Мейоз у грибов

Высококонсервативный процесс, играющий центральную роль в жизни эукариот. Мейоз - редукционное и рекомбинационное деление ядра.

Мейоз - это деление диплоидного ядра, при котором число хромосом уменьшается от диплоидного до гаплоидного. Мейоз у грибов протекает в специализированных диплоидных клетках (базидиях, сумках) в определенные моменты жизненного цикла данного организма.

Зиготный мейоз –у большинства грибов, для которых в жизненном цикле преобладает гаплоидная фаза, две клетки/ядра сливаются с образованием зиготы/диплоидного ядра, которая делится редукционно с образованием четырех гаплоидных клеток.

Гаметный мейоз – у грибов и грибоподобных протистов, для которых в жизненном цикле преобладает диплоидная фаза, мейоз происходит при формировании гамет.

Наиболее изученные грибы относительно мейоза

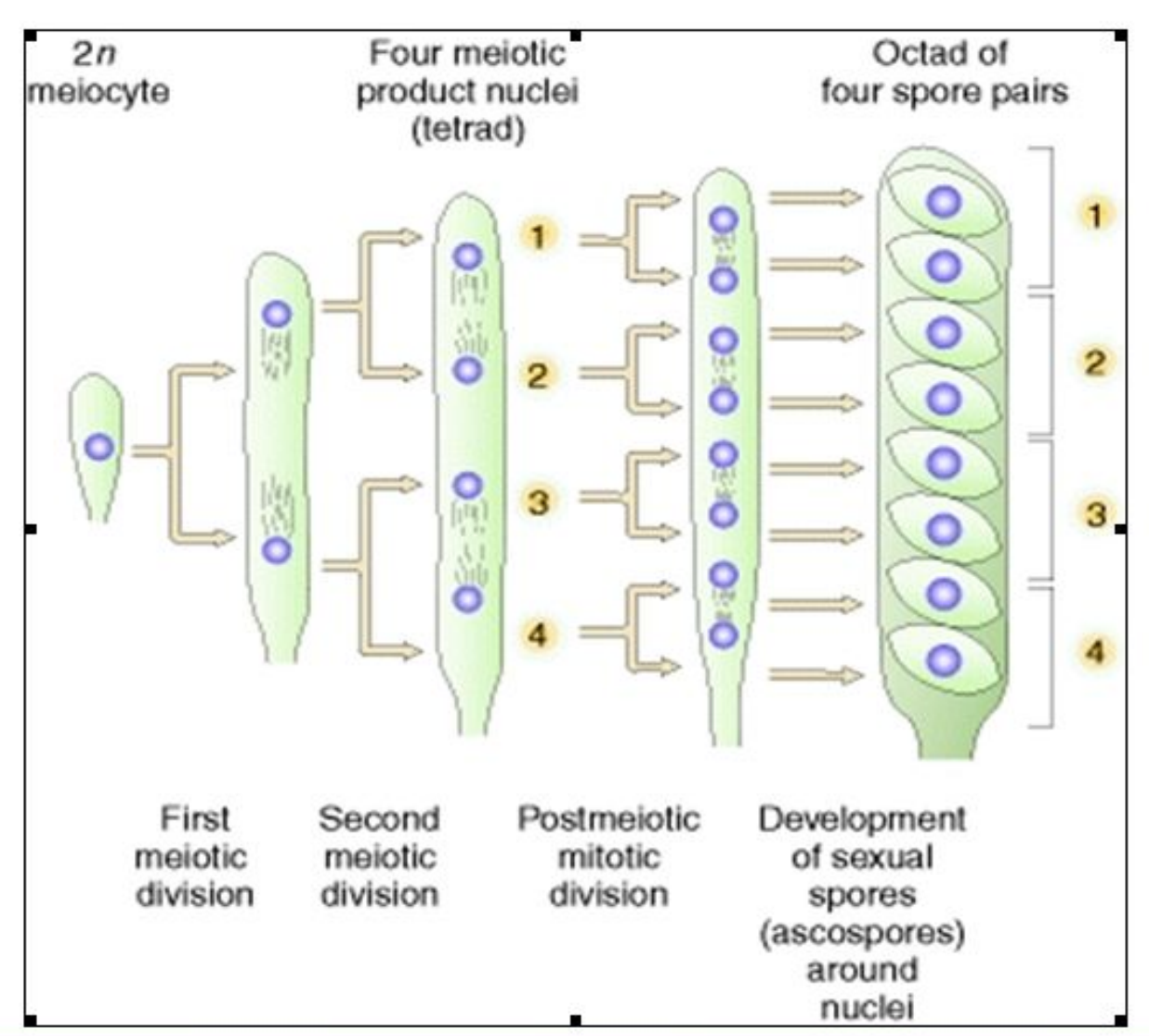
Neurospora crassa, *Sordaria fimicola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Ascobolus immersus*,

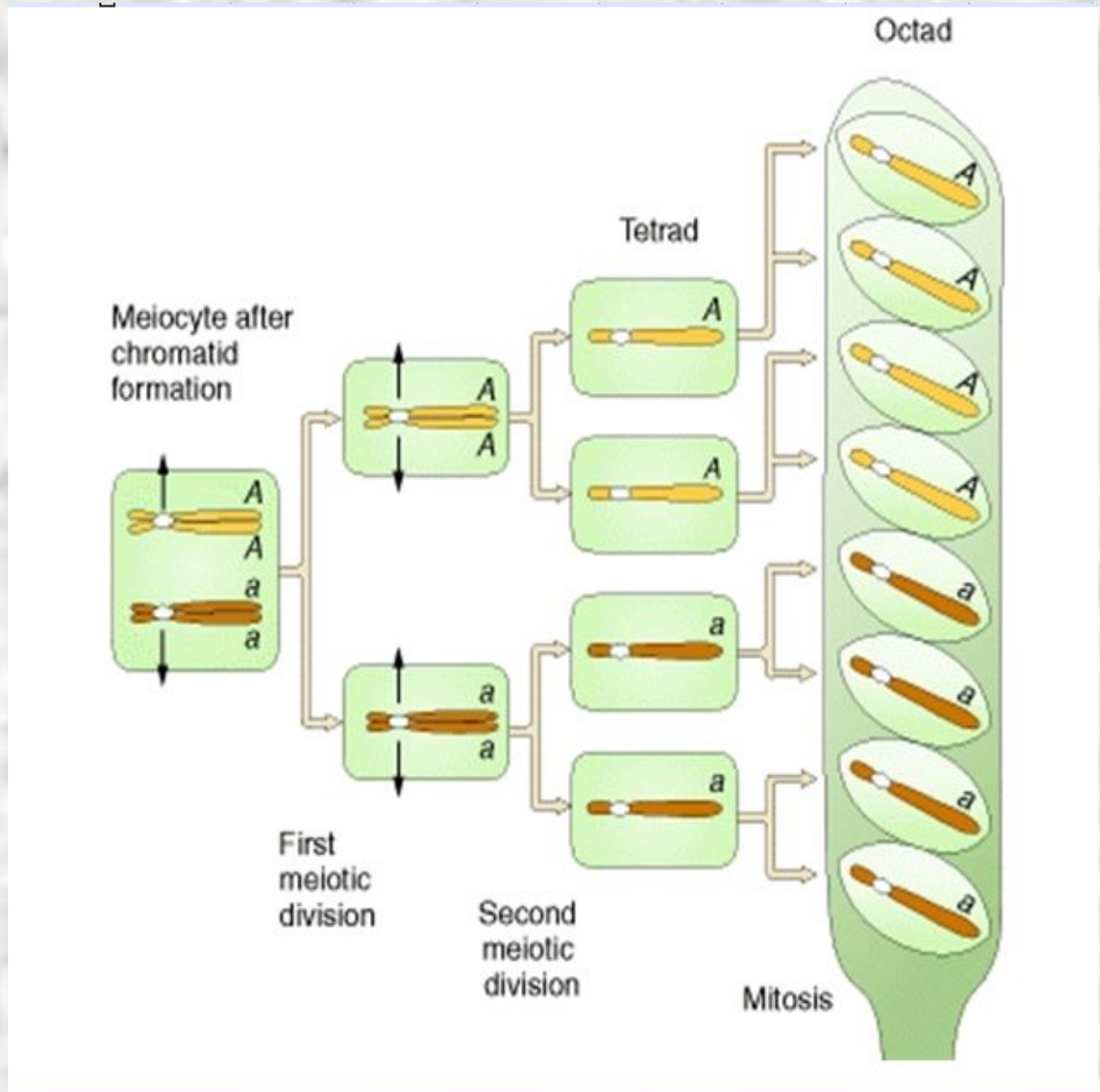
Podospora anserina, *Sordaria macrospora*, *Schizophyllum commune* и *Coprinus cinereus* (*Coprinopsis cinerea*)

Преимущества мицелиальных грибов для изучения мейоза

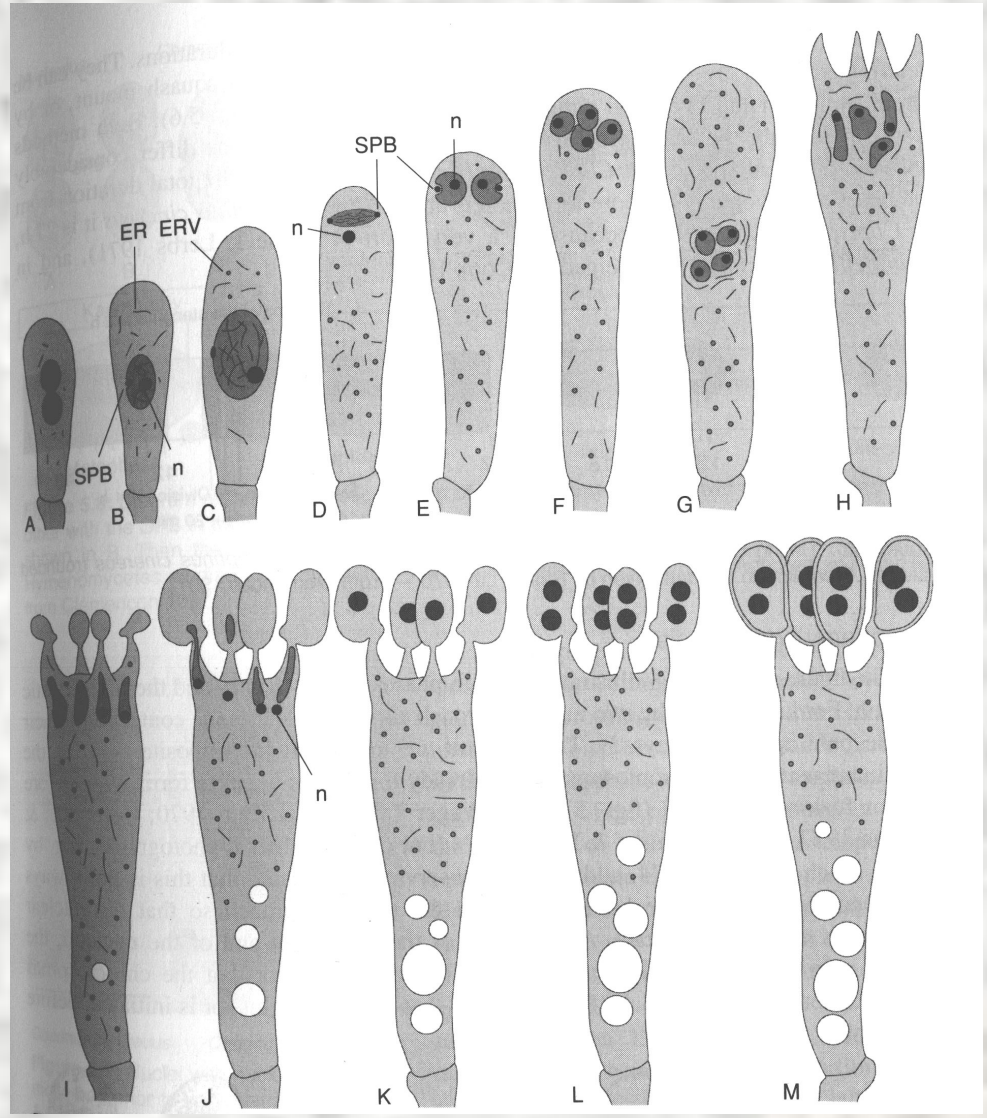
- Короткий жизненный цикл за время которого может быть проанализировано несколько сот мейоцитов (базидии, сумки) и гамет (базидиоспоры и аскоспоры)
- Четыре продукта одного мейоза находятся вместе в одной клетке (базидии или сумке)
- Получена и охарактеризована большая коллекция мутантов *A. nidulans*, *N. crassa*, *P. anserina*,*S. macrospora* and *C. cinereus*
- Опубликованы данные сиквенса геномов пяти аскомицетов (*A. nidulans*, *Fusarium graminearum*, *N. crassa*, *Magnaporthe grisea*, *P. anserina)* и четырех базидиомицетов (*C. cinerea*, *Cryptococcus neoformans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ustilago maydis)* к 2006 году
- Маленький размер хромосом и возможности исследовать их методами трехмерной реконструкции из серии срезов, гибридизации in situ (FISH) и использование мечением GFP

Этапы формирования аскоспор



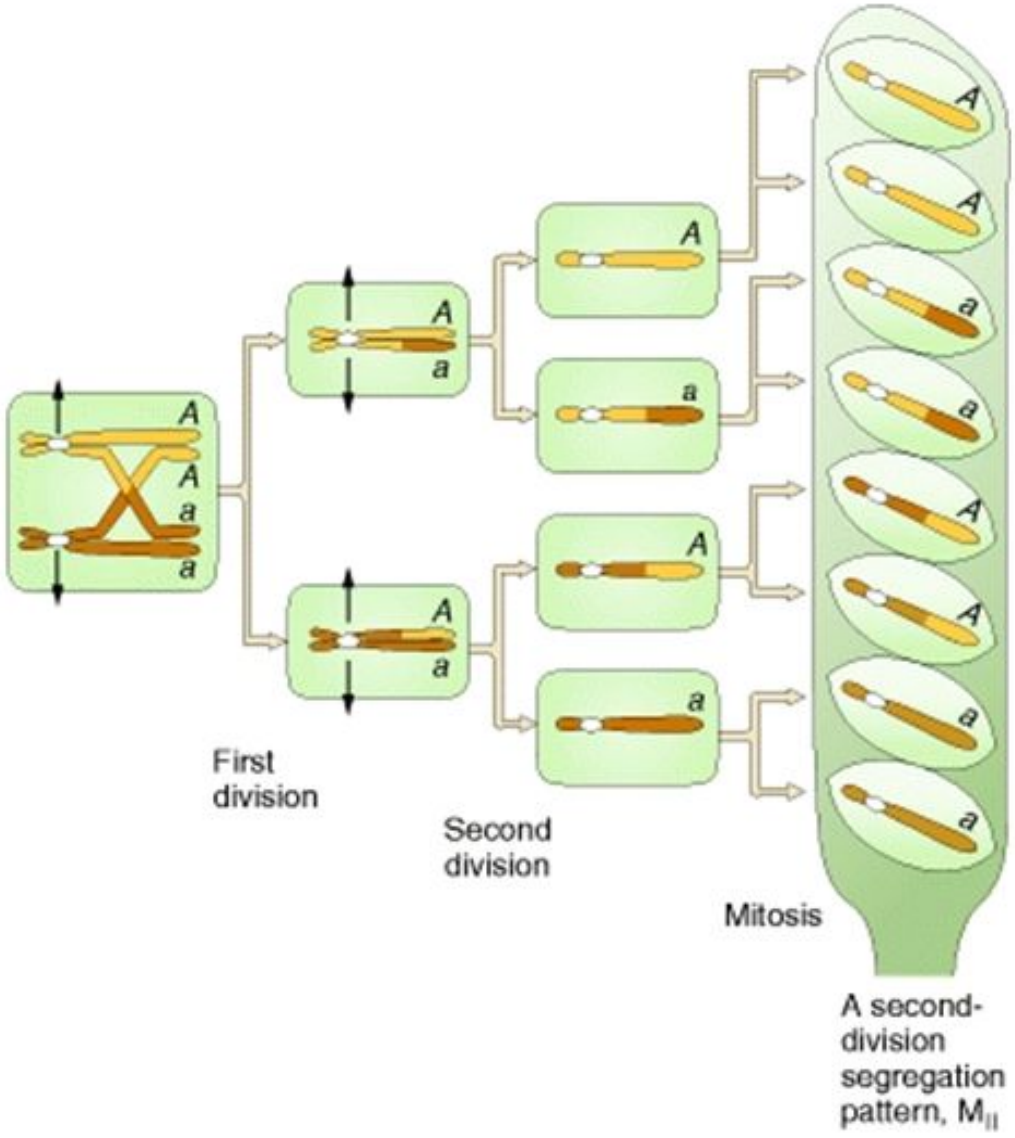

Octad
Tetrad
Meiocyte after chromatid formation
A
A
a
a
First meiotic division
Second meiotic division
Mitosis

Этапы формирования базидий

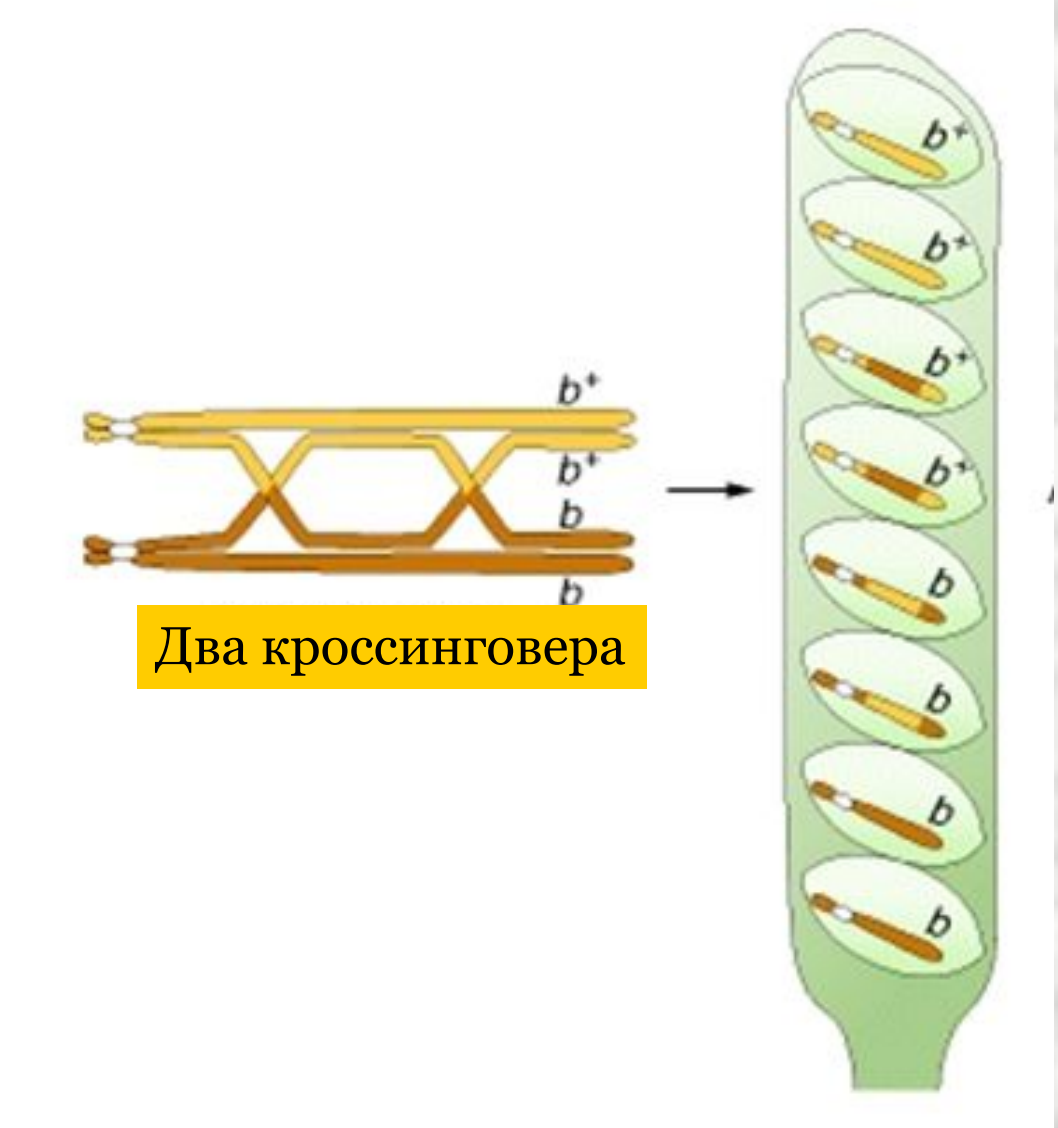


Особенности профазы I мейоза

- Профаза I мейоза – уникальная, протяженная стадия (3-10 часов) с активной транскрипцией
- Профаза I мейоза состоит из нескольких структурно-функциональных фаз (лептотены, зиготены, пахитены, диплотены и диакинеза)
- Профаза I – стадия ядерного цикла, на которой осевые структуры хромосом могут быть визуализированы даже без специального мечения и контрастирования.
- На стадии профазы I происходит ряд важных сопряженных процессов, которые в конечном итоге обеспечивают мейотическую рекомбинацию и сегрегацию гомологов:
  - **сборка осевых элементов и синаптонемных комплексов**
  - **узнавание, сближение, выравнивание и синапсис гомологов**
  - **специфическое движение хромосом, в том числе образование букета**
  - **образование хиазм и мейотическая рекомбинация**


A
A
a
a
A
a
A
a
A
a
A
a
A
A
a
a
a
a
First division
Second division
Mitosis
A second-division segregation pattern, M_{II}

Два кроссинго

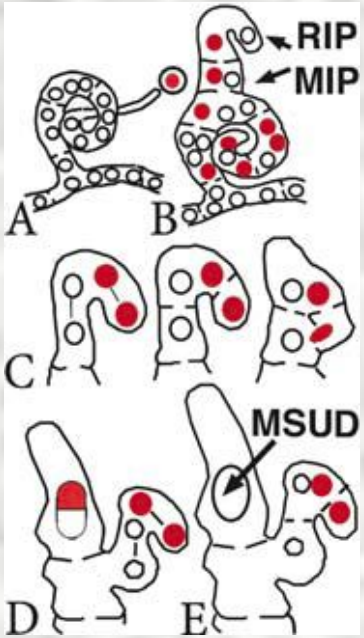


Два кроссинговера

Число хромосом в ядрах разных видов грибов

№	Вид гриба	п
1	*Achlya*	3
2	*Agaricus bisporus*	14
3	*Allomyces*	16
4	*Aspergillus nidulans*	8
5	*Candida utilis*	2
6.	*Coprinus lagopus*	13
6	*Neurospora crassa*	7
8	*Pleurotus ostreatus*	11
9	*P.pulmonarius*	8
10	*Saccharomyces cerevisiae*	16
11	*Sordaria macrospora*	**7**

Мейоз у *Sordaria macrospora*



- Перед кариогамией происходит удвоение ДНК (S-фаза клеточного цикла грибов).
- При мейозе S-фаза длиннее, чем при митозе.
- У дрожжей показано, что двойные разрывы нитей ДНК спарены с процессом рекомбинации и если последняя блокирована, то они не образуются.

Премейотические механизмы “Checking and Cleaning” работают перед S-фазой

- Repeat-induced-point mutation (RIP) mechanism (механизм повторно индуцированных точковых мутаций). Associated with de novo methylation of cytosine residues and converts C/G base pairs to A/T pairs in the duplicated sequences of *N. crassa*, *P. anserina*,*M. grisea* and *Leptosphaeria maculans*
- The methylation induced premeiotically mechanism (MIP) (механизм метилирования, индуцированный перед мейозом), found in *A. immersus* and *C. cinereus.* MIP methylates de novo all gene-sized duplications at their cytosine residues, and maintains this methylation without further requirement for the methylated sequence to remain duplicated.
- Mechanisms that lead to gene/sequence losses, rather than silencing (механизм, который приводит к потере гена/последовательности). Premeiotic recombination between cis-duplicated sequences leads to deletion of the interstitial sequence in *N. crassa* and *P. anserina*

A “Checking” Mechanism that Operates After Karyogamy

- *m*eiotic *s*ilencing by *u*npaired *D*NA (MSUD)

Стадии мейоза

Первое деление мейоза

профаза I

лептотена

зиготена

пахитена

диплотена

диакинез

Первое деление мейоза

метафаза I

анафаза I

телофаза I

Второе деление мейоза

профаза II

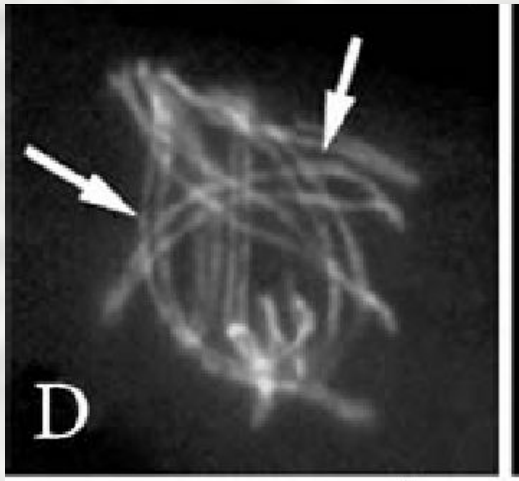
метафаза II

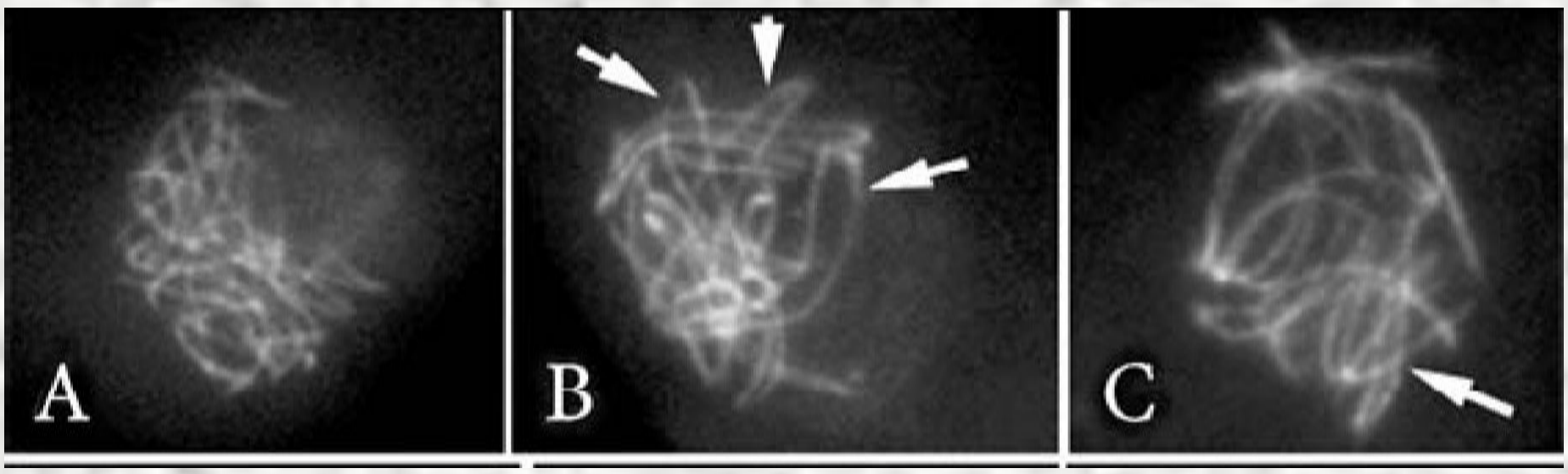
анафаза II

телофаза II

Профаза I.
Лептотена

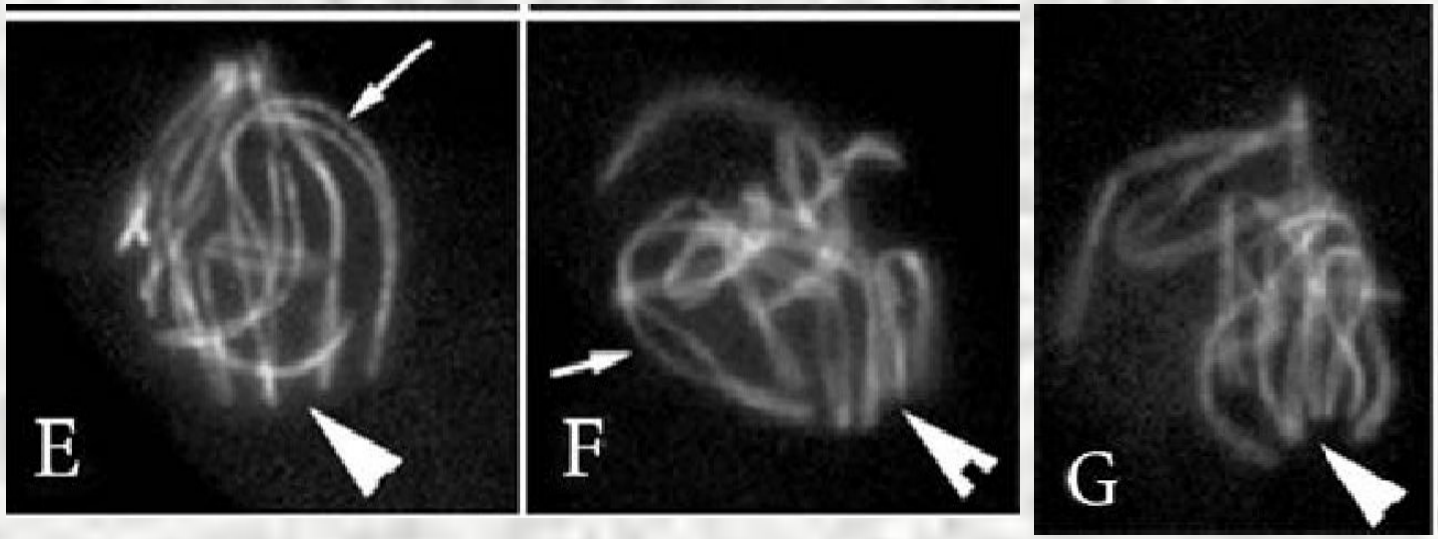
формирование осевых элементов, сближение гомологов





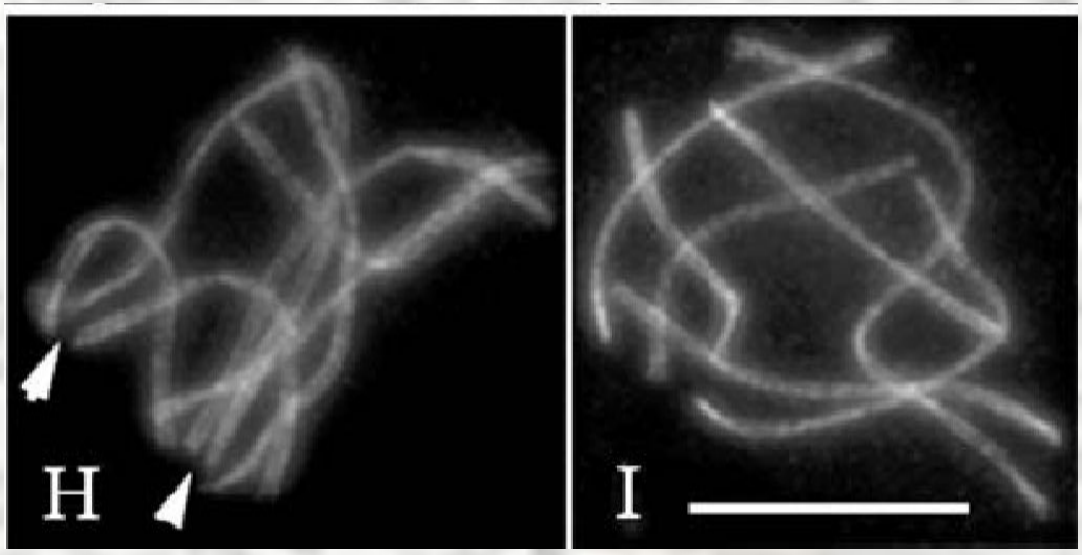
Профаза I. Зиготена

- начало сборки синаптонемного комплекса в сайтах инициации синапсиса (букет)

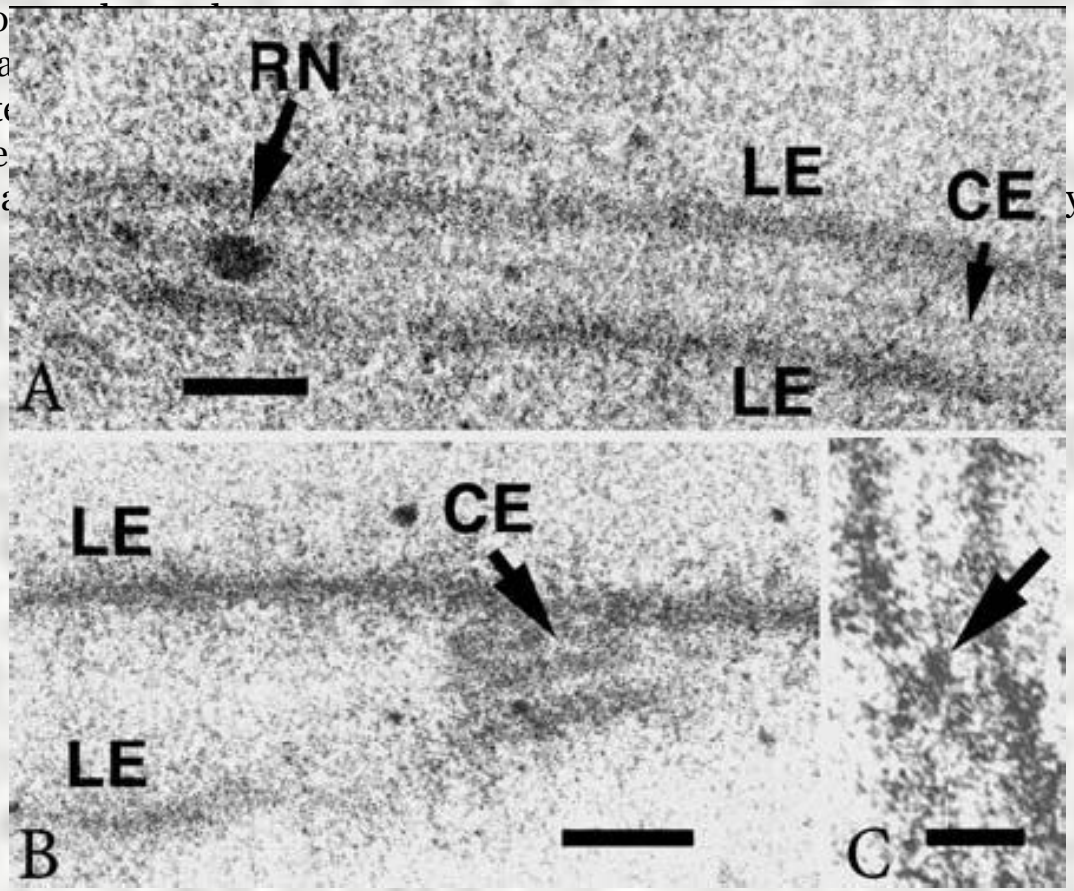


Профаза I. Пахитена

- Стадия полного синапсиса. Синаптонемные комплексы – трилинейные нуклеопротеидные структуры состоят из двух боковых элементов (каждый, в свою очередь, сложен из двух тяжей) и центрального элемента, представляющего собой область пересечения «головок» поперечных филаментов

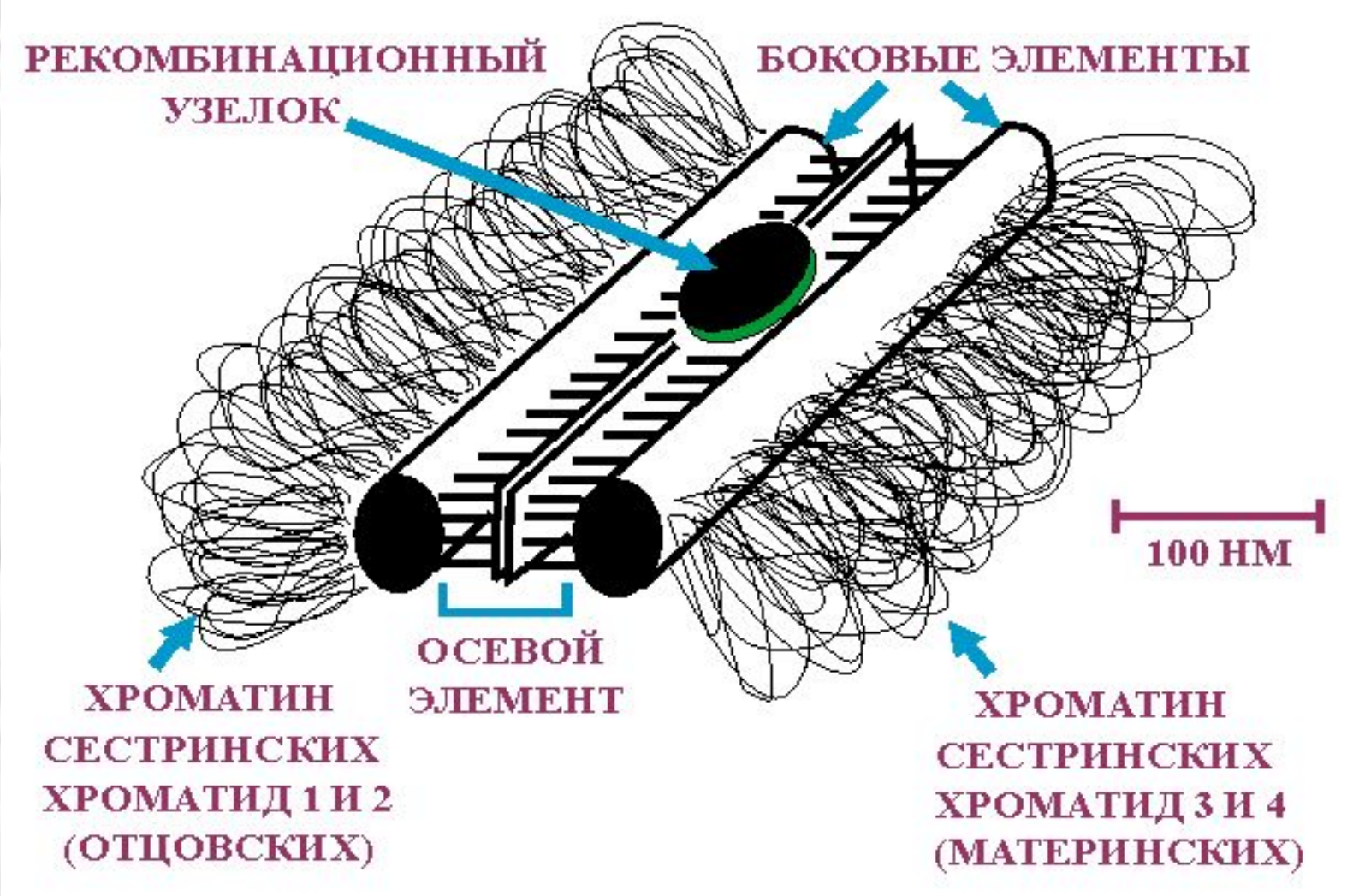


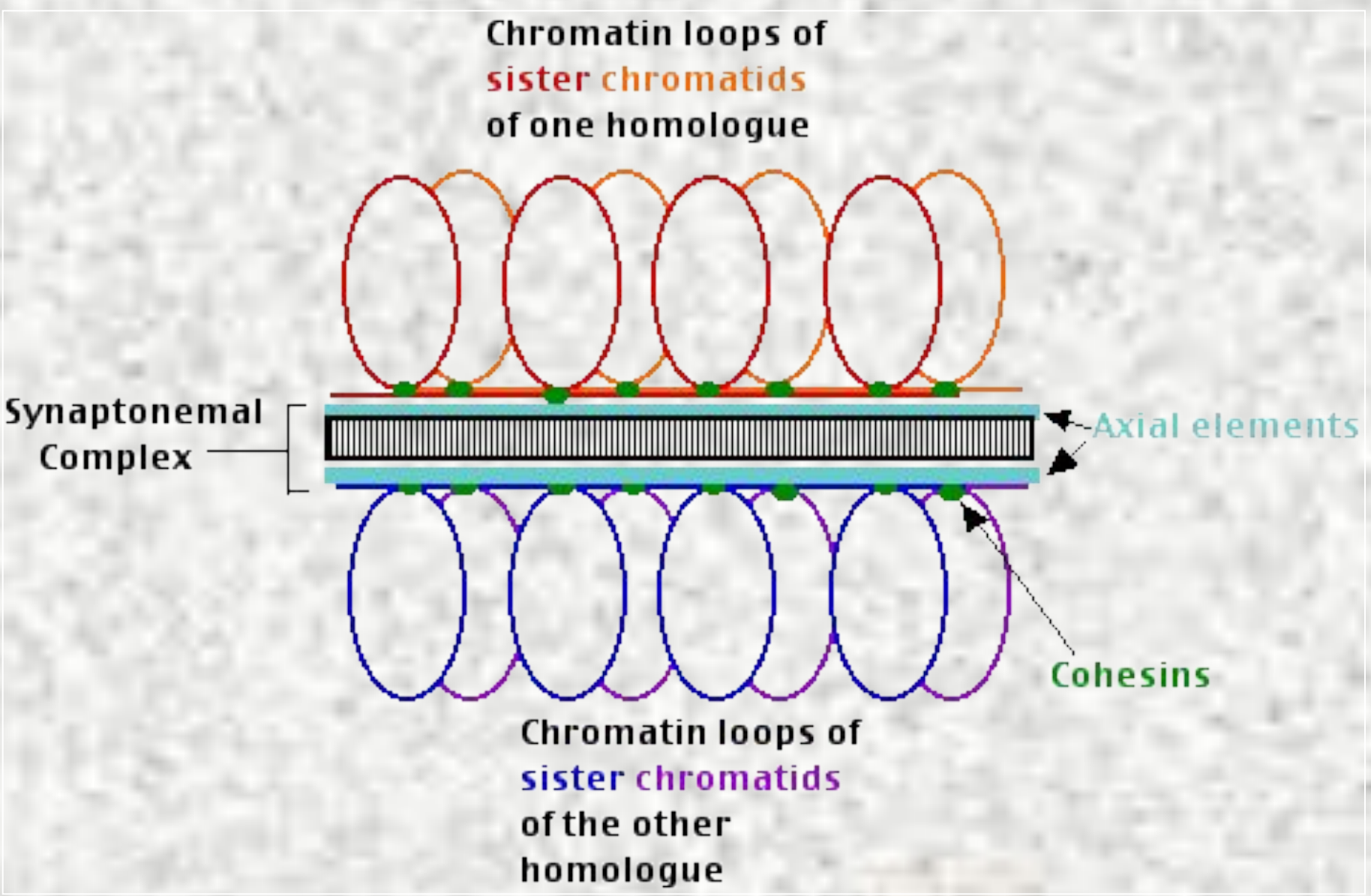
A–C Synaptonemal complex and recombination nodules of *S. macrospora*.
A Pachytene synapto
LE indicates materna complex. The
arrow points to a late
B At zygotene, the ce (*LE*). **C** The
arrow points to an ea y,
compared to the late



A–C Synaptonemal complex and recombination nodules of *S. macrospora*.
A Pachytene synaptonemal complex.
LE indicates maternal and paternal lateral elements, and*CE*the central element of the complex. The *arrow* points to a late recombination nodule (*RN*) located onthe CE.
B At zygotene, the central element (*CE*) initiates between converging lateral elements (*LE*).
C The *arrow* points to an early recombination nodule. Note the difference in size and density,
compared to the late nodule shown in **A**. Bar = 100 nm

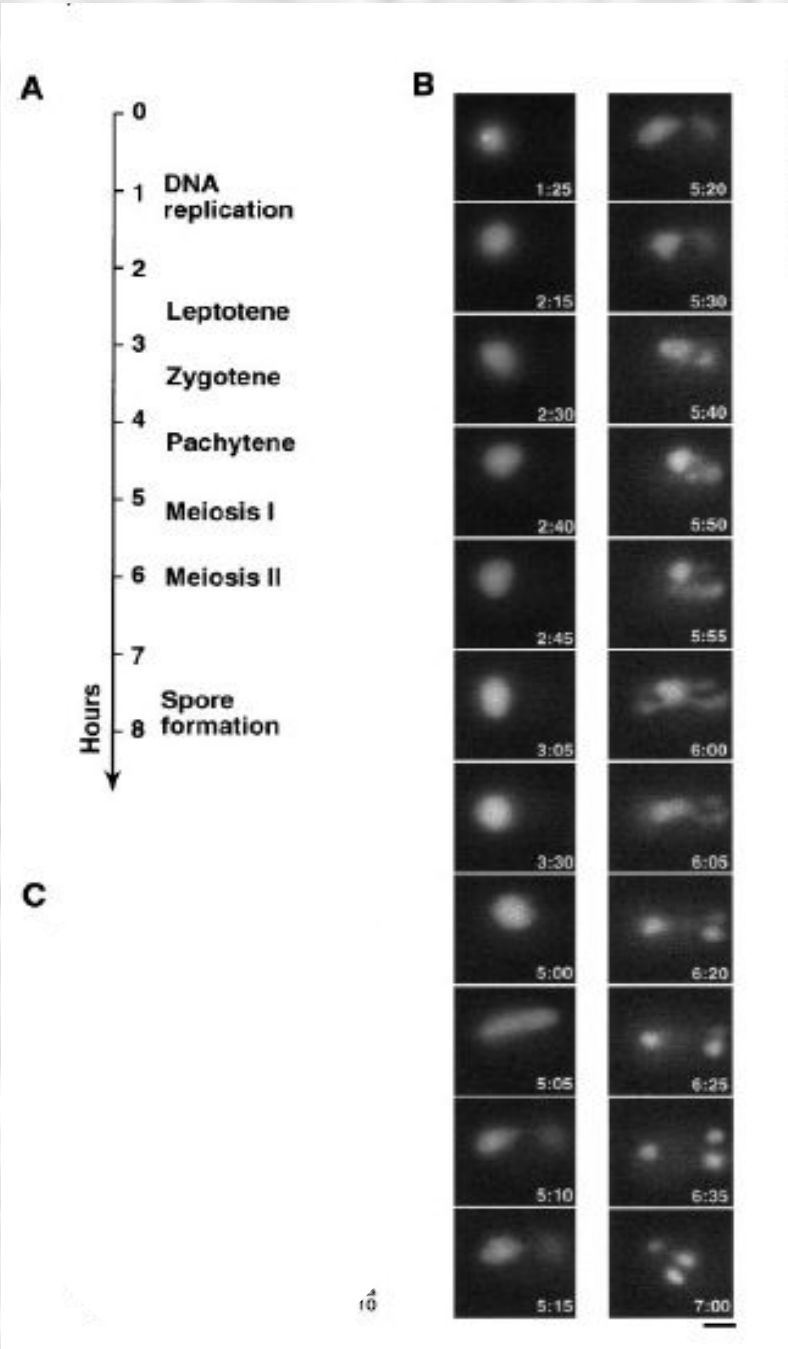
Модель синаптонемного комплекса



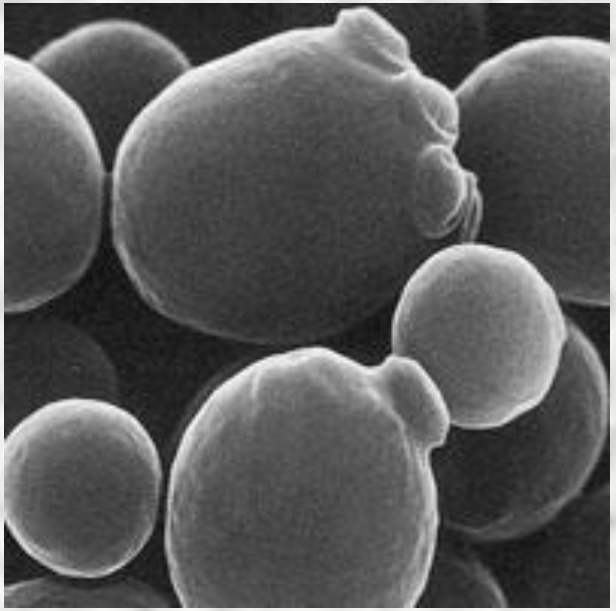

Chromatin loops of
sister chromatids
of one homologue
Synaptonemal
Complex
Axial elements
Cohesins
Chromatin loops of
sister chromatids
of the other
homologue

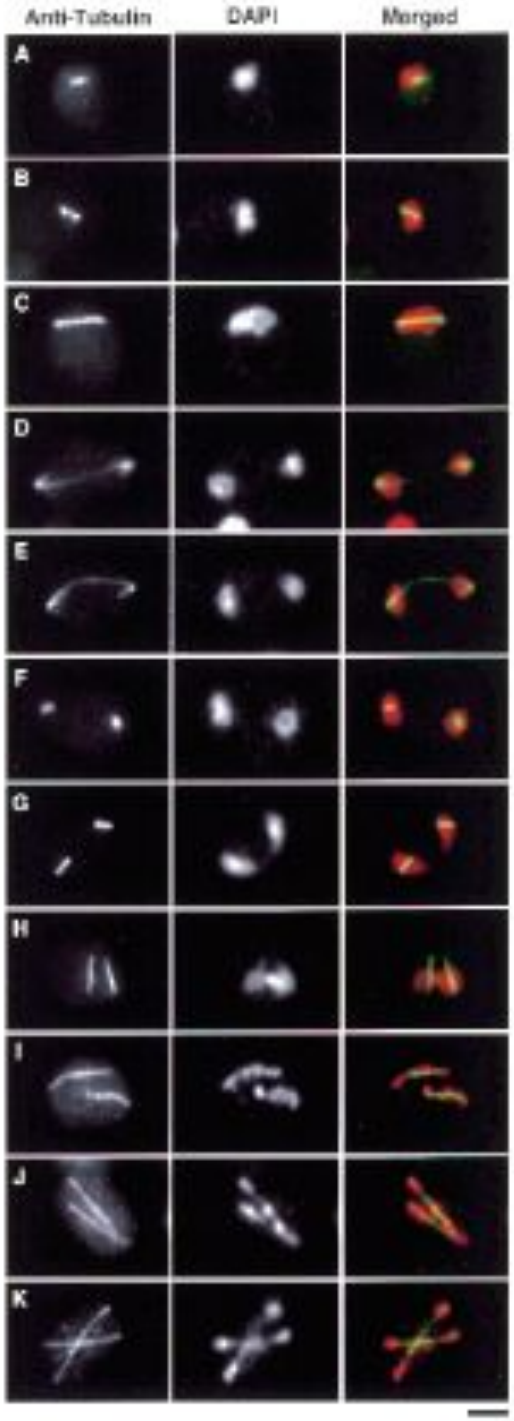
Профаза I. Диплотена, диакинез

- Десинапсис гомологов, разборка синаптонемного комплекса. В конце концов гомологи остаются скрепленными лишь в области хиазм

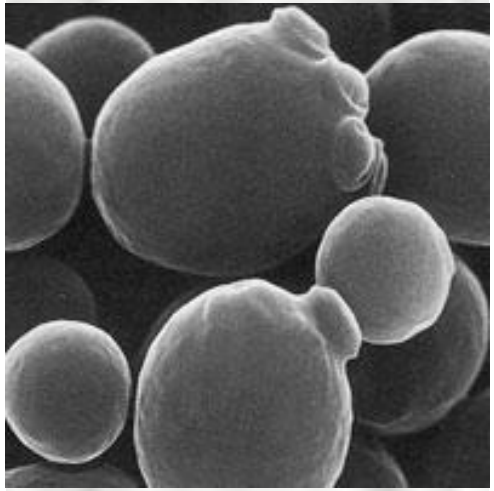


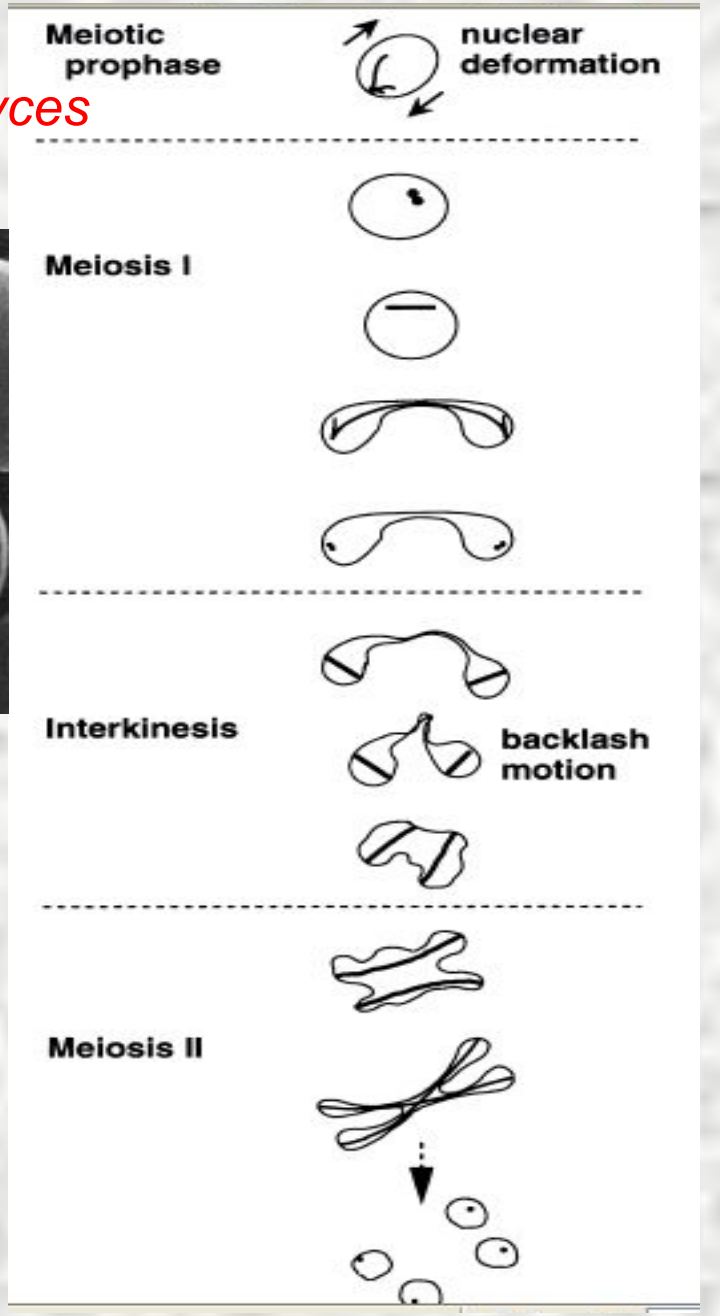
Мейоз у *Saccharomyces cerevisiae*





Мейоз у *Saccharomyces cerevisiae*





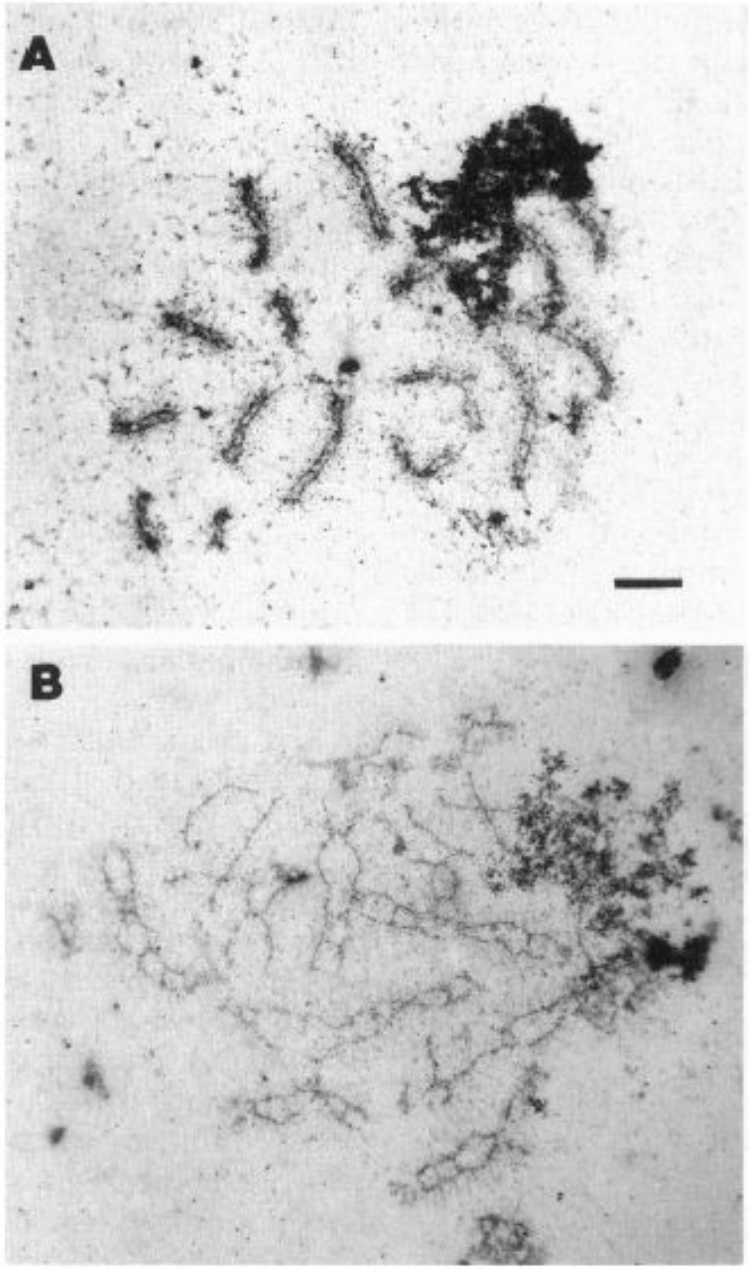
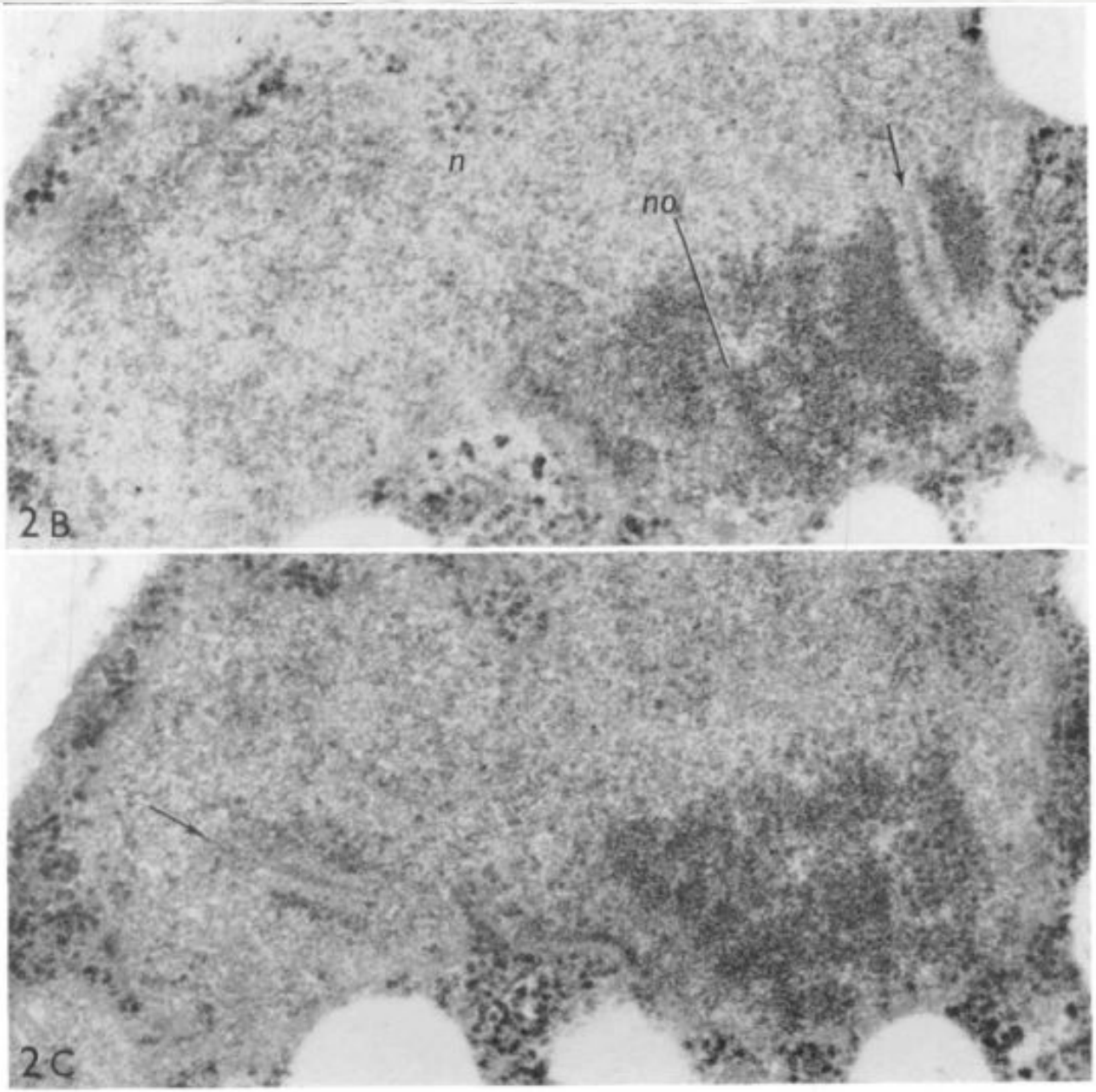


FIG. 1. Electron micrographs of yeast meiotic chromosomes. Meiotic nuclei from wild type (*A*) and the *zip1* mutant (*B*) were surface spread and stained with silver nitrate (1). (Bar = 1 μm; micrographs provided by Mary Sym.)


n
no
2 B
2 C

МЕЙОЗ II

Saccharomyces cerevisiae

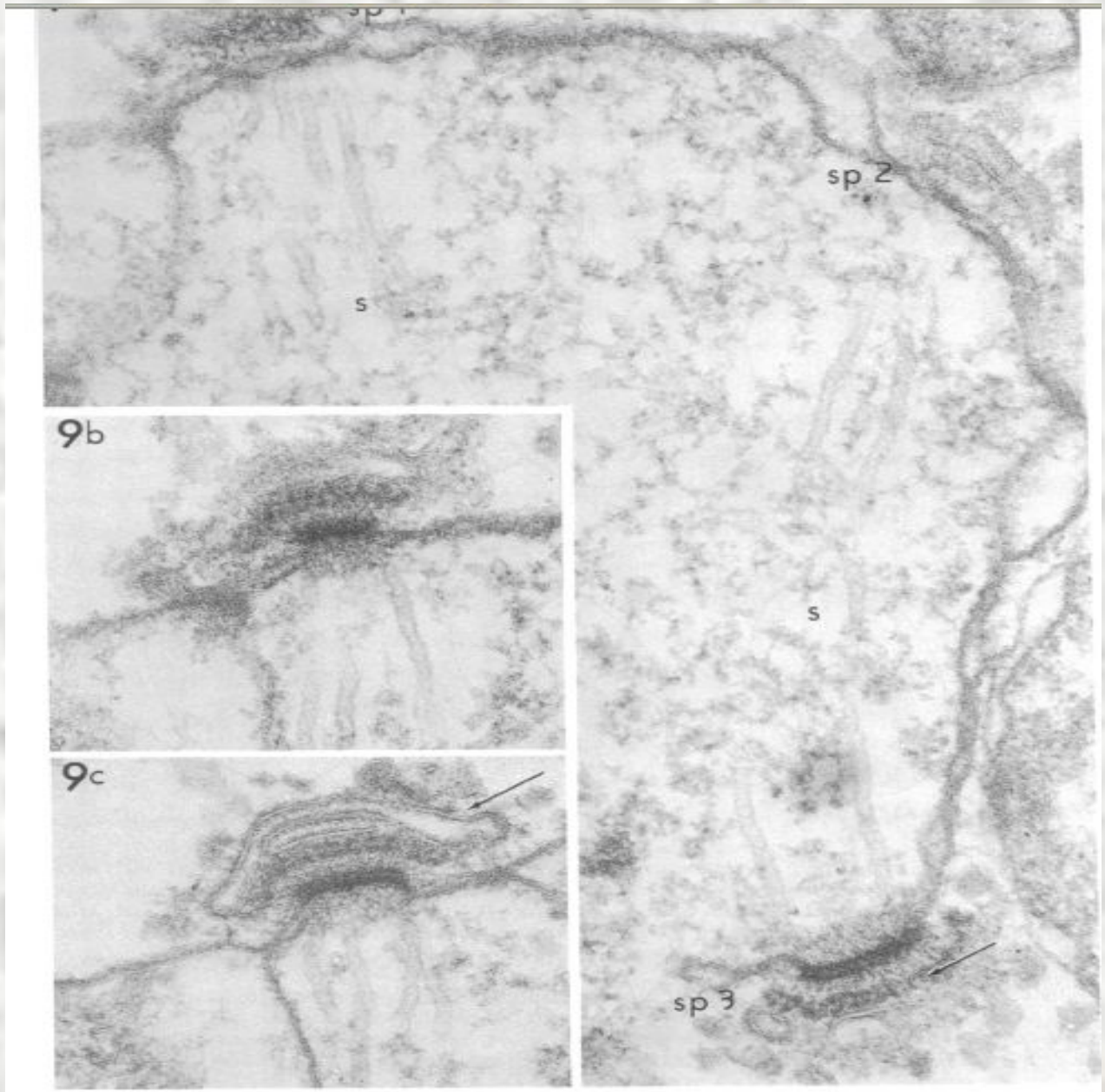


FIG. 9. Meiosis II spindle plaques of Saccharomyces cerevisiae in profile. (a) Three of the four pl

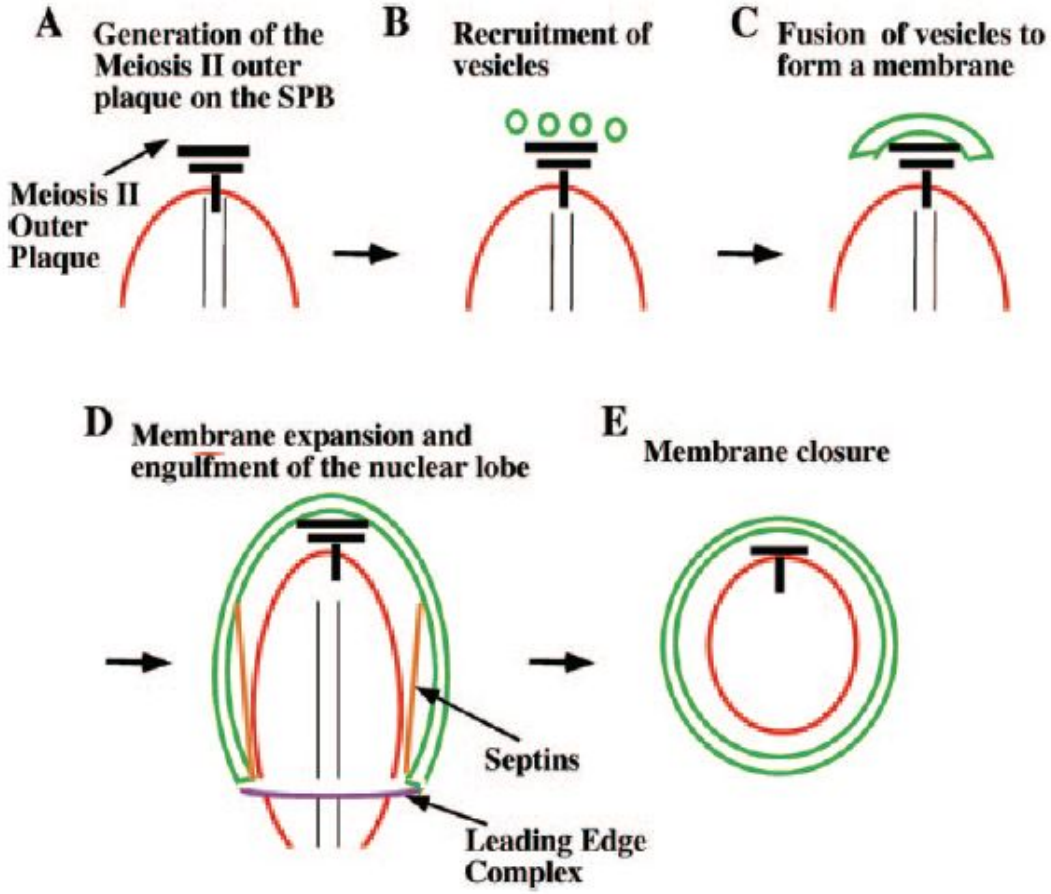
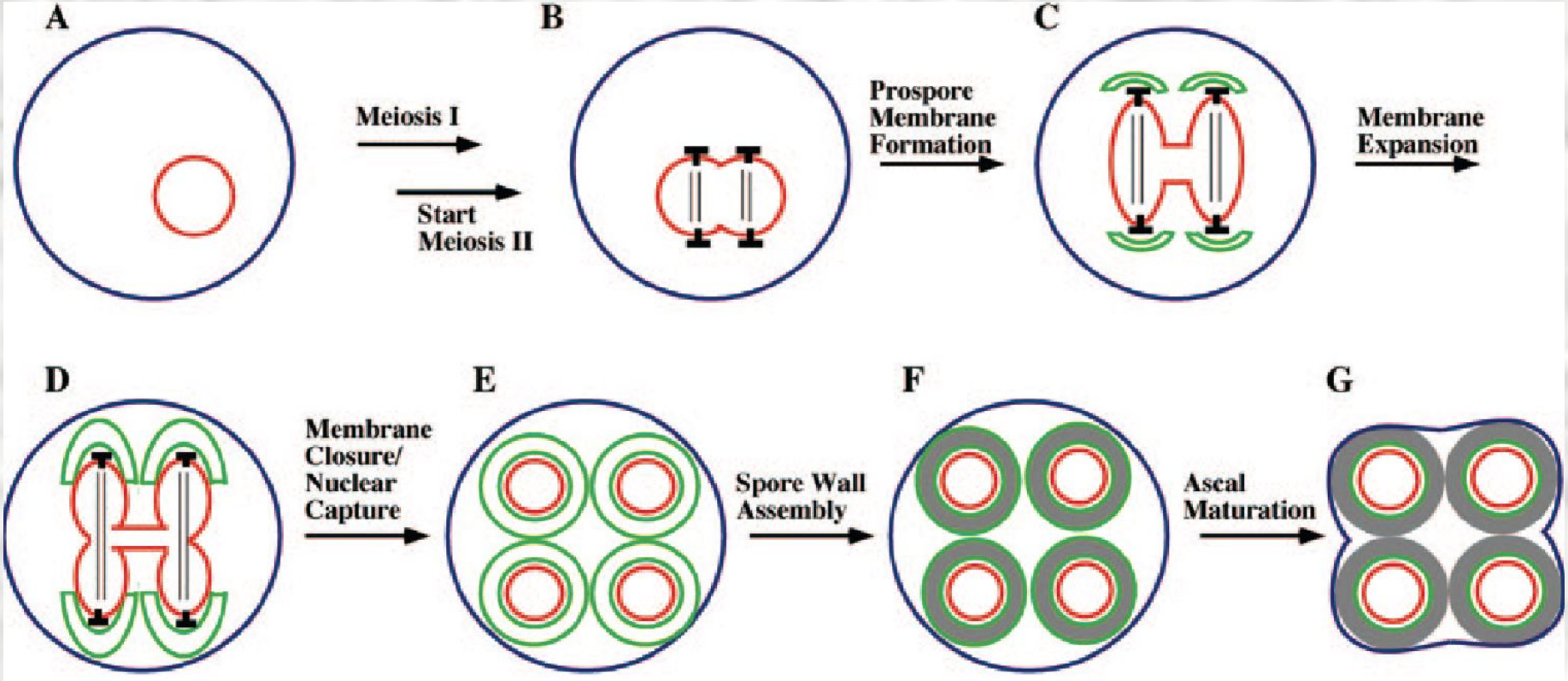


FIG. 2. Stages of prospore membrane growth. (A) As cells enter meiosis II, the meiosis II outer plaque is formed on the cytoplasmic face of the SPB (black bar). (B and C) The meiosis II outer plaque becomes a site for the recruitment and subsequent fusion of secretory vesicles to form a prospore membrane (green). (D) As the prospore membrane expands to engulf a daughter nucleus, its growth is controlled by two membrane-associated complexes: the septins (orange), which form sheets thought to run down the nuclear-proximal side of the prospore membrane, and the leading-edge complex (purple), which forms a ring structure at the membrane lip. (E) Closure of the prospore membrane completes cytokinesis. All three of the prospore membrane-associated complexes, i.e., the septins, leading-edge complex, and meiosis II outer plaque, disassemble at about the time of prospore membrane closure.


A
Meiosis I
Start
Meiosis II
B
Prospore
Membrane
Formation
C
Membrane
Expansion
D
Membrane
Closure/
Nuclear
Capture
E
Spore Wall
Assembly
F
Ascal
Maturation
G

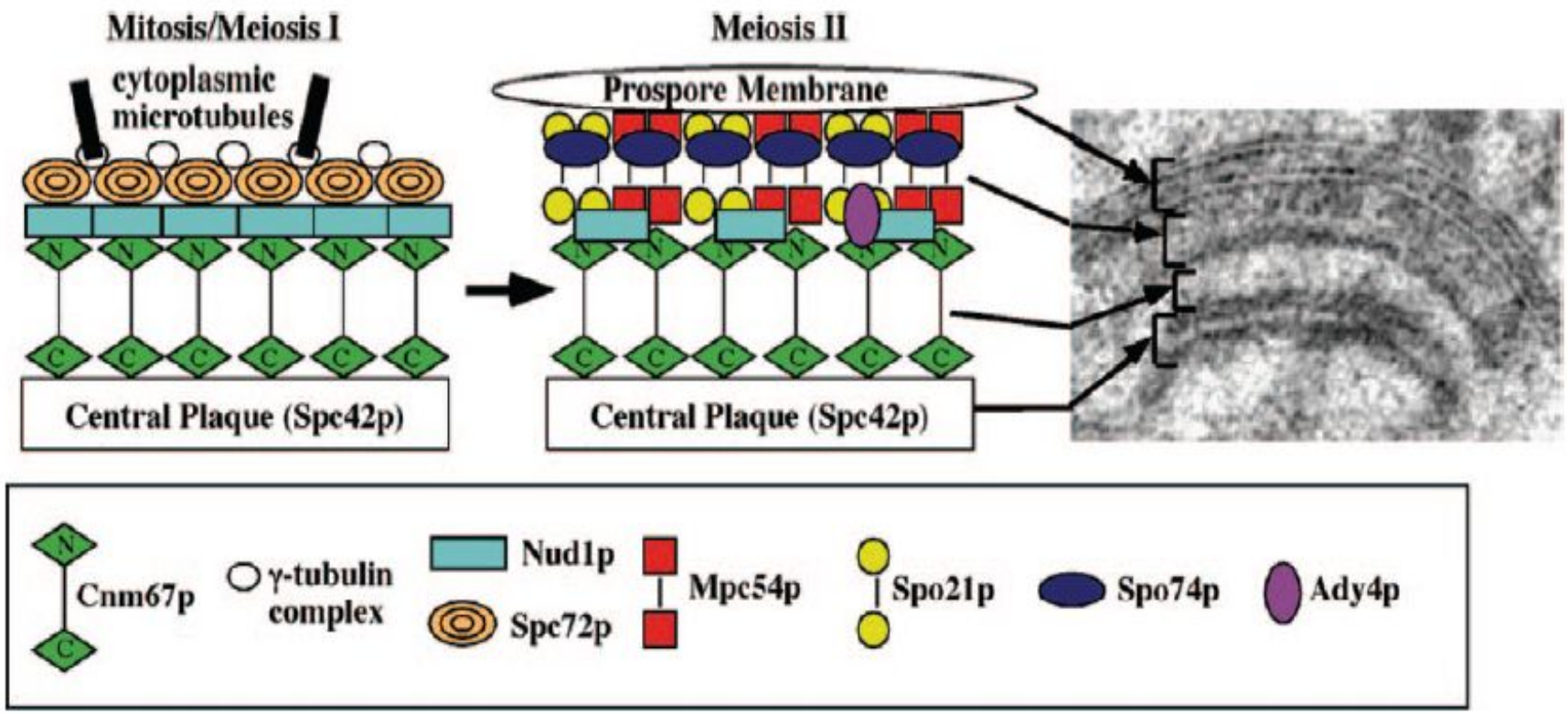


FIG. 3. Organization of proteins within the meiosis II outer plaque. The changes in organization and composition between a mitotic/meiosis I outer plaque and a meiosis II outer plaque are shown in the cartoon. The Spc72p and γ-tubulin complex proteins are removed and replaced with Ady4p, Mpc54p, Spo21p, and Spo74p, leading to a conversion from microtubule to membrane nucleating activity. In the upper right is shown an electron micrograph of a meiosis II outer plaque with associated prospore membrane. The proposed correspondence between the arrangement of proteins in the model and the structure as seen in the electron micrograph is indicated.

List of genes regulating meiosis and sporulation in *S. cerevisiae*

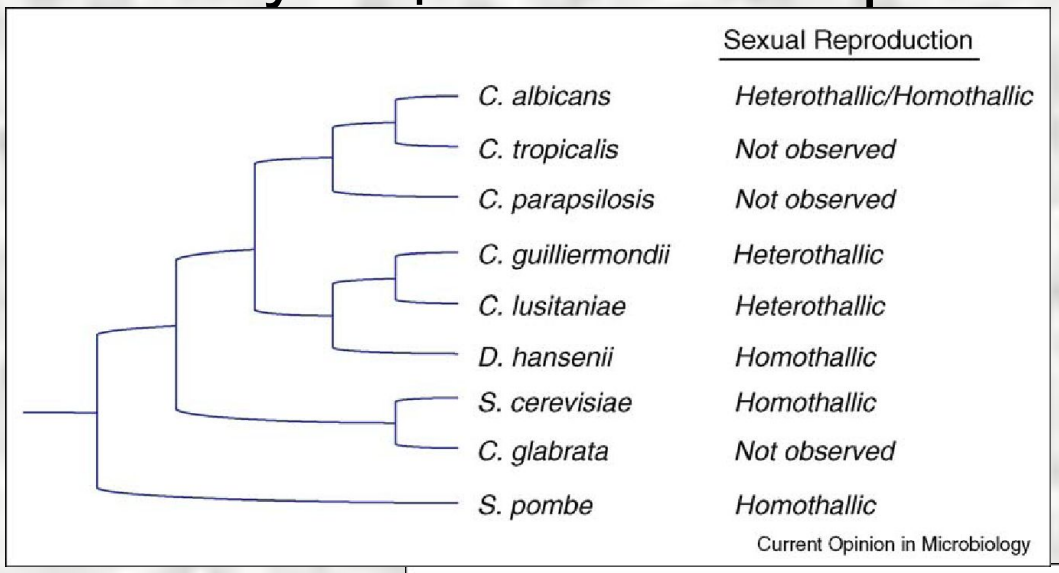
Function of gene product in *S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*	*C. lusitaniae*	*C. albicans*	Function of gene product in *C. albicans*
Genes regulating meiosis in *S. cerevisiae*				
Homeodomain protein that acts with *MAT*α2 to repress mating and permit meiotic induction in **a**/α diploids.	*MAT***a**1	*MTL***a**1	*MTL***a**1	Homeodomain protein that acts with *MTL*α2 to repress white-opaque phenotypic switching and mating in **a**/α cells.
Homeodomain protein, promotes α-specific gene expression pattern.	*MAT*α1	CLUG04923	*MTL*α1	Homeodomain protein, promotes α-specific gene expression patterns.
Homeodomain protein, promotes α-specific gene expression and acts with *MAT***a**1 to repress mating and permit meiotic induction in **a**/α diploids.	*MAT*α2	–	*MTL*α2	Homeodomain protein that acts with *MTL***a**1 to repress white-opaque phenotypic switching and mating in **a**/α cells.
Cell-type-dependent meiotic repressor.	*RME1*	CLUG05819	orf19.4438	White-phase specific gene expression. Upregulation correlates with clinical resistance to fluconazole, an antifungal.
Methyltransferase required for nutrient sensing and activation of *IME1*.	*IME4*	CLUG03093	orf19.1476	*No experimental data*
Meiotic kinase required for sporulation and activation of *IME1*.	*RIM11*	CLUG05114 CLUG01530	orf19.791	*No experimental data*
Glucose repressed kinase, positive regulator of *IME1*.	*RIM15*	CLUG04432	orf19.7044	*No experimental data*
Serine/threonine kinase important for meiotic entry and chromosome segregation.	*MCK1*	CLUG01530	orf19.3459	*No experimental data*
Master transcription factor required for induction of the meiotic pathway.	*IME1*	–	–	
Kinase required for activation of early meiosis genes.	*IME2*	CLUG00015	orf19.2395	Mutants are hyper-susceptible to the antifungal Amphotericin B.
Transcription factor required for induction of middle-meiosis genes.	*NDT80*	CLUG00404 CLUG05634	orf19.2119 (orf19.513)	Expression induced by antifungal treatment, required for basal level of antifungal drug tolerance in wildtype cells.

Function in *S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*	*C. lusitaniae*	*C. albicans*	Function in *C. albicans*
Genes involved in *S. cerevisiae* sporulation				
Serine/threonine kinase involved with spore wall formation, expressed at the end of meiosis.	*SPS1*	CLUG04805	orf19.3049	*No experimental data*
Sporulation specific MAP kinase required for outer spore wall synthesis.	*SMK1*	CLUG04129	orf19.7208	Putative MAP kinase, mutant produces wrinkled colonies.
Sporulation specific enzyme required for dityrosine synthesis, a cell wall precursor.	*DIT1*	CLUG03886	orf19.1741	*No experimental data*
Sporulation specific enzyme required for dityrosine synthesis and cell wall maturation.	*DIT2*	CLUG02306	orf19.554	Involved with chlamydospore (asexual spore) formation and dityrosine synthesis.
Sporulation specific septin.	*SPR3*	CLUG04558	orf19.1524	Required for septin formation.
Nonessential protein expressed during	*SPS4*	CLUG05767	orf19.7568	*No experimental data*

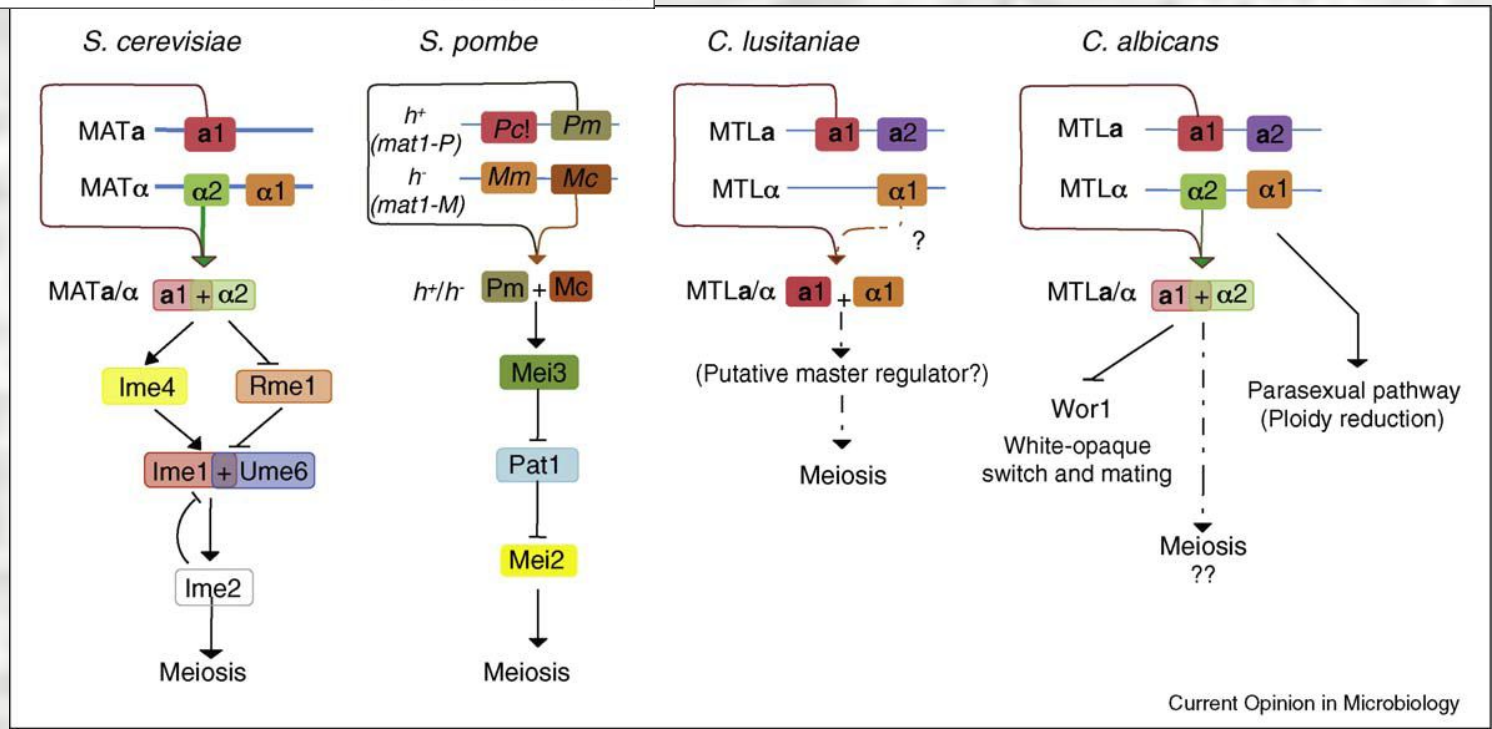
Синхронность мейоза у дрожжей требует согласованной работы более 1000 генов\продуктов

Sherwood, Bennett, 2009

Регуляция полового размножения у дрожжей



Phylogenetic tree of the hemiascomycetes (S. cerevisiae and sequenced Candida species)



Meiotic genes involved in homologous recombination and synaptonemal complex formation

Function of gene product in *S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*	*C. lusitaniae*	*C. albicans*	*S. pombe*	*M. musculus*
Genes involved in homologous recombination					
Meiosis-specific gene, important for processing dsDNA breaks for repair during homologous recombination.	*DMC1**	–	+	+	+
Dmc1 cofactor; forms a complex with Sae3 for dsDNA break processing during homologous recombination.	*MEI5*	–	+	+	+
Meiosis-specific helicase.	*MER3/HFM1*	–	+	–	+
Mismatch repair gene that is important for DNA crossover during meiosis.	*MLH1*	+	+	+	+
Endonuclease that complexes with *MUS81* to cleave branched DNA; involved in joint molecule formation/resolution during recombination.	*MMS4*	+	+	+	+
Forms a complex with *HOP1*, important for chromosome pairing and repair of dsDNA breaks.	*MND1**	–	+	+	+
Subunit of MRX complex, required for dsDNA break repair during homologous recombination.	*MRE11*	+	+	+	+
Forms a complex with *MSH5*, essential for regulating crossover events during meiosis.	*MSH4**	–	+	–	+
Forms a complex with *MSH4*, essential for regulating crossover events during meiosis.	*MSH5**	–	+	–	+
Endonuclease that complexes with *MMS4* to cleave branched DNA; involved in joint molecule formation/resolution during recombination.	*MUS81*	+	+	+	+
Subunit of MRX complex, required for dsDNA break repair during homologous recombination.	*RAD50*	+	+	+	+
Protein important for DNA strand invasion and exchange during homologous recombination.	*RAD51*	+	+	+	+
Protein that stimulates DNA strand exchange during homologous recombination.	*RAD52*	+	+	+	+
Dmc1 cofactor; forms a complex with Mei5 for dsDNA break processing during homologous recombination.	*SAE3*	–	+	+	+
Helicase regulates meiotic crossover formation events.	*SGS1*	+	+	+	+
Meiosis-specific protein that stimulates homologous recombination by catalyzing the formation of dsDNA breaks.	*SPO11**	+	+	+	+
Component of the MRX complex, important for dsDNA repair during homologous recombination.	*XRS2* (*NBS1*)	–	–	+	+

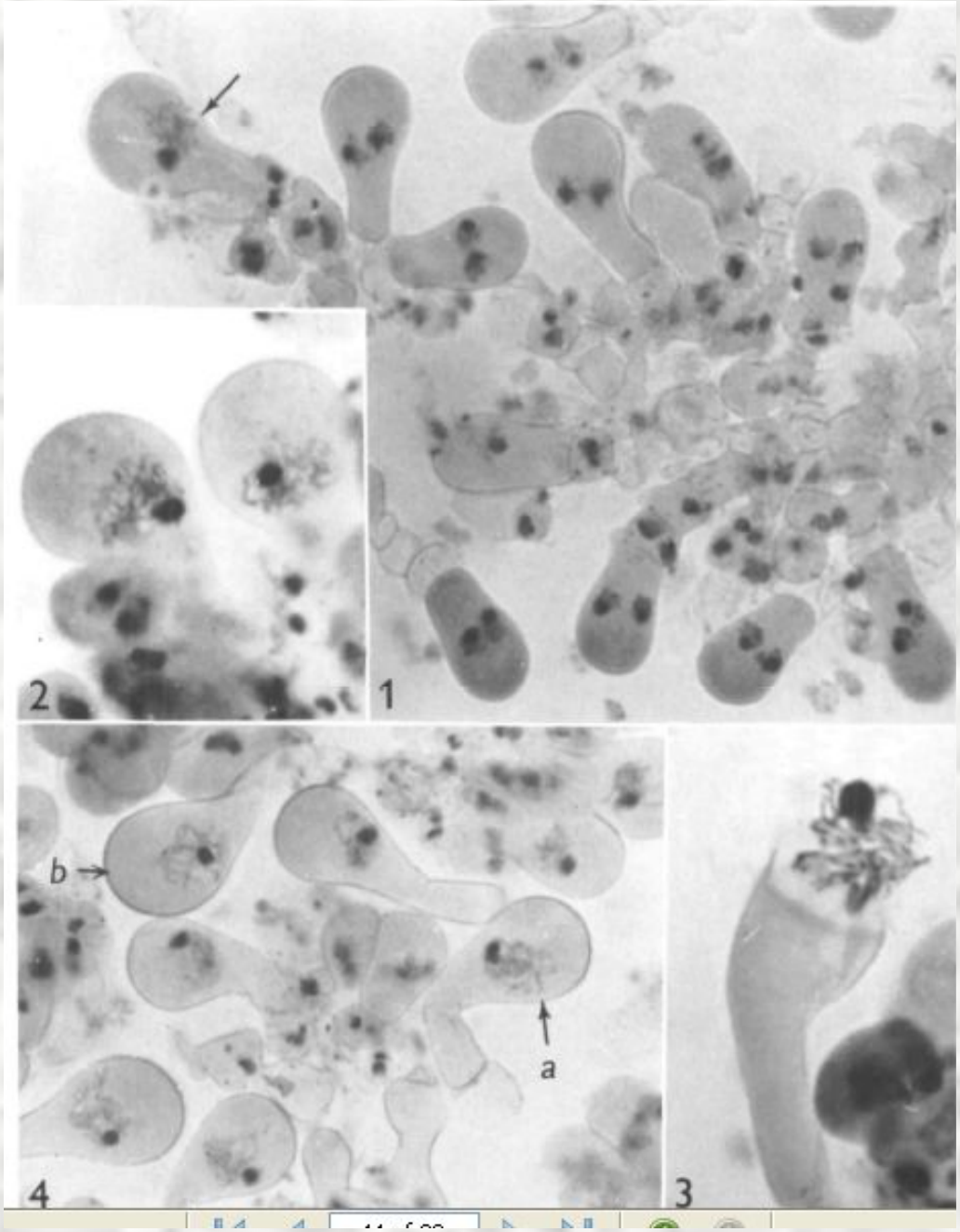
Function of gene product in *S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*	*C. lusitaniae*	*C. albicans*	*S. pombe*	*M. musculus*
Synaptonemal complex genes					
Meiosis-specific protein, localizes to axial elements of the synaptonemal complex. Required for homologous recombination.	*HOP1**	–	+	+	+
Meiosis protein that promotes recombination between homologous chromosomes and prevents recombination between nonhomologous chromosomes.	*HOP2**	–	+	+	+
Meiosis-specific serine/threonine kinase that promotes recombination between homologous chromosomes.	*MEK1*	–	+	+	+
Sister chromatid cohesin protein.	*REC8**	+	+	+	+
Protein component of axial elements.	*RED1*	–	–	+	+
Structural component of synaptonemal complex, promotes recombination between homologs.	*ZIP1*	–	–	–	+
Meiosis-specific protein important for synaptonemal complex formation.	*ZIP2*	–	+	–	+
Sumo E3 ligase, localizes to synapse initiation sites and is required for synaptonemal complex formation.	*ZIP3*	–	+	–	+
Essential for synapsis during homologous recombination.	*ZIP4*	–	–	–	–

MEIOSIS IN *COPRINUS*

VIII. A Time-Course Study of the Fusion and Division of the Spindle Pole Body during Meiosis

BENJAMIN C. LU

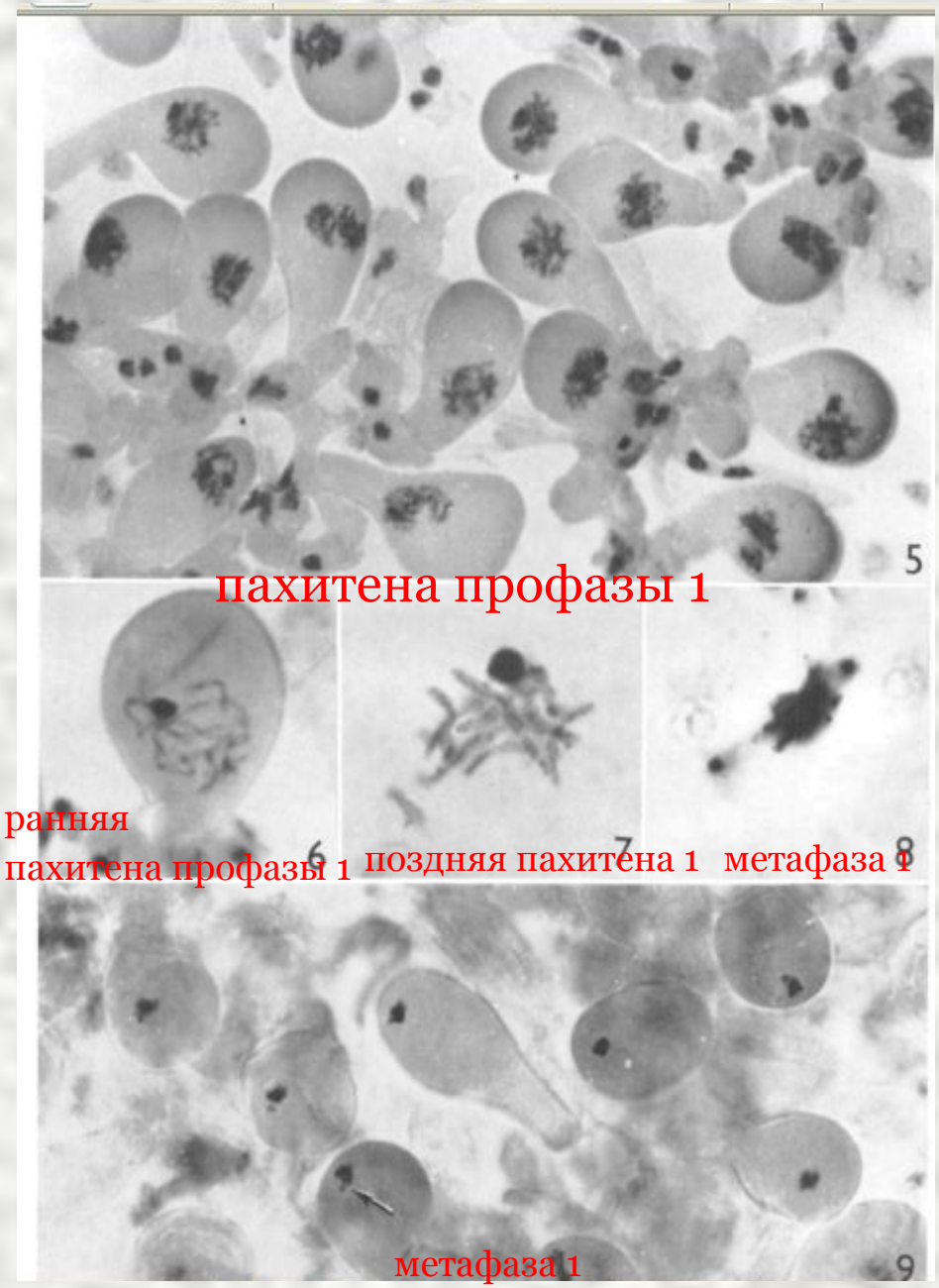
FIGURE 1 The time sequence and the meiotic stages as established by Raju and Lu (12). The arrows point to the sequential samples taken from a single developing fruiting body for electron microscopy. M-T=metaphase I-telophase II.



Мейоз у *Coprinus cinereus* на уровне светового микроскопа

1 стадия перед слиянием (24 часа)
2-3 стадия лептотены после слияния перед синапсисом

4 зиготена



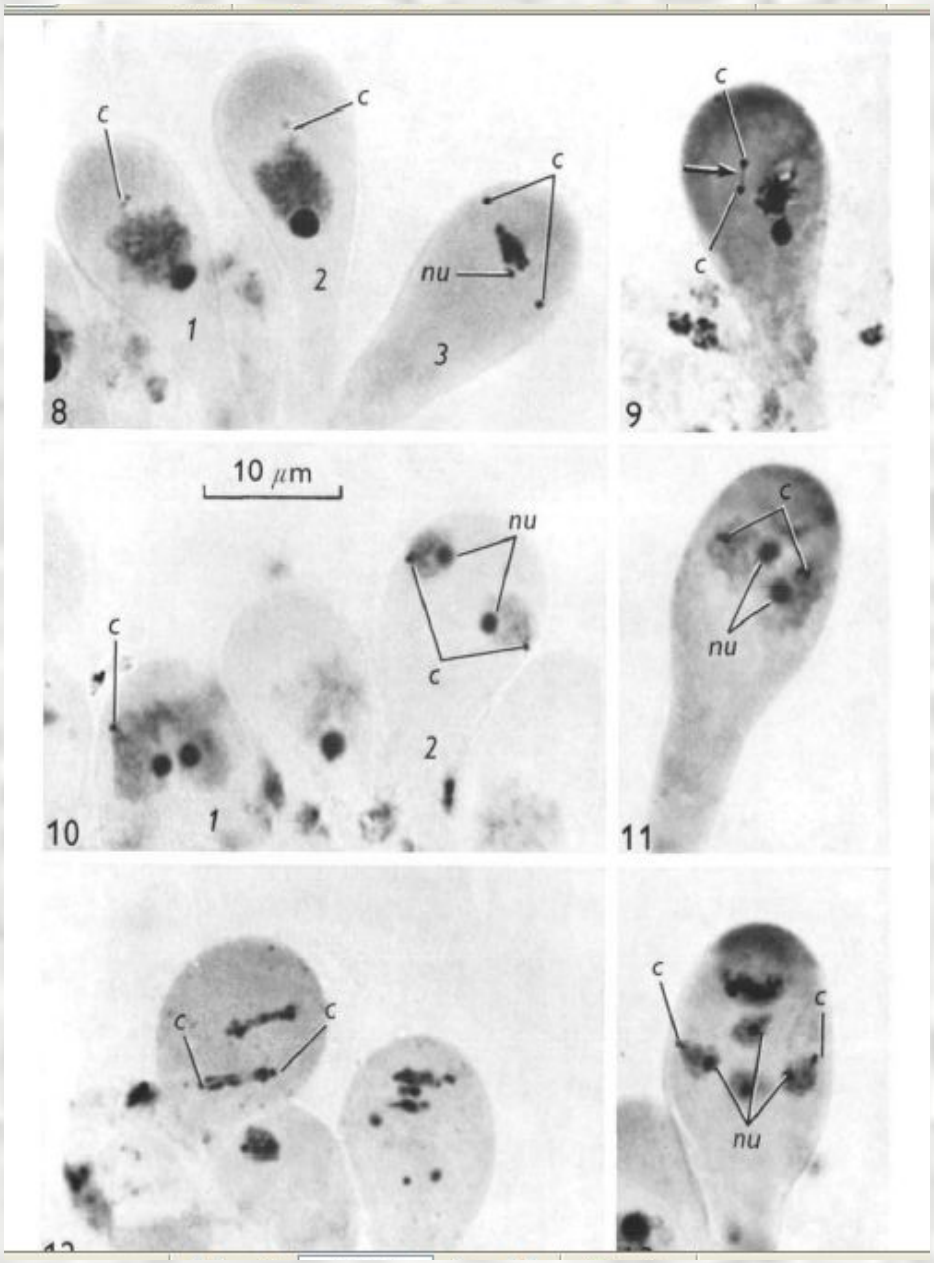
пахитена профазы 1

ранняя
пахитена профазы 1

поздняя пахитена 1

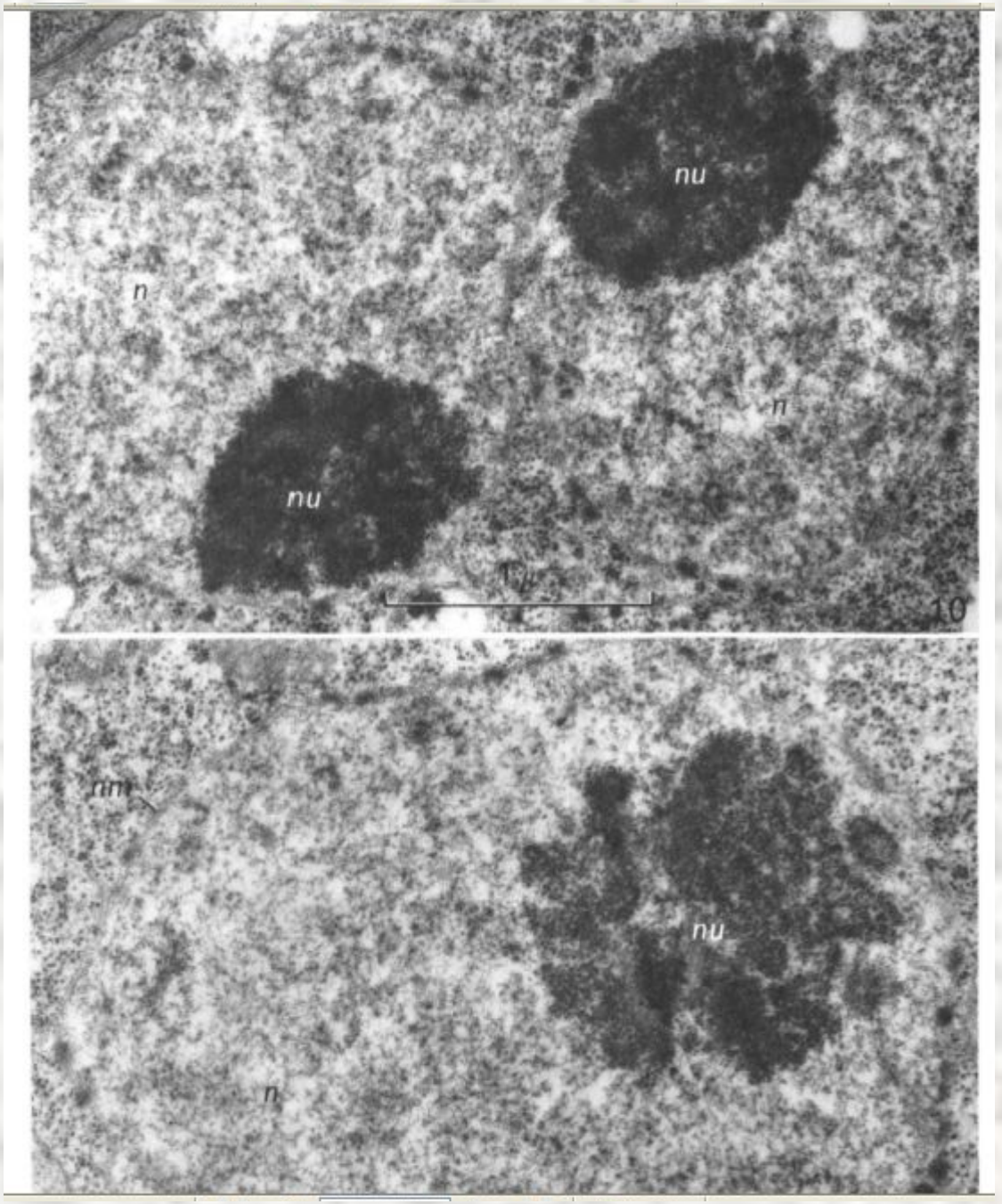
метафаза 1

метафаза 1



Мейоз у *Coprinus cinereus* на уровне светового микроскопа

8 диплотена-метафаза 1
9 диакинез
10 телофаза 1
11 профаза 2
12 анафаза 2
13 телофаза 2

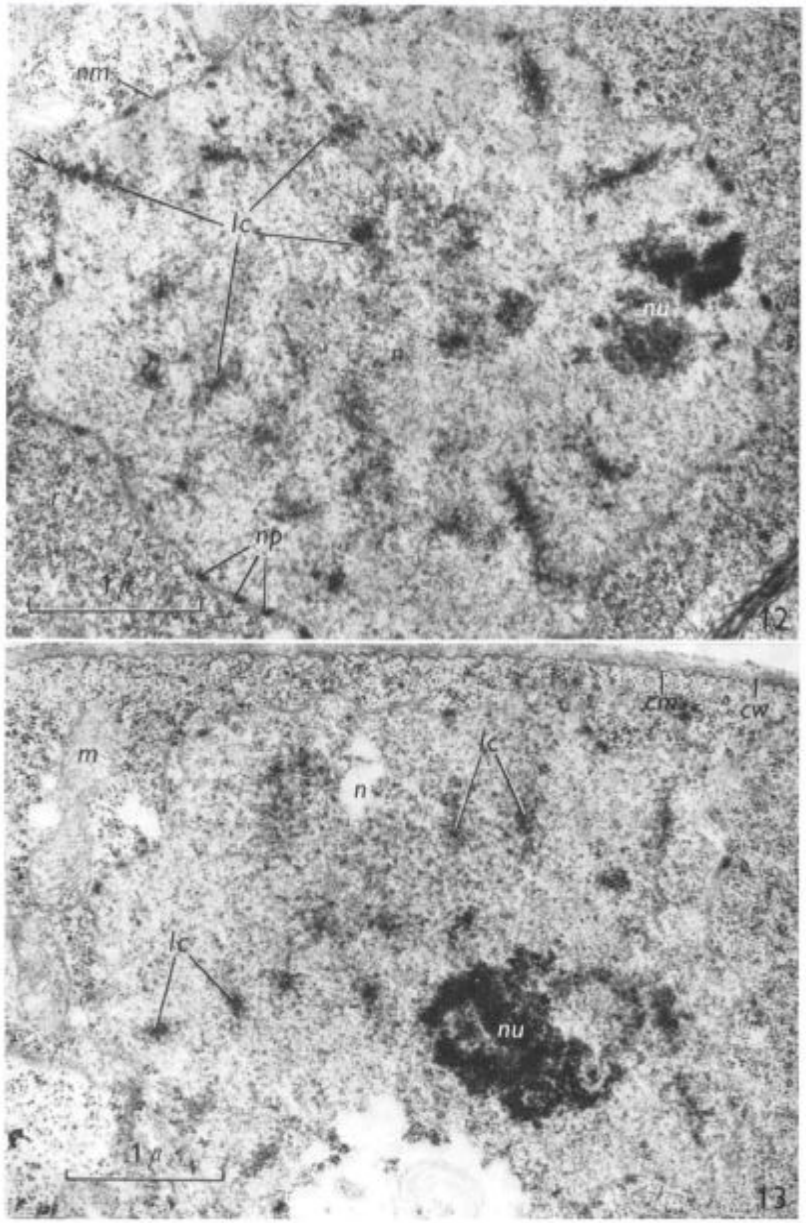


Мейоз у *Coprinus cinereus* на уровне электронного микроскопа

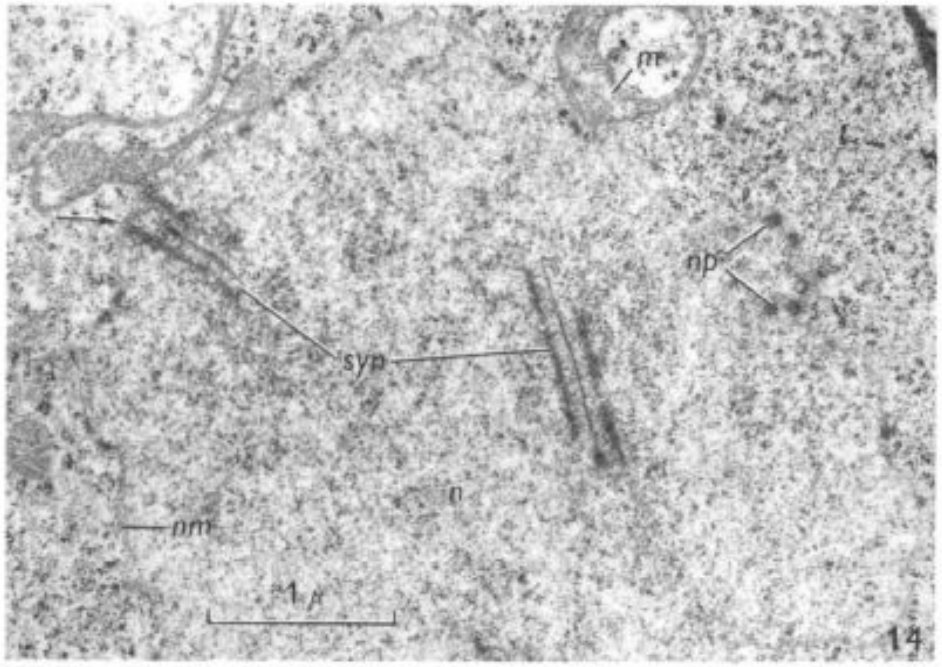
ТЭМ

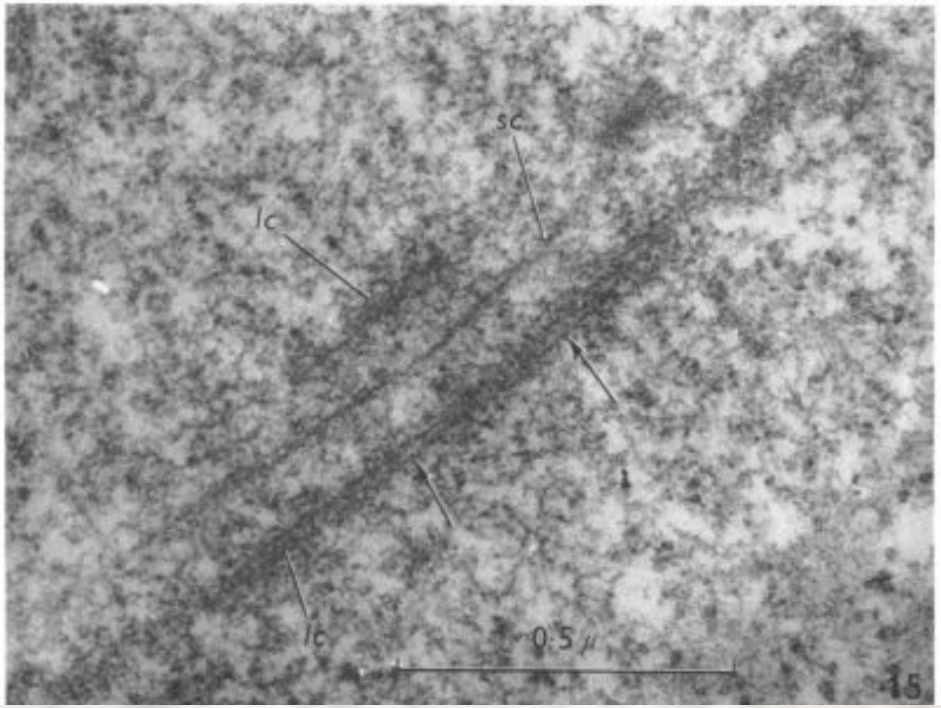
стадия перед слиянием

стадия после слияния перед синапсисом

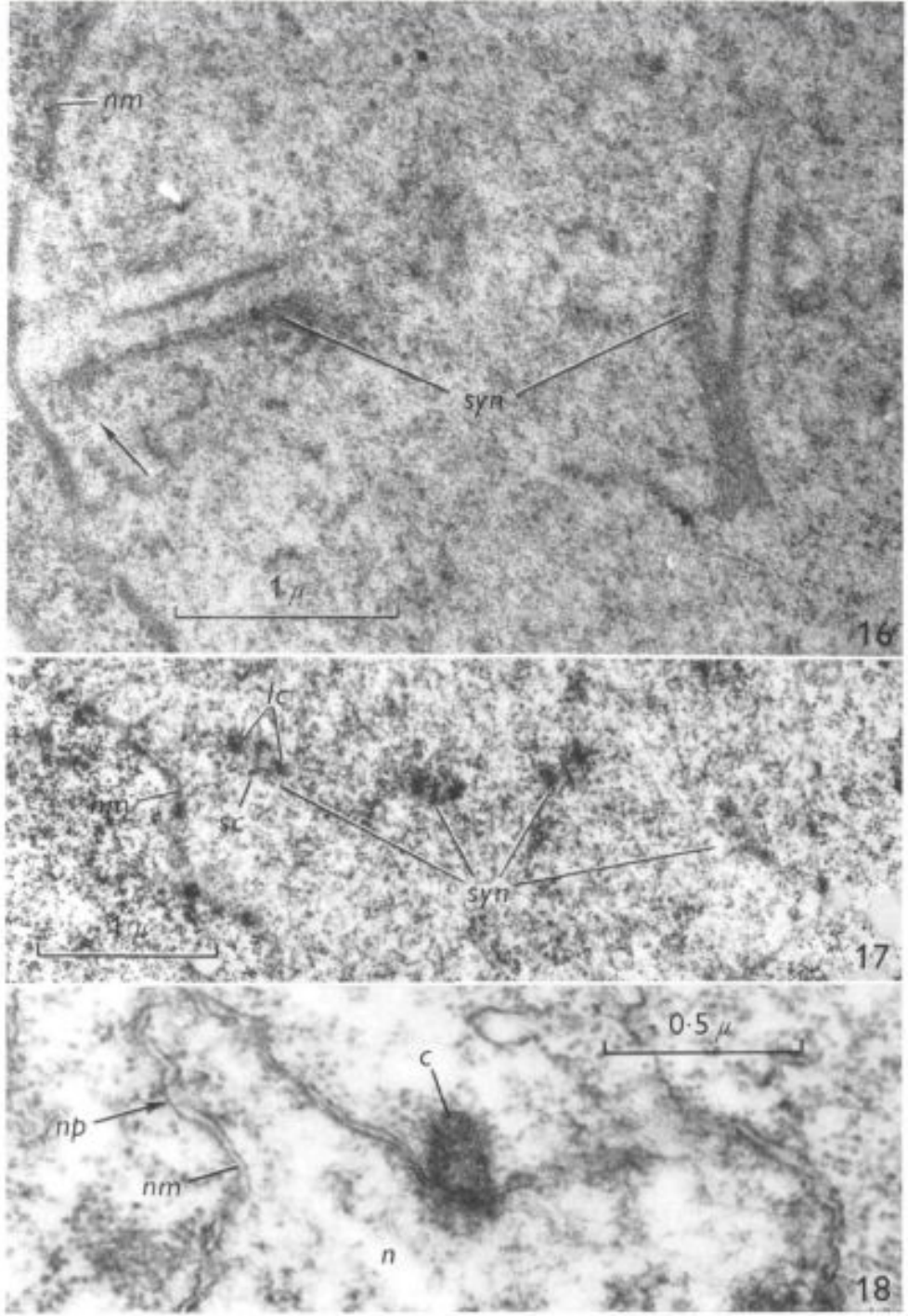


профаза 1
зиготена



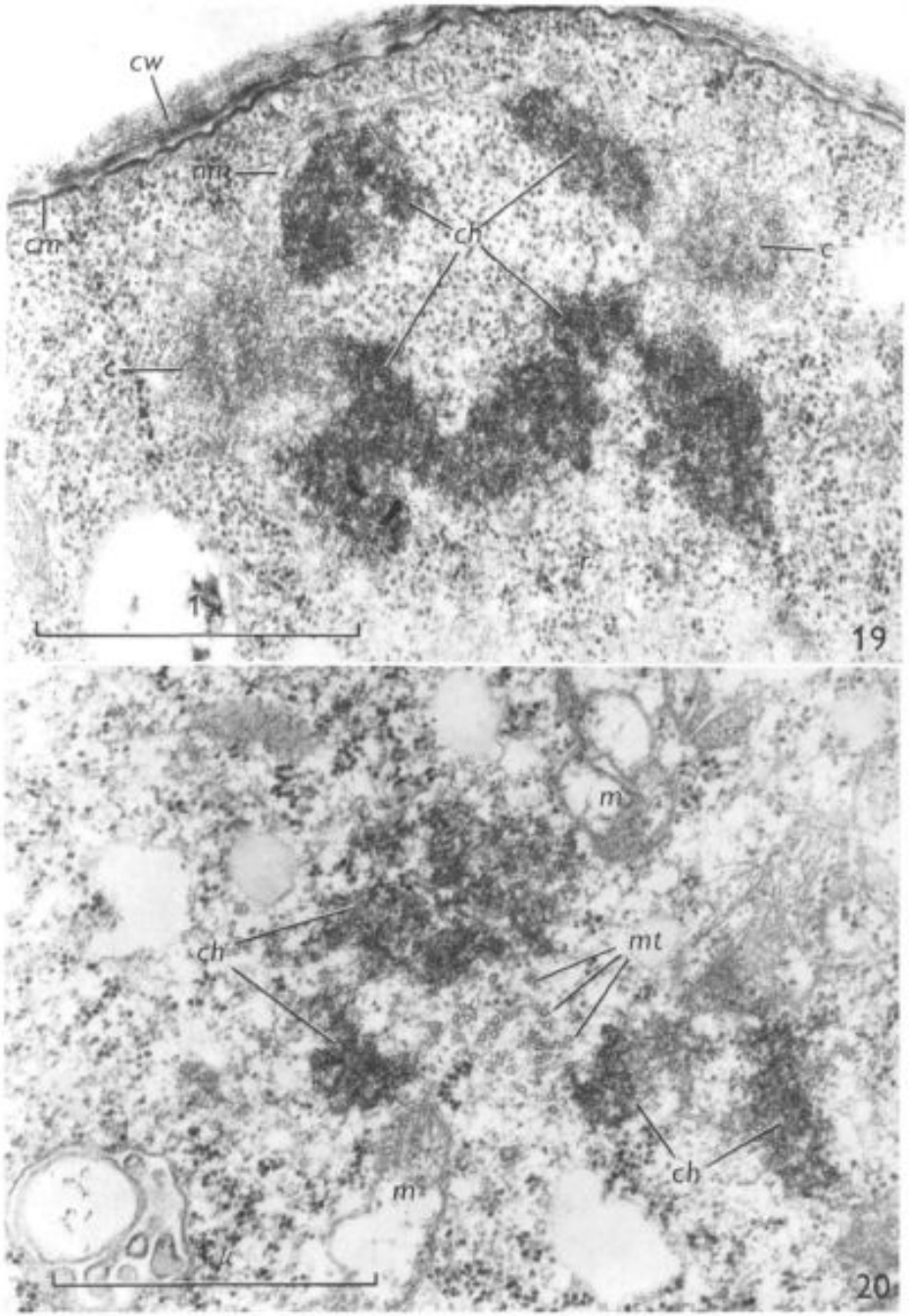


профаза 1
пахитена

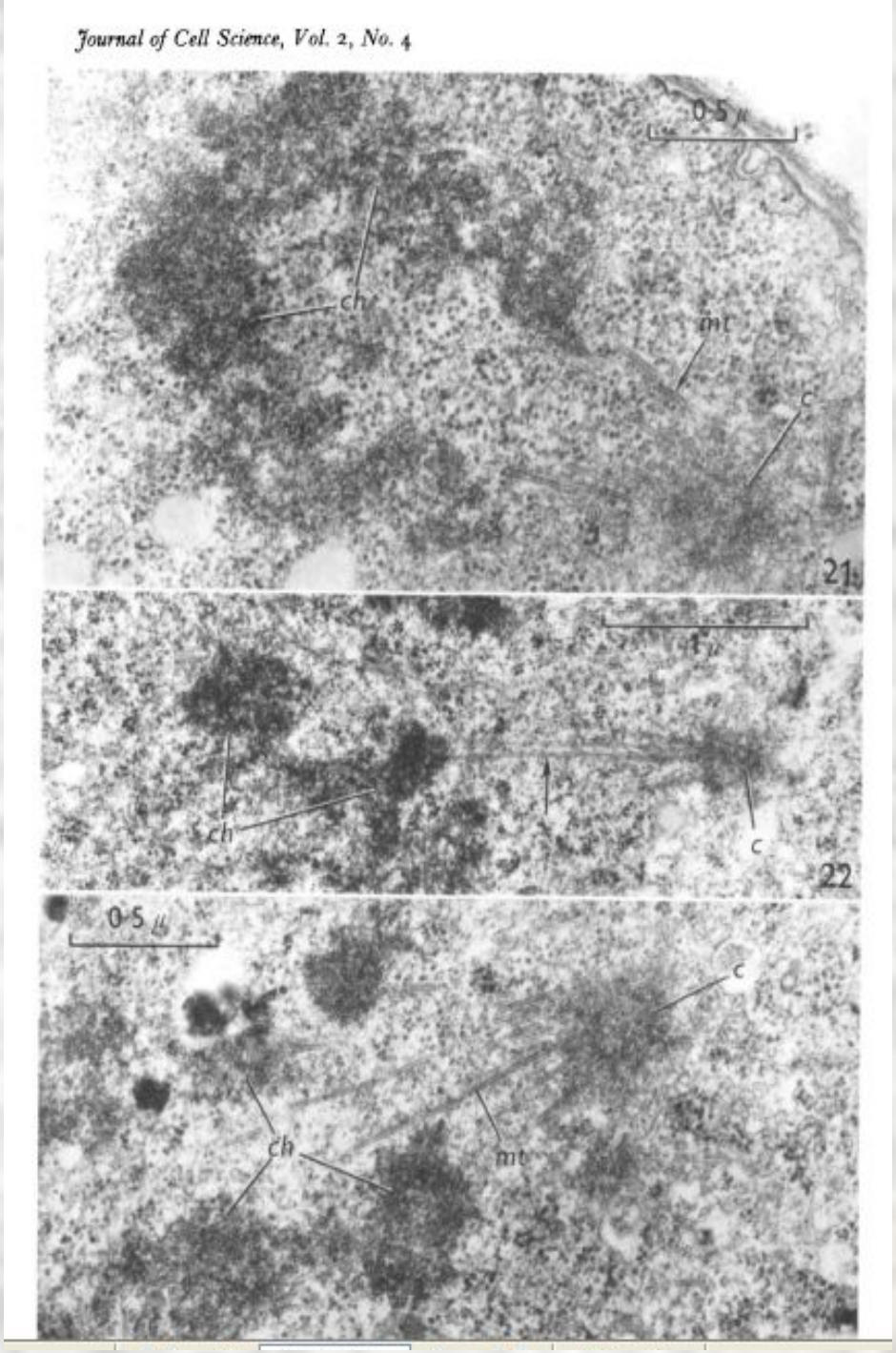


профаза 1
пахитена

Journal of Cell Science, Vol. 2, No. 4

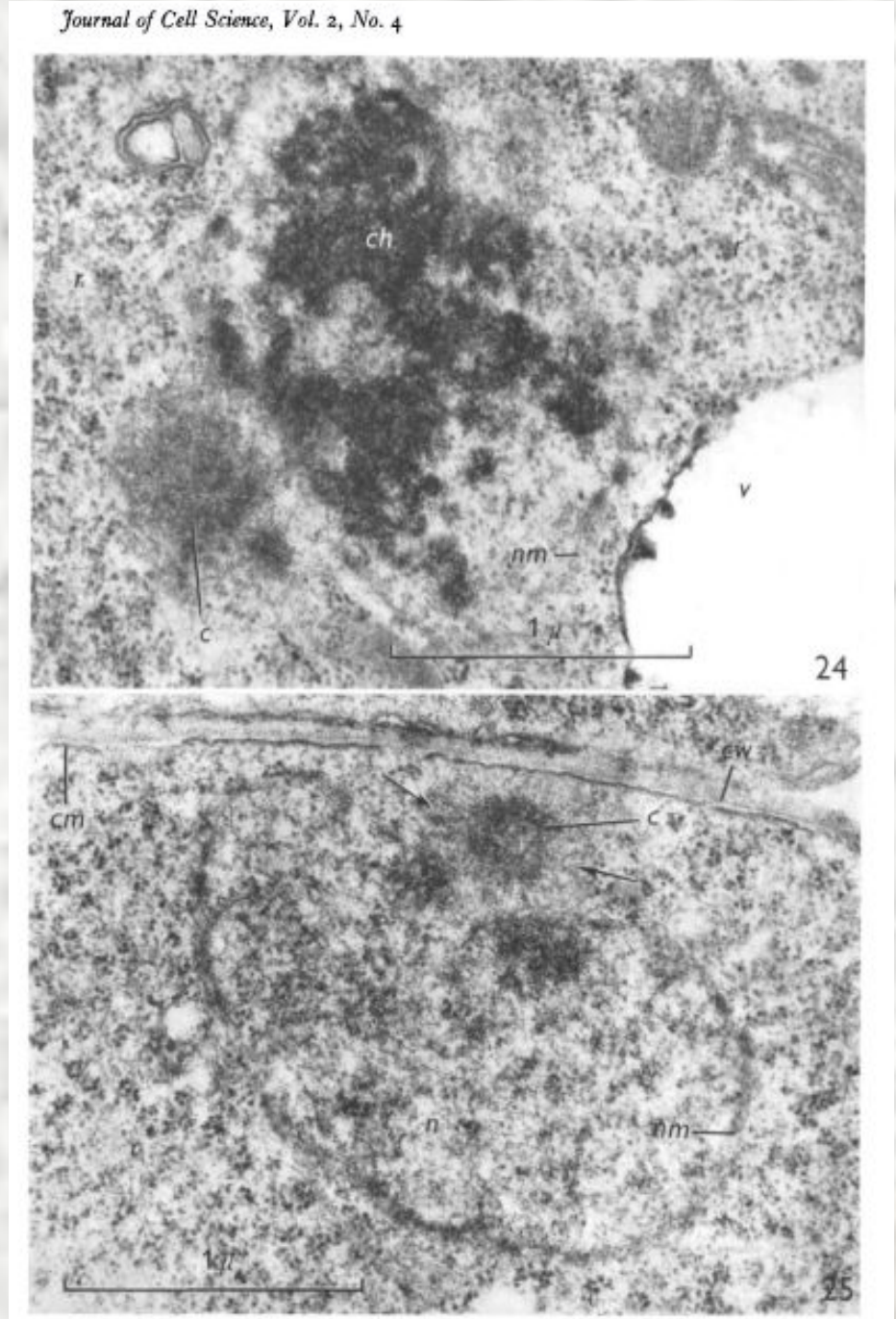


метафаза 1



метафаза 1

анафаза 1

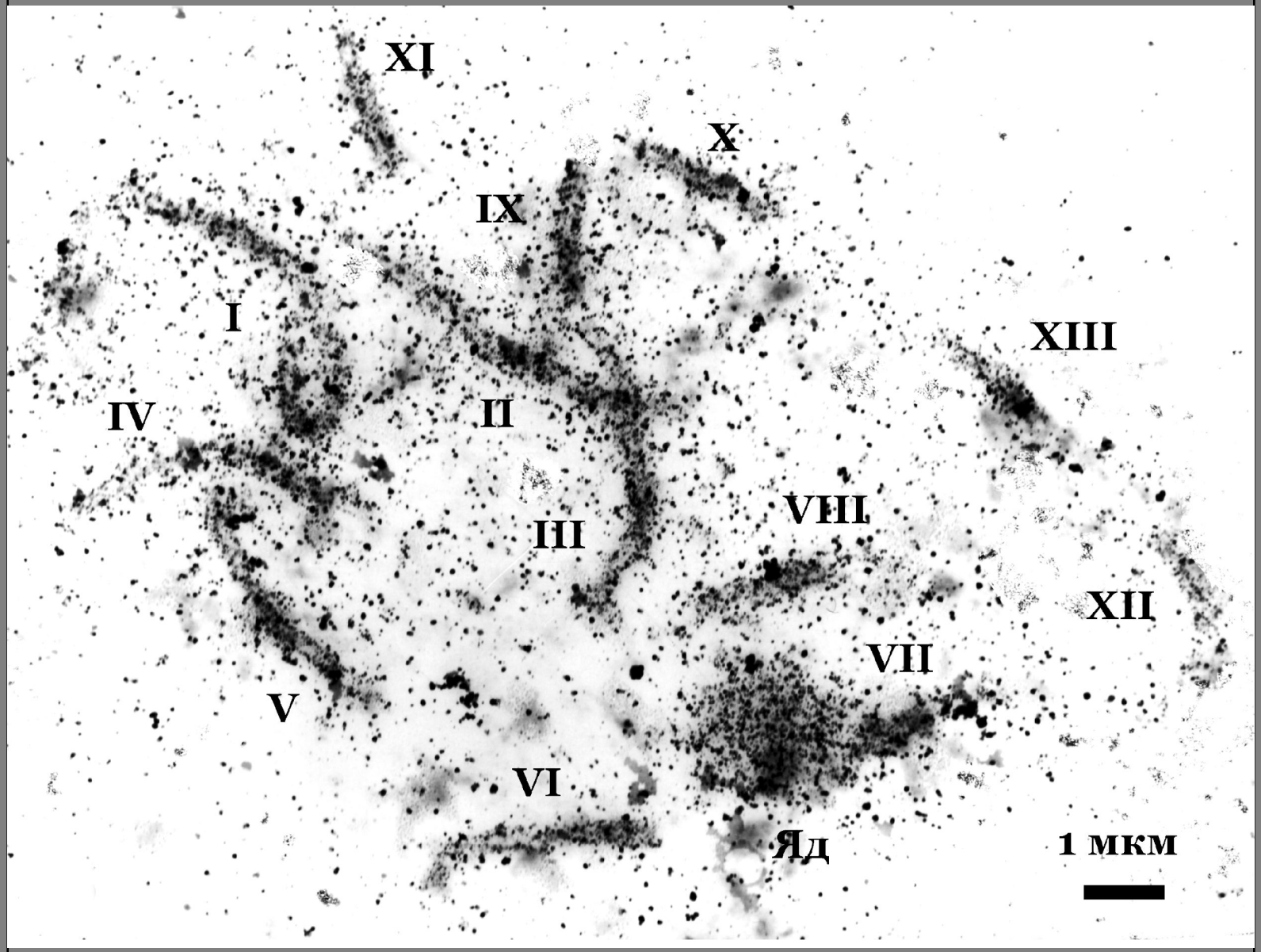


ранняя
телофаза 1

поздняя
телофаза 1

Мейоз у *Agaricus bisporus*

Профаза I мейоза четырехспорового штамма шампиньона

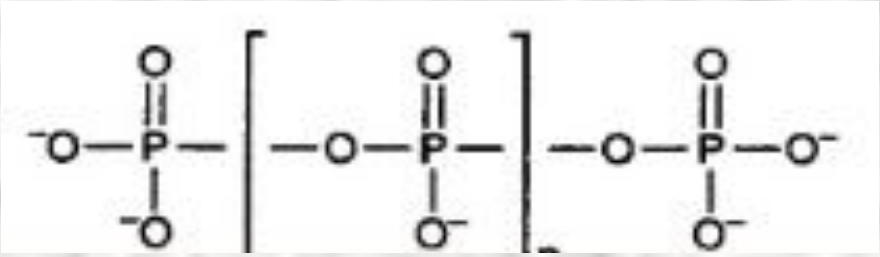


Запасные включения

Одним из способов метаболической регуляции является резервирование большого количества запасных веществ разного состава.

Основными резервными веществами в клетках грибов являются:

- Полифосфаты
- Гликоген
- Липиды
- Трегалоза и полиолы



Полифосфаты

- Были обнаружены впервые у дрожжей в конце XIX века и были названы гранулами волютина и метахроматина.

Inorganic polyphosphates functions could significantly change in the process of evolution. In procaryotes, metabolism of polyphosphates is closely related to bioenergetics. In lower eucaryotes, polyphosphates play a role of an osmotically inert reserve of inorganic phosphorus, while in the higher animals they apparently function as regulators of gene activity and are involved in some transport processes.

На примере полифосфатов показано, что в процессе эволюции функции компонентов клеток могли меняться. У бактерий полифосфаты играют важную роль в биоэнергетике. В обмене веществ низших эукариот главная функция полифосфатов – резервирование фосфата в осмотически инертной форме, а у высших животных полифосфаты участвуют в транспорте веществ через мембраны, а также в регуляции активности генома.

© Кулаев И.С., 1996

И. С. КУЛАЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших и основополагающих разделов современной биологии является биохимия. Эта наука рассматривает, с одной стороны, химические основы жизни, то есть химические соединения, из которых состоят живые клетки, и с другой – их превращения в обмене веществ. Большая часть соединений и их обмен достаточно хорошо изучены. Одна из актуальных задач современной биологии – изучение регуляции биохимических процессов у организмов, находящихся на разных этапах биологической эволюции. Существует несколько уровней такой регуляции. Сегодня можно говорить по крайней мере о пяти уровнях: метаболическом, структурном, генетическом, гормональном и нервном. Если гормональный уровень присущ только животным и растениям, а нервный исключительно животным, то первые три – метаболический, структурный и генетический – характерны для любого живого организма.

Особенно древним и основополагающим является метаболический уровень регуляции, то есть регуляции химических процессов, происходящих в организмах (обмена веществ, или, что то же самое, метаболизма), самими химическими веществами, участвующими в этих процессах (метаболитами). Метаболическая регуляция особенно характерна для клеток микроорганизмов, очень сильно зависящих от их условий существования. Она же существенна для микроорганизмов по причине их примитивной организации.

Одним из способов метаболической регуляции, характерным в первую очередь для клеток микроорганизмов, является резервирование в них большого количества запасных веществ разного состава. Действительно, клетки микроорганизмов, из-за своего небольшого размера необычайно зависящие от постоянно меняющихся условий существования, должны обладать резервами жизненно необходимых метаболитов. В любой момент, благоприятный для роста и развития микроорганизмов, эти резервы должны быстро использоваться, давая жизнь новым генерациям. Ученые давно обратили внимание на то, что в клетках микроорганизмов часто, особенно

Полифосфаты

Высокомолекулярные неорганические полифосфаты (ПолиФ) представляют собой линейные полимеры ортофосфорной кислоты (рис. 1), в кото-

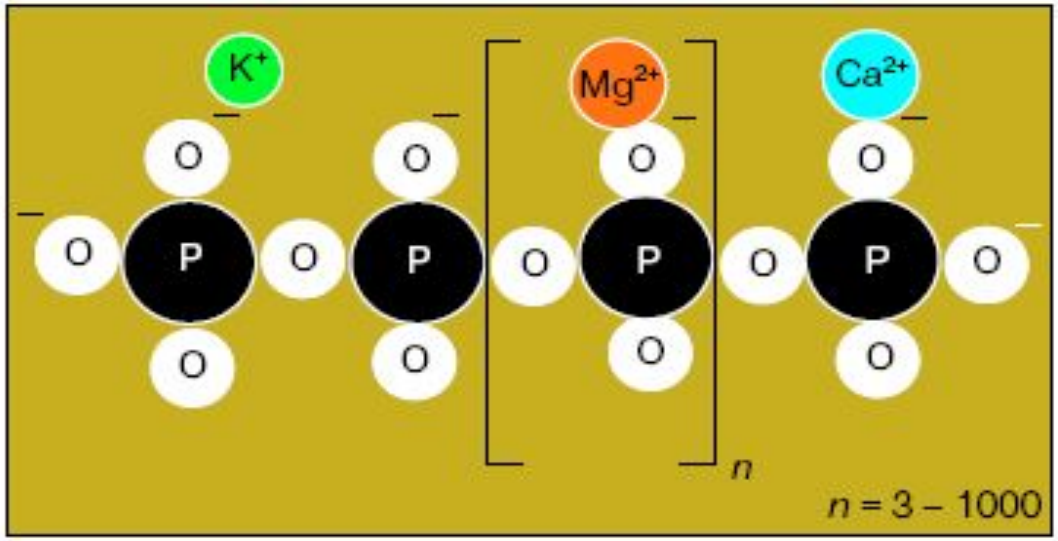


Рис. 1. Строение высокомолекулярных полифосфатов.

рых фосфорные остатки связаны между собой фосфоангидридными связями, подобными тем, которые связывают терминальные фосфатные остатки в молекуле аденозинтрифосфата (АТФ). Подоб-

Распространение полифосфатов

New Phytol. (1985) **99**, 203–210

A CONTRAST BETWEEN OOMYCETES AND OTHER TAXA OF MYCELIAL FUNGI IN REGARD TO METACHROMATIC GRANULE FORMATION

BY G. A. CHILVERS, F. F. LAPEYRIE* AND P. A. DOUGLASS

Botany Department, Australian National University P.O. Box 4, Canberra City, A.C.T. 2601, Australia

(*Accepted 4 October 1984*)

SUMMARY

Forty-nine cultures of mycelial fungi, representing five different taxonomic classes and diverse ecological groupings, were screened for the presence of metachromatic granules by staining hyphae with toluidine blue. Regardless of the ecological roles of the fungi, granules were detected in all representatives of the following classes: Zygomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes and Basidiomycetes. When selected mycelia were starved of phosphorus during growth, they lacked granules. However, these same mycelia would subsequently form granules readily if they were incubated for several hours in a phosphate-containing solution, which supports the belief that these metachromatic granules represent a store of polyphosphate.

No metachromatic granules could be detected in any of the fungi from the class Oomycetes, which provides further evidence of the unique nature of this particular group of fungi. If their inability to form metachromatic granules is indicative of a limited capacity to store phosphorus, it could explain why no reliable examples have been discovered of Oomycete fungi forming symbiotic mycorrhizal associations with higher plants.

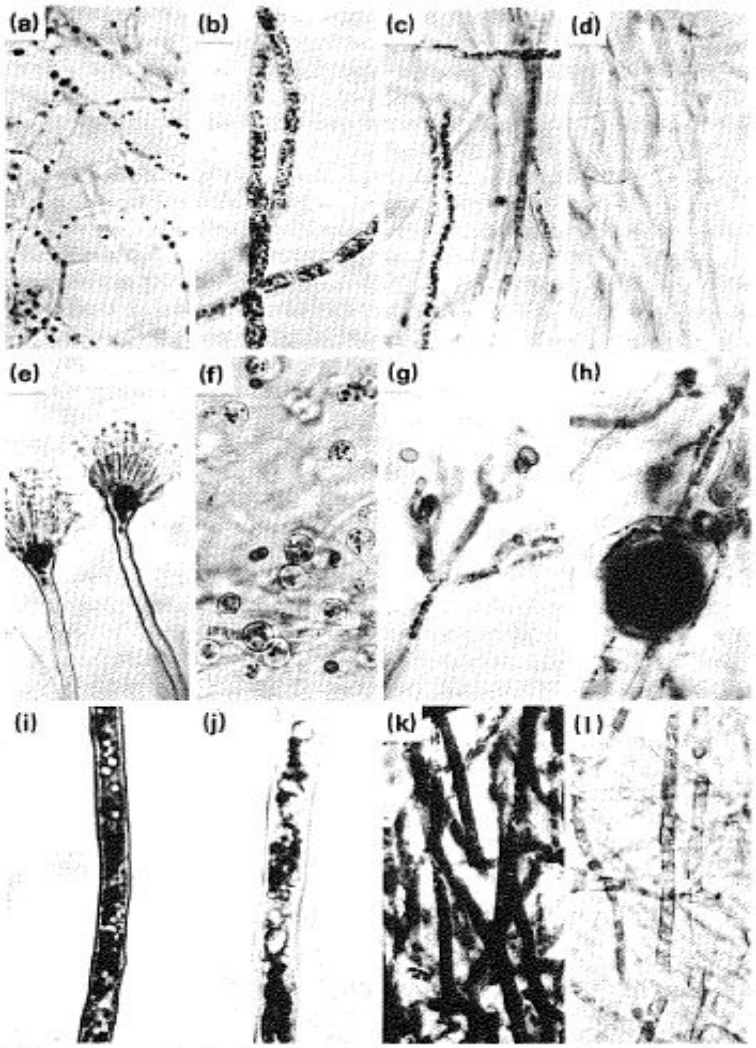


Fig. 1. Photomicrographs of various fungi examined for the presence of metachromatic granules by staining with toluidine blue. (a), (b), (c) Hyphae of *Pycnoporus cinnabarina* (Basidiomycetes), *Gibberella zeae* (Ascomycetes) and *Zygorhynchus moelleri* (Zygomycetes), with metachromatic granules. ×440. (d) Hyphae of *Achlya racemosa* (Oomycetes) lacking any metachromatic granules. ×440. (e) A concentration of granules in the vesicles of *Aspergillus terreus* (Deuteromycetes) conidiophores. ×440. (f), (g) Granules within chlamydospores and a condiophore of *Trichoderma viride* (Deuteromycetes). ×440 and ×600. (h) Sexual stage of *Zygorhynchus moelleri* – the dark structure is of a zygospore. Metachromatic granules are evident in the 'suspensor' curling around the top of the zygospore and attaching to it on the left. ×440. (i), (j) Toluidine blue stained hyphae

Окрашивание полиР толуидиновым голубым с последующей дифференциацией кислым спиртом

Table 1. *Fungi tested for presence of metachromatic granules by staining with toluidine blue*

Fungi (by classes)	Ecological role	Technique	Granules
Basidiomycetes			
Agaricus bisporus	Domesticated mushroom	a, b	+ +
Isolate F247	Orchid mycorrhizal fungus	a, b	+
Isolate F263	Orchid mycorrhizal fungus	a, b	+ + +
Lenzites trabea	Woodrotting fungus	a, b	+ +
Pisolithus tinctorius	Ectomycorrhizal fungus	a, b	+ + +
Pycnoporus (= *Trametes cinnabarina*)	Woodrotting fungus	a, b	+ + +
Rhizopogon luteolus	Ectomycorrhizal fungus	a, b	+ + +
Ascomycetes			
Cochliobolus sativus (= *Drechslera sativa*)	Plant parasite	a, b	+ + +
Ctenomyces serratus	Keratinophilic saprophyte	c	+ + +
Emericella nidulans (= *Aspergillus nidulans*)	Soil saprophyte	a, b	+ +
Talaromyces wortmanni (= *Penicillium kloecheri*)	Soil saprophyte	c	+
Gibberella fujikuroi (= *Fusarium moniliforme*)	Plant parasite	a, b	+ + +
Gibberella zeae (= *Fusarium graminearum*)	Plant parasite	a, b	+ + +
Sclerotinia fructicola (= *Monilia fructicola*)	Plant parasite	a, b	+ + +
Sodaria fimicola	Coprophilous fungus	c	+ + +
Deuteromycetes			
Alternaria sp.	Airborne saprophyte	c	+ +
Arthrobotrys oligospora	Nematophagous saprophyte	c	+ +
Aspergillus niger	Soil saprophyte	c	+ +
Aspergillus terreus	Soil saprophyte	c	+ +
Aureobasidium pullulans	Airborne saprophyte	c	+ +
Botrytis eucalypti	Plant parasite	c	+ + +
Cladosporium sp.	Airborne saprophyte	c	+ + +
Cylindrocarpon radicicola	Rhizophane fungus	c	+ + +
Epicoccum purpurascens	Airborne saprophyte	a, b	+ + +
Penicillium expansum	Plant parasite	c	+ + +
Penicillium italicum	Plant parasite	c	+ + +
Trichoderma viride	Litter saprophyte	a, b	+ + +
Zygomycetes			
Coleromyces recurvata	Soil saprophyte	c	+ +
Cunninghamella echinulata	Soil saprophyte	a, b	+
Erynia neoaphidis	Insect parasite	c	+ + +
Phycomyces nitens + strain	Coprophilous fungus	c	+ + +
Phycomyces nitens − strain	Coprophilous fungus	c	+ +
Piptocephalis virginiana	Parasite of other fungi	c	+
Rhizopus oligosporus	Saprophyte (tempeh manufacture)	a, b	+
Syncephalastrum racemosum	Coprophilous fungus	c	+ +
Zoophthora radicans	Insect parasite	c	+ +
Zygorhynchus moelleri	Soil saprophyte	a, b	+ +
Oomycetes			
Achlya racemosa	Aquatic saprophyte	a, b	—
Phytophthora cinnamomi A1	Plant root parasite	a, b	—
Phytophthora cinnamomi A2	Plant root parasite	a, b	—
Pythium ultimum	Facultative plant parasite	a, b	—
Pythium sp.	Facultative plant parasite	a, b	—
Saprolegnia ferax	Aquatic saprophyte/parasite	a, b	—

a, Grown in broth plus phosphate.
b, Grown in broth without phosphate then incubated 4 h in phosphate.
c, Grown on cellophane over phosphorus-rich agar medium.
+ + +, Many large granules throughout mycelium.
+ +, Large granules abundant in some parts of mycelium.
+, Occasional large granules or scattering of small granules throughout.
—, No granules.
Nomenclature of *Penicillium* species follows Pitt (1979); that for other species follows Webster (1980).

- В работах И.С.Кулаева было показано, что в каждой органелле дрожжей и других грибов присутствует своя фракция полифосфатов, определенной длины цепи. При этом установлено, что для биосинтеза и использования высокомолекулярных полифосфатов практически в каждой органелле имеется свой набор ферментов, связывающий обмен полифосфатов в первую очередь с процессами, характерными для данной органеллы.

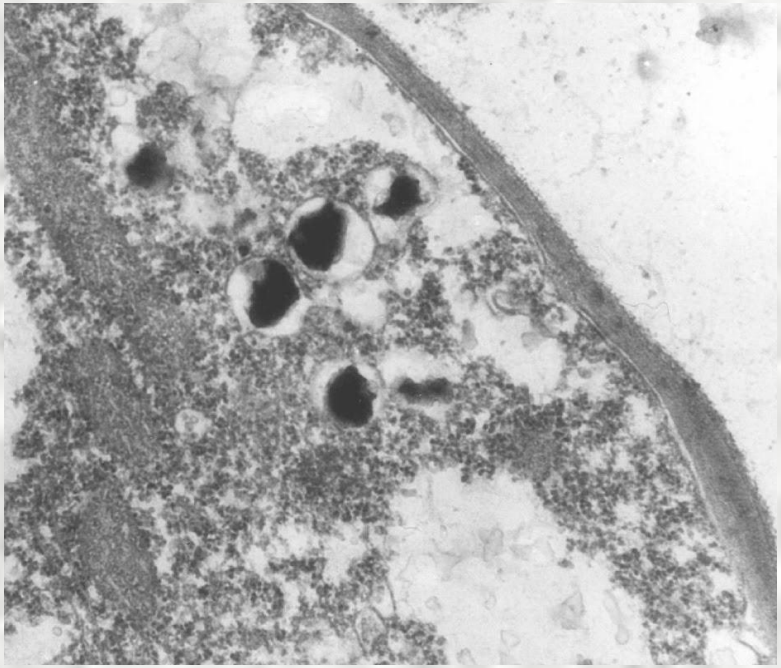
- Например, в ядре биосинтез высокомолекулярных полифосфатов каким-то образом тесно связан с биосинтезом нуклеиновых кислот, в частности РНК.
- В митохондриях биосинтез полифосфатов зависит от происходящего в этой органелле биосинтеза АТФ.
- Образование полифосфатов, локализованных в клеточной оболочке дрожжей, непосредственно связано с биосинтезом одного из компонентов клеточной стенки – маннана.

Функции полифосатов

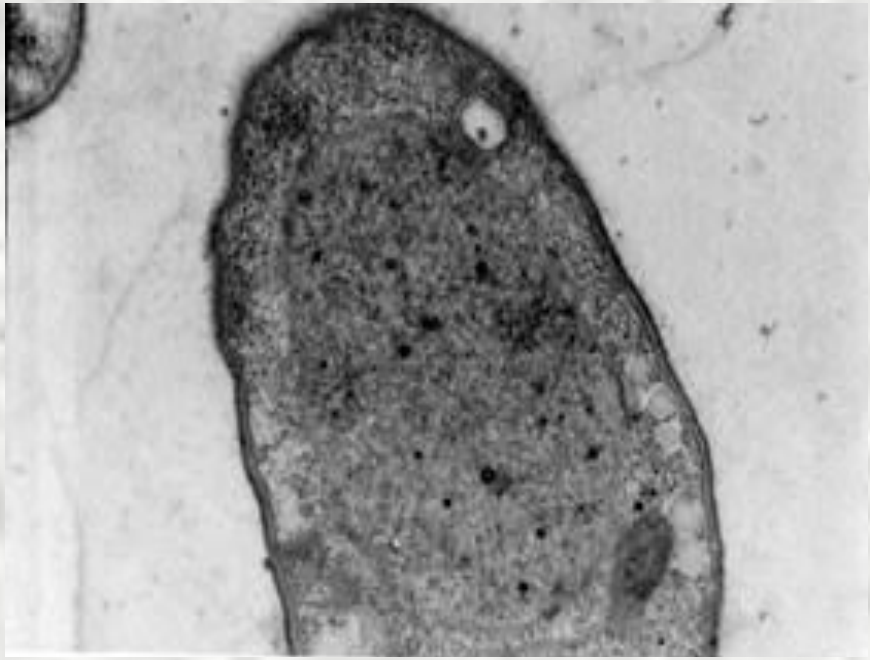
- Резерв фосфора и энергии
- Хелатор металлов
- Буфер против защелачивания
- Участие в формировании и функции клеточной оболочки
- Контроль за активностью генов
- Субстрат фосфорилирования глюкозы
- Минимизация токсического действия тяжелых металлов
- Метаболизм фосфолипидов
- Регуляция pH гомеостаза, осмоадаптация и др.

- Наиболее важный биологический эффект полифосфатов – коррекция в процессе роста и развития мицелия, ответ на стресс и дефицит питания

Полифосфаты при исследовании с помощью электронной микроскопии



Полифосфаты в вакуолях клетки мицелия А.*bisporus*



Полифосфаты в ядре споры *Pleurotus pulmonarius*

New Phytol. (1978) **81**, 571-574.

POLYPHOSPHATE GRANULES IN THE FUNGI OF TWO LICHENS

By G. A. CHILVERS, M. LING-LEE and A. E. ASHFORD*

Botany Department, Australian National University,
P.O. Box 4, Canberra, ACT 2600, Australia

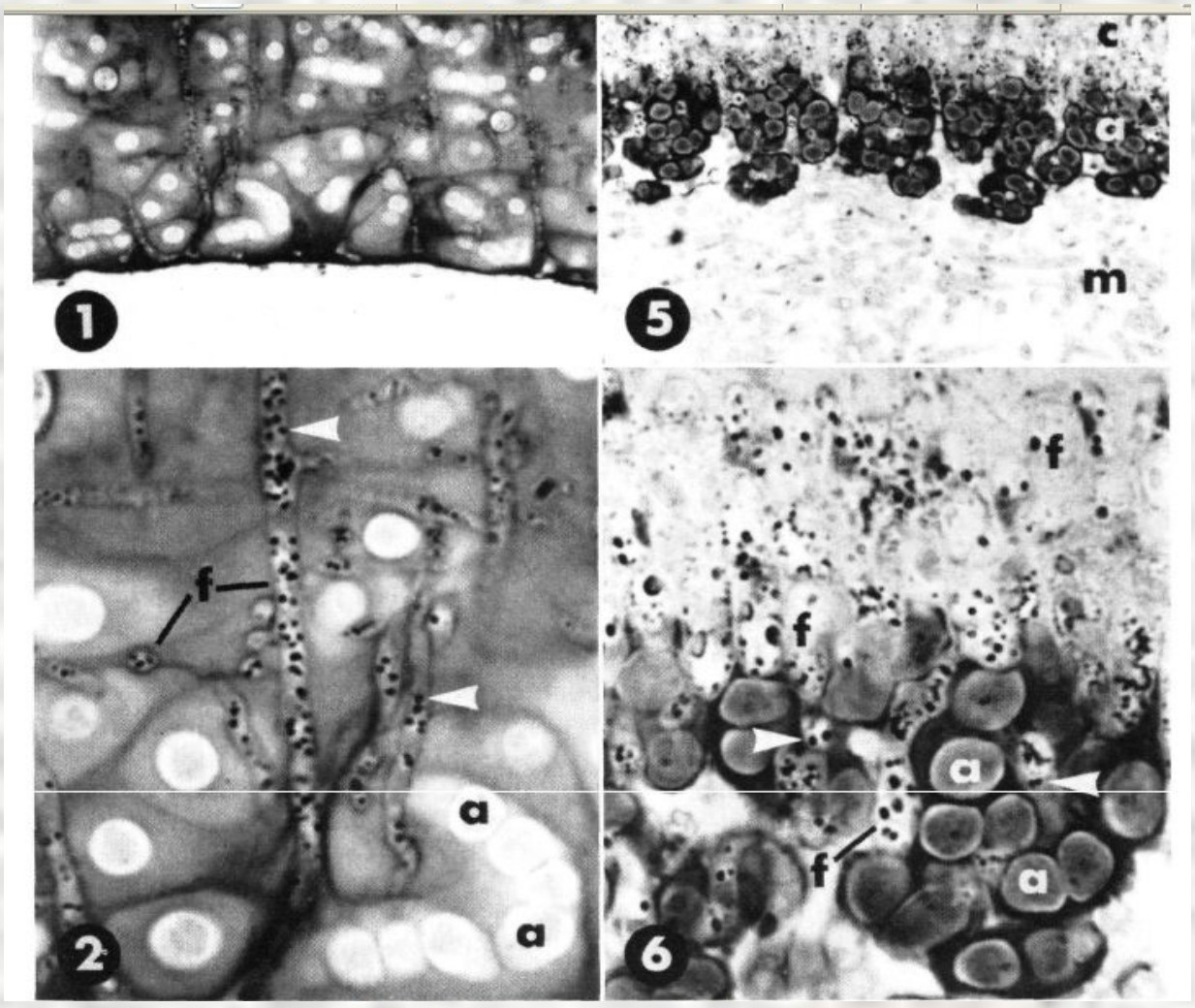
(*Received 26 April 1978*)

SUMMARY

Using Toluidine Blue-stained sections, metachromatic granules have been detected in the fungi of two different lichens. These are histochemically identical with similar granules found in the fungal component of mycorrhizas and, like those, appear to consist largely of polyphosphate. Small numbers of polyphosphate granules have been previously reported from the algal component of a lichen, but not from the fungus. In the material examined here, the size and number of granules in the fungus greatly exceeded those in the algae. These granules merit further investigation to evaluate their significance in ion uptake and accumulation within this symbiotic system.

Collema, Peltigera

Полифосфаты у микобионтов *Collema* (1,2) и *Peltigera* (5,6)



Brazilian Journal of Microbiology (2002) 33:119-126
ISSN 1517-8382

POLYPHOSPHATE IN ZYGOMYCETES: A CYTOCHEMICAL STUDY

Allana Elesbão do Nascimento Shari'a[1,2]; Aline Elesbão do Nascimento[1,2]; Marcos Antonio Barbosa de Lima[2]; Galba Maria de Campos-Takaki[1,2]*; Wanderley de Souza[3]

[1] Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Departamentos de Biologia e Química, Universidade Católica de Pernambuco, Boa Vista, PE, Brasil. [2] Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Microscopia Eletrônica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Boa Vista, PE, Brasil. [3] Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Submitted: August 08, 2001; Retusrned to authors for corrections: November 22, 2001; Approved: May 13, 2002

ABSTRACT

The inorganic phosphorus content, and distribution, structure and localization of polyphosphate in mycelia of zygomycetous fungi was evaluated. Ultrastructural cytochemistry was successfully used to identifying the localization and distribution of polyphosphate in *Absidia cylindrospora, Gongronella butleri* and *Mucor javanicus*. The results revealed differences in the cytochemical staining pattern in all species studied and a uniform labeling on the cellular surface (cell wall and citoplasmic membrane). Reaction products were observed in intracellular structures and cellular membrane. Intracellular staining was observed in trabecullar, vacuolar and vesicular structures, in dense bodies and in the cytoplasm. However, the cytochemical staining intensity varied during the cellular growth. Analytical procedure revealed the phosphorus content during cell growth. The results demonstrated that phosphorus content varied during cultivation time and could be related to the

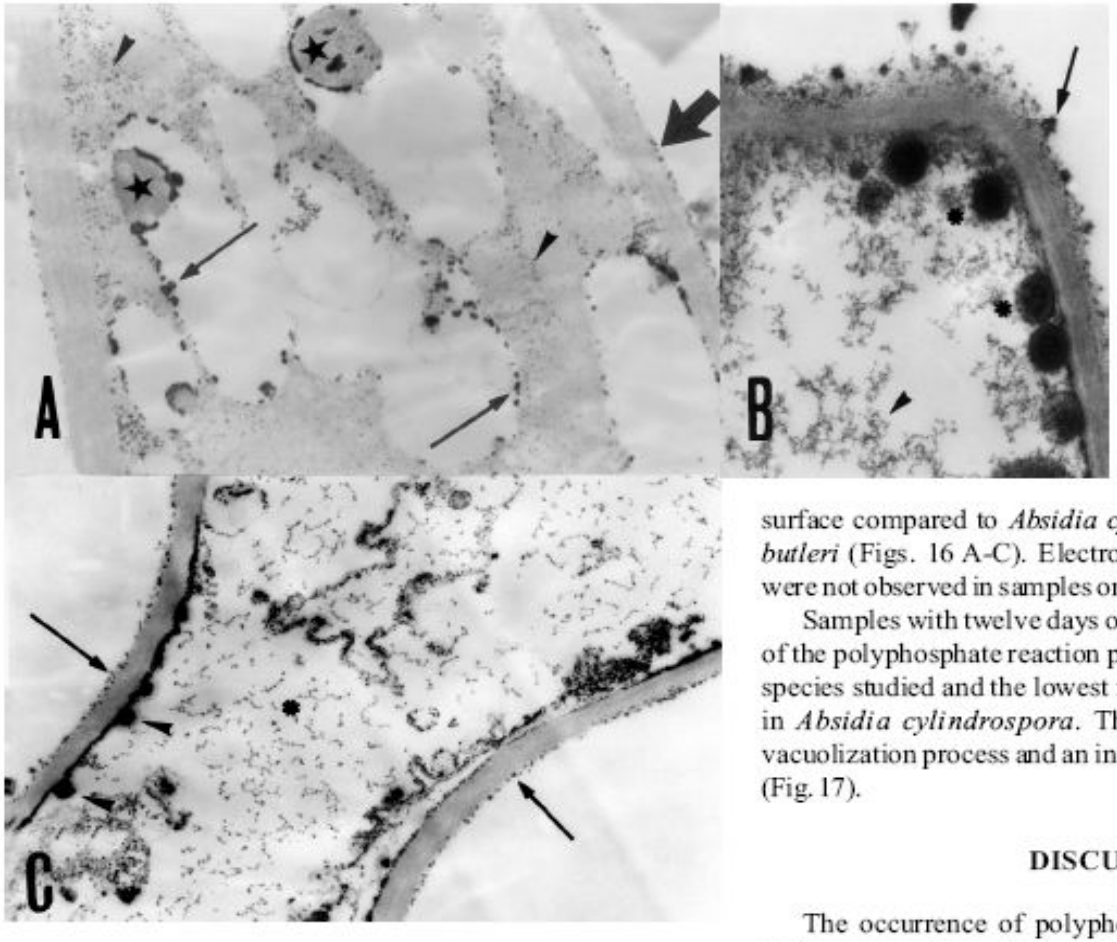


Figure 16. *Mucor javanicus*. A - Reaction products in cell surface (arrows), cytoplasm labeling (arrowhead) and electron dense deposits within vacuoles (thin arrow). Electron dense inclusions containing reaction products (*). 20.000 X. B - Thick cell wall with a decrease in polyphosphate labeling (arrow); cytochemical labeling in vacuole membrane (arrowhead); electron dense inclusions associated to cytoplasmic face of cell membrane( ). 40.000 X. C - surface labeling (arrow), electron dense bodies (arrowhead), cytoplasmic labeling (*). 20.000 X.

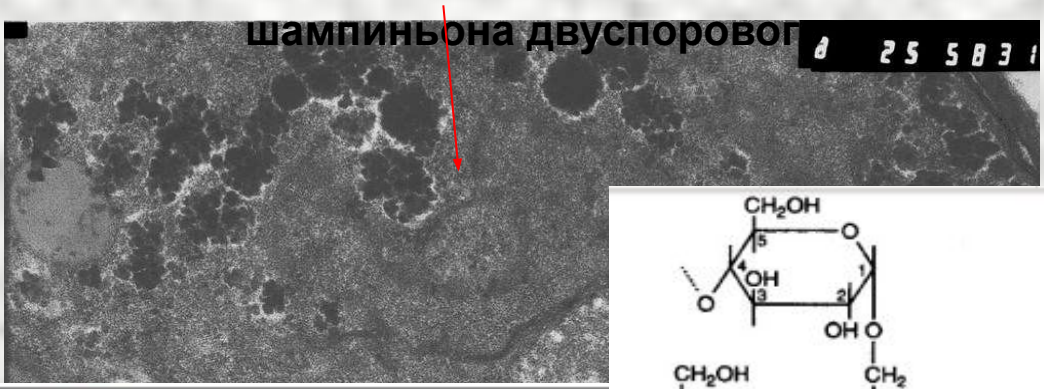
After nine days of cultivation *Mucor javanicus* cells, exhibited a low intensity of polyphosphate labeling in cell surface. However, reaction products were observed in cell membrane, cytoplasm and electron dense precipitates. Cells with twelve days exhibited an intense labeling in the cell membrane, vacuoles and inclusions. On the fifteenth day of cultivation cells exhibited the highest labeling intensity in vacuoles, cytoplasm and cell surface compared to *Absidia cylindrospora* and *Gongronella butleri* (Figs. 16 A-C). Electron-dense bodies and inclusions were not observed in samples on the fifteenth day of cultivation.

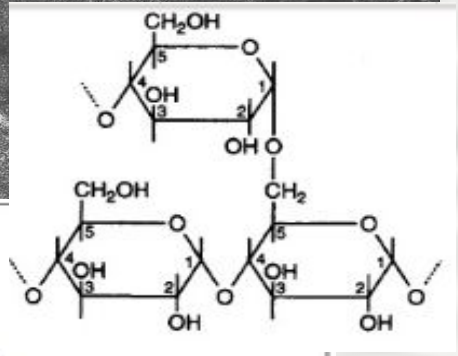
Samples with twelve days of cultivation showed a decrease of the polyphosphate reaction products at the cell surface of all species studied and the lowest intensity labeling was observed in *Absidia cylindrospora*. The cells presented an intense vacuolization process and an increase of the cell wall thickness (Fig. 17).

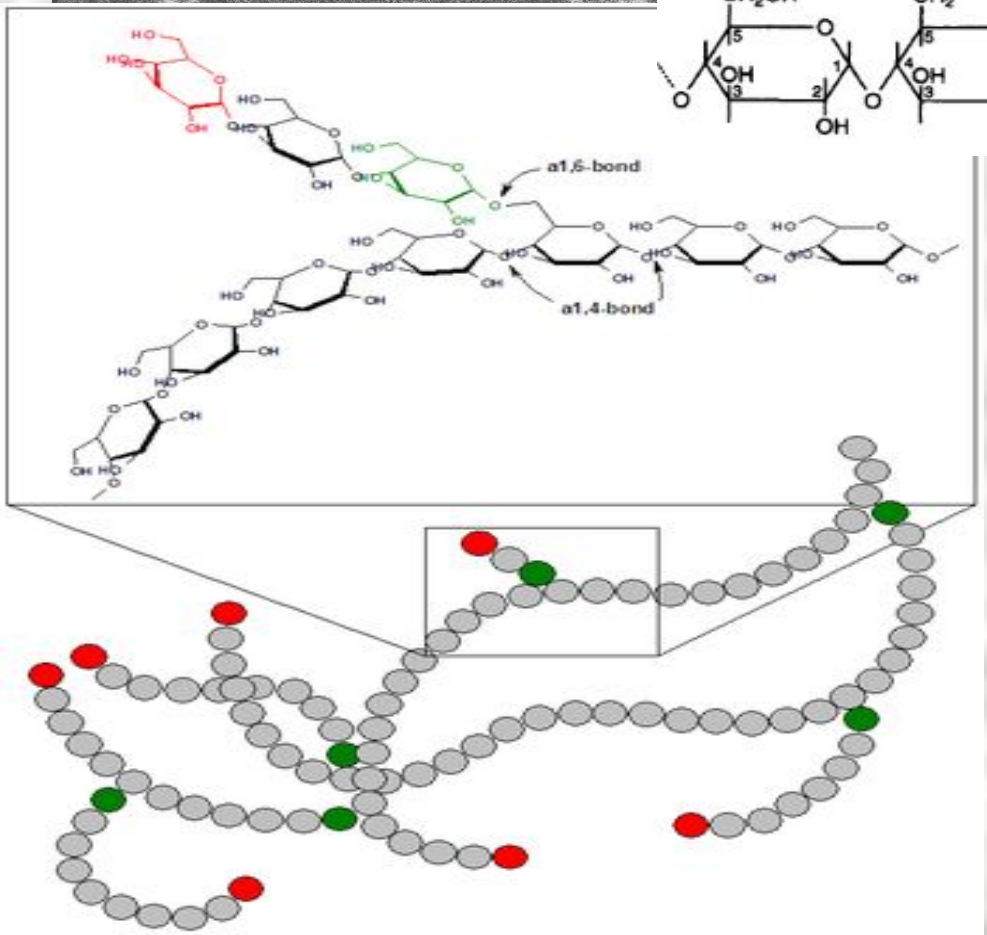
DISCUSSION

The occurrence of polyphosphate has been reported for various organisms, both eukaryotes and prokaryotes. The cytochemical deteccion of polyphosphate shows very distinct features among these organisms. The cytochemical staining of cellular polyphosphate by lead salts permit the observation of polyphosphate precipitated in situ with lead as metachromatic granules after exposure to the electron beam (8,11). However, the polyphosphate distribution in Zygomycetes has not previously been reported. Localization of polyphosphate within a cell also depends on the chain lenght. Low molecular weight

Розетки гликогена в гифах шампиньона двуспорового





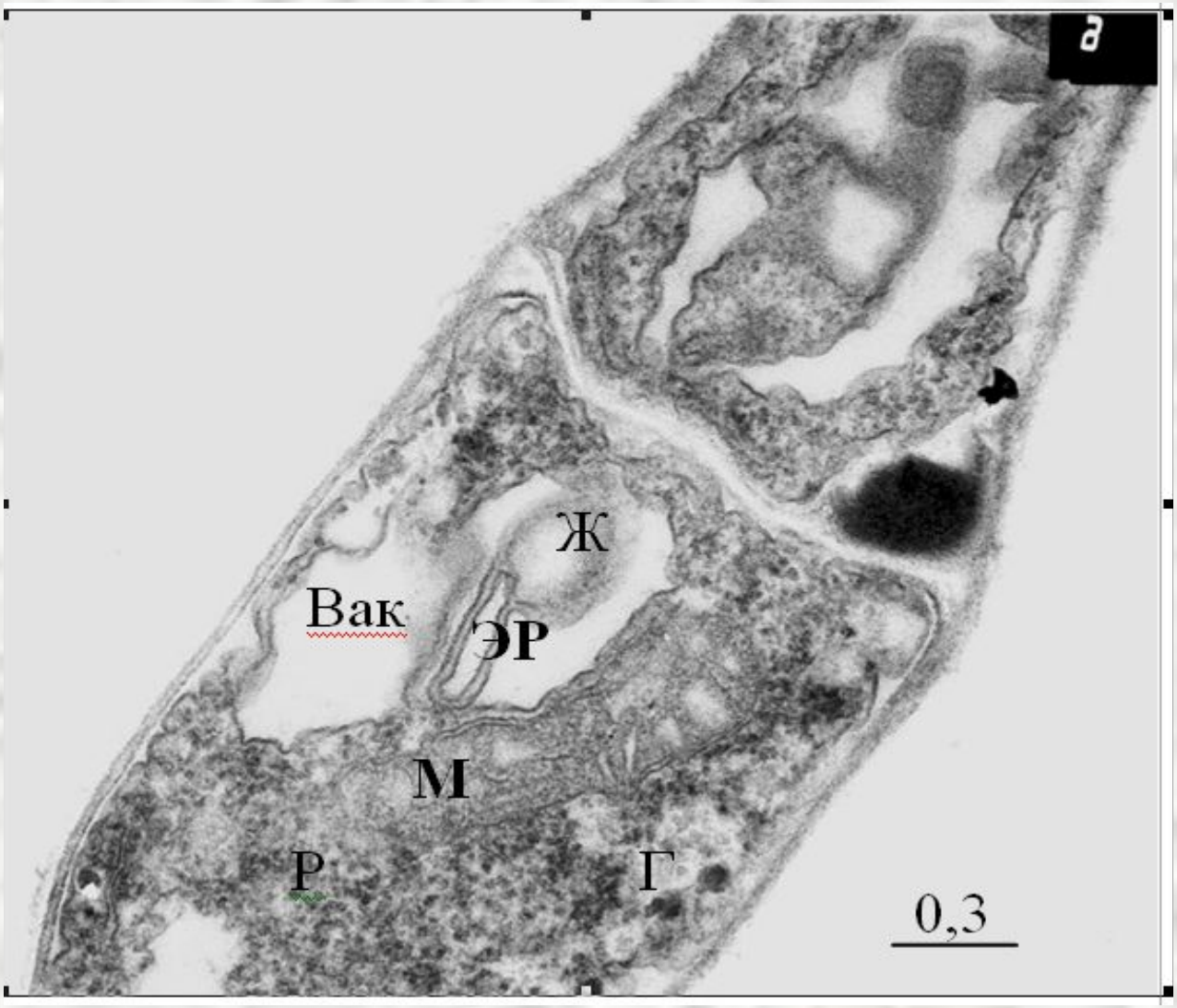


Гликоген Основной запасной полисахарид грибной клетки. Синтезируется в цитоплазме. На ультратонких срезах имеет вид мелких сферических гранул диаметром около 40 нм. Он представляет собой сильноразветвленный полимер **α-D глюкозы**, в котором глюкозные остатки основной цепи связаны **α-(1 → 4),** а остатки ветвей **α-(1→ 6)** связями **(1:14)**. Гликоген в клетках может быть представлен α- и β-частицами. Последние сцеплены в цепочки. α-Гликоген встречается в группах (розетки) . Мобилизация гликогена происходит путем ферментативного гидролиза in situ или в вакуолях

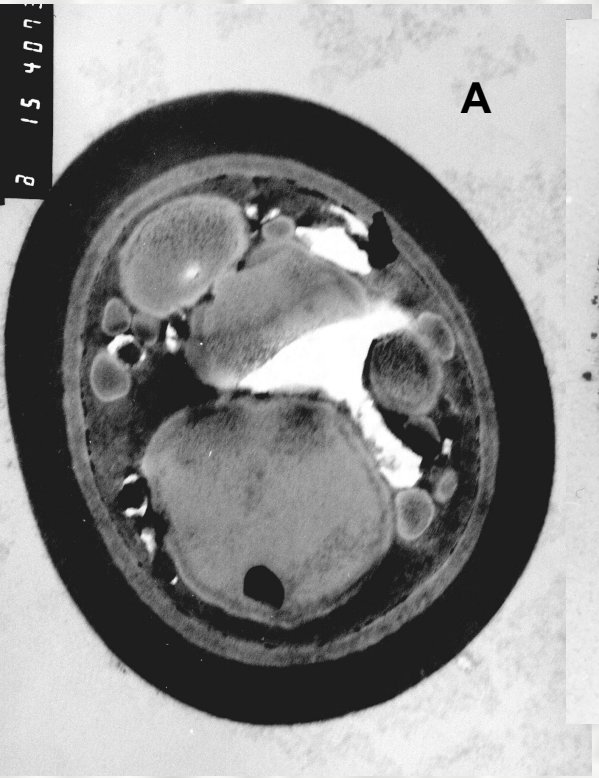
Запасные липиды (олеосомы)

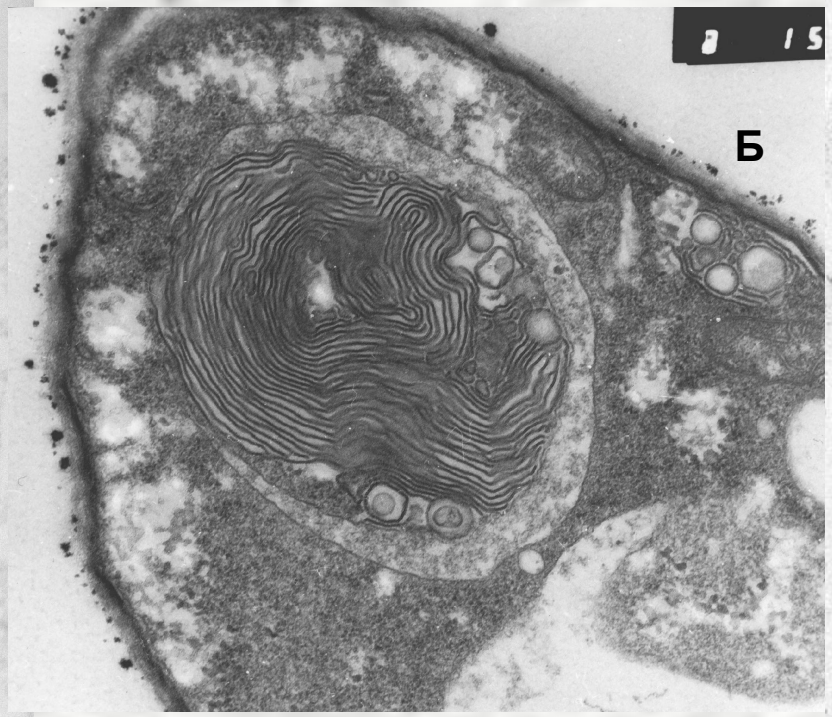
- В цитоплазме могут накапливаться триацилглицерины (в молекуле глицерина образуются эфирные связи с жирными кислотами). Олеосомы состоят из масляной капли, окруженной простой липидной мембраной, отделяющейся от гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭПР).
- В соединении с фосфатами и белками они образуют фосфолипидные и фосфолипопротеидные гранулы, которые на срезах представляют собой либо гомогенные структуры, либо комплексы концентрически расположенных мембран (**миелиноподобные** структуры)

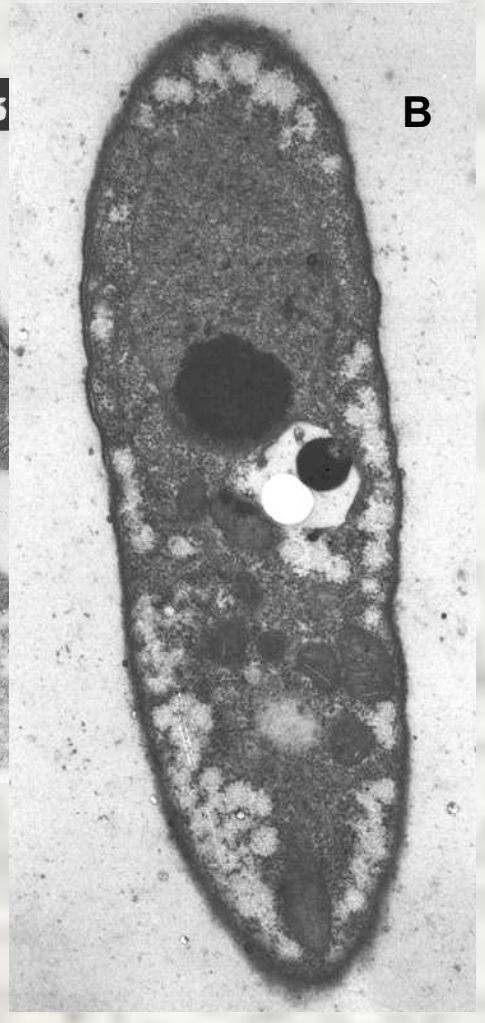
Формирование липидной капли у *Pleurotus ostreatus*



Липидные включения в споре (А) и миелиноподобная структура (Б) в мицелии шампиньона двуспорового и полифосфаты в споре вешенки легочной (В)







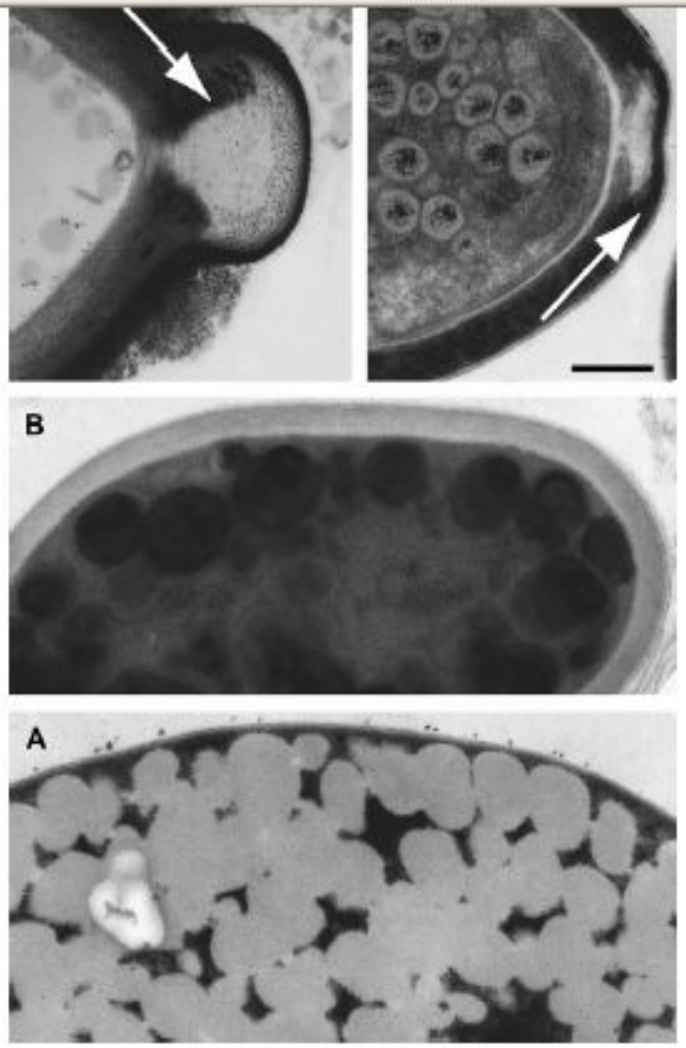


Fig 3 – Transmission electron micrographs of basidiospore walls of agarics. (A) Thin-walled and smooth basidiospore of *Hygrophorus eburneus* TUB 012681. (B) Thick-walled and smooth basidiospore of *Cystoderma amianthinum* TUB 011551. (C) Thick-walled and ornamented basidiospore with a germ pore (indicated with an arrow) of *Lacrymaria lacrymabunda* TUB 014804. D. Thick-walled and smooth basidiospore with a germ-pore (indicated with an arrow) of *Hypholoma fasciculare* TUB 012682. Bar = 500 nm.

TOTAL LIPID AND FATTY ACID ACCUMULATION DURING BASIDIOSPORE FORMATION IN THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus* SP.[1]

André Narvaes da Rocha Campos[2], Maurício Dutra Costa[3, 4], Marcos Rogério Tótola[4] & Arnaldo Chaer Borges[4]

SUMMARY

The basidiospores of *Pisolithus* sp. contain large amounts of lipids, indicating provision for future germination in the host rhizosphere. However, the accumulation, composition, and mobilization of lipids during formation and germination of these spores are largely unknown. In this study, lipid storage and fatty acid composition during basidiosporogenesis were analyzed in fresh basidiocarps using bright-field microscopy and gas chromatography. Abundant lipid bodies are found in the hyphae, basidia, and basidiospores of fungal basidiocarps. This evidences a considerable C transport in the basidiocarp to meet the C demand during basidiospore formation. Fatty acid composition analysis revealed the presence of 24 compounds with chains of 9 to 18 C atoms, either saturated or insaturated, with one or two insaturations. The fatty acid composition and content varied according to the developmental stage of the peridioles. In free basidiospores, the predominant compounds were 16:0, 16:1w5c, 18:1w9c, and 18:2w6,9c/18:0ante, at concentrations of 76, 46, 192, and 51 μg g^{-1} dry matter, respectively. Our results indicate that oleic acid is the major constituent of lipid reserves in *Pisolithus* sp. basidiospores. Further studies are being conducted to determine the factors that induce lipid mobilization during spore germination.

Index terms: Basidiomycota, basidiosporogenesis, carbon storage, ectomycorrhiza, fatty acids.

R.Bras.Ci.Solo 2008. v.32:1531-1540

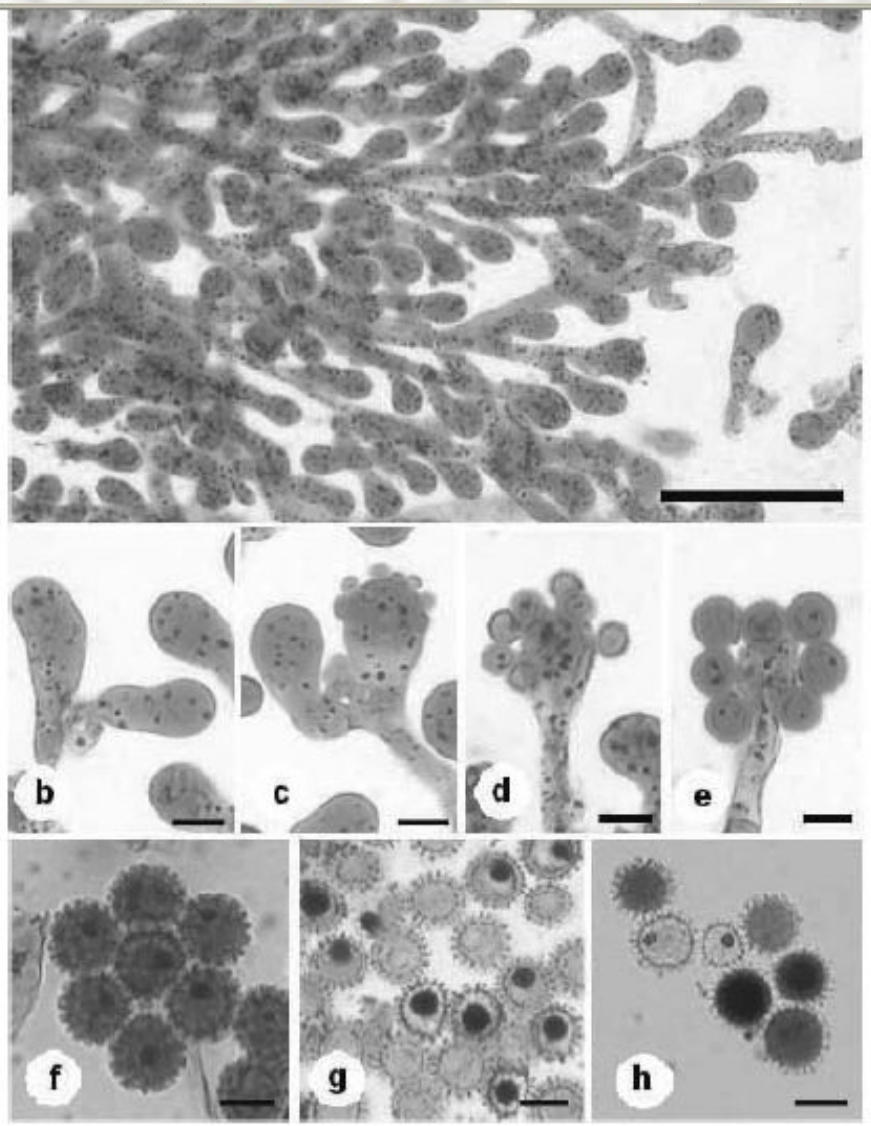
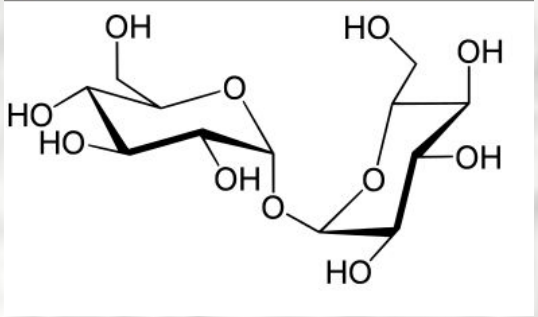


Figure 1. Hyphae, basidia, and basidiospores of *Pisolithus* sp., stained with Congo Red and Sudan Black B, showing the lipid distribution (black inclusions) in the fungal structures. (a) Abundant lipid distribution in young basidia and hyphae. (b) Lipids in a connection clamp located at the base of basidia. (b to g) Progress of lipid accumulation during basidiospore development. (h) Storage lipids in mature basidiospores taking the whole internal space of the spore (light brown to black spores). Bars: a = 30 μm; b to h = 5 μm.

- Липидные капли обнаружены у большинства эукариот и некоторых прокариот LDs (lipid droplets, lipid bodies, lipid particles, oil bodies). Долгое время считали, что это относительно инертные компартменты. Полагали, что они функционируют только, как место запасания излишней энергии и накопления жирных кислот и стеролов в форме нейтральных липидов, главным образом, триацилглицеринов и стериловых эфиров. Ассоциированные с монослоями фосфолипидов и белками в центре – нейтральные липиды LDs могут быть подвергнуты гидролизу в регулируемой форме липазами. В результате возвращение запасенных не эфирных свободных жирных кислот, фосфолипидов и стеролов происходит снабжение энергией через окисление жирных кислот при нехватке питания, поддержании гомеостаза мембранных липидов во время роста клеток и модуляции уровня свободных стеролов внутри и снаружи клетки.

Функции липидных капель

- резервный источник углерода,
- удаление лишних белков из других компартментов для инактивации и/или запасания,
- обеспечивают укладку белков, заякоренных около липидных капель,
- снабжение поверхности липидных капель для последовательной деградации ошибочных и не уложенных белков, которые в противном случае могут формировать токсические агрегаты в цитоплазме,
- снабжение некоторыми связанными с липидными каплями белками компартменты через перенос или контактные места.

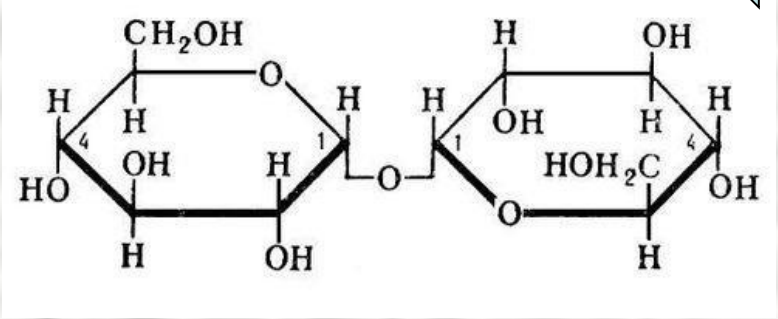


Трегалоза

- Важный запасной дисахарид в вегетативных клетках и в спорах грибов.
- Трегалоза является основным противострессорным веществом, локализованным в цитоплазме и защищающим мембраны при обезвоживании.
- Трегалоза защищает белки от денатурации и преципитации.
- Протекторное действие трегалозы связывают с замещением молекулы воды на поверхности белков или других макромолекул и способностью к образованию структуры подобной стеклу, а не кристаллов под действием высушивания и замораживания.

Трегалоза — ~~углевод~~ — углевод из группы невосстанавливающих ~~дисахаридов~~ — углевод из группы невосстанавливающих дисахаридов. В природной трегалозе 2 остатка D-~~глюкозы~~ связаны α,α-гликозидной связью.

ТРЕГАЛОЗА, ФУНКЦИИ



Ранее трегалозу считали лишь одним из запасных углеводов, но по современным представлениям этому соединению присущи следующие функции:

(а) резервного углевода (б) протектора мембран при разнообразных типах стресса: тепловом, окислительном, осмотическом, действии тяжелых металлов, лекарств, метаболических ингибиторов; (в) регулятора процесса гликолиза, концентрации глюкозы и АТФ в клетке; (г) транспортируемой формы

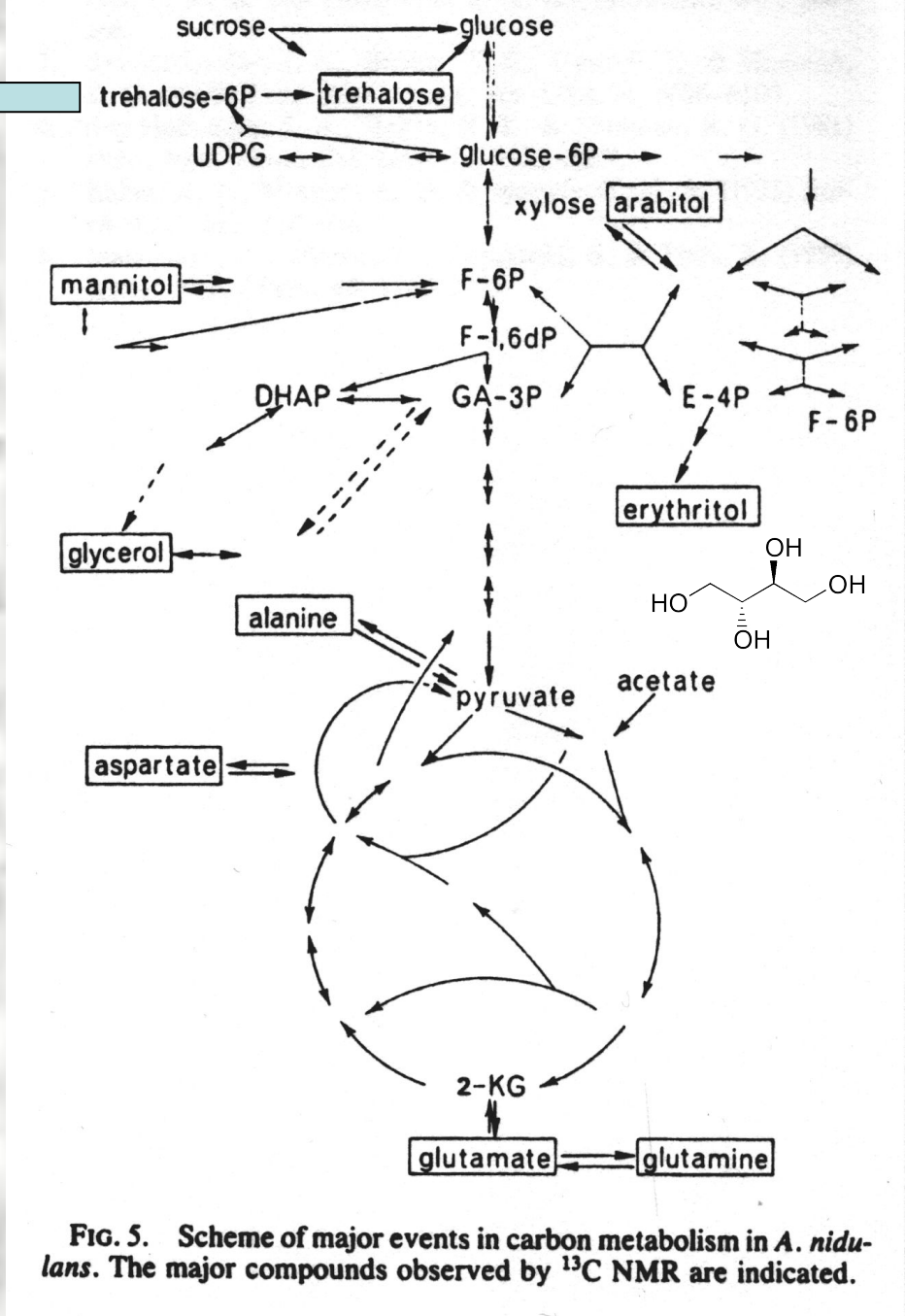
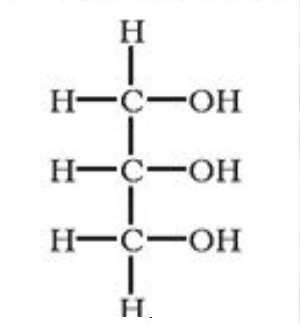
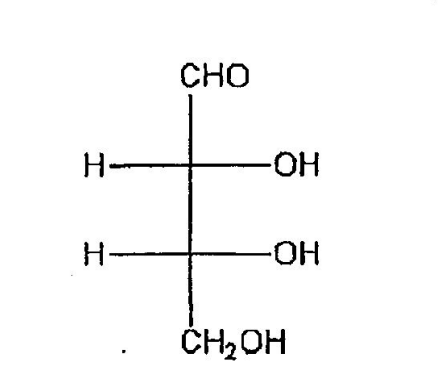


FIG. 5. Scheme of major events in carbon metabolism in *A. nidulans*. The major compounds observed by ^{13}C NMR are indicated.

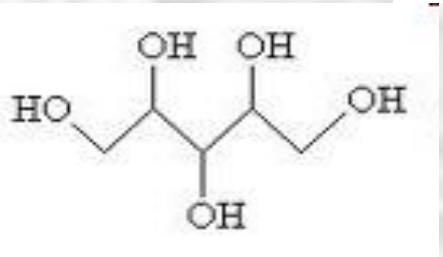
ПОЛИОЛЫ криопротекторы при водном стрессе



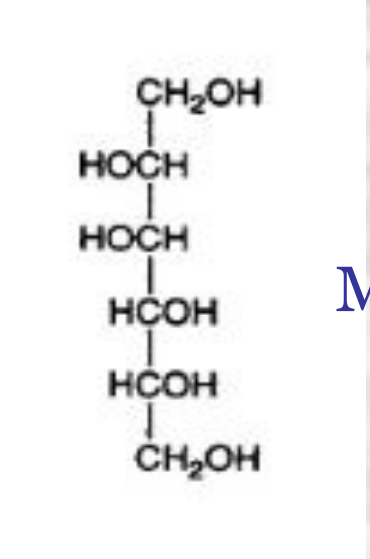
Глицерин



Эритритол



Арабитол



Маннитол