

А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, Е. В. Преснякова

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *EREMOTHECIUM*

Аннотация. *Цель:* изучить цитоморфологические особенности видов *Eremothecium ashbyi* и *Eremothecium gossypii* – продуцентов рибофлавина и эфирного масла. *Материалы и методы.* Материалом для исследования послужили девять штаммов, относящихся к роду *Eremothecium*. Микроморфология изучалась в нативных и окрашенных препаратах с использованием микроскопа «БИОМЕД-6». *Результаты.* Выявлена совокупность общих признаков (дихотомически ветвящийся септированный мицелий, конидии, вакуолизация и утолщение гиф, включения) и видовые особенности (форма и размеры спорангия, аскоспор). Рассмотрены онтогенетические изменения микромицета: не обнаружено существенных отличий в темпах роста и развития, чередовании фаз и форм между видами. *Выводы.* В ходе проведенного исследования штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* определен комплекс цитоморфологических признаков, как характерных для обоих видов, так и отличительных. Отдельные структуры (спорангии, аскоспоры) имеют дифференциально-диагностическое значение. Не выявлены различия между видами и штаммами в темпах и формах онтогенетических изменений.

Ключевые слова: *Eremothecium ashbyi*, *Eremothecium gossypii*, микроморфологические признаки.

A. I. Shpichka, E. F. Semenova, E. V. Presnyakova

CYTOMORPHOLOGICAL STUDY OF REPRESENTATIVES OF EREMOTHECIUM GENUS

Abstract. *Background.* The article is aimed at studying the cytomorphological features of species *Eremothecium ashbyi* and *Eremothecium gossypii* - producers of riboflavin and essential oil. *Materials and methods.* The material for research was 9 strains pertained to the genus *Eremothecium*. Micromorphology was studied in the native and dyed preparations by means of the microscope BIOMED-6. *Results.* The complex of mutual features (dichotomous branching septate mycelium, conidia, vacuolization and thickening of hyphae, inclusions) and species characteristics (forms and sizes of sporangia, ascospores) were revealed. The ontogenetic changes of micromycete were considered. There was no significant difference of the growth rate, the phases and forms of alteration among species. *Conclusions.* In the study of *E. ashbyi* and *E. gossypii* strains the distinctive characteristics and the complex of cytomorphological features were determined as specific for both species. The certain structures (sporangia, ascospores) have a differential-diagnostic meaning. The differences of rate and forms of ontogenetic changes were not revealed among species and strains.

Key words: *Eremothecium ashbyi*, *Eremothecium gossypii*, micromorphological features.

Введение

В настоящее время проблема получения биологически активных соединений весьма актуальна для химико-фармацевтической индустрии. Одним из способов ее решения является использование биотехнологических подходов,

в частности связанных с синтезом *de novo* необходимых субстанций микроорганизмами [1]. Как было показано в более ранних исследованиях, виды рода *Eremothecium*, а именно *Eremothecium ashbyi* и *Eremothecium gossypii*, представляют интерес в качестве продуцентов рибофлавина и эфирного масла, приближенного по компонентному составу к розовому маслу [2–7]. Однако для внедрения на биотехнологическом производстве необходимо проведение их комплексного изучения, одним из этапов которого является сравнительный микроскопический анализ.

Целью данного исследования является проведение цитоморфологического изучения видов *Eremothecium ashbyi* и *Eremothecium gossypii* – продуцентов рибофлавина и эфирного масла.

Материалы и методы

Объектами изучения служили штаммы *E. ashbyi* (syn. *Crebrothecium ashbyi*, *Spermophthora gossypii*) (Guilliermond ex Routien) Batra (1973) ВКМ F-124, ВКМ F-3009, ВКПМ F-36, ВКПМ F-6, ВКПМ F-340 и *E. gossypii* (syn. *Ashbya gossypii*, *Nematospora gossypii*) (Ashby and Nowell) Kurtzman (1995) ВКМ F-1398, ВКМ F-3276, ВКМ F-3296, ВКПМ F-35, относящихся к роду *Eremothecium* семейства *Eremotheciaceae*.

Хранение культур микромицета осуществлялось на скошенных соево-сахарозном, картофельно-глюкозном, мясо-пептонном, питательном агаре, сусло-агаре, агаре Сабуро, среде Чапека. Для проведения микроморфологического исследования штаммы культивировали в жидких питательных средах различного состава (соево-сахарозной, глюкозо-пептонной) в течение 24–72 ч при непрерывном встряхивании. Микроскопия осуществлялась в нативных и окрашенных метиленовым синим, йодом, суданом III, черной тушью препаратах с использованием микроскопа «БИОМЕД-6» (кратность увеличения 4, 10, 40, 100).

Результаты и обсуждение

Одним из важных микроморфологических признаков, характерных для всех штаммов изучаемых видов, является многоклеточный мицелий с дихотомическим ветвлением (рис. 1, 2), который в онтогенезе микромицета вакуолизируется, утолщается (рис. 3) и приобретает желтое окрашивание, обусловленное присутствием водорастворимого витамина – рибофлавина. Причем в некоторых случаях при его сверхсинтезе в вакуолях гиф можно наблюдать выпадение кристаллов, которое встречается чаще у штаммов видов *E. ashbyi* (рис. 4).

Кроме включений рибофлавина, внутри мицелия *E. ashbyi* и *E. gossypii* локализуется эфирное масло, представленное в липидных каплях и липосомах, которые приобретают желтый цвет при окрашивании суданом III (рис. 5).

Следует отметить, что в условиях проводимого эксперимента бесполое размножение, осуществляемое за счет формирования конидий на выростах мицелия, в большей степени характерно для *E. gossypii*. У обоих изучаемых видов споры имеют латеральную или терминальную локализацию на гифах и веретеновидную, продолговатую форму (рис. 6).

Что касается полового размножения, то дифференциально-диагностическое значение у изучаемых видов представляют морфологические особенности строения спорангиев и аскоспор.

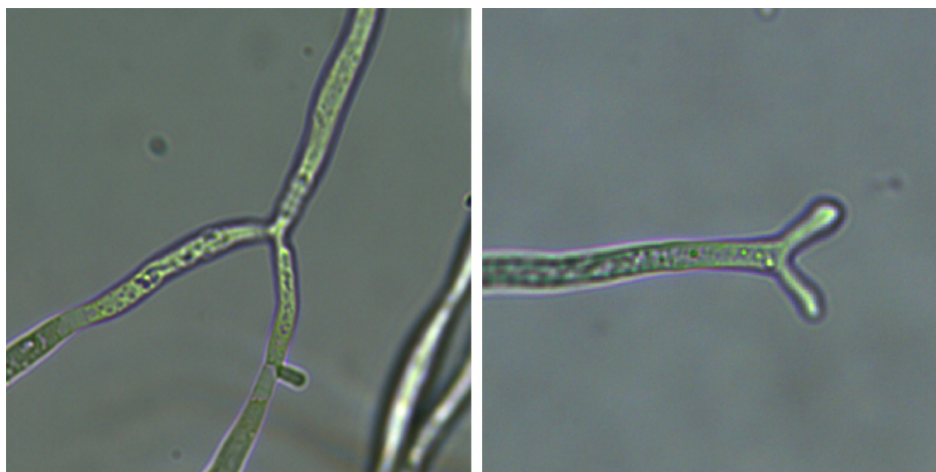


Рис. 1. Дихотомическое ветвление мицелия: слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*

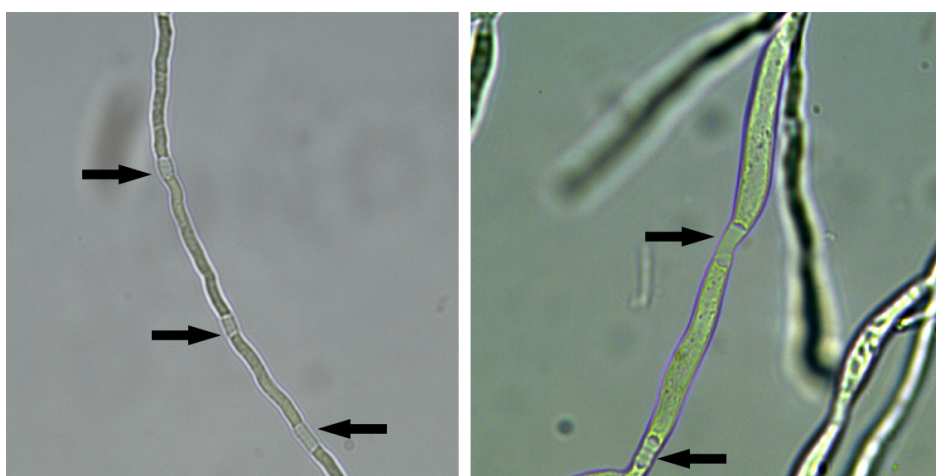


Рис. 2. Септированный мицелий (стрелкой показана межклеточная перегородка): слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*



Рис. 3. Утолщение и вакуолизация гифы: слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*.



Рис. 4. Рибофлавин, придающий желтое окрашивание мицелию: слева – кристаллы (указаны стрелкой) в вакуолях гифы *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*

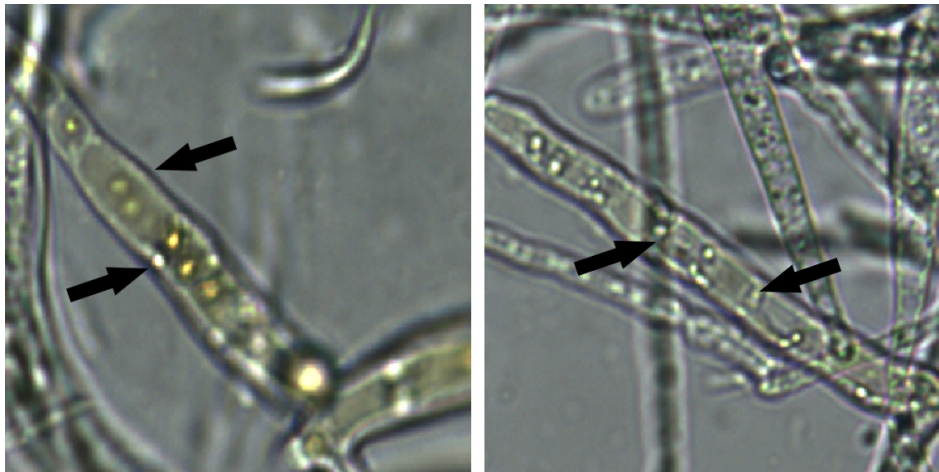


Рис. 5. Липидные капли внутри мицелия (указаны стрелкой): слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*

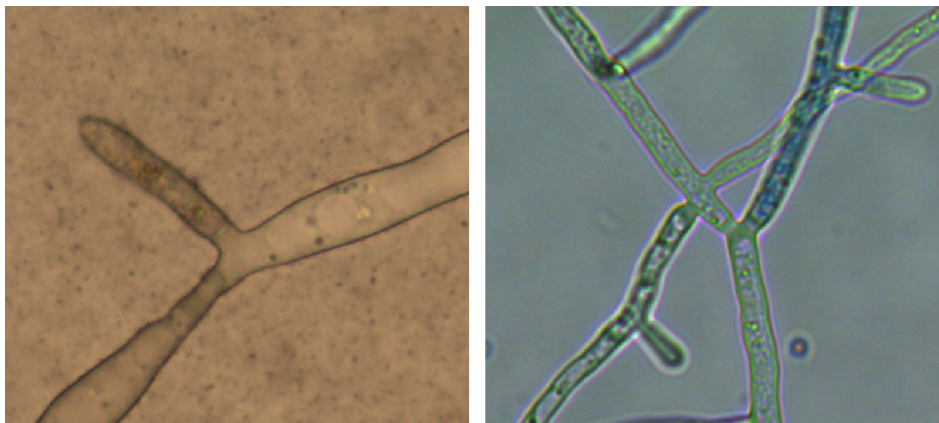


Рис. 6. Латерально расположенные на гифе конидии: слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*

Споры высвобождаются и прорастают при автолизе или разрыве аска, который содержит от 4 до 32 аскоспор. Спорангии обычно расположены одиночно, в группах или в цепочках и часто имеют продолговатую форму у *E. ashbyi* и сигмоидальную у *E. gossypii* (рис. 7). Аскоспоры *E. ashbyi* имеют изогнутую булавовидно-игольчатую форму с суживающимся концом, их длина составляет 20–27 мкм, диаметр – 2,5–3 мкм. Споры *E. gossypii* от игловидных до веретеновидных, часто с тонкой септой в центре и имеют длину 25–37 мкм, диаметр 2–5 мкм (рис. 8).

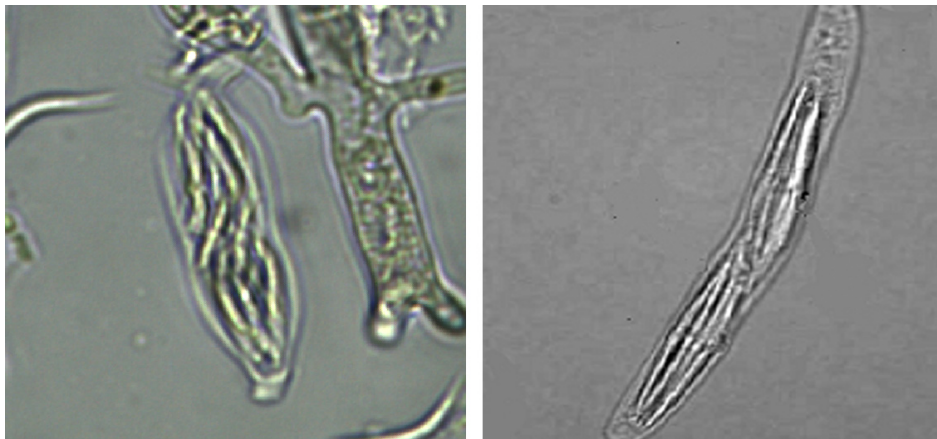


Рис. 7. Многоспоровые одиночные спорангии: слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*.

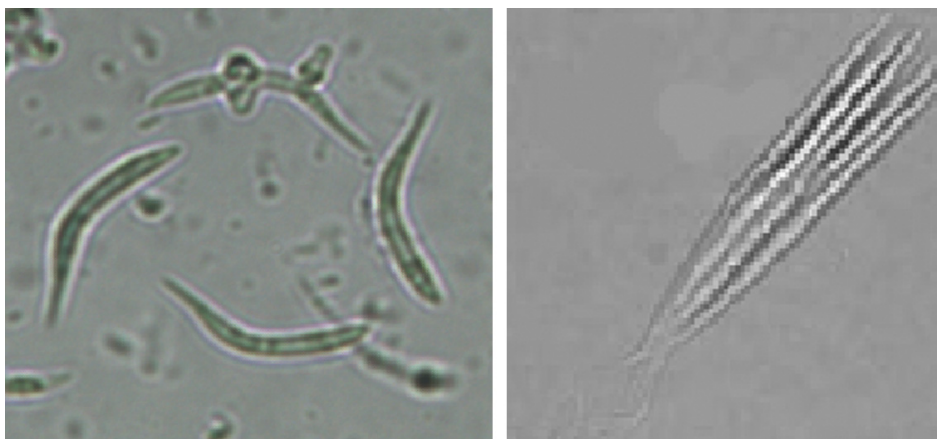


Рис. 8. Аскоспоры: слева – *E. ashbyi*; справа – *E. gossypii*.

При изучении морфологических изменений в онтогенезе не было обнаружено существенных отличий в фазах и формах развития между видами. По определенным микроскопическим структурам (спорангии, аскоспоры, конидии) было отмечено, что для *E. ashbyi* и *E. gossypii* характерно наличие как полового, так и бесполого размножения. Кроме того, был выявлен выраженный диморфизм, проявляющийся в наличии септированного мицелия и дрожжеподобных клеток, что согласуется с литературными данными (рис. 9) [2].

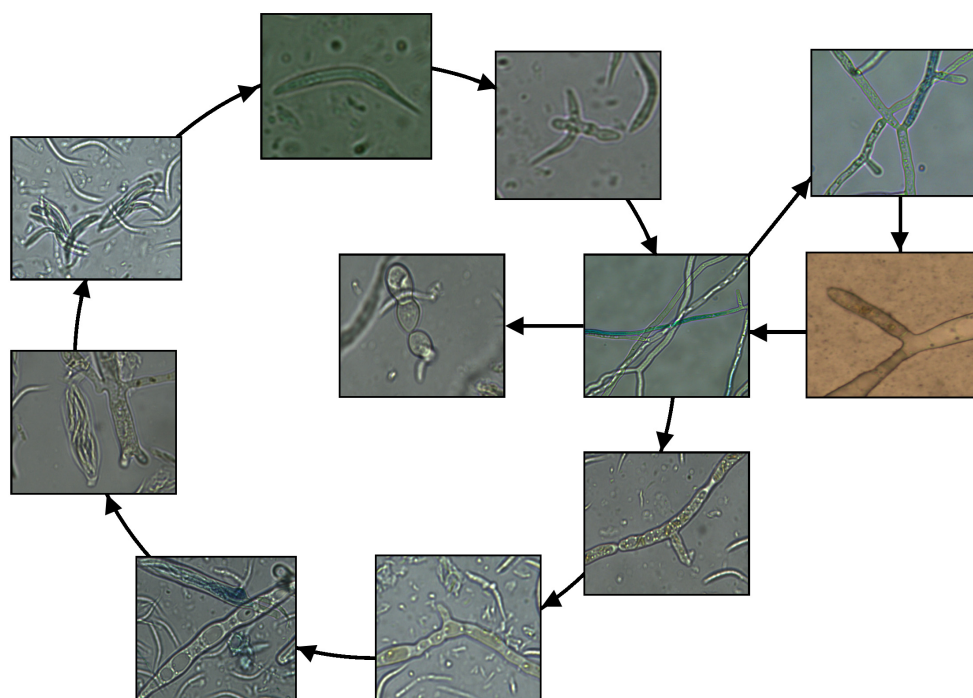


Рис. 9. Онтогенетический цикл *E. ashbyi*

При рассмотрении онтогенетического цикла изучаемых видов обращает внимание то, что формирование липидных тел происходит в вегетативных гифах суточной культуры. Количество их в мицелии по мере роста и развития продуцентов повышалось. Выраженная вакуолизация мицелия отмечалась в период 36–48 ч культивирования. Активное спорообразование происходило в стационарной фазе изучаемых продуцентов (48–60 ч роста).

Заключение

В ходе проведенного микроскопического исследования штаммов *E. ashbyi* и *E. gossypii* нами были выявлены совокупность микроморфологических признаков, характерных для представителей двух видов (тип ветвления мицелия, внутриклеточные включения, конидии, спорангии), видовые особенности, а также было обнаружено отсутствие различия между видами в темпах и формах онтогенетических изменений.

Список литературы

1. **Semenova, E. F.** About essential oils biotechnology on the base of microbial synthesis / E. F. Semenova, A. I. Shpichka, I. Ya. Moiseeva // *European Journal of Natural History*. – 2012. – № 4. – P. 29–31.
2. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом *Eremothecium ashbyi* (структурно-функциональные особенности) / А. Н. Погорельская, П. С. Бугорский, Е. Ф. Семенова, Н. П. Бузулукова, Е. И. Горнунг // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2003. – № 1. – С. 83–85.
3. **Семенова, Е. Ф.** Биосинтетическая активность и антимикробные свойства *Eremothecium ashbyi* Guill. / Е. Ф. Семенова // *Известия вузов. Поволжский регион. Медицинские науки*. – 2007. – № 4. – С. 44–50.

4. **Семенова, Е. Ф.** Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства видов рода *Eremothecium* / Е. Ф. Семенова, А. И. Шпичка, И. Я. Моисеева // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 6. – С. 210–214.
5. **Шпичка, А. И.** К вопросу определения рибофлавина в биотехнологическом сырье / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, А. В. Кузнецова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2011. – № 1. – С. 30–32.
6. **Семенова, Е. Ф.** Some pharmbiotechnological characteristics of *Eremothecium*, producer of riboflavin and essential oil / E. F. Semenova, A. I. Shpichka // *International journal of applied and fundamental research*. – 2012. – № 1. – P.170–172.
7. **Семенова, Е. Ф.** About explanation of elaboration of essential *Eremothecium* oil biotechnology / E. F. Semenova, A. I. Shpichka, I. Ya. Moiseeva // *International journal of experimental education*. – 2012. – № 3. – P. 35–36.

References

1. Semenova E. F., Shpichka A. I., Moiseeva I. Ya. *European Journal of Natural History*. 2012, no. 4, pp. 29–31.
2. Pogorel'skaya A. N., Bugorskiy P. S., Semenova E. F., Buzulukova N. P., Gornung E. I. *Vestnik Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Agricultural Sciences]. 2003, no. 1, pp. 83–85.
3. Semenova E. F. *Izvestiya vuzov. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki* [University proceedings. Volga region. Medical sciences]. 2007, no. 4, pp. 44–50.
4. Semenova E. F., Shpichka A. I., Moiseeva I. Ya. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research]. 2011, no. 6, pp. 210–214.
5. Shpichka A. I., Semenova E. F., Kuznetsova A. V. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2011, no. 1, pp. 30–32.
6. Semenova E. F., Shpichka A. I. *International journal of applied and fundamental research*. 2012, no. 1, pp.170–172.
7. Semenova E. F., Shpichka A. I., Moiseeva I. Ya. *International journal of experimental education*. 2012, no. 3, pp. 35–36.

Шпичка Анастасия Иосифовна

аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: ana-shpichka@yandex.ru

Shpichka Anastasiya Iosifovna

Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Семенова Елена Федоровна

кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, кафедра общей и клинической фармакологии, Медицинский институт, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: sef1957@mail.ru

Semenova Elena Fedorovna

Candidate of biological sciences, associate professor, senior staff scientist, sub-department of general and clinical pharmacology, Medical Institute, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Преснякова Елена Викторовна

кандидат биологических наук, доцент,
кафедра медицинских информационных
систем и технологий, Медицинский
институт, Пензенский государственный
университет (Россия, г. Пенза,
ул. Красная, 40)

E-mail: spl7@mail.ru

Presnyakova Elena Viktorovna

Candidate of biological sciences, associate
professor, sub-department of medical
information systems and technologies,
Medical Institute, Penza State University
(40 Krasnaya street, Penza, Russia)

УДК 579.23

Шпичка, А. И.

**Цитоморфологическое исследование представителей рода *Eremot-
hesium* / А. И. Шпичка, Е. Ф. Семенова, Е. В. Преснякова // Известия высших
учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. –
№ 4 (28). – С. 53–60.**