

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

По теме

*Экофизиология, цитология и генетика грибов как
основа рационального природопользования и
биотехнологий
(промежуточный)*

-
- **Руководитель темы**
- *Зав. кафедрой, профессор, д.б.н., доцент,*
- Кураков Александр Васильевич (раздел № 1, 2)
- **Исполнители темы:**
- *Профессор, д.б.н., профессор,*
- Гарибова Лидия Васильевна (раздел № 4)
- *Профессор, д.б.н., доцент,*
- Камзолкина Ольга Владимировна (раздел № 5)
- *Профессор, д.б.н., доцент,*
- Шнырева Алла Викторовна (раздел № 2, 3, 4)
- *Старший научный сотрудник, к.б.н.,*
- Биланенко Елена Николаевна (раздел № 2)
- *Старший научный сотрудник, к.б.н.,*
- Георгиева Марина Леонидовна (раздел № 2)
- *Научный сотрудник, к.б.н.,*
- Мажейка Игорь Стасисович (раздел № 7)
- *Научный сотрудник, к.б.н.,*
- Воронко Оксана Васильевна (раздел №2)
- *Младший научный сотрудник, к.б.н.,*
- Кудрявцева Ольга Александровна (раздел № 6)
- *Младший научный сотрудник, к.б.н.,*
- Бондаренко Софья Андреевна (раздел № 1)
- *Инженер-лаборант, к.б.н.*
- Юрина Татьяна Петровна (раздел №4)
- *Инженер-лаборант 1 категории (1/2 ставки),*
- Винер Илья Андреевич (раздел № 2)
-

Раздел 1. Грибы экстремальных местообитаний и механизмы их адаптации к этим экотопам

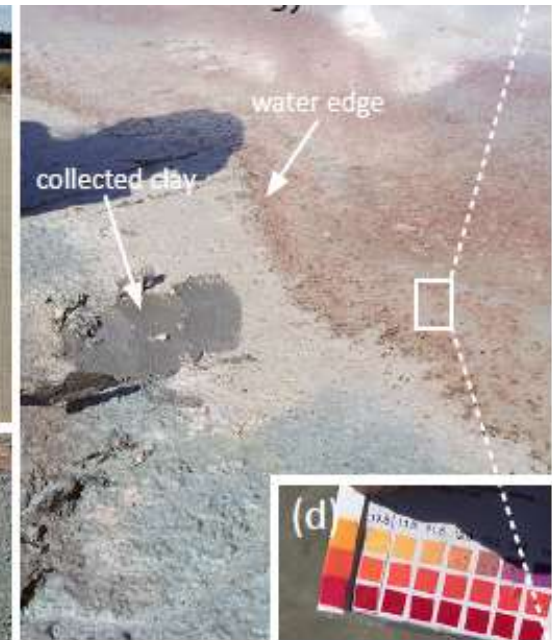
- Отобраны, с учетом микролокального распределения субстратов, образцы в зоне литорали содовых озер системы Танатар (Кулундинская степь, Россия),
 - гиперсоленых озер Эльтон, Баскунчак, Булухта (Волгоградская и Астраханская области, Россия),
 - побережий озер разной степени минерализации: Доронинское, Ножи, Зун-Торей, Хангей, Алга (Забайкалье, Россия),
 - литорали Японского моря.
 - илы из Белого, Карского и Восточно-Сибирского морей, Косинского озера (Москва), Старосельского болота (ЦЛГЗ, Тверская обл.),
 - почв степной зоны Монголии, растений и почв Якутии и из ряда других регионов.
-
- Сделаны подробные описания
 - большинства образцов,
 - получены фотографии мест отбора



Раздел 1. Грибы экстремальных местообитаний, их метаболиты и механизмы адаптации к этим условиям

- Продолжено исследование соле- и щелочеустойчивых грибов в прибрежной зоне содовых озер системы Танатар (Кулундинская степь), гиперсоленых озер Эльтон, Баскунчак, Булухта (Волгоградская и Астраханская области), озер с разной степенью минерализации (Забайкалье),
- литорали и донных грунтов морей Северного Ледовитого и Атлантического океанов.
- Проведено выделение таких грибов из собранных образцов и коллекция пополнена на 200 культур, около половины из которых идентифицировано с использованием морфолого-культуральных и генетических признаков.

- Установлен состав грибов (*Acremonium* spp., *Oidiodendron* spp., *Bionectria* sp. (anam. *Clonostachys* sp.), *Pleosporales*, *Alternaria alternate*, *Trichoderma* spp., *Mucor* sp.), развивающихся и, видимо, мацерирующих *Sphagnum fallax*, доминирующем на болотах в подзоне крайней северной тайги (Республика Коми).
- Исследованы *in vivo* культуры грибов в ассоциациях с другими организмами (бактериями). Для *Sodiomyces alkalinus* показана тесная связь с бактериями и, по-видимому, он использует в качестве источников питания бактерии и ракообразных, что согласуется с местами его обнаружений, которые близки к воде и полностью лишены растительности.



Коллекция экстремофильных грибов из этих экотопов (**150 штаммов каталогизировано**).

Озеро Баскунчак

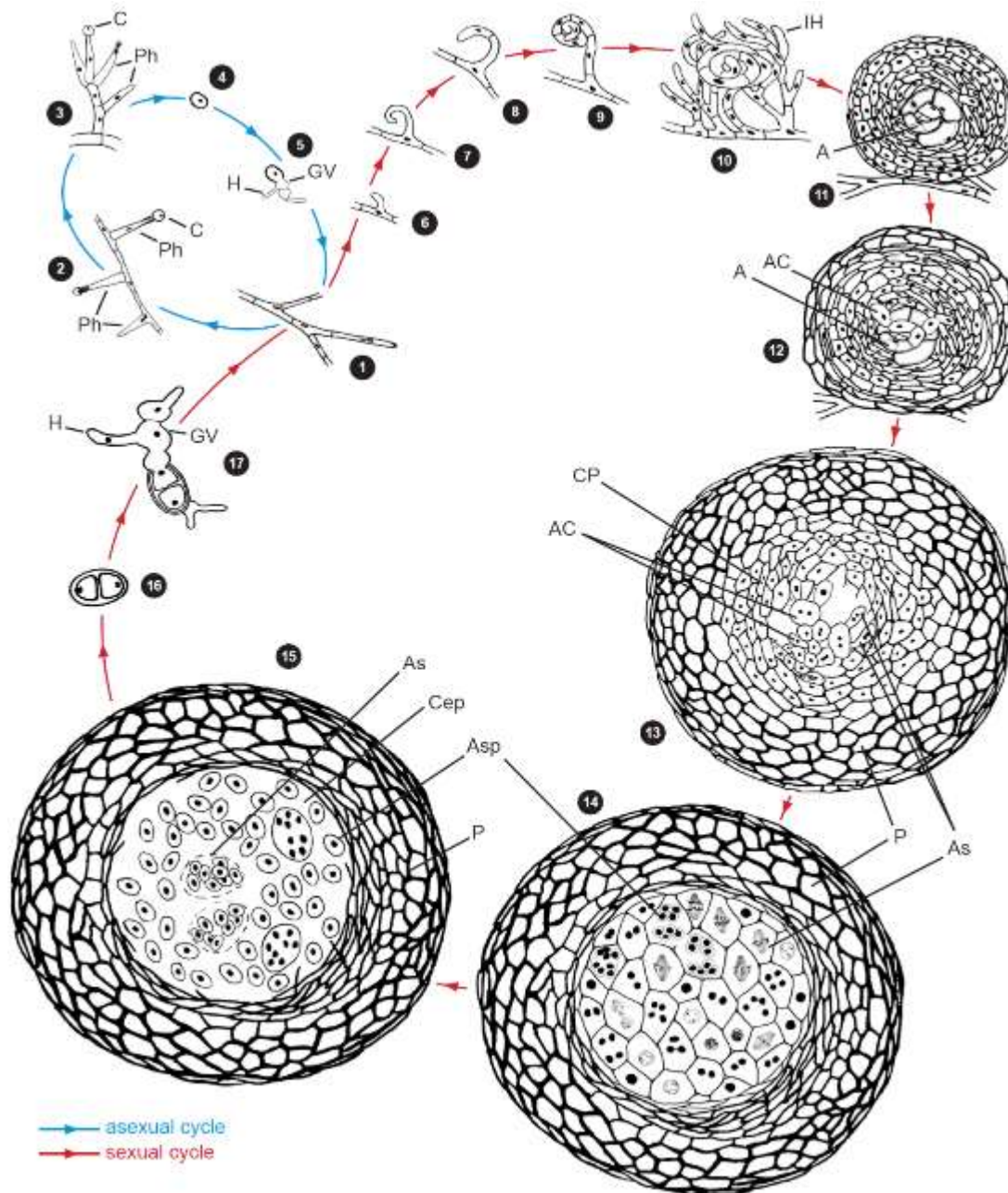


Белое море



Схема жизненного цикла *Sodiomyces* *alkalinus*

Описан новый
Sodiomyces-тип
развития плодовых тел,
который имеет
конвергентное
сходство с морскими
грибами.



- Продолжено изучение микроскопических грибов, изолируемых из морских грунтов, Белого моря и других морей.
- Выделено 70 видов, которые относились к 26 родам, 18 семействам, 10 порядкам, 8 классам и 3 отделам.
- Установлены грибы, способные развиваться в условиях низких температур, лимитации по кислороду и на различных органических субстратах (крахмал, целлюлоза, хитин, таллом ламинарии) в донных грунтах *in vitro*. Физиологическая характеристика изолятов этих видов показала, что все они галотолерантные, многие с оптимумами роста на среде с содержанием хлорида натрия как в морской воде, большинство из них психротолерантные, многие факультативные анаэробы, и все могут разлагать субстраты, поступающие в морские грунты.

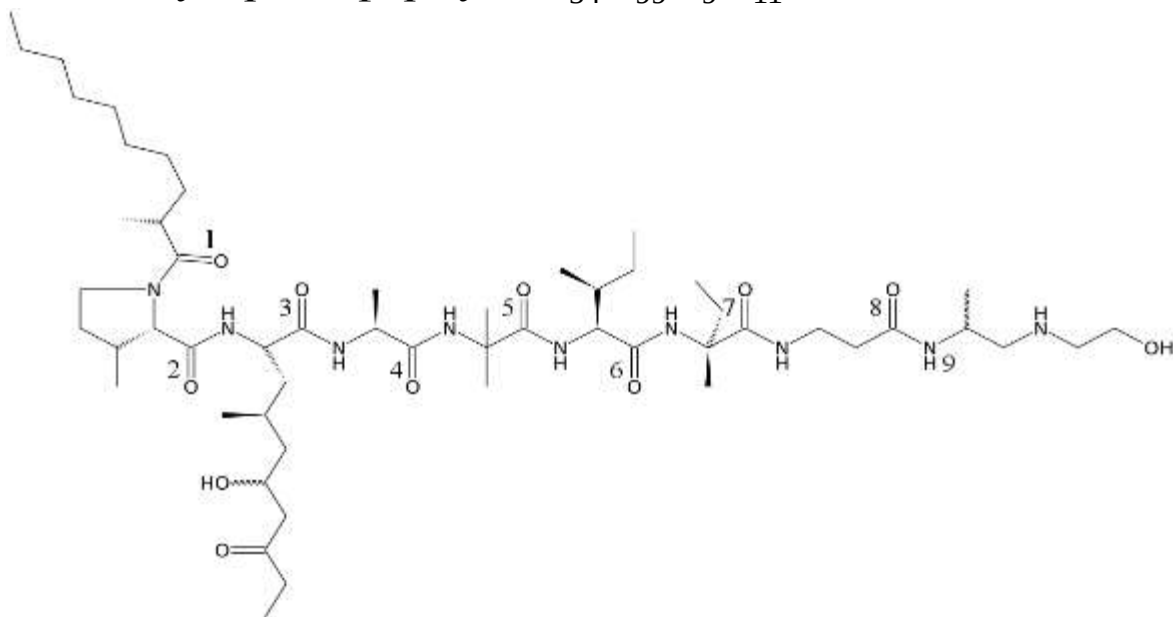
- Изучена динамика **растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов** у факультативно **алкалофильного гриба *E. alkalina*** в ответ на **изменение pH среды**.
- Обнаружен **низкий уровень трегалозы в цитозоле, основными сахарами являются маннит и арабит**. В кислых условиях преобладает маннит, в **высокощелочных – арабит**.
- Значимых **изменений в составе мембранных липидов** в при разных значений pH среды **не наблюдали**.
- Исследована динамика растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов у облигатно **алкалофильного гриба *Sodiomyces tronii*** в условиях теплового шока.
- В контрольных условиях состав углеводов **представлен трегалозой (48-56% от суммы сахаров)**, а также глюкозой и маннитом. В ответ на воздействие **теплового шока**, происходит ингибирование синтеза маннита; **содержание трегалозы и глюкозы остается на высоком уровне**. Значительных **изменений в липидном составе мембран** при тепловом шоке **не обнаружено**.

- **Высокая антимикотическая активность обнаружена у морских изолятов рода *Tolypocladium* (*T. cylindrosporum*, *T. inflatum*) при росте, как на твердых, так и жидких средах, и связана она, по предварительным данным, с активным синтезом циклоспоринов.**

Отобран штамм *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428 – продуцент нового антимикробного пептида, проявляющего активность к плесневым и дрожжевым грибам

Эмерициллиписин А - линейный пептид, образует альфа-спираль и содержит 9 аминокислотных остатков.

Молекулярная формула $C_{54}H_{99}N_9O_{11}$



Получены данные о противогрибковой активности эмерициллиписина А в отношении клинических штаммов патогенных грибов:

- Эмерициллиписин А *in vitro* в 1,5 - 8 раз более активен, чем антимикотик амфотерицин В, включая резистентные штаммы возбудителей аспергиллемы легких, хронического некротизирующего аспергиллеза легких;
- Активен отношении основных возбудителей инвазивных кандидозов

Rogozhin et al., *Molecules*, 2018;
Баранова и др., *Прикл. биохим. и микробиол.*, 2019
in press; Заявка на Патент РФ 040362018 от
04.02.18, приоритет от 06.08.18

Стабильность протеаз алкалофильных и алкалотолерантных грибов в присутствии детергентов

Штамм/ условия	Кон тро ль	Triton X-100, %					SDS, %			
		0,5	1	2	4	8	0,1	0,2	0,4	0,6
<i>S.alkalinus</i> F10	100 %	59%	51%	51%	40%	34%	42%	40,5%	39%	39%
<i>C.antarcticum</i> M27	100 %	78%	64%	63%	42%	36%	39%	39%	30%	27%

Внеклеточные алкалостабильные протеазы у 4-х штаммов алкалофильных и алкалотолерантных грибов (*Sodiomyces alkalinus* F10, *Gibellulopsis nigrescens* MAG21, *Chordomyces. antarcticum* M27 и V213) сохраняют высокие активности не только при 30%-ном содержании хлорида натрия в среде, но и устойчивы к воздействию ионного (SDS) и неионного (Triton-100) детергентов, что важно для их практического применения.

Раздел 2. Сбор плодовых тел макромицетов, выделение, идентификация и отработка режима низкотемпературно хранения

- Проведен сбор более 80 плодовых тел макромицетов и выделение из них чистых культур, их идентификация и депонирование в GenBank ITS-последовательностей (14 штаммов трутовых грибов).
- Добавлены в коллекцию штаммы из Института Аридных Зон Южного Научного Центра РАН – 26 штаммов (7 штаммов хранятся по методу быстрой заморозки и 19 – по методу программируемого замораживания).
- Коллекция съедобных и биотехнологически значимых базидиальных грибов СБГ-МГУ пополнена 12 новыми тропическими штаммами рода *Ganoderma*, собранными на территории провинции Веракруз, Мексика.
- ITS последовательности идентифицированных в 2017 г., депонированы в международные базы данных GenBank.

- Проверены на жизнеспособность мицелиальных культуры базидиомицетов, штаммы которых заложены на хранение в 2015 году.
- Из 51 штамма мицелиальный рост продемонстрировали 26 штаммов из разных трофических групп, около 50% природных изолятов.
- То есть требуется дальнейшая оптимизация условий закладки на длительное хранение макромицетов, в первую очередь, учет влияния криопротекторов на их морфолого-культуральные характеристики.
- Заложен долгосрочный эксперимент по хранению чистых культур макромицетов при разных концентрациях криопротектора (глицерина).

Раздел 3. Филогенетический анализ грибов рода *Ganoderma* и вида *Fomitopsis pinicola*

- Филогенетический анализ штаммов коллекции из рода *Ganoderma* и вида *Fomitopsis pinicola* на основе ITS- последовательностей кластера генов рРНК показал
- **высокий уровень генетического полиморфизма для штаммов *Ganoderma***
- **и относительный консерватизм ITS локуса у трутовика окаймленного *F. pinicola*. на территории Европейской части России, Финляндии и Франции.**
- Продемонстрирована возможность использования минисателлитных ДНК-маркеров для внутривидовой дифференциации штаммов *F. pinicola*.
- Охарактеризованы группы вегетативной несовместимости для природных штаммов трутовика окаймлённого.
- .

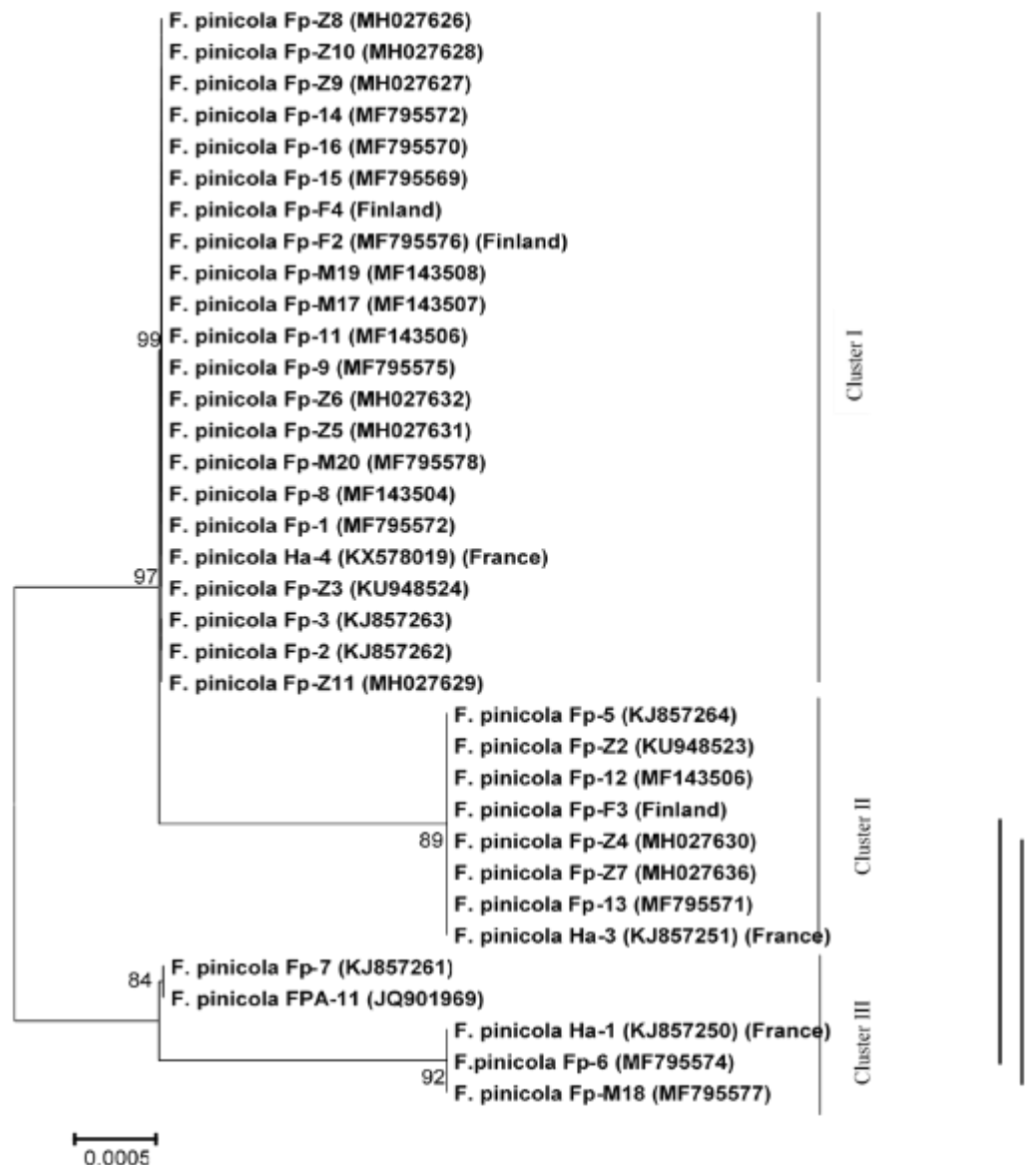


Рис.1. Филогенетическое дерево сходства штаммов *Fomitopsis pinicola* на основе ITS и IGS последовательностей

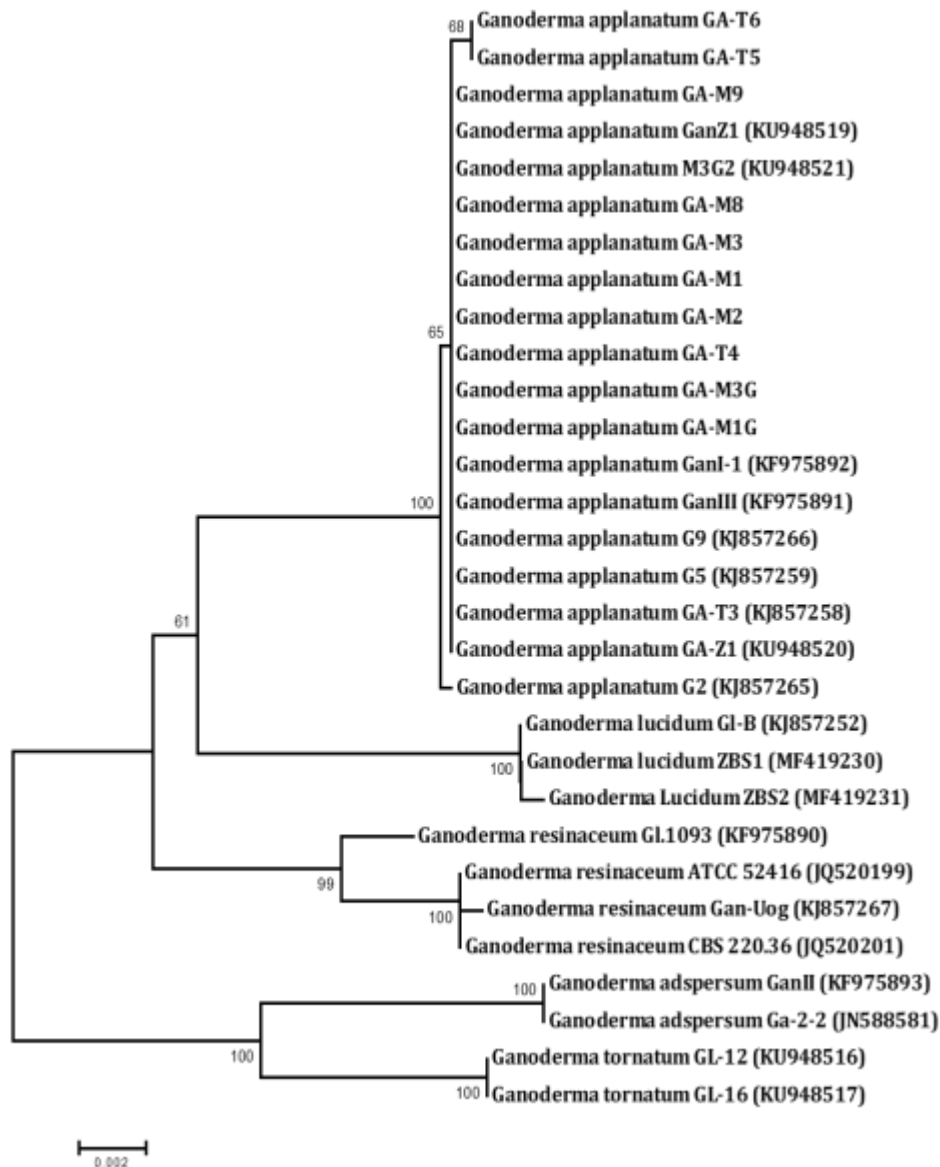


Рис. 2. Филогенетический анализ штаммов рода *Ganoderma* на основе ITS последовательностей

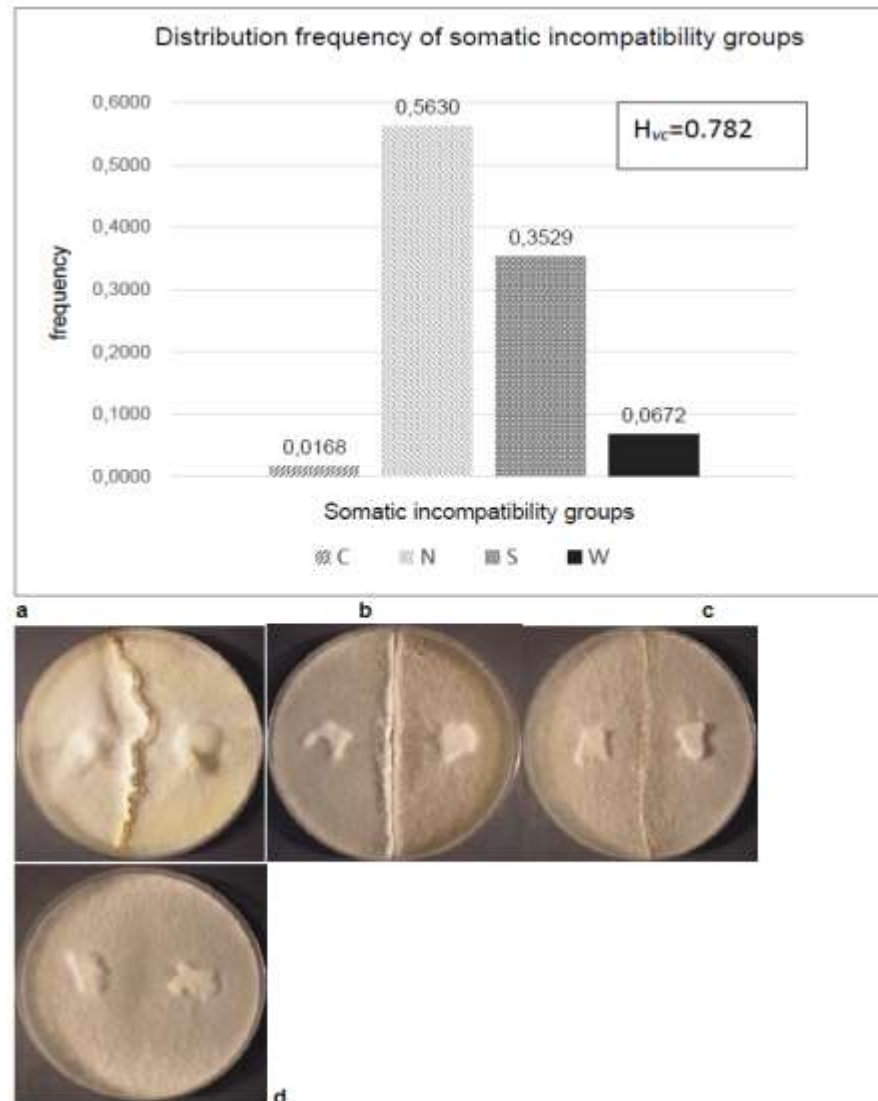


Рис. 3. Распределение природных штаммов *F. pinicola* в группы вегетативной несовместимости

Раздел 4. Изучение особенностей роста и плодообразования штаммов базидиомицетов из кафедральной коллекции и изучение противоопухолевой активности

- Изучены особенности циклов развития и формирования базидиом 4-х видов базидиальных макромицетов из разных эколого-трофических групп: гумусовых сапротрофов – шампиньоны двуспоровый и двукольцевой *Agaricus bisporus* и *A. bitorquis*, ксилотрофов – вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* и зимний опенок *Flammulina velutipes*.
- Получены in vitro базидиомы 4-х видов макромицетов.
- Проведена реизоляция чистых культур тканевым и споровым методами, пополнена ими коллекция.
- Установлено облигатное триггерное действие света на инициацию и форму базидиом ксилотрофов *P. ostreatus* и *F. velutipes*. Для гумусовых сапротрофов *A. bisporus* и *A. bitorquis* триггерным действием является микробиота покровной почвы.

- Предварительный скрининг водных и метанольных экстрактов шести видов трутовых грибов из коллекции (*Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Trametes versicolor*, *Trichaptum biforme*, *Inonotus obliquus*, *Coniophora puteana*) показал активность метанольных экстрактов на шести линиях опухолевых клеток (A-549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D и WiDr).
- Наибольшую противоопухолевую активность проявили метанольные экстракты трех видов – *F. pinicola*, *I. obliquus* и *T. versicolor* – с эффективной концентрацией препарата не менее 50 мкг/мл.
- Тесты на цитотоксичность показали перспективность экстрактов грибов *Fomitopsis pinicola* (штамм Fp-7) и *Trametes versicolor* (штамм It-1) как противоопухолевых агентов.

TABLE: Antiproliferative activity of aphyllorphoroid bracket fungi extracts.
Values are expressed in GI50 (µg/mL)

Species, strain	Extract	Cancer cell lines					
		A-549 (lung)	HBL-100 (breast)	SW1573 (lung)	HeLa (cervix)	T-47D (breast)	WiDr (colon)
<i>F. fomentarius</i> , FA-3	Biomass	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<i>F. pinicola</i> , Fp-7	Biomass	51	66	49	67	172	44
<i>T. versicolor</i> , It-1	Biomass	3.6	6.6	1.7	0.7	45	28
<i>T. biforme</i> , Tb-4	Biomass	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<i>I. obliquus</i> , Inon-1	Biomass	224	204	>250	151	>250	81
<i>C. puteana</i> , Cp-1	Biomass	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Раздел 5. Изучение эндоцитоза у грибов

- Методами флуоресцентной и электронной микроскопии исследован эндоцитоз у фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani* с помощью окрашивания мицелия эндоцитозным маркером AM4-64 и высокомолекулярных водорастворимых полисахаридов - декстранов, конъюгированных с флуоресцентной меткой, так как они поступают в клетку через рецептор-независимый эндоцитоз.
- Данные, полученные микроскопическими методами позволяют предположить существование его нескольких путей: микропиноцитоз (размер везикул до 20 нм) и макропиноцитоз (размер поглощенных везикул от 20-200 нм).

- **Классический микропиноцитозный путь** включает инвагинацию плазматической мембраны, формирование везикул, ранних и поздних эндосом, и деградацию поглощенного «груза» в вакуолях, либо возврат (рециклинг) компонентов плазмалеммы.
- Начальные этапы этого пути на структурном уровне можно наблюдать с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.
- **Эндоцитоз может идти по макропиноцитозному пути**, когда происходит захват более крупных полимерных молекул, которые могут транспортироваться в эндосомах к вакуолям грибной клетки, где происходит их гидролиз до мономеров.

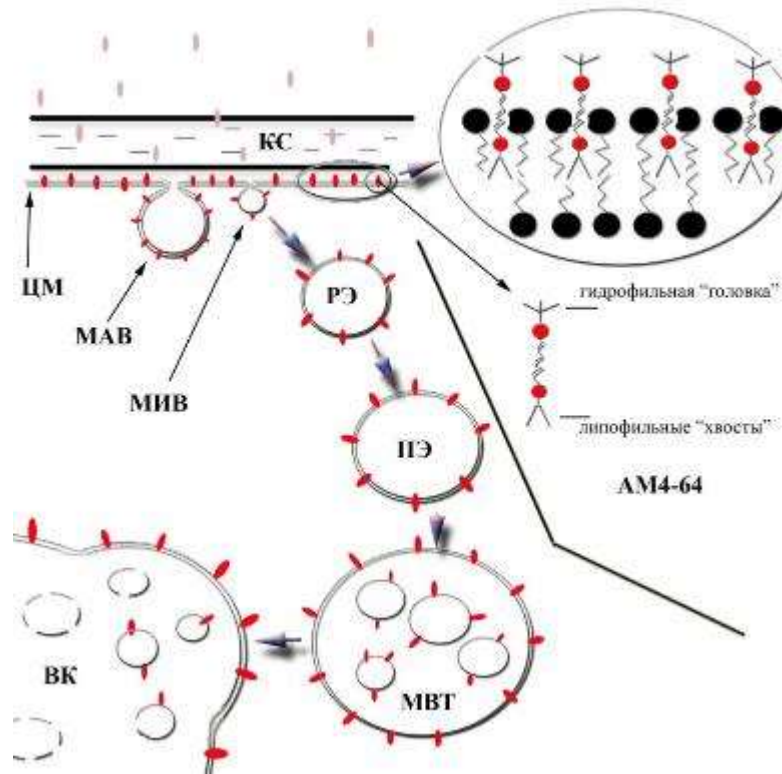


Рис. . Схема, отражающая работу **стирилового флуоресцентного AM4-64** и его организацию.

Стрелками обозначен эндоцитозный путь. AM4-64 встраивается в цитоплазматическую мембрану, далее образуются везикулы разного размера со встроенным AM4-64, которые сливаются между собой или с другими эндомембранными компартментами клетки, образуются эндосомы также со встроенным AM4-64, после этого флуоресцентент доходит до вакуолей. Обозначения на рисунке: ВК – вакуоли, КС – клеточная стенка, МАВ – макровезикулы, МВТ – мультивезикулярные тела, МИВ – микровезикулы, ПЭ – поздние эндосомы, РЭ – ранние эндосомы, ЦМ – цитоплазматическая мембрана.

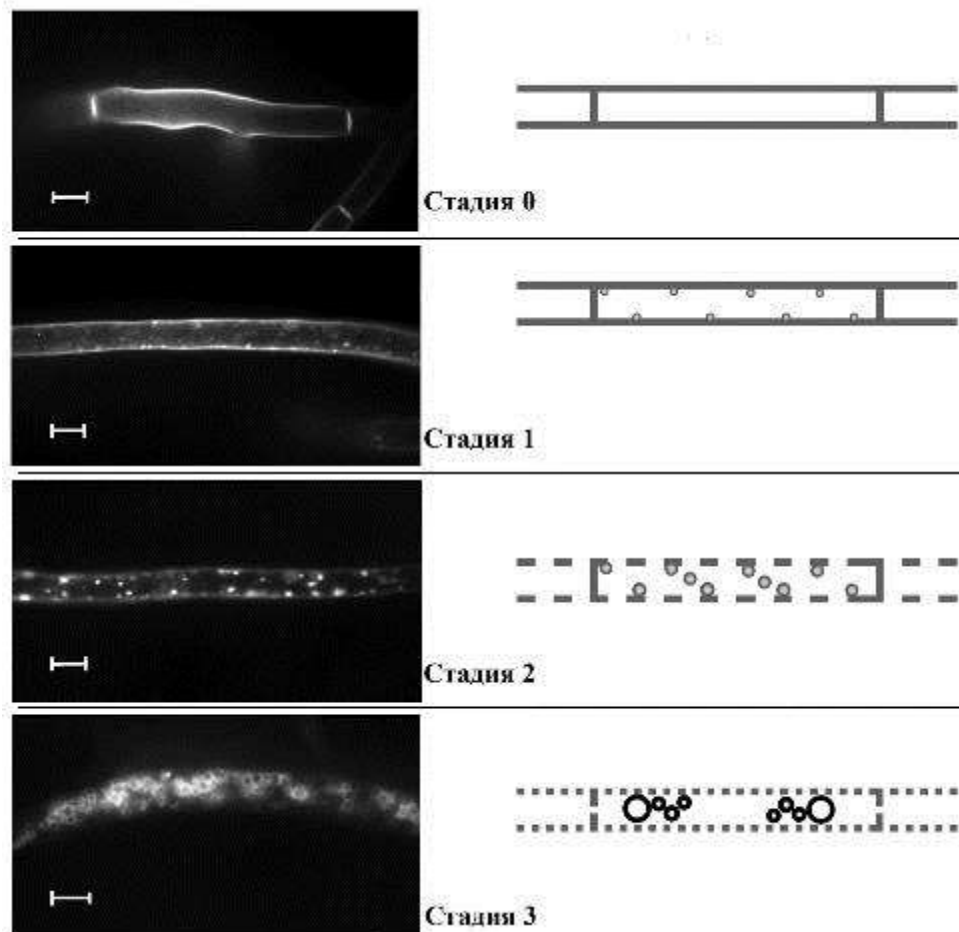


Рис. . Фотографии (слева) и схемы (справа) стадий эндоцитоза у *Rhizoctonia solani*: 0 стадия – окрашена цитоплазматическая мембрана; 1 стадия – окрашивание мелких везикул; 2 стадия - окрашивание более крупных везикул-эндосом, цитоплазматическая мембрана флуоресцирует значительно слабее; 3 стадия – окрашивание вакуолей, цитоплазматическая мембрана практически не флуоресцирует.

Rhizoctonia solani

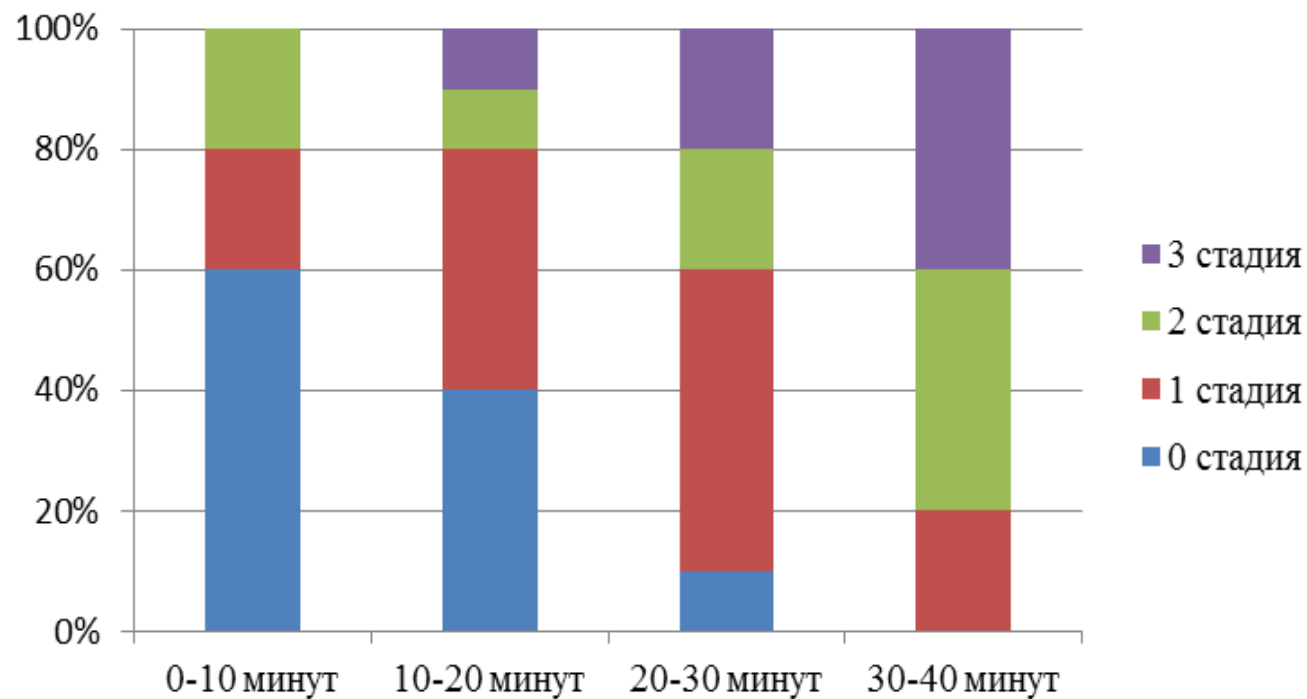


Рис. . Динамика эндоцитоза у *R. solani*.



Рис. . Окрашивание вакуолей мицелия **TRITC-декстраном с флуоресцентной меткой** (10 мг/мл) слева, справа то же в проходящем свете микроскопа Axioskop 40FL.

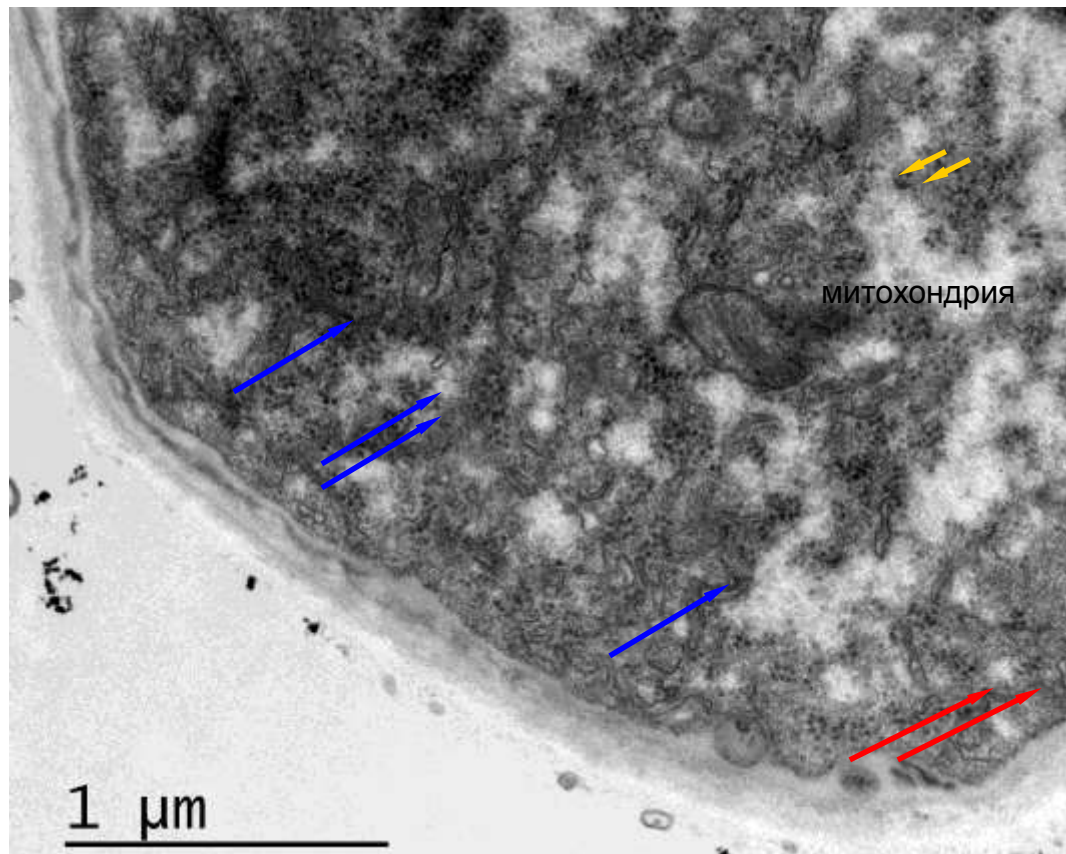


Рис. . Фрагмент гифы *R. solani*, предъинкубация в декстрине (2%, 30 мин).

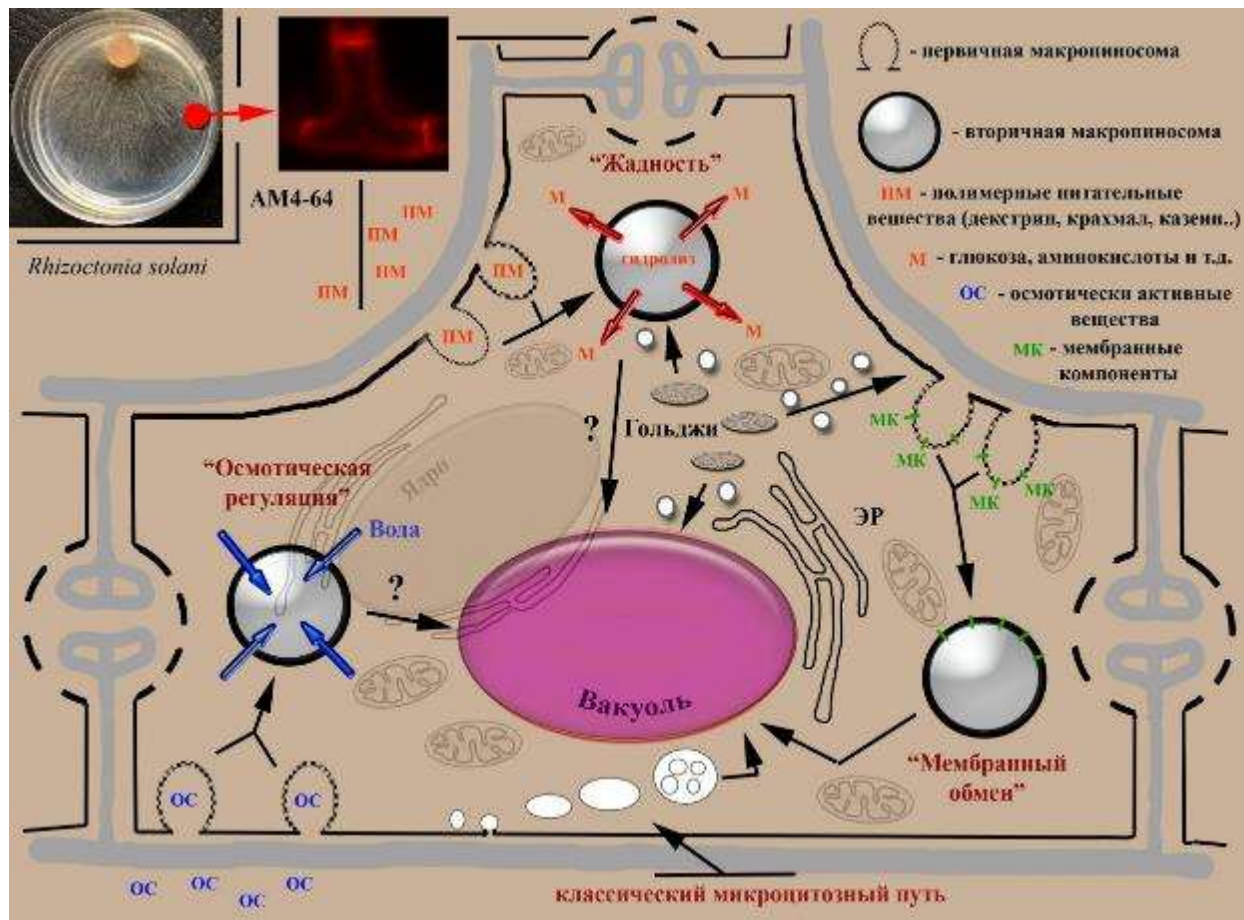
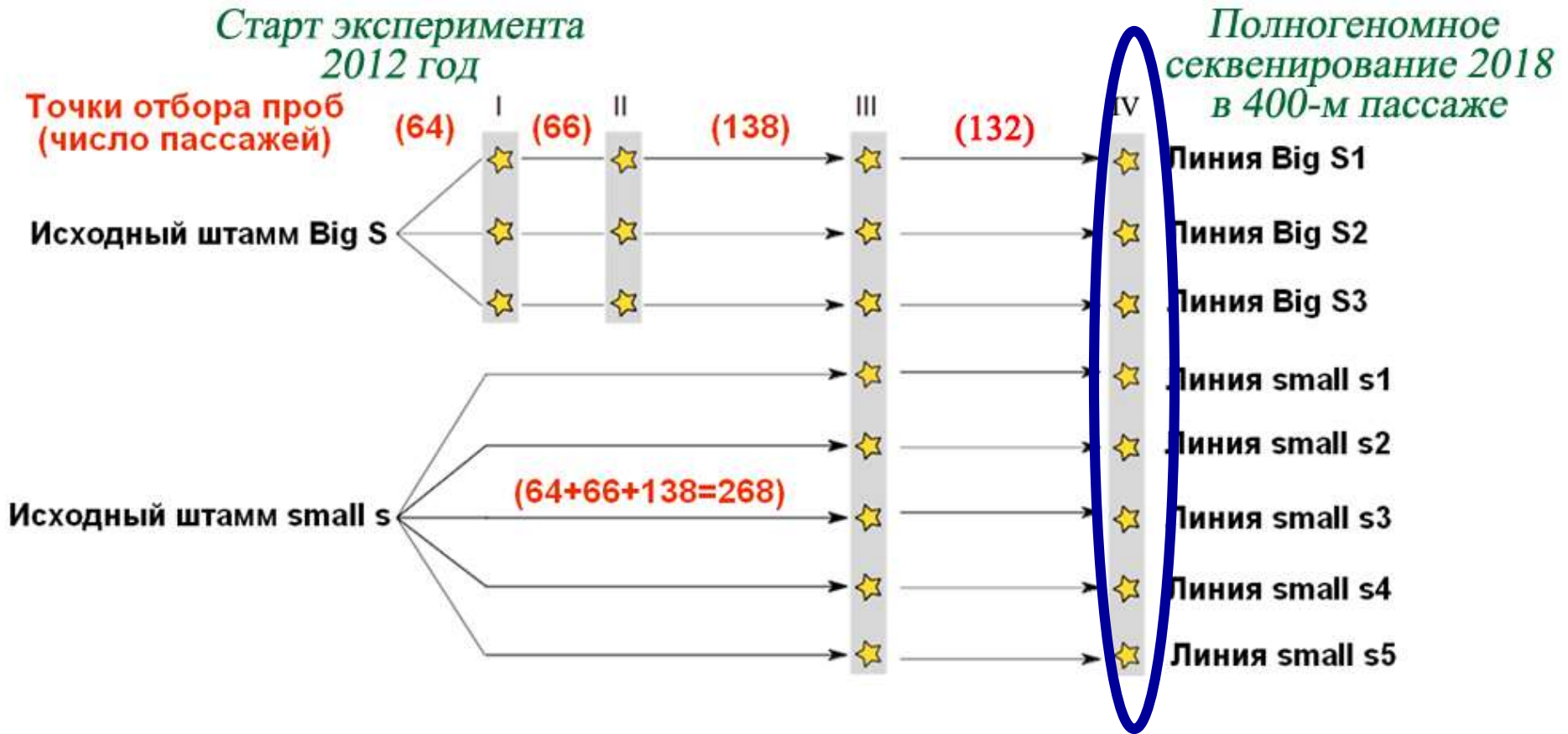


Рис. . Схема возможных путей эндоцитоза:
 1-классический микропиноцитозный путь,
 2 – «жадность» или макропиноцитоз, когда происходит захват полимерных питательных веществ, а уже после попадания в клетку – их гидролиз или деградация,
 3 – осмотическая регуляция.

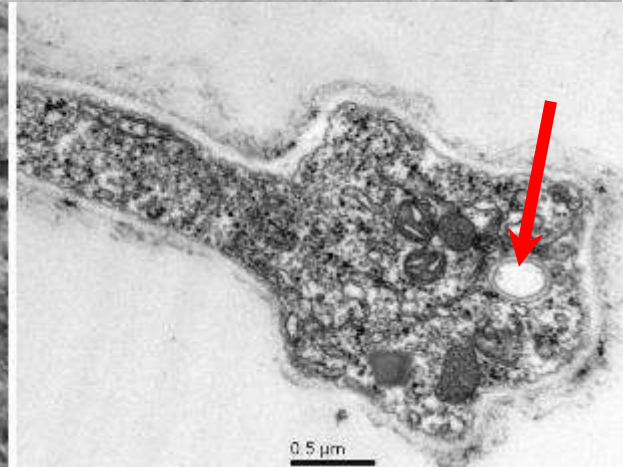
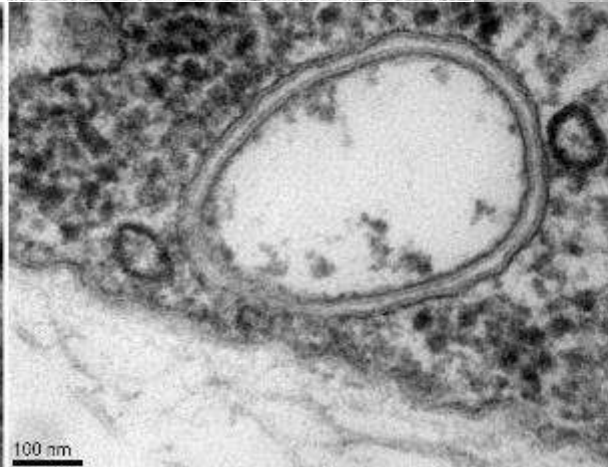
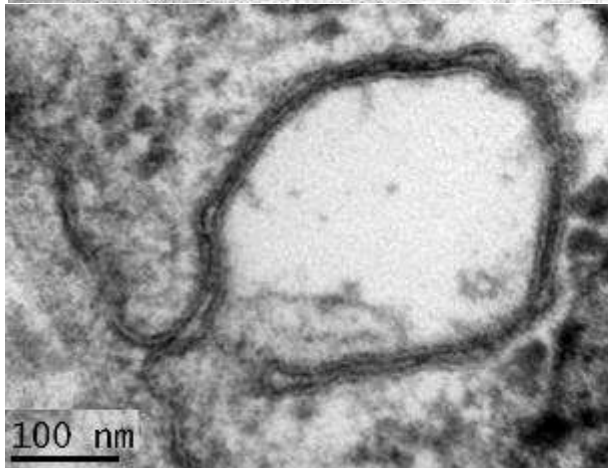
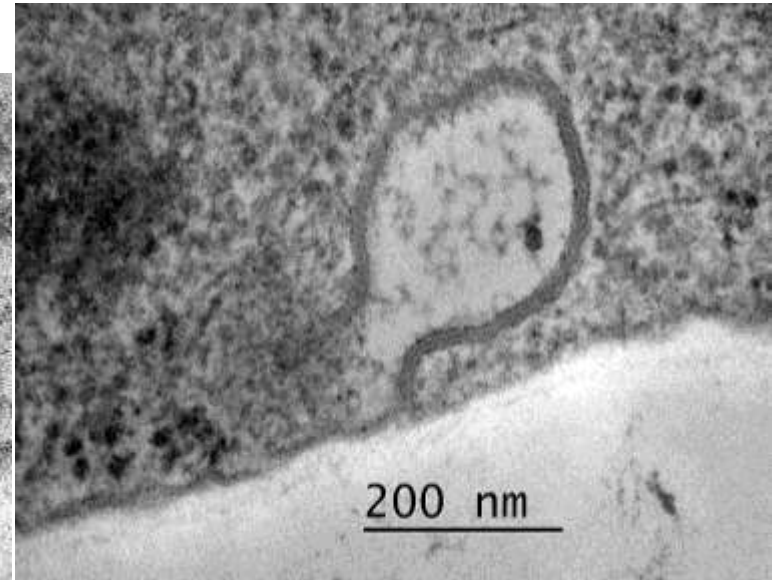
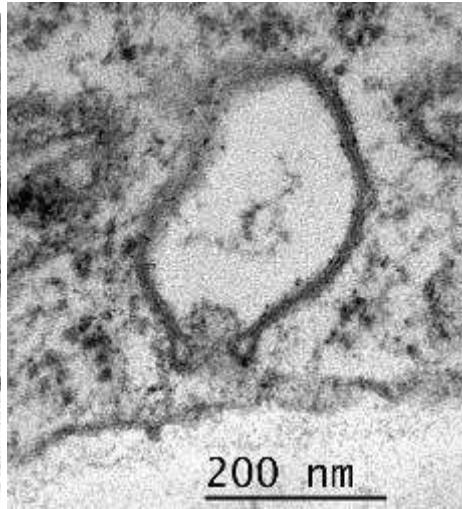
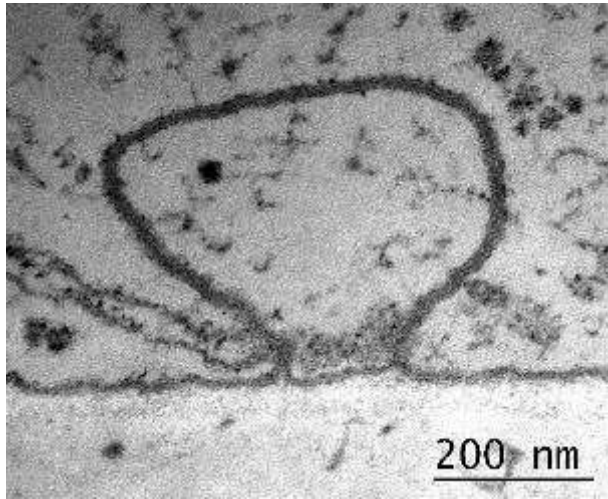
Раздел 6. Комплексное изучение изменений гриба *Podospora anserina*, непрерывно растущего в течение 6,5 лет

- **Продолжена работа по поддержанию непрерывного роста 8 независимых линий *Podospora anserina* от двух исходных моноспоровых гомокариотических штаммов путем периодических единовременных пассажей в условиях погруженного культивирования.**
- **За 2018 год сделано 60 пассажей (их общее число за 6,5 лет - 400).**
- **Независимые линии культуры, полученные в таких условиях, показали себя как морфологически стабильные, быстро набирающие биомассу, сохраняющие способность метаболизировать широкий круг субстратов, включая сложные (казеин), не требующие специфических условий для своего роста, устойчивые к стрессу (добавление NaCl).**

Секвенирование полных геномов всех грибных линий в общей схеме эволюционного эксперимента (звездочки – точки секвенирования)



Формирование двумембранных везикул из плазмалеммы *P. anserina*, ТЭМ (5 лет от старта эксперимента)



Раздел 7. Поиск маркеров и разработка подходов оценки старения грибов

- **В работе по подбору эффективных маркеров грибного старения начаты исследования возможности применения антител к HNE - продукту пероксилипидной модификации белков.**
- **Были также обнаружены и устранены серьезные технические ошибки в используемом ранее иммунологическом методе полуколичественного анализа других маркеров грибного старения (карбонилированных белков).**

Статьи в журналах Web of Sci/Scopus – 17

Статьи в материалах конференций, журналах,
сборниках – 25

Тезисы – 30

Доклады на Всероссийских и
Международных конференциях – 33

Практикум – 1

Патент – 2

Черновик публикации в открытом доступе: Kudryavtseva et al. Genetics of adaptation of the ascomycetous fungus *Podospora anserina* to submerged cultivation (выложен 06.12.2018)

Genetics of adaptation of the asc

https://www.biorxiv.org/content/early/2018/12/06/488486



bioRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME | ABOUT | SUBMIT | ALERTS / RSS
CHANNELS

Search 
Advanced Search

New Results

Genetics of adaptation of the ascomycetous fungus *Podospora anserina* to submerged cultivation

 Olga A Kudryavtseva,  Ksenia R Safina, Olga A Vakhrusheva, Maria D Logacheva, Alexey A Penin, Tatyana V Neretina,  Viktoria N Moskalenko,  Elena S Glagoleva, Georgii A Bazykin, Alexey S Kondrashov

doi: <https://doi.org/10.1101/488486>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]

Abstract

Info/History

Metrics

Preview PDF

Abstract

Podospora anserina is a model ascomycetous fungus which shows pronounced phenotypic senescence when grown on solid medium but possesses unlimited lifespan under submerged cultivation. In order to study the genetic aspects of adaptation of *P. anserina* to submerged cultivation, we initiated a long-term evolution experiment. In the course of the first four years of the experiment, 125 single-nucleotide

Previous

Next

Posted December 06, 2018.

 Download PDF

 Supplementary material

 Email

 Share

 Citation Tools

 Revision Summary

 Tweet

 Нравится 0

 G+

Subject Area

Evolutionary Biology

Subject Areas

All Articles

Спасибо за внимание!

