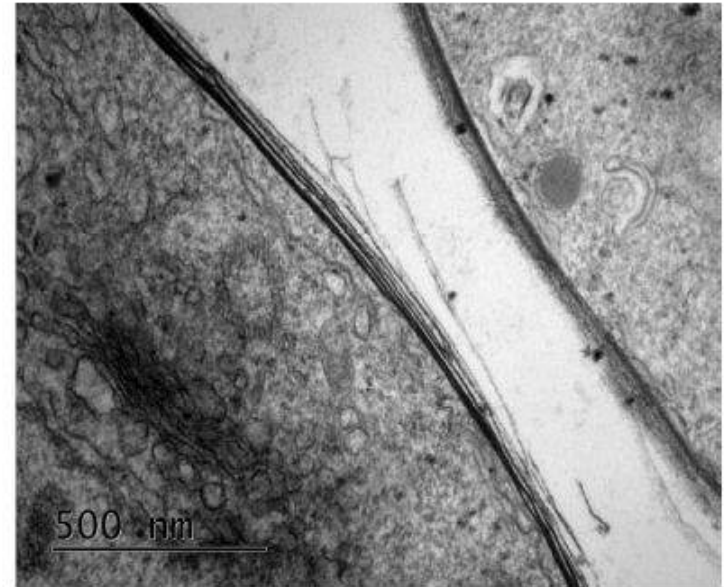


Эктоплазматическая сеть, исходящая из крупного таллома. Штамм ВСВ (*Ulkenia visurgensis*). ДИК

Электронная микроскопия

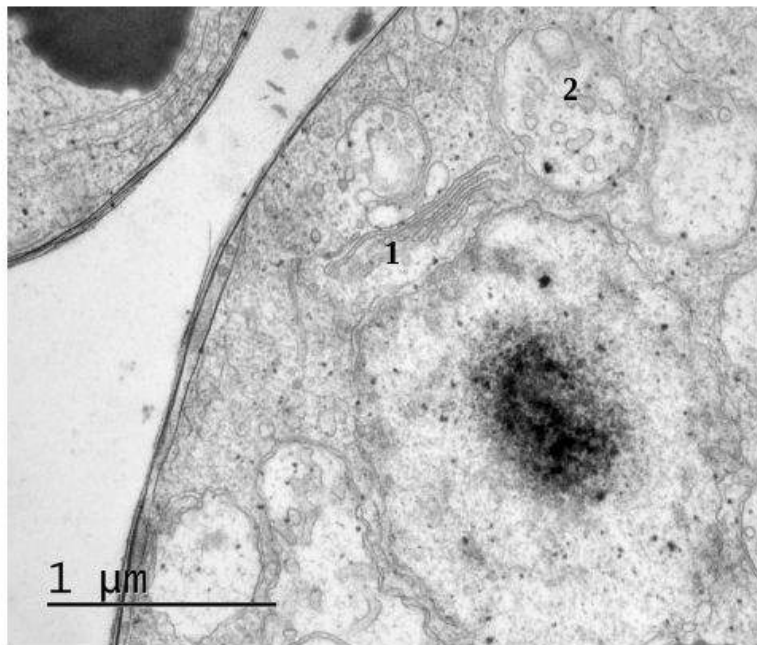


Микрофотография СЭМ штамма ADG. Видны чешуйки, покрывающие клетки, и трубковидные участки эктоплазматической сети (стрелки).

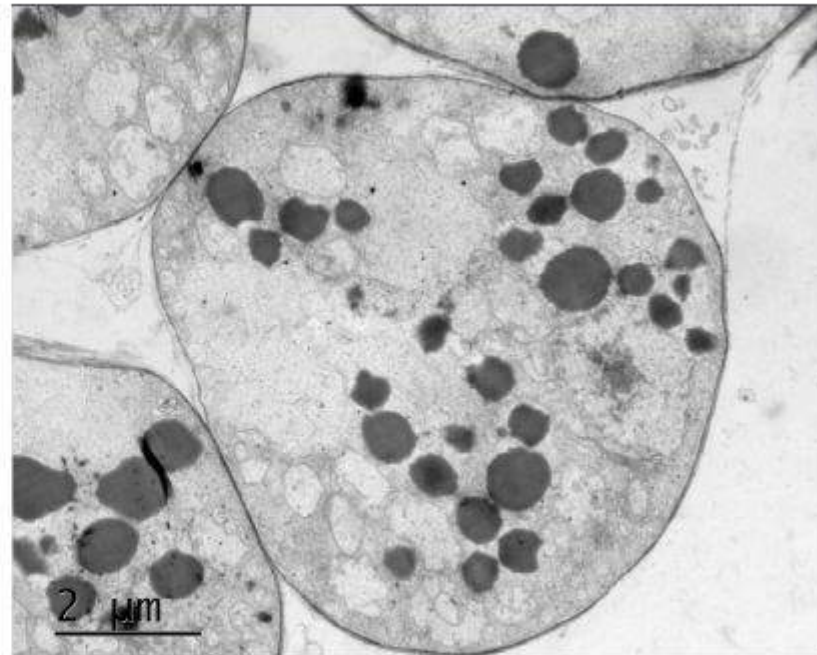


ТЭМ микрофотография участка среза таллома ADG. Хорошо видна слоистость клеточной оболочки

Трансмиссионная электронная микроскопия



ТЭМ микрофотография участка среза таллома ADG:
1) Аппарат Гольджи, 2) митохондрия с трубчатыми кристами



ТЭМ микрофотография среза таллома ADG,
хорошо видны обильные темные тела -
липидные включения

Молекулярная идентификация:

- Первичная обработка и слияние прочтений производились с помощью библиотеки `Byopython 1.78` и программного обеспечения `DNADynamo v. 1.615`
- Таксономическая база последовательностей лабиринтуломитетов была получена на основе курируемой базы данных последовательностей гена малой субъединицы рибосомы протистов `PR2 v4.14.0`, после фильтрации лабиринтуломитетных сиквенсов с помощью библиотеки `Byopython 1.78`, объединения полученных результатов в операционно-таксономические единицы со сходством $> 99\%$ с использованием программного обеспечения `vsearch 2.7.0` и дальнейшим созданием локальной базы данных `BLAST` нуклеотидных последовательностей при помощи утилиты `makeblastdb 2.13.0+`
- Установление таксономической принадлежности производилось при помощи утилиты `blastn 2.13.0+` по созданной локальной базе данных

Результаты работ по молекулярной идентификации:

Таксон	BS-01	BS-02	BS-03	BS-04	BS-05
<i>Ulkenia visurgensis</i>	-	8	-	-	-
<i>Thraustochytrium aureum</i>	-	4	2	-	-
<i>Aurantiochytrium spp.</i>	7	2	5	-	-
<i>Thraustochytriidae sp1</i>	-	-	-	-	1
<i>Thraustochytriidae sp2</i>	-	-	-	-	2

Точка	Населенный пункт	Соленость, ppt	Содержание органического углерода, %	Тип грунта	Выделено штаммов в коллекцию
BS-01	Мурманск	13,3	3,56	песок заиленный	10
BS-02	Мурманск	13,1	3,45	песок заиленный	15
BS-03	Териберка	11,9	2,89	песок слабозаиленный	12
BS-04	Териберка	20,0	1,82	песок	0
BS-05	Териберка	23,7	2,53	песок	3

Таксон	BS-01	BS-02	BS-03	BS-04	BS-05
<i>Ulkenia visurgensis</i>	-	8	-	-	-
<i>Thraustochytrium aureum</i>	-	4	2	-	-
<i>Aurantiochytrium spp.</i>	7	2	5	-	-
<i>Thraustochytriidae sp1</i>	-	-	-	-	1
<i>Thraustochytriidae sp2</i>	-	-	-	-	2

Выводы



1. Из 25 образцов грунтов литорали Баренцева моря, отобранных в 5 точках, было выделено 40 чистых культур лабиринутомицетов. Обнаружено, что количество выделяемых изолятов больше в условиях заиления, повышенного содержания органического углерода и пониженной солёности.
2. Данных о морфологии и ультраструктуре выделенных лабиринутомицетов недостаточно для их идентификации. Использование методов СЭМ и ТЭМ позволяют подтвердить общие свойства лабиринутомицетов, отличающие их от морфологически сходных организмов: наличие эктоплазматической сети, чешуйки на поверхности клеток, развитый аппарат Гольджи и трубчатые кристы митохондрий.
3. Молекулярные исследования позволили идентифицировать 14 штаммов до вида: *Thraustochytrium aureum* (6) и *Ulkenia visurgensis* (8). Еще 14 идентифицированы до рода (*Aurantiochytrium*) и 3 до семейства (*Thraustochytriidae*), эти штаммы являются ресурсом для дальнейшего изучения биоразнообразия, и, возможно, описания новых видов.

Благодарности



- Научному сотруднику Лаборатории экологии прибрежных донных сообществ Института океанологии имени П.П. Ширшова РАН, к.б.н.

Симаковой Ульяне Вадимовне

- Профессору кафедры Микологии и Альгологии Биологического Факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, д.б.н.

Камзолкиной Ольге Владимировне

- Старшему научному сотруднику кафедры микробиологии Биологического Факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н.


Виноградовой Елизавете Николаевне

- Заместителю руководителя управления научных исследований и разработок центра морских исследований МГУ имени М. В. Ломоносова, к.б.н.

Коноваловой Ольге Петровне

- Научному сотруднику Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова Биологического Факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, к.б.н.

Бубновой Екатерине Николаевне



Благодарю за внимание!

*“Разнообразие лабиринтуломикетов в литоральных
грунтах Баренцева моря”*

Дмитрий Перебоев

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

dm.pereboev@gmail.com

- [1] Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... & Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.
- [2] Thakur R., Shiratori T., Ishida K. Taxon-rich multigene phylogenetic analyses resolve the phylogenetic relationship among deep-branching stramenopiles. // *Protist* 2019. V. 170. 125682
- [3] Bennett R.M., Honda D., Beakes G.W., Thines M. Labyrinthulomycota, in: Archibald J.M., Simpson A.G.B., Slamovits C.H. (eds.) // *Handbook of the Protists*. Springer International Publishing, 2017. P. 507-542.
- [4] Iwata, I. and Honda, D., 2018. Nutritional intake by ectoplasmic nets of *Schizochytrium aggregatum* (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles). *Protist*, 169(5), pp.727-743.