

Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова Биологический факультет
кафедра микологии и альгологии

Нематофаговые грибы рода
Arthrobotrys и их
биотехнологический потенциал

Исполнитель:
Агроскин С.М.

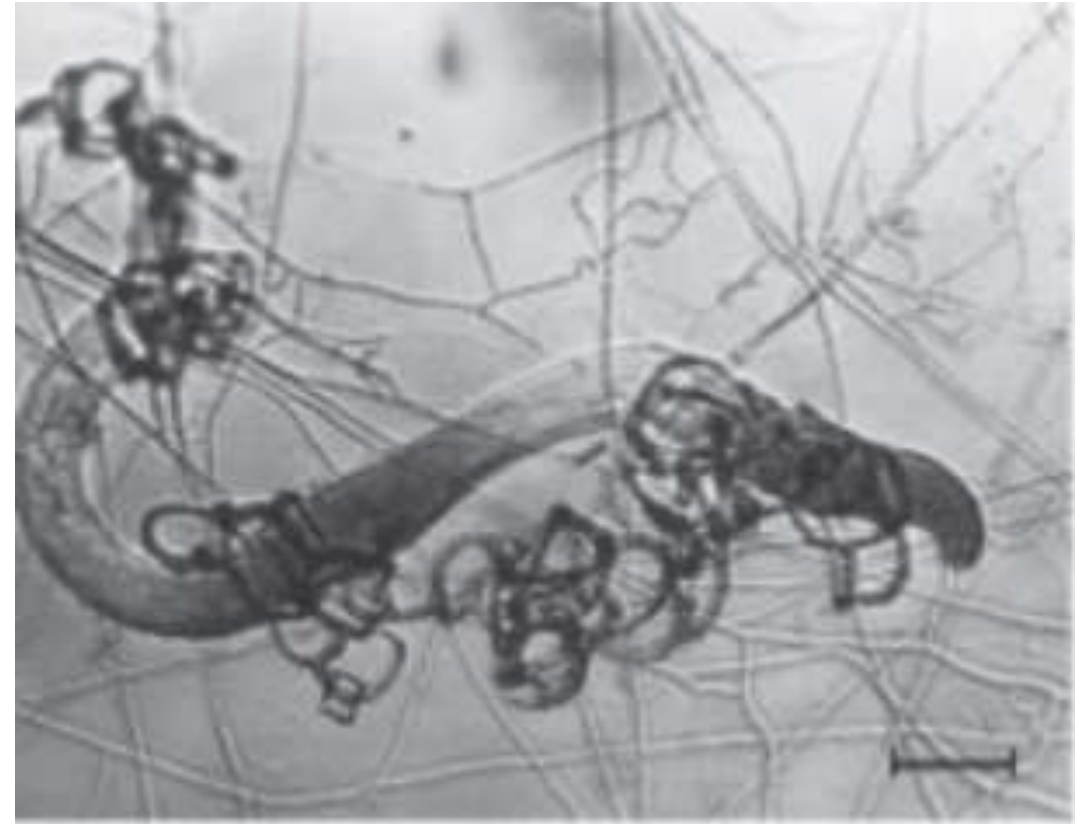
Руководитель:
д.б.н., в.н.с. Александрова А.В.

Рецензент:
д.б.н., профессор кафедры
биоинженерии биологического
факультета МГУ Соловченко А.Е.



Введение

- Нематофаговые грибы – небольшая группа, которая приобрела способность к активной ловле нематод, являющихся дополнительным источником азота. Данный механизм осуществляется благодаря формированию из гиф специальных ловчих приспособлений.
- Большая часть нематофаговых грибов сосредоточена в семействе Orbiliaceae отдела Ascomycota. В настоящее время выделяют 3 рода: *Arthrobotrys*, *Dactylellina* и *Drechslerella*.
- Нематофаговые грибы являются объектом интереса из-за уникальной стратегии питания и потенциала использования в качестве агентов биологического контроля нематод.



Moore, Robson & Trinci; (2020). 21st century guidebook to fungi. Cambridge University Press.

Введение

- Проведенные исследования эволюции, таксономии, морфологии и биохимии нематофаговых грибов позволяют оценить их биотехнологический потенциал и перспективы использования в различных сферах жизни человека.
- Расширение масштабов их применения возможно за счет исследования ранее неизученных территорий в поисках новых штаммов, а также оптимизации методов культивирования на специализированных производствах.
- Перспективными направлениями также являются изучение их ферментативных аппаратов, метаболических путей, механизмов распознавания жертв и физиологии ловчих приспособлений.



Цель работы

Получить новые данные о нематофаговых грибах из различных регионов, сформировать коллекцию чистых культур и оценить возможность их использования в биотехнологических направлениях.

Задачи

- Собрать и проанализировать образцы субстратов на наличие нематофаговых грибов на территории Беломорской биостанции МГУ, ботсада МГУ и стационара Тропического центра в национальном парке Катъен (Вьетнам).
- Составить рабочую коллекцию чистых культур нематофаговых грибов рода *Arthrobotrys*. Описать их морфологические признаки и провести на их основе предварительную идентификацию.
- Получить набор диагностических нуклеотидных последовательностей для штаммов коллекции и провести на их основе молекулярную идентификацию.
- Оценить нематофаговую активность полученных штаммов коллекции.
- Оценить антибактериальную активность полученных штаммов коллекции.
- Провести подбор наиболее подходящих источников азотного и углеродного питания.

Материалы и методы: общая схема практической части



Материалы и методы: сбор образцов

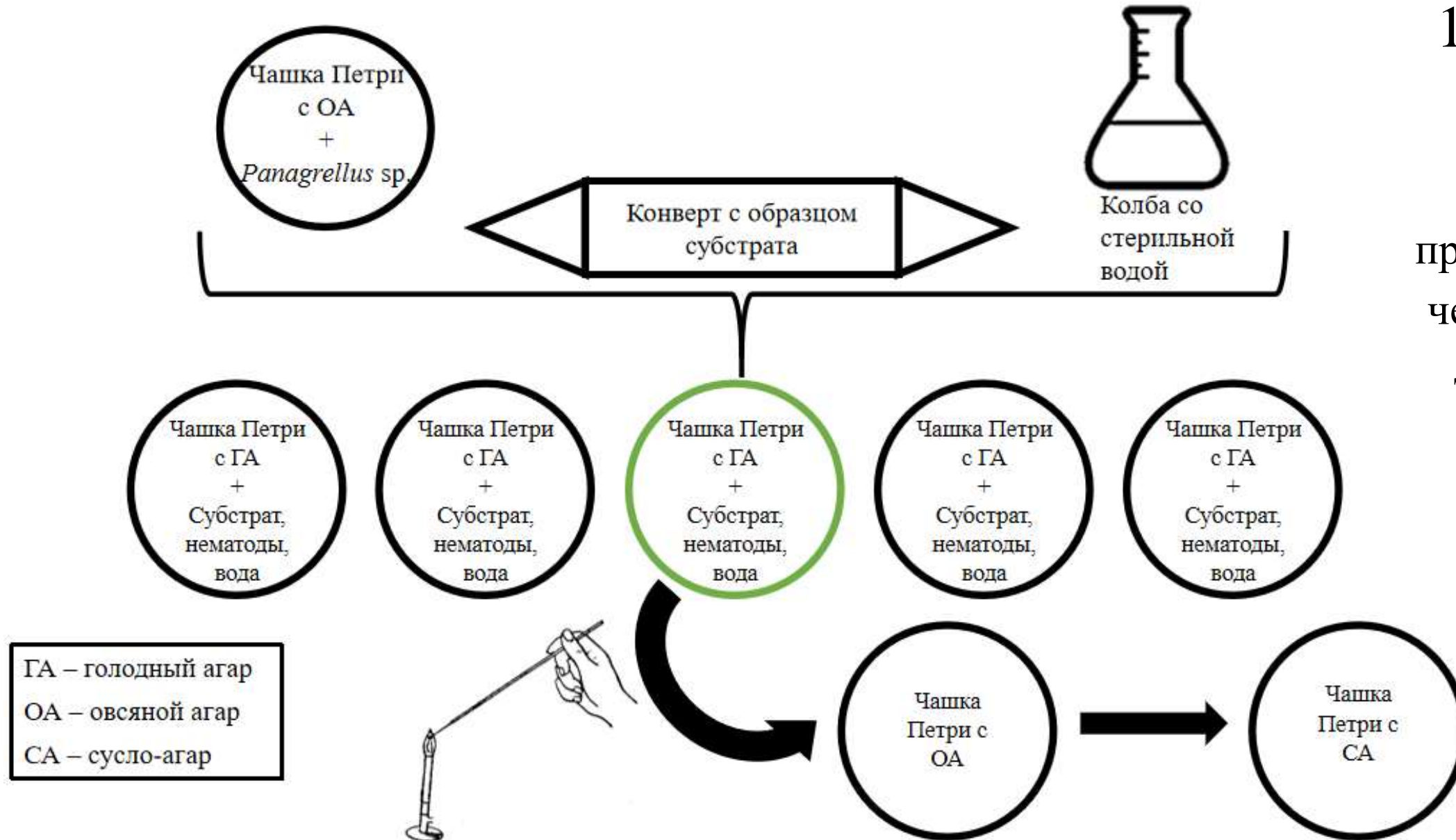
Количество образцов субстратов, собранных в 3-х разных географических зонах.

Год	Географическая зона	Типы субстрата			Общее число образцов
		Почва	Опад/подстилка	Разлагающаяся древесина	
2023	Субарктическая (ББС МГУ)	34	14	22	70
	Умеренная (Ботсад МГУ)	38	11	21	70
	Тропическая (Вьетнам)	35	35	0	70
2025	Субарктическая (ББС МГУ)	8	0	0	8
	Тропическая (Вьетнам)	5	2	2	9
Всего		120	62	45	227

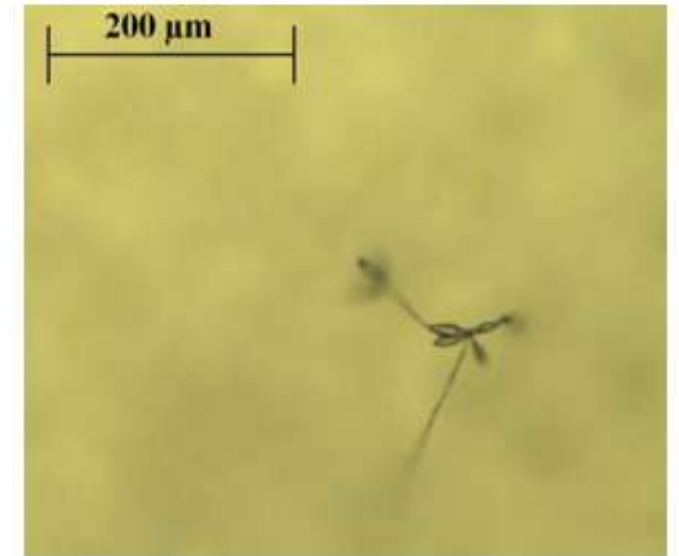
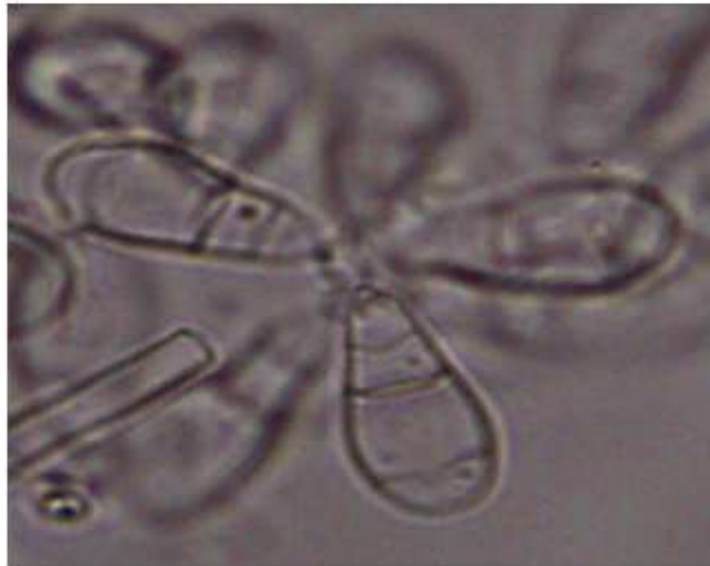
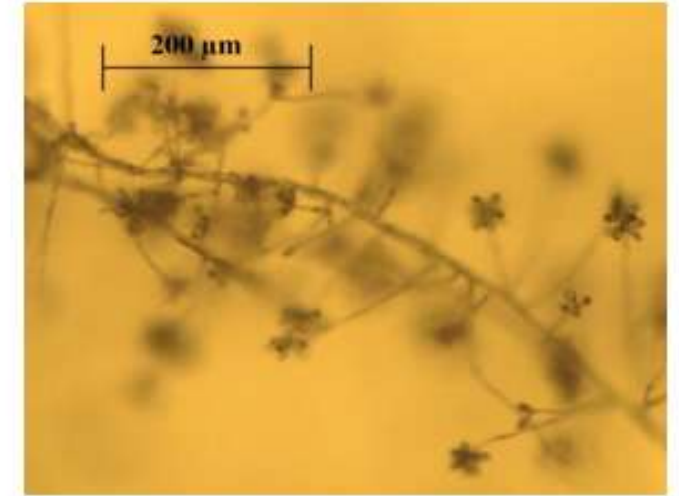
Материалы и методы: посев

Всего было посеяно 1135 чашек Петри.

Чашки просматривали через 14 и 30 дней после посева.



Материалы и методы: морфологическая идентификация



Структуры ловчих приспособлений

Морфология конидий

Морфология конидиеносцев

Материалы и методы: молекулярная идентификация

Выделение ДНК, ПЦР
(ITS, BenA),
гель-электрофорез, очистка

Сравнение полученных
последовательностей с базами
данных

Построение и анализ
филогенетических
деревьев



Помимо полученных в ходе данной работы, использованы коллекционные штаммы кафедры микологии и альгологии:

№6006 (ex№768) – *Arthrobotrys oligospora* и

№6007 (ex№769) – *Arthrobotrys musiformis*.

Результаты: выделение и морфологическая идентификация

В результате анализа 227 образцов субстратов нематофаговые грибы обнаружены в 41. Среди них больше всего отобрано в умеренной зоне – 22 из 41, в субарктической зоне – в 8 из 41 образца, в тропической зоне – 11 из 41 образца.

В результате морфологической идентификации выявлено 2 рода нематофаговых грибов: *Arthrobotrys* и *Dactylellina*.



Ловчие приспособления *Arthrobotrys* sp.



Ловчие приспособления *Dactylellina* sp.

Результаты: морфологическая идентификация

Виды нематофаговых грибов, обнаруженные в образцах из различных зон:

Вид	Субарктическая зона	Умеренная зона			Тропическая зона	
	Почва	Почва	Опад	Древесина	Почва	Опад
<i>Arthrobotrys anomalus</i> G.L. Barron & J.G.N. Davidson	0	1	0	0	0	0
<i>A. cladodes</i> Drechsler	0	1	0	0	0	0
<i>A. clavisporus</i> (R.C. Cooke) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer	0	1	0	0	0	0
<i>A. conoides</i> Drechsler	0	4	0	0	0	1
<i>A. oligospora</i> Fresen	3	2	1	0	0	0
<i>A. robustus</i> Dudd	2	0	0	0	0	0
<i>A. superba</i> Corda	2	0	0	0	0	1
<i>A. vermicola</i> (R.C. Cooke & Satchuth.) Rifai	0	0	0	0	0	2
<i>Arthrobotrys</i> spp.	2	5	3	3	2	4
<i>Dactylellina candida</i> (Nees) Yan Li	1	1	0	0	1	1
<i>D. gephyropaga</i> (Drechsler) Ying Yang & Xing Z. Liu	0	0	0	0	0	2

Результаты: молекулярная идентификация

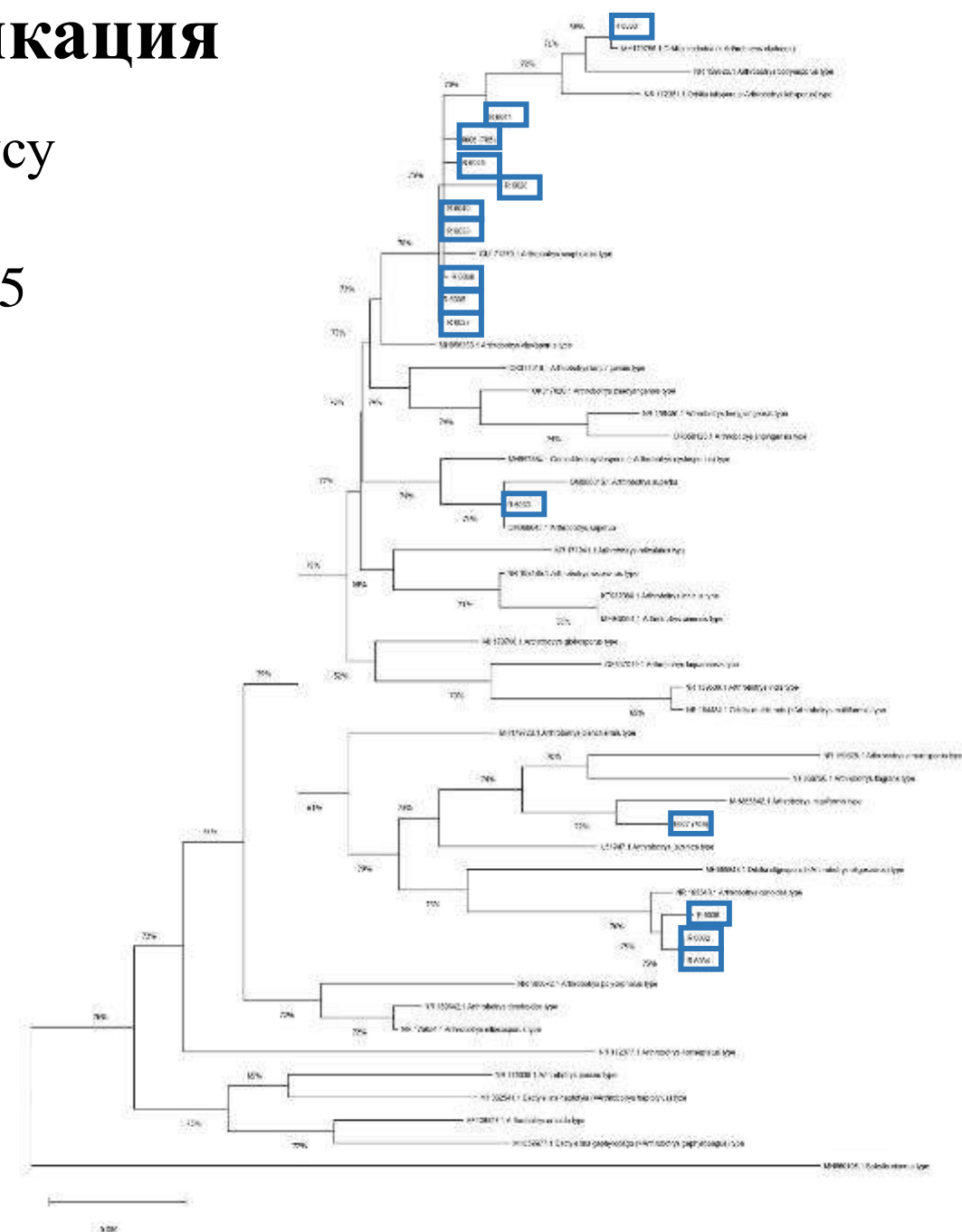
Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS построено на основе

- последовательностей из базы данных Genbank (35 референсных и 1 корневая);
- 15 последовательностей, полученных в ходе данной работы.

Использовали программы Mega11, Unipro UGENE, MAFFT.

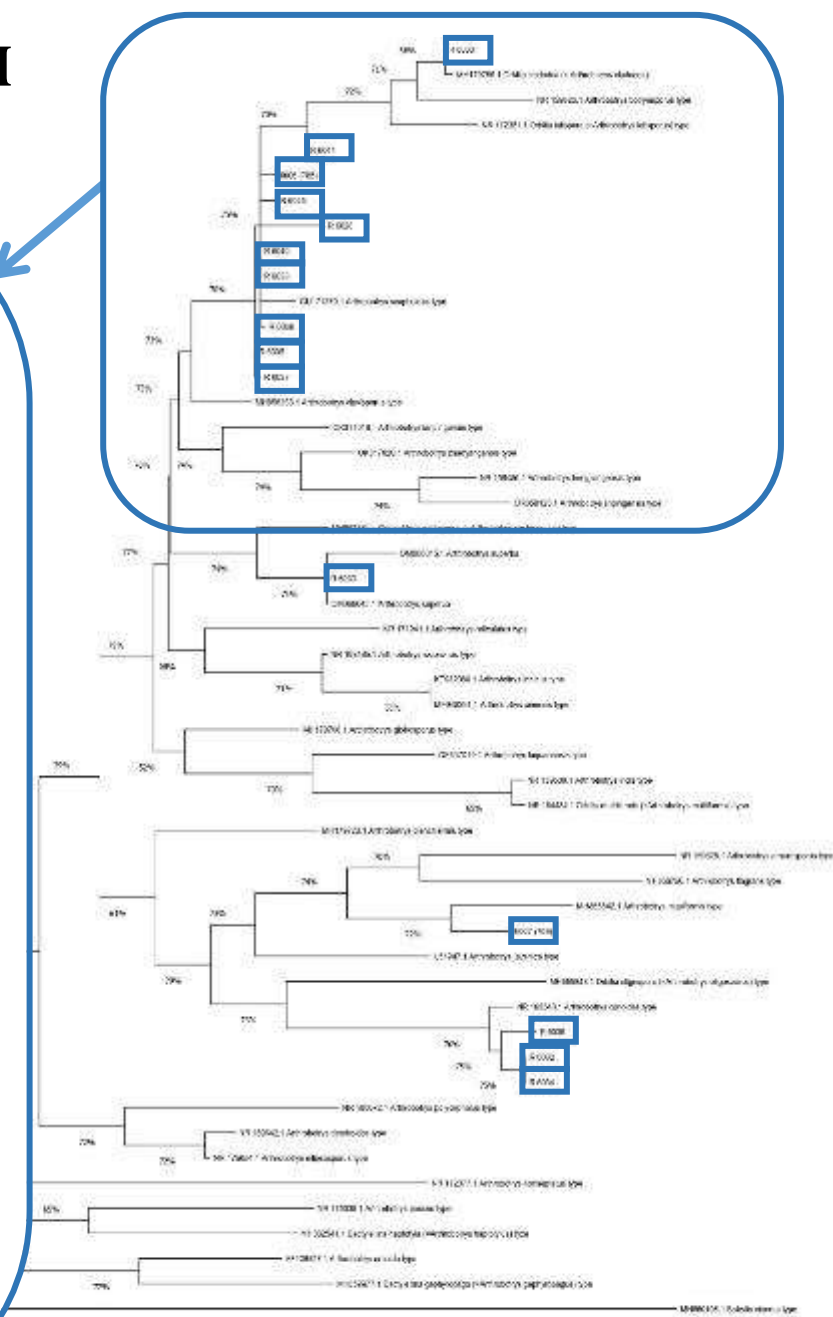
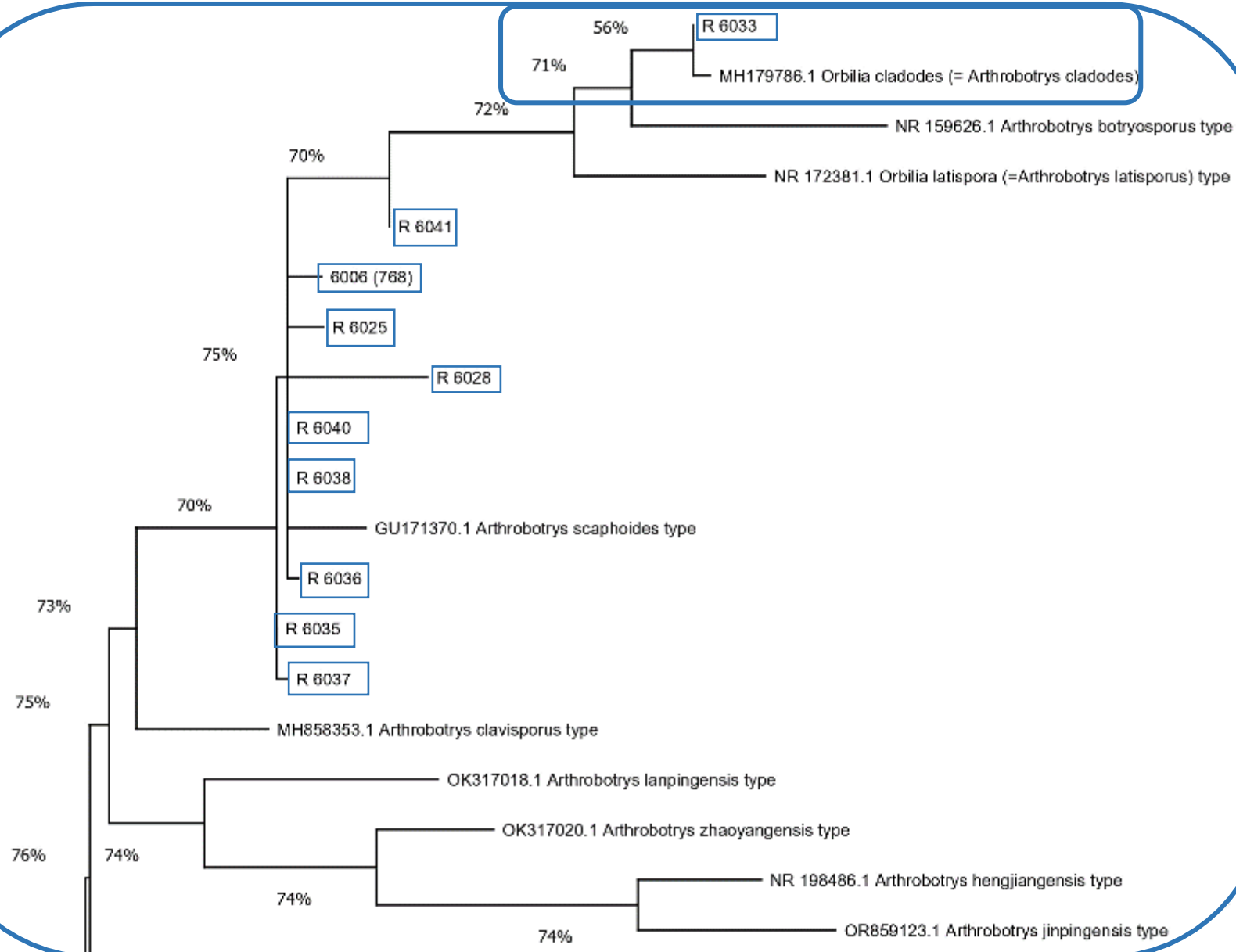
Дерево построено методом Maximum Likelihood.

Количество бутстреп-выборок 1000.



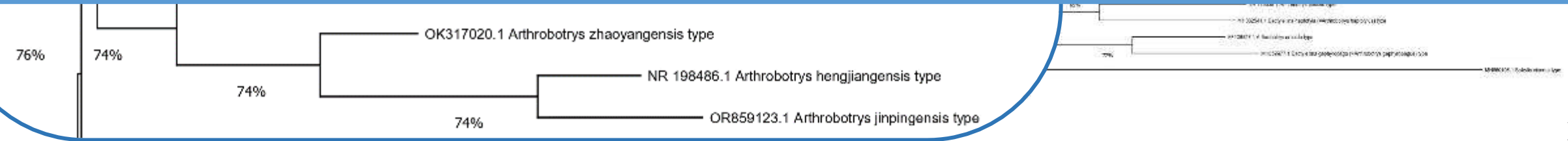
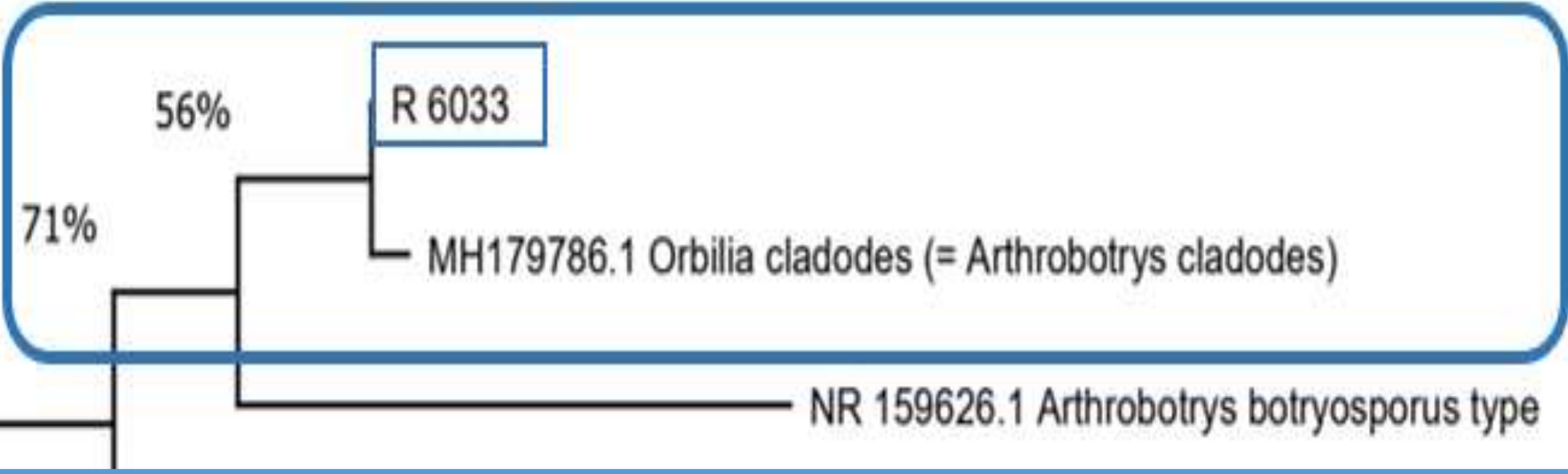
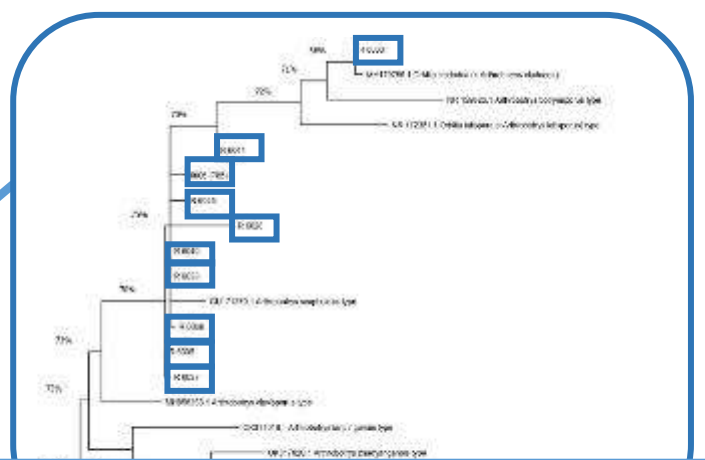
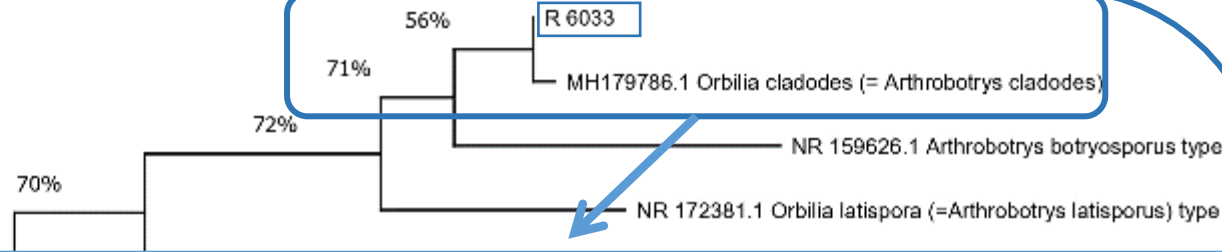
Результаты: молекулярная идентификация

Филогенетическое дерево рода *Arthrotrrys* по локусу ITS



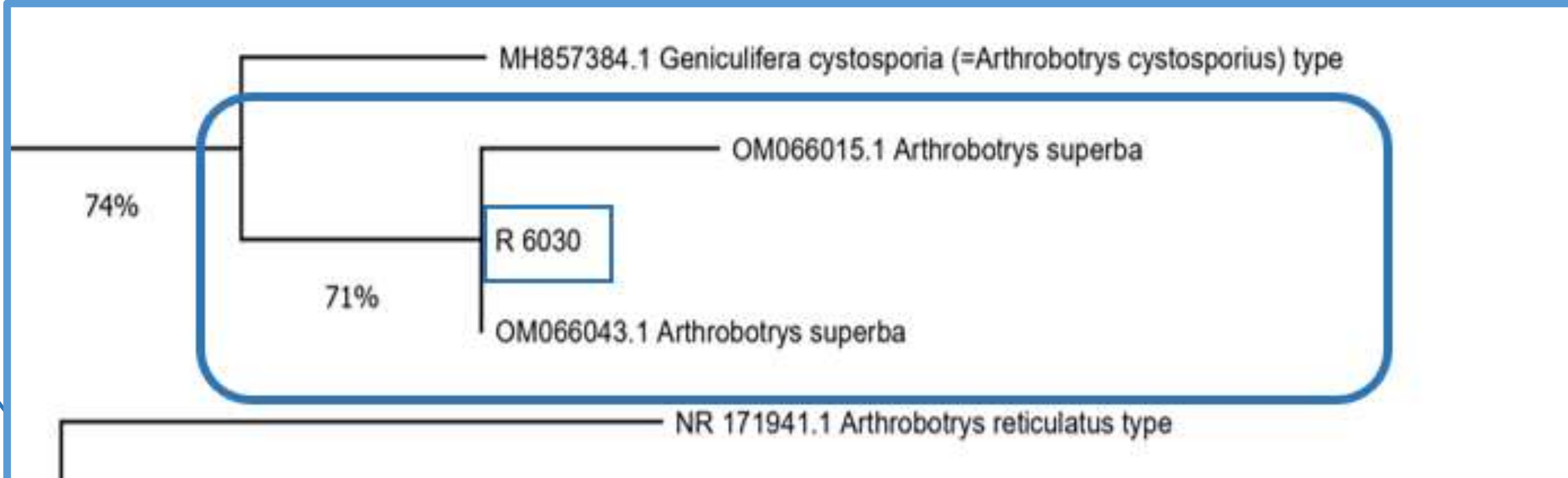
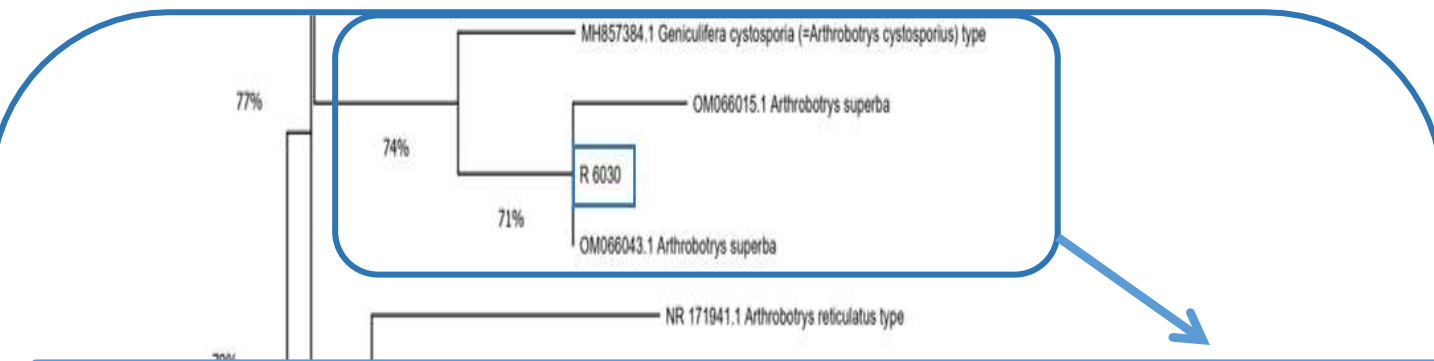
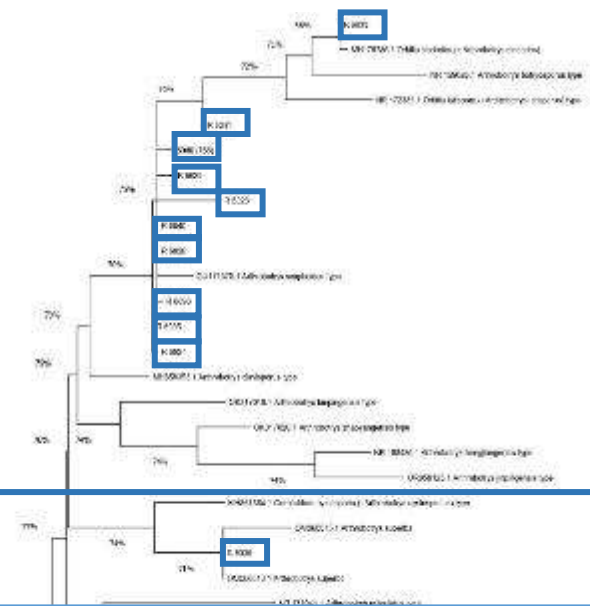
Результаты: молекулярная идентификация

Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS



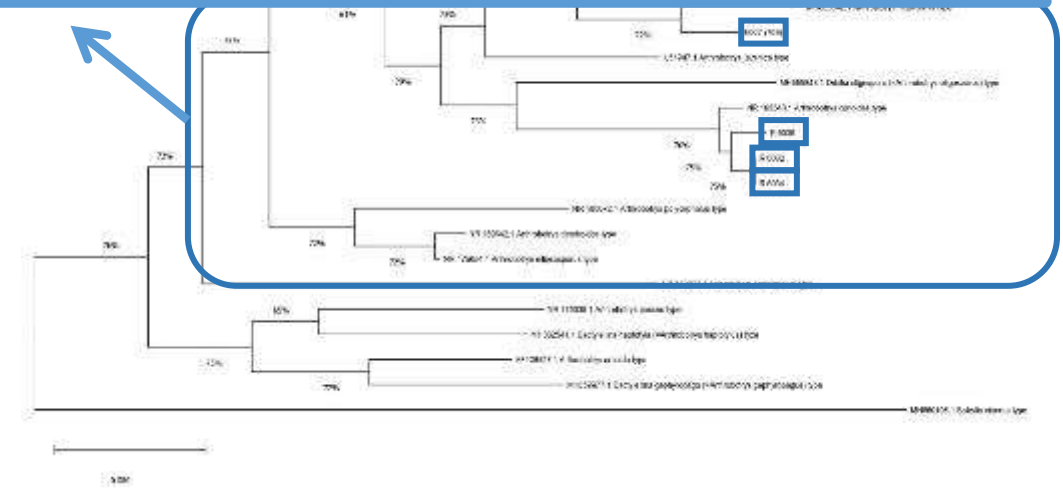
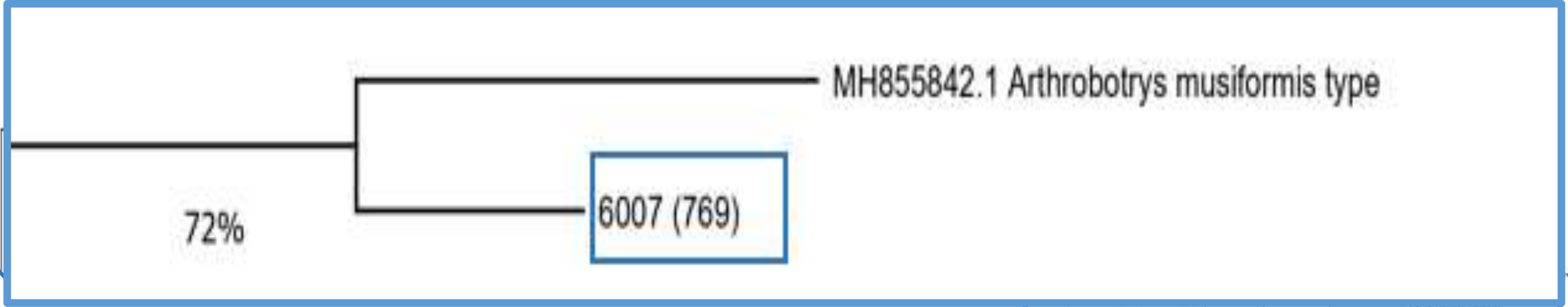
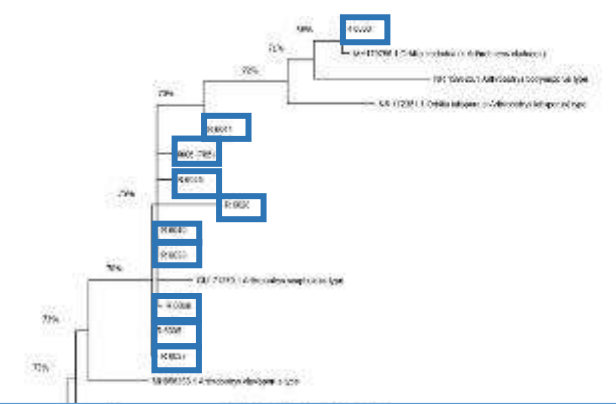
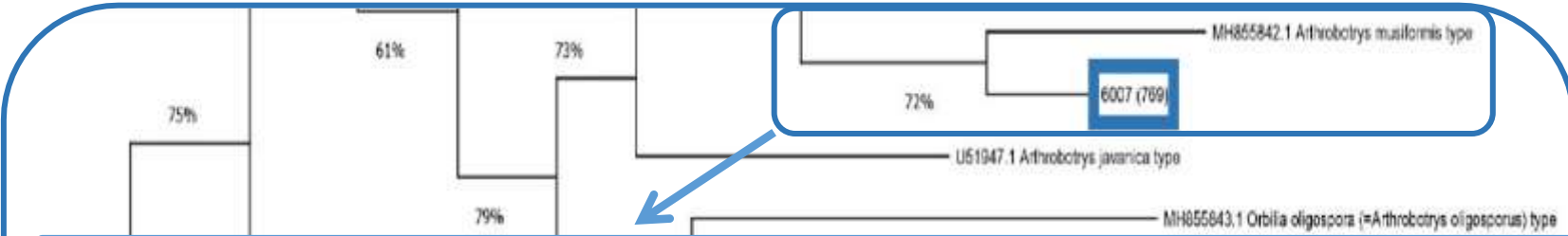
Результаты: молекулярная идентификация

Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS



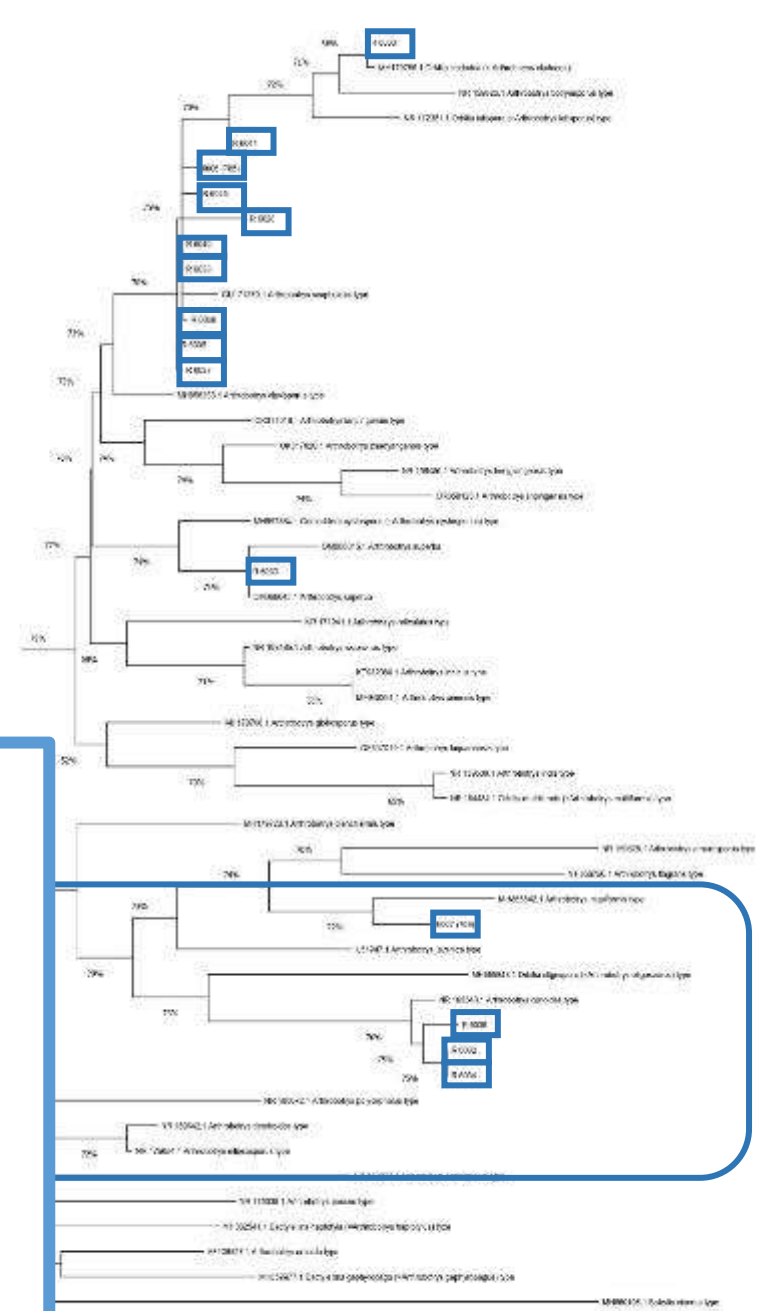
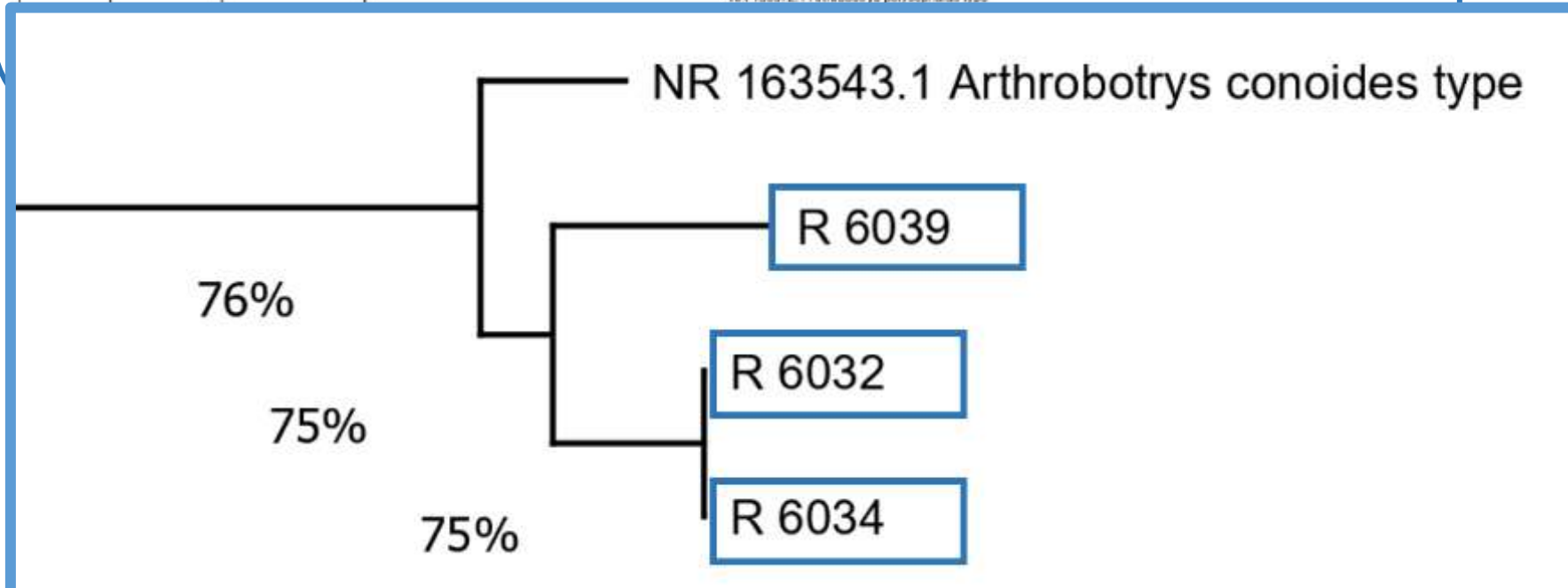
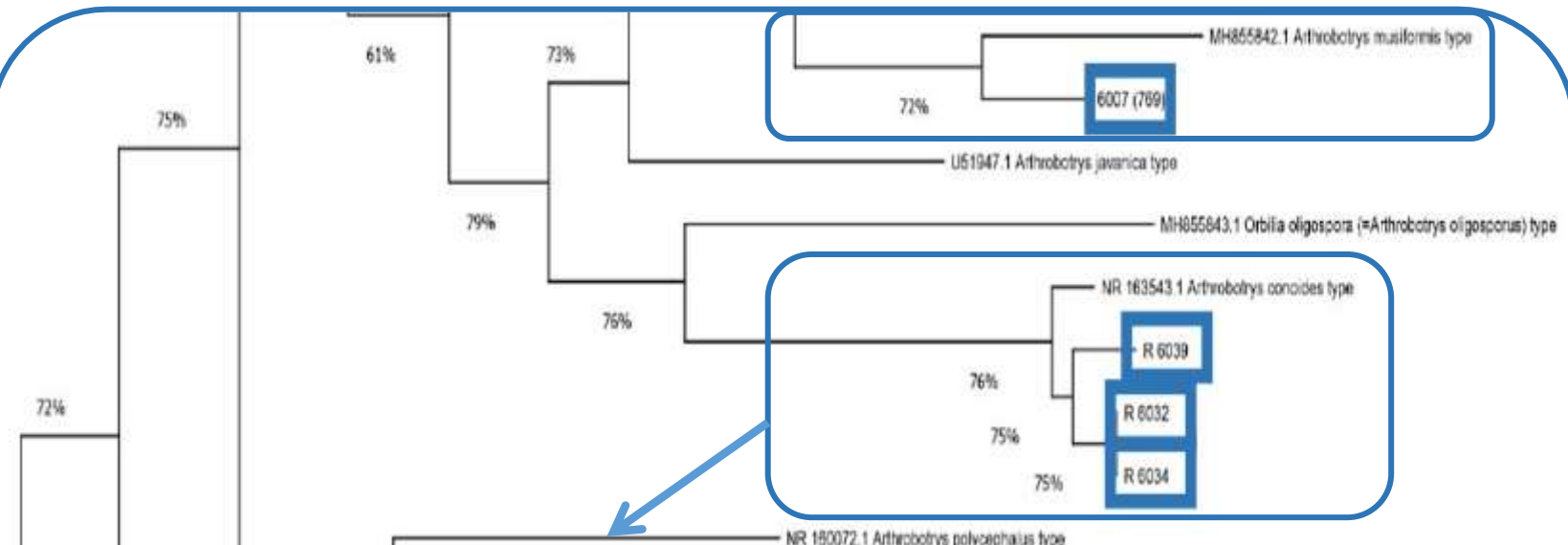
Результаты: молекулярная идентификация

Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS



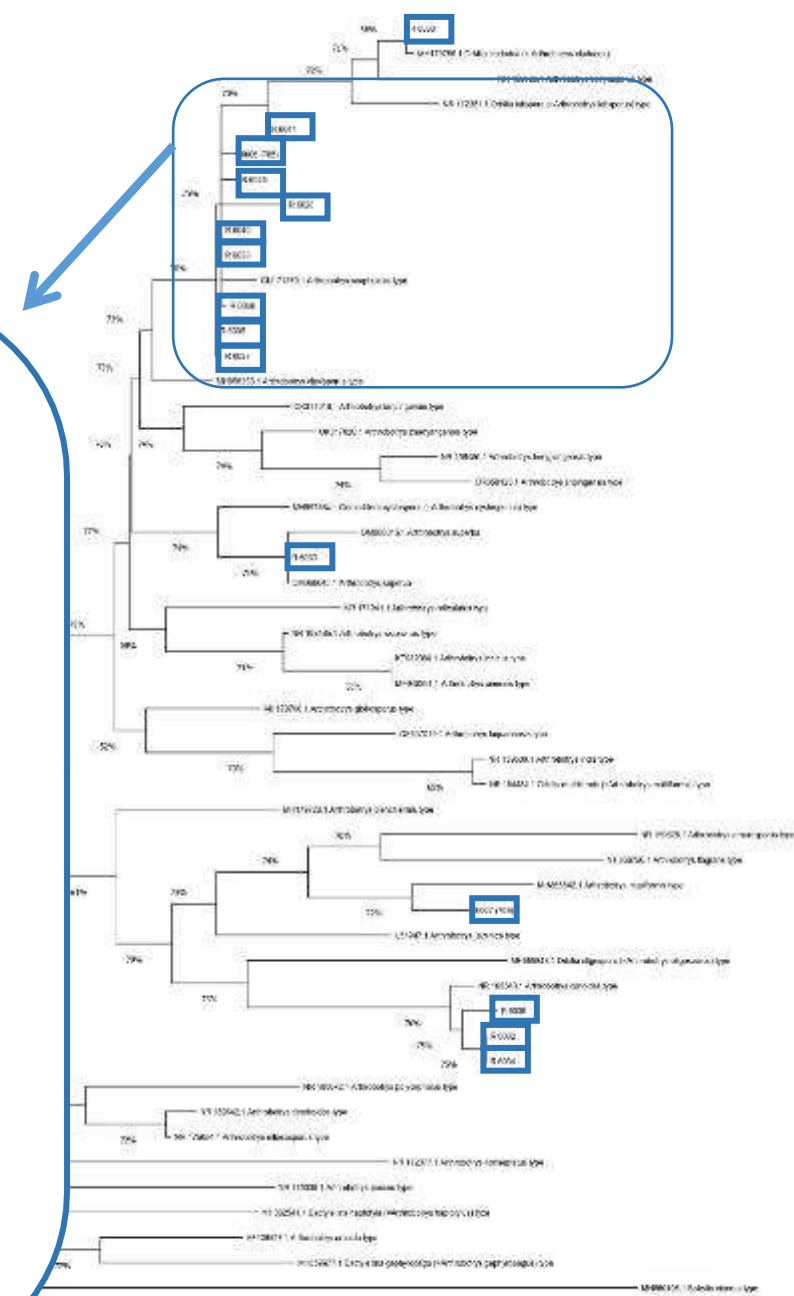
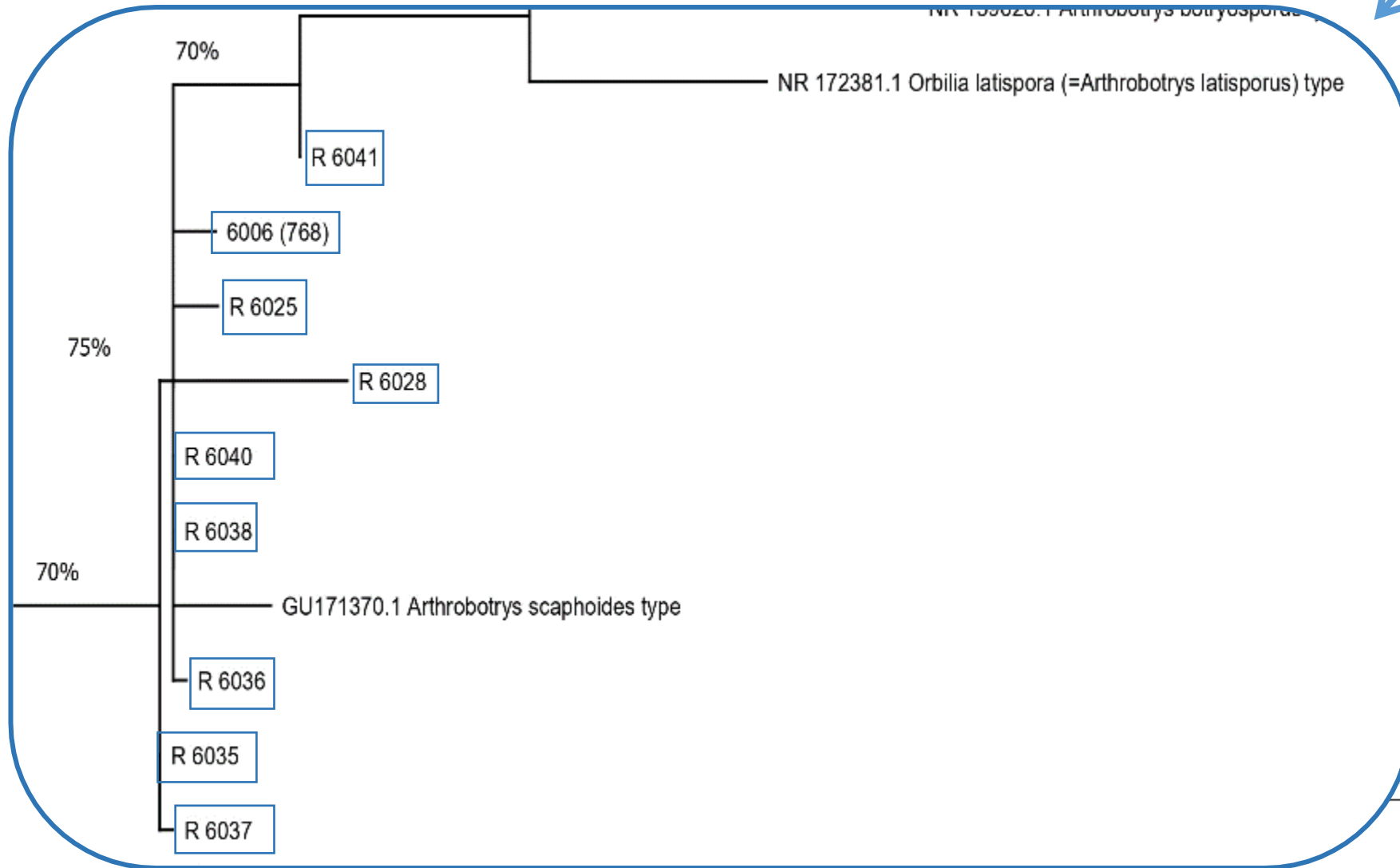
Результаты: молекулярная идентификация

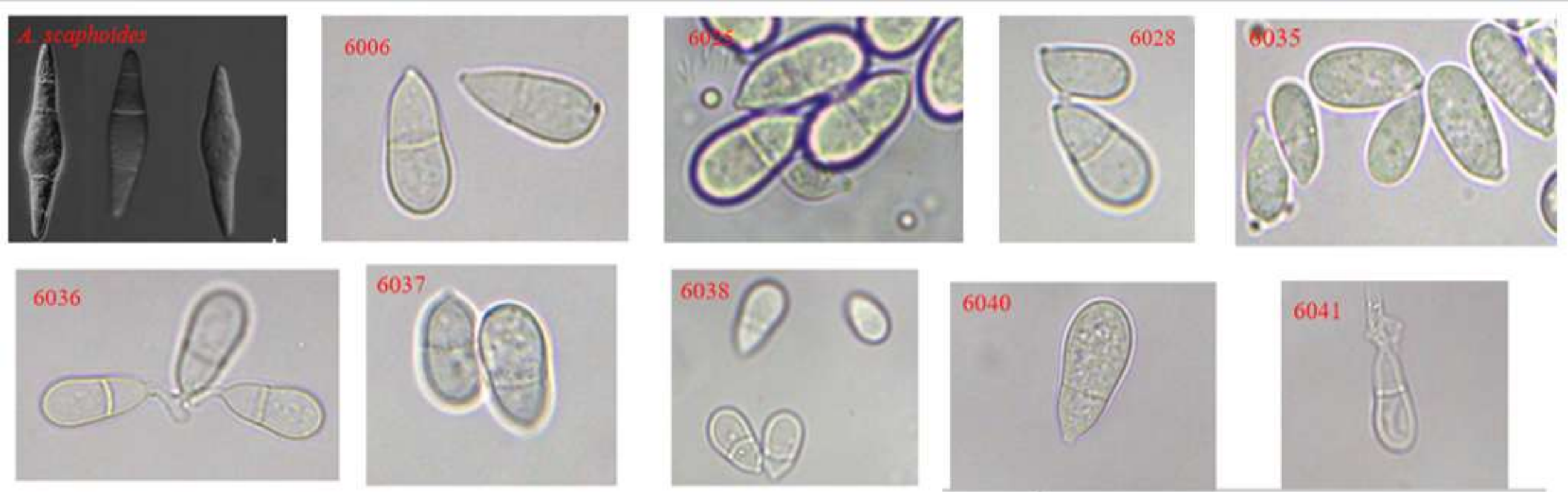
Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS



Результаты: молекулярная идентификация

Филогенетическое дерево рода *Arthrobotrys* по локусу ITS





Морфологические признаки *A. scaphoides* (Yu et. al 2014) и штаммов коллекции: 6006 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6025 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6028 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6035 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. anomalus*), 6036 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6037 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6038 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. oligospora*), 6040 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. clavisporus*), 6041 (*Arthrobotrys* sp, морфологически близкий к *A. conoides*)

В ходе данной работы из 41 образца удалось выделить в чистую культуру 18 штаммов, из которых сформирована рабочая коллекция.

Вид	Географическая зона		
	Субарктическая	Тропическая	Умеренная
<i>Arthrobotrys cladodes</i>	-	-	MSU_FS-6033
<i>A. conoides</i>	-	-	MSU_FS-6032, MSU_FS-6034, MSU_FS-6039
<i>A. superba</i>	MSU_FS-6030	-	-
<i>A. vermicola</i>	-	MSU_FS-6031	-
<i>Arthrobotrys sp</i> , морфологически близкий к <i>A. anomalus</i>	-	-	MSU_FS-6035
<i>Arthrobotrys sp</i> , морфологически близкий к <i>A. clavisporus</i>	-	-	MSU_FS-6040
<i>Arthrobotrys sp</i> , морфологически близкий к <i>A. conoides</i>	-	-	MSU_FS-6041
<i>Arthrobotrys sp</i> , морфологически близкий к <i>A. oligospora</i>	MSU_FS-6024, MSU_FS-6025, MSU_FS-6027, MSU_FS-6028	-	MSU_FS-6036, MSU_FS-6037, MSU_FS-6038
<i>Arthrobotrys sp</i> , морфологически близкий к <i>A. robustus</i>	MSU_FS-6026, MSU_FS-6029	-	-

Материалы и методы: оценка нематофаговой активности

Показатели:

Хищность



Активность



Пробирка с культурой гриба



ГА – голодный агар
ОА – овсяной агар

Результаты: нематофаговая активность

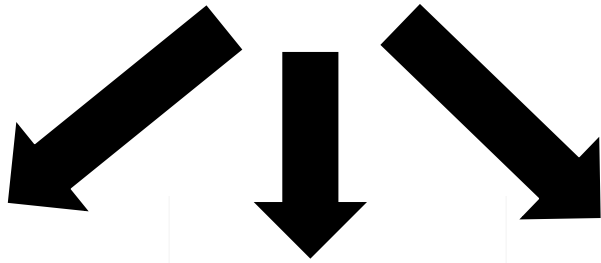
Зона	№ Штамма	Хищность, шт/100 п.з.		Активность, шт/100 п.з.	
		1 неделя	2 недели	1 неделя	2 недели
Субарктическая	6029	37±16	50±13	12±9	20±8
	6030	48±24	23±5	30±37	20±27
Умеренная	6032	79±37	81±34	22±13	21±12
	6034	76±16	54±17	14±5	21±6
	6036	69±25	28±6	18±6	17±3
	6039	38±20	64±16	9±7	18±8
	6040	40±10	35±8	29±6	24±5
Тропическая	6031	118±18	110±34	10±5	14±10

Оба исследуемых показателя преимущественно проявили тенденцию к снижению своих значений с течением времени.

При этом были образцы, значения хищности и активности в которых наоборот, увеличились.

Материалы и методы: подбор оптимального состава сред

Пробирка с культурой гриба



Колбы со стерильной средой

Для эксперимента взяли 5 штаммов из рабочей коллекции с наибольшими значениями показателя хищности:

6029, 6030, 6031, 6032, 6034.

За основу брали среду Чапека, где варьировали источники азота и углерода.

Эксперимент проводили в 3 этапа:

1. выявление оптимального источника азотного питания;
2. сравнение эффективности моно- и полисахаридов в комбинации с выявленным оптимальным источником азота;
3. сравнение комплексных составов.

Результаты: подбор оптимального состава сред для культивирования

1 этап: сравнение значений веса сухого мицелия (г), полученного на средах с вариациями источников С и N: глюкоза/сахароза и нитрат/аммоний.

Состав сред	№ штамма					Среднее значение (среда), г
	6029	6030	6031	6032	6034	
Глюкоза/NO ₃	0.047±0.004	0.062±0.007	0.056±0.007	0.056±0.007	0.059±0.015	0.056±0.008
Глюкоза/NH ₄	0.058±0.002	0.074±0.005	0.065±0.007	0.053±0.009	0.077±0.011	0.065±0.007
Сахароза/NO ₃	0.118±0.011	0.099±0.005	0.098±0.008	0.092± 0.002	0.088±0.010	0.099±0.007
Сахароза/NH ₄	0.078±0.016	0.092±0.002	0.068±0.014	0.076±0.008	0.087±0.013	0.080±0.011
Среднее значение (штамм), г	0.075±0.008	0.082±0.005	0.072±0.009	0.069±0.007	0.78±0.012	

Результаты: подбор оптимального состава сред для культивирования

2 этап: сравнение значений веса сухого мицелия (г), полученного на средах с вариациями типа углеводов: фруктоза /мальтоза /лактоза / крахмал.

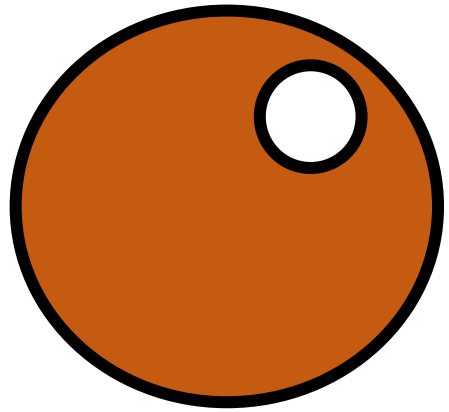
Состав сред	№ штамма					Среднее значение (среда), г
	6029	6030	6031	6032	6034	
Фруктоза/NO3	0.120±0.002	0.071±0.002	0.086±0.003	0.097±0.005	0.058±0.026	0.086±0.008
Мальтоза/NO3	0.151±0.026	0.175±0.018	0.153±0.019	0.112±0.004	0.136±0.007	0.145±0.015
Лактоза/NO3	0.057±0.010	0.064±0.008	0.066±0.005	0.074±0.013	0.082±0.009	0.069±0.009
Крахмал/NO3	0.049±0.001	0.044±0.002	0.039±0.002	0.045±0.002	0.051±0.004	0.046±0.002
Среднее значение (штамм), г	0.094±0.010	0.089±0.008	0.086±0.007	0.081±0.006	0.082±0.012	

Результаты: подбор оптимального состава сред для культивирования

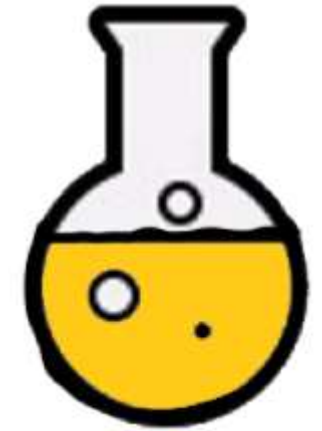
3 этап: сравнение значений веса сухого мицелия (г), полученного на средах с вариациями соевая мука/дрожжевой экстракт/пептон.

Состав сред	№ штамма					Среднее значение (среда), г
	6029	6030	6031	6032	6034	
Соевая мука	0.332±0.015	0.379±0.009	0.331±0.008	0.352±0.007	0.340±0.013	0.347±0.010
Дрожжевой экстракт	0.088±0.006	0.079±0.005	0.082±0.005	0.092±0.006	0.069±0.007	0.082±0.006
Пептон	0.152±0.006	0.138±0.006	0.155±0.007	0.118±0.004	0.143±0.003	0.235±0.005
Среднее значение (штамм), г	0.191±0.009	0.199±0.007	0.189±0.007	0.187±0.006	0.184±0.008	

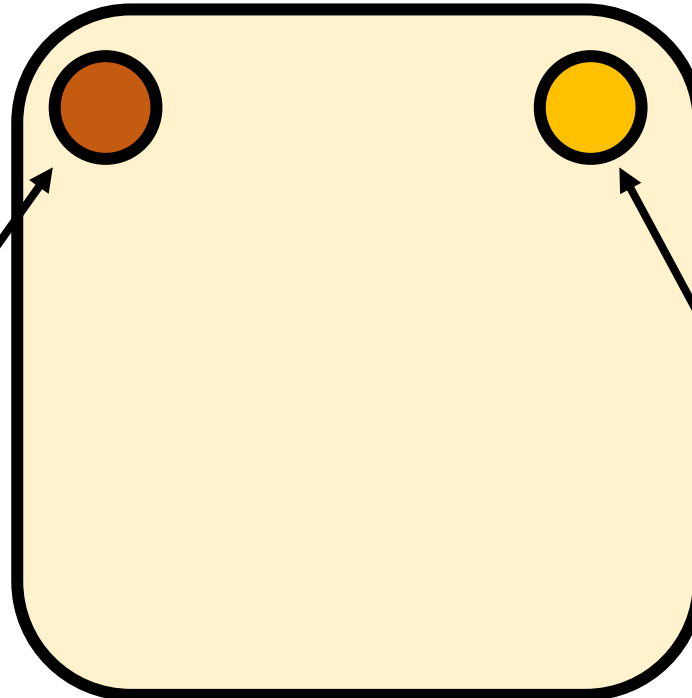
Материалы и методы: оценка антибактериальной активности



Чашка Петри с чистой культурой гриба



Колба с глубинной культурой гриба



Блок агара с мицелием

Лунка с культуральной жидкостью

Чашка Петри с *Escherichia coli*
(штаммы Δ и Lptd)

штамм Δ – нарушена работа механизма выкачивания антибиотиков из клетки

штамм Lptd – мутирован липополисахарид-связывающий белок lptD

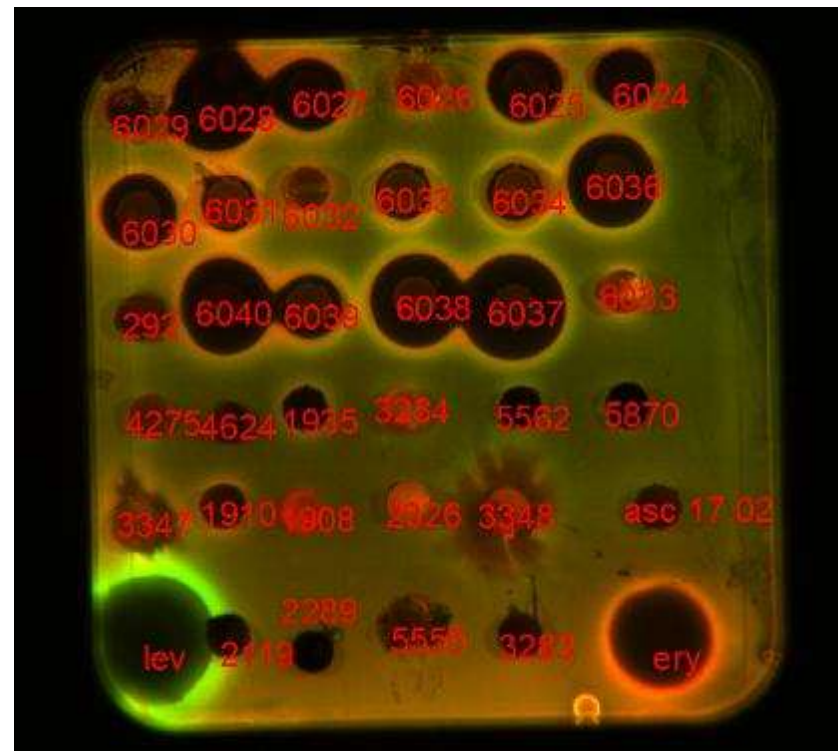
Результаты: оценка антибактериальной активности

(совместно с группой Д. Лукьянова, кафедра химии природных соединений, Химический факультет)

Анализировали 16 штаммов видов рода *Arthrobotrys*:



Все 16 штаммов грибов
проявили активность
против штамма *E. coli* Lptd
на 7 сутки



13 штаммов грибов
проявили активность
против штамма *E. coli* Δ
на 7 сутки

В жидкой культуре
наибольшую активность
проявили штаммы

- **6030**
- **6031**
- **6032**
- **6036**
- **6037**

Они отобраны для
дальнейшей работы по
идентификации
действующего вещества.

Результаты: оценка антибактериальной активности

Зона	№ Штамма	D зоны подавления, мм			
		Штамм <i>E. coli</i> Lptd		Штамм <i>E. coli</i> Δ	
		Недельная культура гриба	Двухнедельная культура гриба	Недельная культура гриба	Двухнедельная культура гриба
Субарктическая	6024	16	10	2	1
	6025	18	12	5	1
	6027	16	14	5	1
	6030	20	14	5	0
Умеренная	6032	16	10	0	0
	6036	12	7	6	4
	6037	16	14	8	3
	6038	16	12	7	2
Тропическая	6031	16	10	1	1

Заключение

Подобранные в данной работе условия выращивания и культивирования нематофаговых грибов подтвердили эффективность методики их выделения путем посева кусочков субстрата.

Совместное использование морфологической и молекулярной идентификации позволило сделать предположения о видовой принадлежности штаммов рабочей коллекции. Для более точной молекулярной идентификации необходимы новые данные и увеличение числа исследуемых локусов.

Среди обнаруженных, видов рода *Arthrobotrys* выявлено больше, чем видов рода *Dactylellina*.

Наблюдаемая тенденция к снижению эффективности ловли нематод с течением времени, вероятно, может быть связана с высокой «платой» за формирование ловчих приспособлений и необратимыми возрастными изменениями физиологии мицелия.

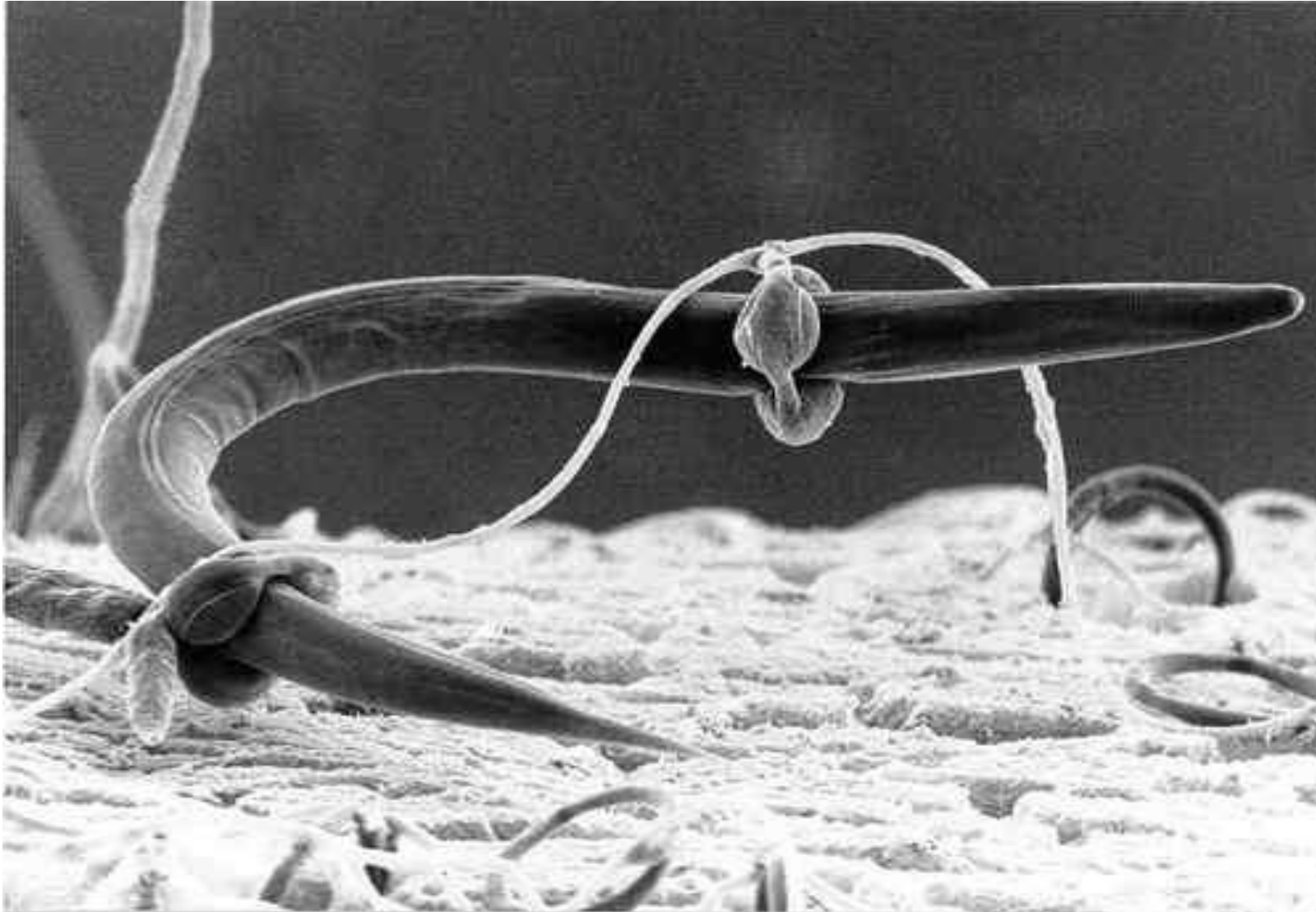
Обнаруженная способность к секреции антибактериальных метаболитов позволяет пересмотреть и расширить их биотехнологический потенциал.

Наиболее подходящим источником азотного питания для выращивания нематофаговых грибов является нитрат, а источником углеродного питания – дисахарид мальтоза. Максимальные значения сухого веса мицелия получены в средах с комплексными источниками питания.

Выводы

- В результате анализа 227 образцов нематофаговые грибы обнаружены в 41 образце, отмечен 61 изолят, из них 18 отобраны для формирования рабочей коллекции.
- В умеренной зоне отобрано больше всего образцов, содержащих нематофаговые грибы – 22 из 41 (54%). В субарктической зоне они обнаружены в 8 из 41 образца (20%), в тропической зоне – в 11 из 41 образца (26%).
- В ходе работы идентифицированы 8 видов рода *Arthrobotrys*: *A. anomalus* G.L. Barron & J.G.N. Davidson, *A. cladodes* Drechsler, *A. clavisporus* (R.C. Cooke) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer, *A. conoides* Drechsler, *A. oligospora* Fresen., *A. robustus* Dudd., *A. superba* Corda, *A. vermicola* (R.C. Cooke & Satchuth.) Rifai.
- Наибольшее значение нематофаговой активности на 7 сутки продемонстрировали нематофаговые грибы из тропической зоны (максимальное количество ловушек 118 ± 18), а наименьшее – субарктической зоны (от 27 ± 9 до 48 ± 24). В течение следующей недели нематофаговая активность заметно снизилась.
- Наибольшую антибиотическую активность изоляты проявили на 7 сутки против штамма *E. coli* LptD (зоны подавления: блоки с мицелием 20 мм, культуральная жидкость – 21 мм). В течение следующей недели антибиотическая активность заметно снизилась.
- Оптимальным источником азотного питания для нематофаговых грибов является нитрат (среднее значение веса сухого мицелия составило 0.099 ± 0.007 г), а источником углеродного питания – дисахарид мальтоза (0.145 ± 0.015 г.). Наиболее эффективным компонентом питательной среды оказалась соевая мука (0.347 ± 0.010 г.)

Спасибо за внимание!



N.Allin, G.L.Barron