

КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МАКРОМИЦЕТОВ ВЕРХОВЫХ БОЛОТ НА БАЗЕ ФУНГАРИЯ ЮГУ

Попеску Кристина Валерьевна

студентка,

Югорский государственный университет,

РФ, г. Ханты-Мансийск

E-mail: Popesku74@inbox.ru

Научный руководитель:

Филиппова Нина Владимировна

канд. биол. наук, зав. лабораторией разработки методики

метагеномного анализа, доцент,

Югорский государственный университет,

РФ, г. Ханты-Мансийск

E-mail: filippova.courlee.nina@gmail.com

CULTURE COLLECTION OF PEATLAND MACROMYCETES IN THE FUNGARIUM OF YUGRA STATE UNIVERSITY

Popesku Kristina

student,

Yugra State University,

Russia, Khanty-Mansiysk

E-mail: Popesku74@inbox.ru

Scientific adviser:

Filippova Nina Vladimirovna

candidate of biological science, of the laboratory of metagenomic

analysis methodology development,

assistant professor,

Yugra State University,

Russia, Khanty-Mansiysk

E-mail: filippova.courlee.nina@gmail.com

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты создания первой коллекции культур макромицетов на базе фунгария ЮГУ. В ходе полевого сезона 2023 года собирали образцы макромицетов из разных местообитаний верховых болот. Коллекцию чистых культур выделяли по стандартным методикам на агаризованные среды (основная среда для выделения – сусло – агар). Полученные чистые культуры описывались, фотографировались, и информация о характере роста и особен-

ностях штаммов вносились в базу данных коллекции культур фунгария ЮГУ. Всего получено 42 штамма, относящихся (по предварительному определению) к четырнадцати видам макромицетов верховых болот. Идентификация чистых культур будет проведена в последующем молекулярно-генетическими методами. В дальнейшем полученные культуры будут тестироваться для определения физиолого-биохимических характеристик и перспектив их использования в биотехнологии.

ABSTRACT

The paper presents the results of the first collection of pure cultures of macromycetes in the Fungarium of Yugra State University collection. During the 2023 field season, about 100 specimens of larger fungi from different raised bog habitats were collected. A collection of pure cultures was isolated using standard methods on agar media (the main isolation medium was Malt Extract Agar). The resulting pure cultures were described, photographed, and information about the characteristics of the strains was entered into the database of the culture collection of Fungarium YSU. A total of 42 strains were obtained, belonging (by preliminary identification) to fourteen species of macromycetes of raised bogs. Identification of pure cultures will be carried out subsequently using sequencing ITS region of nuclear ribosomal DNA (barcoding). In the future, the resulting cultures will be tested to determine their physiological and biochemical characteristics and the prospects for their use in biotechnology.

Ключевые слова: микология, чистая культура, штамм, Западная Сибирь.

Keywords: mycology, pure culture, strain, Western Siberia.

Введение

Чистые культуры грибов используются в широком спектре областей науки и прикладных направлениях. Коллекции культур создаются и поддерживаются в научных учреждениях для сохранения биологического разнообразия, изучения систематики, выявления биологически активных веществ, изучения патогенных свойств и других задач [1, 2]. В России существует несколько основных коллекций, занимающихся поддержанием разнообразия чистых культур грибов (например, Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН; Коллекция культур базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова). В Западной Сибири поддерживаются коллекции на базе нескольких институтов (Центральный Сибирский ботанический сад; Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»).

Одними из самых изученных экологических грибов на базе фунгария ЮГУ являются макромицеты верховых болот [3]. Эти экосистемы играют значительную роль в ландшафте региона и большую роль в депонировании наземного углерода почв во всем мире. Грибы являются основными сапротрофами этих экосистем,

а также играют роль микоризообразователей и патогенов. В коллекции фунгария ЮГУ насчитывается около 500 образцов макромицетов верховых болот, однако выделения этих видов в чистую культуру до сих пор не проводилось [4].

Целью настоящей работы является создание коллекции чистых культур макромицетов верховых болот на базе фунгария Югорского государственного университета.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Сбор коллекции свежих образцов макромицетов верховых болот и выделение их в чистую культуру.
2. Поддержание коллекции чистых культур на чашках Петри для описания их свойств.
3. Секвенирование полученных штаммов для уточнения их определения.
4. Создание коллекции образцов культур в разных системах долговременного хранения.

Методика

Сбор образцов макромицетов проводили в ходе маршрутов на массивы верховых болот стационаров «Мухрино» и «Шапша» ЮГУ (болота Мухрино и Чистое). Всего в августе – сентябре 2023 года было сделано около 10 маршрутов, собрано около 100 образцов коллекции 51 вида макромицетов.

Сбор образцов в поле проводился по стандартной методике сбора и описания образцов макромицетов в фунгарии ЮГУ [4, 5]. Собранные плодовые тела фотографировались в полевых условиях, затем заворачивались в фольгу (рисунок 1). В лаборатории образцам присваивались порядковые номера. Часть образца высушивалась и сохранялась в коллекции сухих образцов, другая часть использовалась для выделения в чистую культуру.

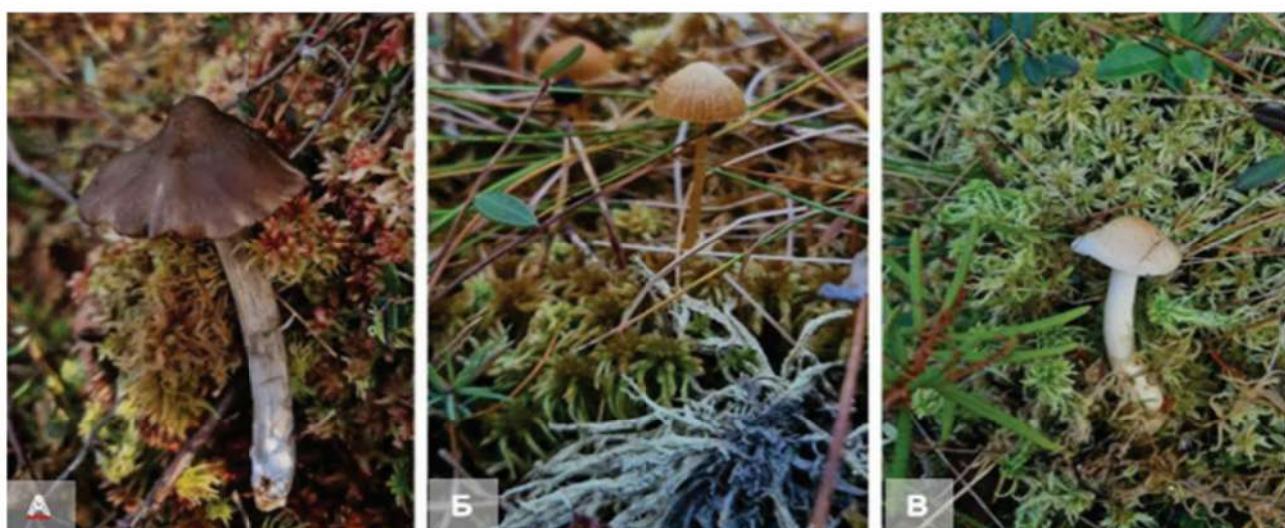


Рисунок 1 – Пример образцов макромицетов, собранных на болоте Чистое для выделения в культуру (A – *Entoloma fuscotarginatum*, B – *Galerina sp.*, выделения в культуру (A – *Entoloma fuscotarginatum*, B – *Galerina sp.*, B – *Hebeloma incarpatulum*)

Для выделения чистых культур макромицетов пользовались стандартной методикой [6, 7]. Для культивирования использовался сусло – агар с добавкой дрожжей и лимонной кислоты, которая создаёт оптимальный уровень pH (3-4) для роста макромицетов (таблица). Среда стерилизовалась и разливалась в стерильные одноразовые чашки Петри диаметром 4 см.

После остывания среды посев культур проводился двумя способами:

1) споровым отпечатком. Хирургическим пинцетом, предварительно простерилизованным спиртом и с помощью горелки, вырезалась часть шляпки, содержащая гименофор, и приклеивалась на внутреннюю часть крышки Петри с помощью вазелина. Через сутки фрагмент шляпки вынимался из чашки.

Таблица

Состав культуральной среды для выделения образцов макромицетов верховых болот в чистую культуру

Компонент среды	Кол-во, %
Агар	2,68
Сусло	2,68
Дрожжи	0,24
Лимонная кислота	0,16
Вода	94,23

2) частью стерильной трамы шляпки. Гриб разламывался пополам, хирургическим пинцетом, предварительно простерилизованным спиртом и с помощью горелки, вырезался небольшой фрагмент внутренней части шляпки и переносился на готовую питательную среду в чашку Петри.

На чашке указывался индивидуальный номер штамма и дата посева.

Наблюдения за характером роста проводили каждые 2 дня первые 2 недели и раз в 2 недели последующие 2 месяца. В случае появления контаминации чистая колония пересевалась на новую чашку с аналогичным составом среды.

У сформированных колоний описывали микро- и макроморфологические признаки. Микропризнаки изучали с помощью лупы и светового микроскопа. Обращали внимание на наличие конидиального спороношения (признак контаминации) или его отсутствие, а также наличие пряжек (характерный признак базидиомицетов). Колонии, которые не образовали конидиального спороношения в ходе роста, считали целевыми, т. е. выращивали в чистой культуре для последующего хранения и экспериментальных задач.

Для выделения ДНК (подтверждение определения с помощью молекулярно-генетических методов) целевые культуры высевали на агар, покрытый целлофаном. Для этого готовили стандартную среду, как описано выше. Целлофан разрезали на кусочки 5 см², стерилизовали и накладывали на поверхность агара в центр чашки. Затем на целлофан высаживалась колония, и ждали разрастания

мицелия в радиусе 1-2 см. Полученный мицелий снимали скальпелем и использовали для выделения ДНК по стандартным протоколам.

На последнем шаге целевые штаммы высевали на водный агар в пробирки для долговременного хранения. Для этого голодный агар разливали по 0,5 мл в микропробирки (1,5 мл объем). На среду пересевали кусочки целевой колонии и оставляли для роста на 2–3 недели. Каждую пробирку подписывали с помощью перманентного маркера номером штамма. После этого колонии переносились на хранение в холодильник при -20°C.

Для записи всех наблюдений создана таблица, в которой содержится около 10 полей для описания следующих признаков штаммов: 1) научное название вида; 2) дата сбора; 3) состав среды; 4) скорость роста; 5) этапы последующих пересевов; 6) дата посева на целлофан; 7) дата посева в пробирки на хранение; 8) кто выделил культуру; 9) примечания; 10) номер образца в коллекции YSU-F.

Результаты

В настоящее время решена половина задач, поставленных в рамках проекта (сбор образцов и создание коллекции чистых культур). Задачи, касающиеся подтверждения идентификации молекулярно-генетическими методами, будут решаться в будущем.

Всего в чистую культуру посеяно около 170 штаммов, относящихся к 51 виду макромицетов. Положительный результат дали 42 штамма 14 видов макромицетов, а именно: *Ascocoryne turficola*, *Collybia cirrata*, *Galerina sp.*, *G. sphagnorum*, *G. tibiicystis*, *Gymnoporus junquilleus*, *Hericium coralloides*, *Hypholoma capnoides*, *H. elongatum*, *H. myosotis*, *H. udum*, *Mycena megaspora*, *Omphaliaster sp.*, *Thelephora terrestris*.

Остальные 128 штаммов, представленные 36-ю видами, не удалось выделить в чистую культуру.

У 23 видов не наблюдалось роста мицелия по истечении 2 месяцев: *Arrenia bigelowii*, *Clavaria sphagnicola*, *Collybia cirrata*, *Cortinarius uliginosus*, *Entoloma sp.*, *Flammulina velutipes*, *Galerina calyptata*, *G. sp.*, *G. sphagnicola*, *Gymnoporus sp.*, *Hebeloma incarnatulum*, *H. sp.*, *Laccaria laccata*, *L. proxima*, *Lactarius helvus*, *L. rufus*, *Lentinellus sublineolatus*, *Mycena concolor*, *M. galopus*, *Omphaliaster sp.*, *Psilocybe turficola*, *Sphagnomphalia brevibasidiata*, *Suillus flavidus*.

Остальные 13 видов были контаминыированы на ранней стадии выделения: *Cortinarius biformis*, *Entoloma fuscomarginatum*, *Galerina stagnina*, *Gloiocephala caricensis*, *Gymnoporus androsaceus*, *Lactarius pubescens*, *Lichenomphalia umbellifera*, *Mycena concolor*, *Paxillus involutus*, *Polyporus ciliatus*, *Sphagnomphalia brevibasidiata*, *Sphagnurus paluster*, *Xeromphalina sp.*

Чистые культуры целевых видов описаны с помощью макро- и микроморфологических признаков и сфотографированы под лупой с помощью фотоаппарата (рисунок 2). Все целевые культуры посеяны на целлофан и подготовлены для проверки их определения с помощью секвенирования. Также культуры посеяны на длительное хранение в коллекции культур фунгарию ЮГУ.

культуры посеяны на длительное хранение в коллекции культур фунгариев ЮГУ.



Рисунок 2 – Пример полученных культур макромицетов верховых болот
Рисунок 2 – Пример полученных культур макромицетов верховых болот (рост на сусло-агаре в чашках Петри) (А – *Thelephora terrestris*,
агаре в чашках Петри) (АВ – *Thelphothoma sp.*; С – *Galerina tibiicystis*)

Выходы

1. Было собрано около 100 образцов коллекции 51 вида макромицетов верховых болот.

1. Было собрано около 100 образцов коллекции 42 штаммов 14 видов макромицетов верховых болот (41 штамм), 13 видов были контаминированы (87 штаммов).

2. Начата работа по подтверждению первичного определения культур секвенированием геномной ДНК.

2. Начата работа по подтверждению первичного определения культур секвенированием геномной ДНК (42 штаммов 14 видов, 29 видов не дали роста (41 штамм), 13 видов были контаминированы (87 штаммов)).

3. Начата работа по подтверждению первичного определения культур

Благодарности

358

Грант для организации молодежной лаборатории в Югорском государственном университете (Западно-Сибирский межрегиональный научно-образовательный центр мирового уровня) в рамках национального проекта «Наука и университеты».

Список литературы

1. Озёрская С. М. Грибы в коллекции культур: фундаментальные и прикладные аспекты: автореф. дисс. ... д.б.н. Москва, 2012. 50 с.
2. Гельтман Д. В. [и др]. Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов: тезисы докладов Всероссийской конференции. Санкт-Петербург, 26–27 июня 2023 г. 68 с.
3. Filippova N. [et al.]. The diversity of macromycetes in peatlands: nine years of plot-based monitoring and barcoding in the raised bog «Mukhrino», West Siberia // Biodiversity Data Journal. 2023. № 11: e105111. DOI: <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e105111>.

4. Filippova N. [et al.]. Yugra State University Biological Collection (Khanty-Mansiysk, Russia): general and digitisation overview // Biodiversity Data Journal. 2022. № 10: e77669. DOI: <https://doi.org/10.3897/BDJ.10.e77669>.
5. Wu Q. [et al.] Preparation, preservation, and use of fungal specimens in herbaria. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press. P. 23-36.
6. Бисько Н. А. [и др]. Высшие съедобные макромицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев: Наук. думка, 1983. 312 с.
7. Благовещенская Е. Ю. Микологические исследования: основы лабораторной техники: учебное пособие. М. : ЛЕНАНД, 2017. 96 с.