

## Влияние ядерного статуса на морфо-физиологические показатели гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*)

СЕРГЕЙ МИХАЙЛОВИЧ БОЙКО

Бойко С. М., 2012: Вплив ядерного статусу на морфо-фізіологічні показники гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*). *Чорноморськ. бот.ж.*, Т. 8, № 4: 432-438.

Встановлено, що міцелій дикаріотичних культур *Sch. commune* на відміну від монокаріотичних має практично у два рази більшу ширину гіф, колонії, що утворюються більш щільні, з добре розвиненим повітряним та зануреним міцелієм. Електрофоретичні дослідження ендоферментних систем дозволяють ідентифікувати монокаріотичні культури, що домінують під час спільного зростання на єдиному субстраті.

*Ключові слова:* *Schizophyllum commune*, монокаріотична культура, дикаріотична культура, електрофорез, ізоферменти, міцелій

BOIKO S.M., 2012: **The effect of nuclear status on morpho-physiological characteristics of the fungus *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*)**. *Chornomors'k bot. z.* Vol. 8. № 4: 432-438.

Mycelium dikaryotic cultures of *Sch. commune* unlike monokariotic has almost twice the width of hyphae, formed colonies more dense with well-developed aerial and submerged mycelium are found. Electrophoretic studies endoenzymes systems allow us to identify dominant monokariotic culture with joint growth on the single substrate.

*Key words:* *Schizophyllum commune*, monokariotic culture, dikaryotic culture, electrophoresis, isozymes, mycelium

Бойко С.М.: Влияние ядерного статуса на морфо-физиологические показатели гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*). *Черноморск. бот. ж.* Т.8, № 4: 432-438.

Установлено, что мицелий дикариотических культур *Sch. commune* в отличие от монокаріотических имеет практически в два раза большую ширину ги́ф, образуемые колонии более плотные, с хорошо развитым воздушным и погруженным мицелием. Электрофоретические исследования эндоферментных систем позволяют идентифицировать монокаріотические культур, доминирующие при совместном произрастании на едином субстрате.

*Ключевые слова:* *Schizophyllum commune*, монокаріотическая культура, дикариотическая культура, электрофорез, изоферменты, мицелий

Дереворазрушающий базидиальный гриб *Schizophyllum commune* Fr. является космополитом, свойства и особенности которого интенсивно изучаются в ведущих лабораториях [ЗУБКОВА, СТЕПАНОВА, 1998; GUETTLER et al., 2003]. На данный момент имеются сведения об использовании гриба в медицине, в частности при лечении онкологических заболеваний, в качестве иммуномодуляторов, а в некоторых тропических странах имеет гастрономическую ценность [OKAMURA et al., 1986; SMITH, SULLIVAN, ROWAN, 2003; RUÁN-SOTO, GARIBAY-ORIJЕ, CIFUENTES, 2006]. Благодаря широкому распространению и легкой идентификации его часто используют в качестве модельного объекта при популяционно-генетических исследованиях [RAPER, 1988; JAMES et al., 1999; OHM et al., 2010; Бойко С.М. 2011].

Для *Sch. commune* характерен гапло-дикариотический цикл развития, что отражается на количестве генетической информации в "клетке" и качестве ее реализации на каждом из жизненных этапов. Достаточно широко изучены особенности дикариотических изолятов, введенных в культуру, показана значительная вариабельность их свойств [ЛІНОВИЦЬКА, БУХАЛО, 2005]. Особенности монокариотических культур в частности и в сравнении с дикариотическими практически являются неизученными.

Целью нашей работы было исследовать морфофизиологические особенности ди- и монокариотических культур *Sch. commune*.

### **Материалы и методы исследования**

В качестве объектов исследования использовались ди- и монокариотические культуры дереворазрушающего гриба *Sch. commune*. Чистую дикариотическую культуру получали по общепринятой методике с использованием перекиси водорода [Билай, 1982]. Монокариотические культуры грибов получали методом споровых отпечатков, с которых в дальнейшем производился смыв стерильной дистиллированной водой с последующим многократным разведением. Полученную водную суспензию базидиоспор высевали глубинно в чашки Петри на агаризированную среду и выдерживали в термостате ТС-80М-2 при температуре 28°C. Едва появившиеся колонии изолировали на чашках со свежей агаризированной средой. Гомокариотичность отобранных моноспоровых изолятов подтверждали по отсутствию пражек на мицелии при микроскопировании.

Фотосъемку микрообъектов осуществляли при помощи микроскопа "Биолам Р4У4.2", соединенного с цифровым фотоаппаратом "Canon".

Мицелиальную массу, используемую в работе, получали путем культивирования гриба на жидкой глюкозо-пептонной питательной среде (50 мл среды в колбах Эрленмэйера объемом 250 мл) [СЕМЕНОВ, 1990]. Начальный уровень рН питательной среды составлял 5,0. Культивирование осуществлялось на протяжении 18 суток. Как свидетельствуют ранее проведенные исследования, данный срок является оптимальным для качественного электрофоретического анализа ферментных систем [Бойко, 2011].

Мицелий грибов промывали и высушивали при помощи вакуумной фильтрации, далее гомогенизировали в буферной системе и фильтровали. Электрофоретическое разделение белков проводили в 7,5% и 11,25% полиакриламидном геле с использованием трис-глициновой буферной системы (рН 8,3). Гистохимическое проявление зон активности осуществляли для следующих ферментов: алкогольдегидрогеназа (ADH) (КФ 1.1.1.1),  $\alpha$ -амилаза (AMY) (КФ 3.2.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) (КФ 2.6.1.1), эстераза (EST) (КФ 3.1.1.1) [Корочкин и др., 1977].

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Все дикариотические изоляты при культивировании на твердой глюкозо-картофельной питательной среде формируют плотную колонию белого цвета с хорошо развитым воздушным мицелием. Витальный препарат позволил установить среднюю ширину гиф – 3,4 мкм, а также множественное присутствие пражек, указывающих на дикариотичность культуры (рис. 1а). Монокариотические культуры формировали колонии, отличающиеся меньшей плотностью гиф и очень слабым развитием воздушного мицелия. Ширина гиф в среднем составила 1,7 мкм, пражки не формировались (рис. 1б).

В дальнейших исследованиях с целью уменьшения разнокачественности культур мы использовали дикариотическую культуру Sc-28 и полученные с нее методом споровых отпечатков монокариотические культуры. Полученные моноспоровые культуры в дальнейшем избирательно высаживались попарно для возможного

формирования дикариотичного мицелия. В результате таких манипуляций у нас формировались 2 группы чашек Петри, в первых формировалась четкая граница между монокариотичными колониями, а во вторых граница отсутствовала (рис. 2).

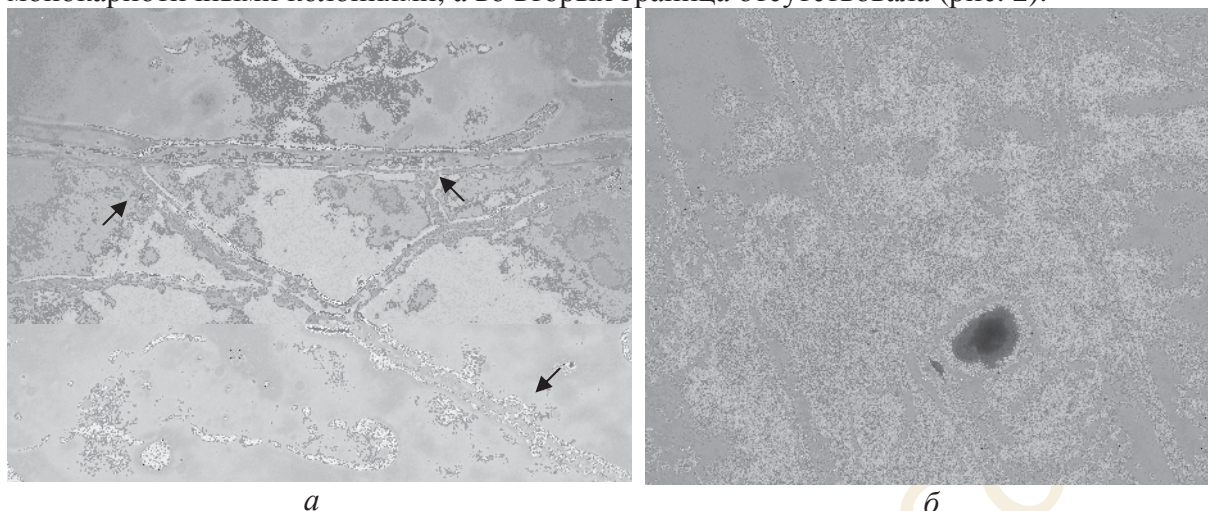


Рис. 1. Гифы дикариотической (а) и монокариотической (б) культур *Schizophyllum commune* × 600 (стрелками указаны пряжки).

Fig. 1. Hyphae dikaryotic (a) and monokaryotic (b) cultures *Schizophyllum commune* × 600 (arrows indicate the buckles).

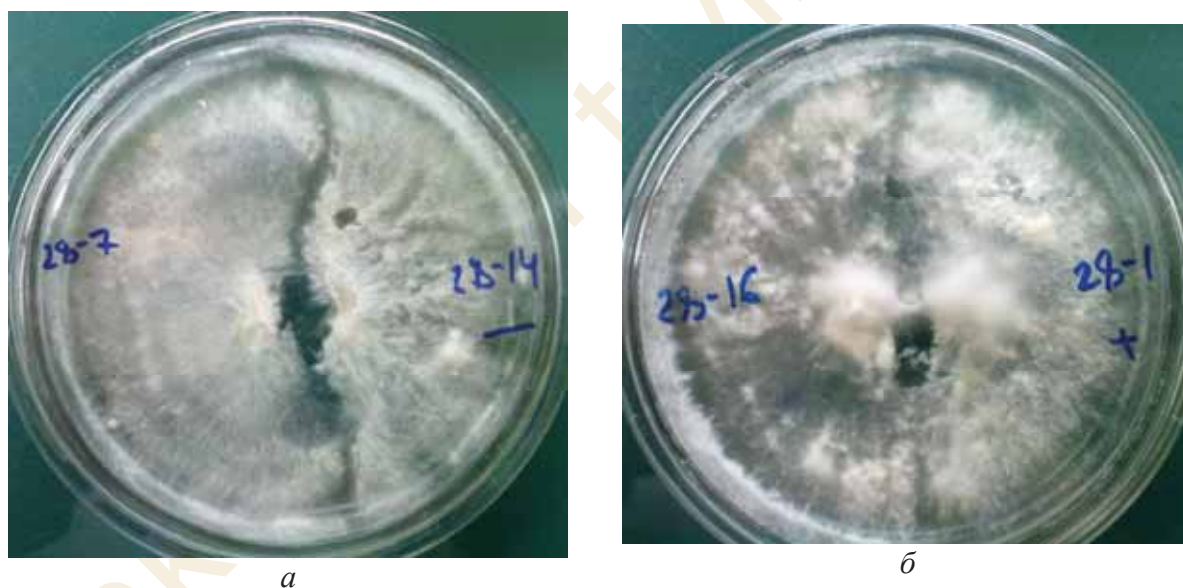


Рис. 2. Чашки Петри, содержащие попарно монокариотические культуры *Sch. commune* с формированием четкой границы раздела колоний (а) и без границы раздела (б).

Fig. 2. Petri dishes containing pairs monokaryotic culture *Sch. commune* with formation of distinct border between the colonies (a) and without the border (b).

При микроскопировании зоны срастания двух колоний удалось установить полное отсутствие пряжек в случае формирования четкой границы раздела двух колоний и образование одиночных пряжек в чашках Петри, где отсутствует четкая граница раздела.

При выращивании культур на жидкой глюкозо-пептонной питательной среде наблюдалась существенная разница в морфологии культур. Дикариотическая культура формирует очень плотную колонию с хорошо развитым воздушным и глубинным

мицелием (рис. 3 а), а монокариотические культуры образуют менее плотную колонию с менее развитым воздушным и глубинным мицелием (рис. 3 б, в, г).

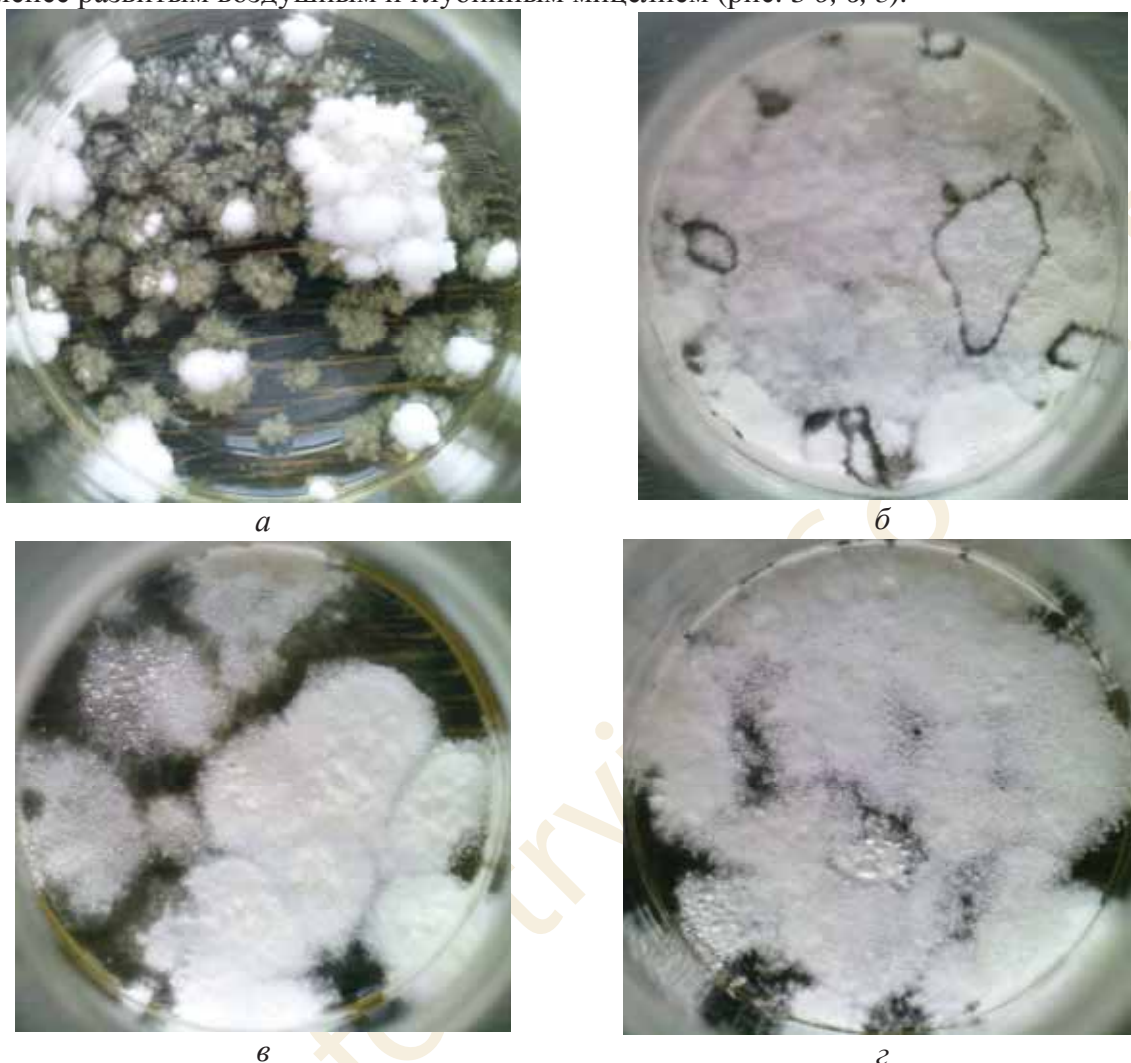


Рис. 3. Внешний вид колонии ди- и монокариотических культур *Sch. commune* на жидкой глюкозо-пептонной среде (а – дикариотическая культура Sc-28; б - монокариотические культуры Sc-28-7 и Sc-28-14; в - монокариотические культуры Sc-28-1 и Sc-28-16; г - монокариотические культуры Sc-28-7 и Sc-28-16).

Fig. 3. Appearance of colonies di- and  $\square$ monokariotic cultures *Sch. commune* on a liquid glucose-peptone medium (a – dikaryotic culture Sc-28; б – monokariotic cultures Sc-28-7 and Sc-28-14; в – monokariotic cultures Sc-28-1 and Sc-28-16; d – monokariotic cultures Sc-28-7 and Sc-28-16).

Однако монокариотические культуры выгодно отличает увеличенная площадь колонии. Можно предположить, что это связано с тем, что в естественных условиях при выбросе споровой массы монокариотические культуры вынуждены конкурировать за субстрат, либо таким образом увеличивается площадь поиска полового партнера. Не исключено, что оба фактора справедливы одновременно.

При выращивании культур на жидкой питательной среде наблюдались колбы, в которых прослеживалась четкая граница раздела двух колоний (рис. 3 б), и колбы, где таковой не наблюдалось (рис. 3 в, г). Наличие или отсутствие четкой границы между колониями можно объяснить тем, что для *Sch. commune* характерна двухфакторная система совместимости [Дьяков, Шнырева, Сергеев, 2005]. При общих факторах А и В у монокариотических культур морфогенез не протекает и формируется четкая граница раздела колоний (рис. 2 а, 3 б). При различии только по фактору А монокариотические культуры способны к частичному морфогенезу, при котором образование пряжек

наблюдается у первичных анастомозирующих клеток, а остальные клетки остаются одноядерными, при этом говорят о так называемой полусовместимости, что хорошо прослеживается в нашем случае (рис. 2 б, 3 в, г).

Для выявления физиологических особенностей вышеописанных культур исследовалась активность внутриклеточных ферментных систем. Анализ колбы, содержащей две колонии с четкими границами (рис. 3 б), позволили установить доминирование монокультуры Sh-28-7 над Sh-28-14. Заключение было сделано по результатам сравнения ферментных спектров чистых монокультур и после их совместного культивирования. Особенно показательно в данном случае сравнение спектров  $\alpha$ -амилазы и глутаматоксалоацетаттрансаминазы (рис. 4). Для чистой культуры Sh-28-14 характерны зоны активности фермента, которые не наблюдаются при совместном культивировании двух моноспоровых культур ( $\alpha$ -амилаза Rf – 0,66; глутаматоксалоацетаттрансаминаз Rf – 0,32). Подобные сравнения позволяют с большой долей уверенности говорить о том, что преобладающая площадь колонии (рис. 3 б) принадлежит именно культуре Sh-28-7.

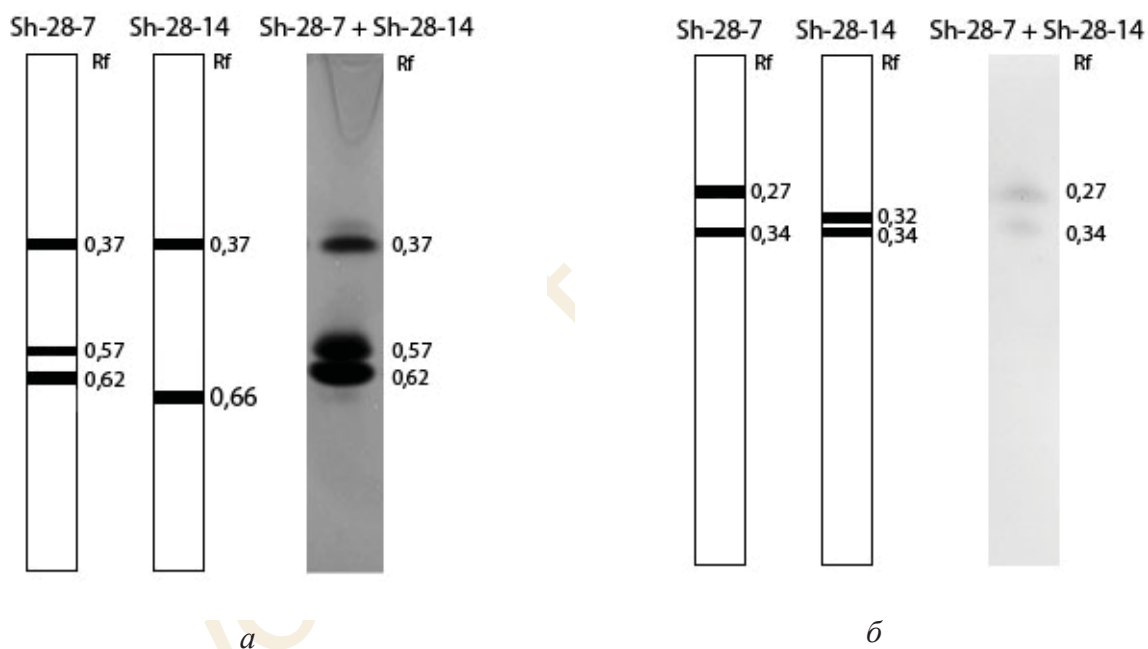


Рис. 4. Электрофореграмма внутриклеточных ферментных систем монокариотических культур *Sch. commune* (а - изоферменты  $\alpha$ -амилазы; б – изоферменты глутаматоксалоацетаттрансаминазы)

Fig. 4. Electrophoregram of intracellular enzyme systems monokariotic cultures *Sch. commune* (а –  $\alpha$ -amylase isozymes, б – glutamate oxaloacetate transaminase isozymes )

Сравнение совместных колоний монокультур Sc-28-1 + Sc-28-16 и Sc-28-7 + Sc-28-16, которые не образуют четко разделимых границ, является весьма интересным. Сравнение спектров изоформ четырех ферментных систем свидетельствует о преобладании монокариотической культуры Sc-28-16 над Sc-28-1 (видно по ферменту  $\alpha$ -амилаза (рис. 5 а)) и над монокультурой Sc-28-7 (изоферменты  $\alpha$ -амилаза, эстераза (рис. 5 б)).

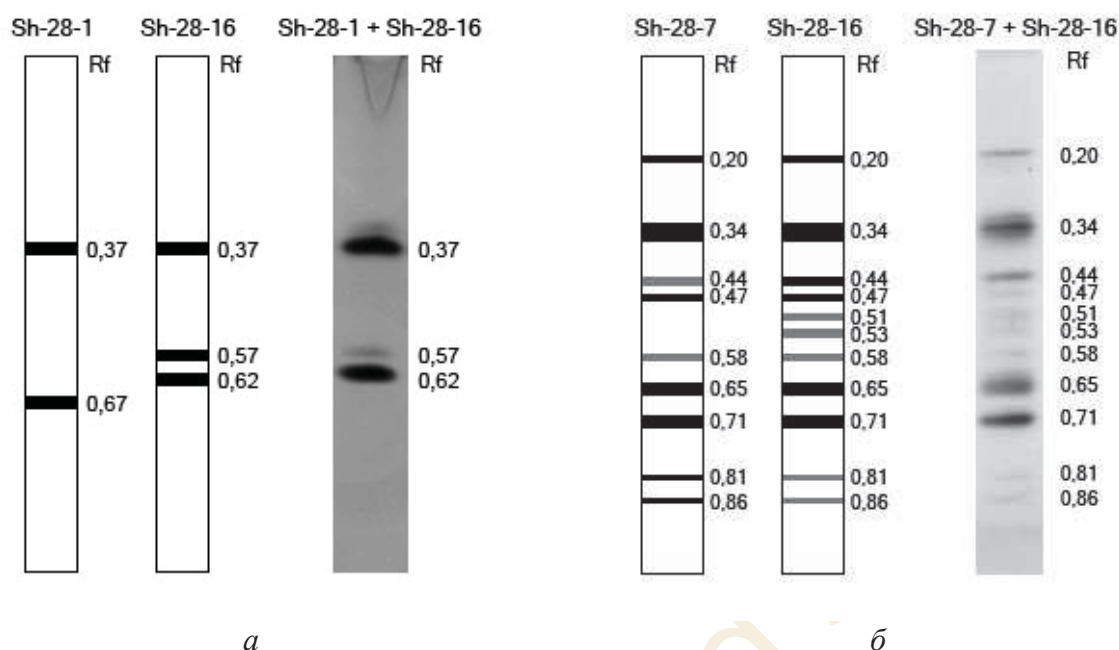


Рис. 5. Электрофореграмма внутриклеточных ферментных систем монокариотических культур *Sch. commune* (а - изоферменты  $\alpha$ -амилазы; б - изоферменты эстеразы)

Fig. 5. Electrophoregram of intracellular enzyme systems monokariotic cultures *Sch. commune* (а -  $\alpha$ -amylase isozymes, б - esterase isozymes)

### Выводы

Мицелий дикариотических грибов в сравнении с монокариотическими имеет ряд морфологических отличий, а именно: увеличенная практически в два раза ширина гиф, образуемые колонии более плотные, с хорошо развитым воздушным и погруженным мицелием. Монокариотические культуры способны к более интенсивному распространению по субстрату, что, возможно, связано с конкурентными взаимоотношениями за субстрат между моноспоровыми культурами, а также увеличением площади поиска полового партнера. Морфологические особенности колоний позволяют с высокой точностью определить ядерный статус мицелия. Электрофоретические исследования эндоферментных систем позволяют идентифицировать монокариотические культуры, доминирующие при совместном произрастании на едином субстрате.

### Список литературы

- БИЛАЙ В.И. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наук. думка, –1982. –550 с.  
 БОЙКО С.М. Зміна ізоферментного складу культури гриба *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycetes) залежно від віку міцелію // Укр. ботан. журн. – 2011. –68. №4. – С. 598–603.  
 БОЙКО С.М. Поліморфізм внутрішньоклітинних ізоферментів *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycetes) на території Донецької області // Цитология и генетика. – 2011. – № 6. – С. 48–52.  
 ДЬЯКОВ Ю.Т. Введение в генетику грибов / Ю.Т. Дьяков, А.В. Шнырева, А.Ю. Сергеев. – М.: Издательский центр "Академия", 2005. – 304 с.  
 ЗУБКОВА Л.А., СТЕПАНОВА А.А. Ультраструктура базидий и спор *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. (*Schizophyllaceae*) в зависимости от типа субстрата // Микология и фитопатология. –1998. –Т.32, вып.2. –С.48–53.  
 КОРОЧКИН Л.И. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. – М.: Наука. – 1977. – 275 с.  
 ЛІНОВИЦЬКА В.М., БУХАЛО А.С. Культуральні та морфологічні особливості лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. (Basidiomycetes) на агаризованих живильних середовищах // Укр. ботан. журн. – 2005. –62. №1. –С. 78–86.

- СЕМЕНОВ С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник.– М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
- GUETTLER, S., JACKSON, E. N., LUCCHESI, S. A., HANAAS, L., GREEN, A., HITTINGER, C. T., TIAN, Y., LILLY, W. W., GATHMAN, A. C. ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media // Fungal Genetics and Biology. -2003. -39. –P. 191–198.
- JAMES T. Y., PORTER D., HAMRICK J. L., VILGALYS R. Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom, *Schizophyllum commune* // Evolution. – 1999. – 53. – P. 1665–1677.
- OHM R. A., JONG J. F., LUGONES L. G., AERTS A., KOTHE E., STAJICH J. E., ET AL. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune* // Nature Biotechnology. – 2010. – Т. 28. – № 9. – P. 957–963.
- OKAMURA K., SUZUKI M., CHIHORA T. ET AL. Clinical evaluation of schizophyllan // Cancer (Philadelphia). – 1986. – 58. – P. 865–872.
- RAPER C. A. *Schizophyllum commune*, a model for genetic studies of the *Basidiomycotina* / Genetics of Plant Pathogenic Fungi, edited by G. S. Sidhu. Academic Press, London. – 1988. – P. 511–522.
- RUÁN-SOTO F., GARIBAY-ORJIJE R., CIFUENTES J. Process and dynamics of traditional selling of wild edible mushrooms in tropical Mexico // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. – 2006. – Т. 2. – № 3. –P. 1–13.
- SMITH J.E., SULLIVAN R., ROWAN N. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: Current perspectives (Review.) // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – 5. – P. 217–234.

Рекомендує до друку  
А.П.Орлюк

Отримано 12.11.2012 р.

Адреса автора:

С.М. Бойко  
Донецький національний університет,  
вул. Шорса, 46,  
м. Донецьк, 83050  
Україна  
e-mail: bsm73@ukr.net

Author's address:

Boiko S.M.  
Donetsk National University,  
vul. Shorsa, 46,  
Donetsk, 83050  
Ukraine  
e-mail: bsm73@ukr.net