

Б І О Л О Г І Я

УДК 582.287

МОНОКАРІОТИЧНЕ ПЛОДОНОШЕННЯ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

С.Ф.Негруцький, М.М.Сухомлин

До групи вищих базидіоміцетів відноситься більшість грибів, які люди використовують для харчування, а деякі з них є основним об'єктом грибовництва. При цьому, маються на увазі плодові тіла грибів, хоча в останній час ведуться розробки, щодо можливості використання міцелію грибів в якості харчових домішок (Бисько та інш., 1997).

У зв'язку з цим, усі питання, пов'язані з механізмами, що відповідають за ініціацію, розвиток та різноманіття плодових тіл викликають не тільки суто науковий, але і практичний інтерес.

Плодові тіла переважної більшості базидіоміцетів формуються на вторинному, дикаріотичному міцелії, оскільки утворення плодових тіл залежить від дії як морфогенетичних факторів, так і від факторів несумісності. У тетраполярних видів фактори несумісності А та В, як показали дослідження ряду авторів (Raper J.R., Raper C.A., 1973; Mutasa et al., 1990; Kues U., Casselton L., 1992), це складні генетичні одиниці, кожна з яких складається з двох близько пов'язаних генів. Фактори, які відповідають за несумісність, відповідно гомогенній несумісності, контролюють дію морфогенетичних генів, що здійснюють перетворення від поєднання гіф (плазмогамії) до утворення дикаріону (формування пражок). В свою чергу дикаріон здатний формувати плодові тіла при відповідних зовнішніх умовах.

Крім нормального дикаріотичного плодоношення, у деяких видів базидіоміцетів спостерігали монокаріотичне плодоутворення, коли формування плодових тіл або структур, подібних плодовим тілам, відбувається на міцелії, що утворюється з однієї гаплоїдної базидіоспори (Esser, Stahl, 1975). З того часу, коли це явище було описано вперше (Wakefield, 1909), в різних лабораторіях світу винайдено види базидіоміцетів, яким був притаманний даний феномен. Спостерігали індукцію гаплоїдних плодових тіл під впливом речовин, механічних пошкоджень та інших факторів. На цей час нараховують більше тридцяти видів з таким типом плодоношення. В табл. 1 представлено список базидіальних грибів, на підставі даних професора Ессера (Esser, 1978), здатних формувати монокаріотичні плодові тіла. Такий тип плодоношення знайдений як у поліпорових, так і у агарікальних видів. Раніше це явище характеризувалось, як аномальне, і в зв'язку з тим не бралось до уваги генетиків. У одного з найбільш популярних в генетиці грибів виду – *Schizophyllum commune* – штами з монокаріотичним плодоношенням навіть вилучались з експериментів. Однак пізніше такі види стали ретельно аналізуватися (Esser, 1978), особливо після факту нормального проростання спор, які утворювались монокаріотичними плодовими тілами. Це дає можливість використовувати такі спори для генетичного аналізу. Явище монокаріотичного плодоношення не є результатом культивування гаплоїдних ізолятів на штучному середовищі, воно широко розповсюджено у природі (Lesli, Leopard, 1984).

Для ілюстрації явища монокаріотичного плодоношення та його генетичної основи, ми вибрали *Flammulina velutipes* – зимовий гриб. Він є ксилотрофом, широко розповсюдженим в Україні. Гриб викликає великий практичний інтерес у використанні

його як продуцента лікарських та біологічно активних речовин. Крім того, він є одним з перспективних видів у грибовництві (Негруцький, 1997).

Монокаріотичне плодоношення у цього гриба вперше було відмічено Заттлером (Zattler, 1924). Однак генетичний аналіз цього виду плодоношення у *F. velutipes* тоді як інші види (*Polyporus ciliatus*, *Polyporus brumalis*, *Agrocybe aegerita* та інші) в цьому напрямку вивчалися більше (Esser, Hoffmann, 1977).

Матеріали та методи

В наших дослідженнях використані три ізолята *F. velutipes* (РТ, ЛВ-1, ДН-1) з різних місцевостей України. Культури отримані з плодових тіл, що знайдені на різних породах листяних дерев (тополі, клені та акації). В ході експерименту з кожного дикорослого плодового тіла отримано спорові відбитки, які стали матеріалом для отримання моноспорових культур (Eger G., 1974).

Монокаріотичні культури кожного плодового тіла схрещувались між собою у всіх можливих комбінаціях для встановлення факторів несумісності.

У подальшому моноспорові культури висівали на середовище із зволуженим лушпинням соняшника у конічні колби для отримання плодових тіл. Монокаріотичні плодові тіла перевірялись на спороутворення та здатність спор до проростання.

Результати дослідження

З плодових тіл РТ, ЛВ-1 та ДН-1, що знайдені в природних умовах, отримано 31, 20 та 15 моноспорових культур.

Оскільки, сумісність гомокаріонів зимового гриба контролюється тетраполярною системою сумісності (Ingold, 1991), моноспорові культури кожного плодового тіла розділили на чотири групи в результаті схрещення гомокаріонів у всіх можливих комбінаціях. Рис. 1 демонструє розподілення монокаріонів плодового тіла РТ за типами схрещення.

У процесі експерименту гомокаріотичні культури всіх штамів утворювали монокаріотичні плодові тіла. Ця здатність не залежала від факторів несумісності. Однак, монокаріотичне плодоношення характерне не для всіх монокаріонів. Така особливість спостерігалась і в інших видів базидомецетів. Так за даними Ессера та Стала (1975), серед вивчених видів монокаріотичне плодоношення мали тільки біля 60% всіх гомокаріотичних ізолятів. Крім того, ці плодові тіла відрізнялись нетиповою формою, що коливалась від плектенхиматичноподібної маси до деформованих плодових тіл.

Форма плодових тіл, утворених монокаріонами *F. velutipes*, також відрізнялась від типової у тканинних культур (Рис. 2). Відмічено різноманітну форму плодових тіл. Більшість культур усіх трьох штамів формували плодові тіла зі шапінкою "раковинно-подібною" форми. Гіменофор, при цьому, розташований зовні, а поверхня шапинки – усередині. Край шапинки, як правило, нерівний, хвилюподібний. Ніжка в розрізі не круглява, а розділена вздовж на дві частини, тобто по всій довжині ніжки проходить ніби-то "рівчак". Причому, ніжка – спірально закручена навкруг своєї осі (Рис. 2б). У інших плодових тіл спостерігали потовщену ніжку та маленьких розмірів шапинки. Такі плодові тіла не формували гіменофору та були стерильними. Деякі плодові тіла зовсім не формували ніжки, складчастий гіменофор утворювався безпосередньо на поверхні середовища.

Більшість монокаріотичних плодових тіл мали базидії. *F. velutipes* формує чотирихспорові базидії на стерильному міцелії (Біський, Дудка, 1987). Однак більшість ін-

ших видів утворює дві спори на базидії монокаріотичного плодового тіла (Esser, 1978). В цих спорангіях не мають місця ні каріогамія, ні мейоз. Таким чином, формування монокаріотичних плодових тіл є частиною статевого циклу.

	A1B1									A2B1											A2B2				A1B2						
	1	4	8	10	11	14	16	22	25	29	2	7	12	13	15	19	20	24	30	31	3	9	21	27	28	5	6	17	23	26	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Рис. 1. Розподіл факторів несумісності серед монокаріонів плодового тіла РТ *F. velutipes* (А та В – фактори неусумісності; 1-31 – номери гомокаріонів)

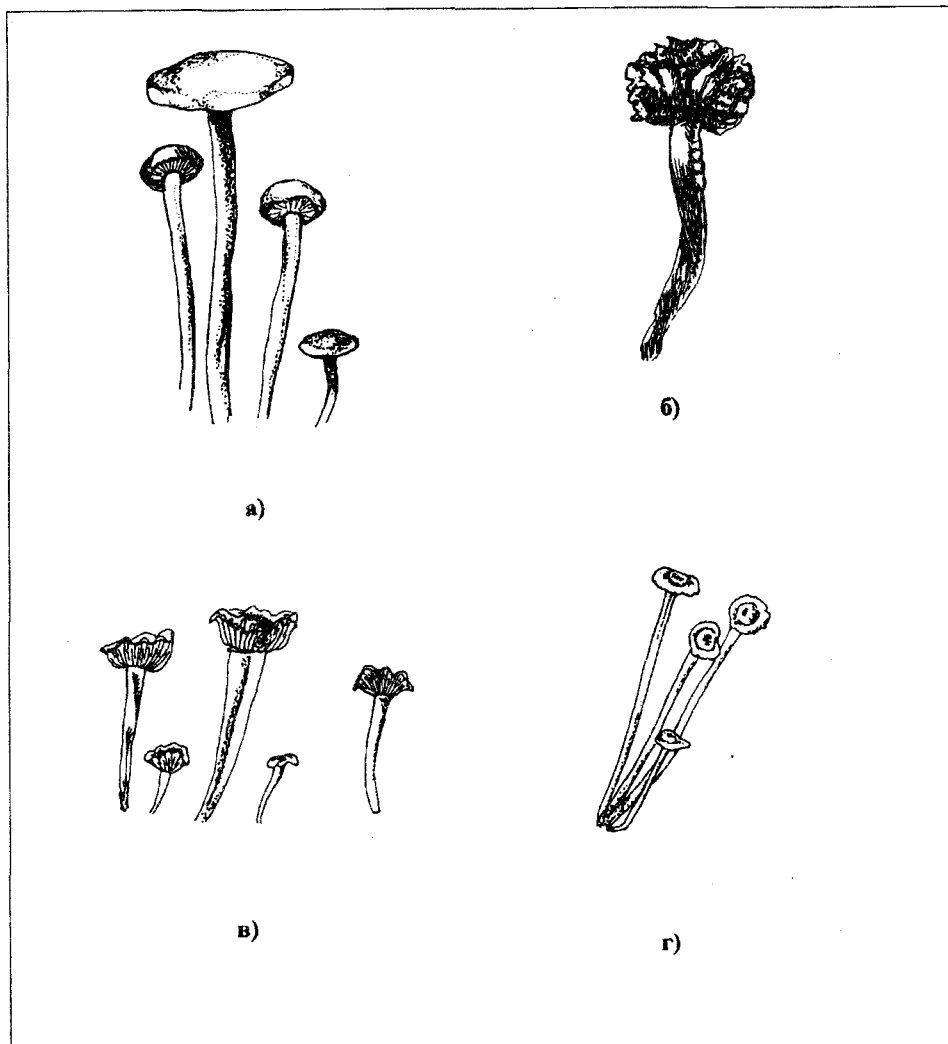


Рис. 2. Форма плодових тіл дикаріотичного (а) і монокаріотичного (б-г) походження у *Flammulina velutipes*

Різницю у часі зростання субстрату спостерігали не тільки між різними гомокаріонами, але і серед повторностей одного і того ж монокаріону (за виключенням №1 та №16). Найбільш швидко, після перенесення колб на світло, формували плодові тіла монокаріони №№4, 14, 17, 22 та №27.

У вищих базидіоміцетів один ген fi^+ (fruit initiation) викликає монокаріотичне плодоношення (Esser, Stahl, 1975). Експресія цього гену призводить до формування деформованих плодових тіл. Якщо присутня його алель, монокаріотичне плодоношення не має місця. Певно, монокаріони плодового тіла РТ (№№2, 7, 10, 11, 12, 15, 19, 20, 23, 24, 25 та №29), які не утворювали плодових тіл в культурі, володіли саме цією алелю.

Якщо монокаріони формують фертильні плодові тіла з шапинками, найбільш подібні до нормальних дикаріотичних плодових тіл, разом з fi^+ геном вони мають другий fb^+ (fruit body) ген (Esser, Stahl, 1975). Однак третій ген, названий "модифікуючим" (mod^+) рішуче змінює дію двох попередніх. В комбінаціях fi^+mod^+ та $fi^+fb^+mod^+$

утворюються стерильні структури. Експресія обох генів $fb+$ та $mod+$ можлива тільки в присутності гену $fi+$.

F. velutipes не утворює паренхімантичної стерильної маси. Стерильними є плоді тіла з ніжкою та шапінкою дуже маленьких розмірів, в котрій відсутній гіменофор. У зв'язку з різноманіттям форм фертильних монокаріотичних плодових тіл у *F. velutipes* можливо передбачити наявність декількох генів, які відповідають за різну форму плодових тіл на відміну від *Agrocybe aegerita* (Esser, 1978).

Фактори несумісності у даному випадку не впливають на формування монокаріотичних плодових тіл і, ймовірно, певно мають значення тільки при формуванні нормальних дикаріотичних плодових тіл. Хоча в дослідях по диференціації ядерної та цитоплазматичної спадковості, шляхом формування відомих дикаріотів з наступним розділенням ядер (дедикаріотизацією), на середовищі з холієвою кислотою показали, що у всіх монокаріотів тип спарювання батьків був пов'язаний з монокаріотичним феноменом (Lesli, Leopard, 1984). Фактори несумісності можуть бути залучені до цього процесу, оскільки вони гарантують, що в ході статевого розмноження генетично різнорідний або дикаріотичний матеріал буде включений до плодових тіл. Припускається, що моно-і дикаріотичне плодоношення контролюється однаковими генами, оскільки у потомстві, отриманому шляхом схрещення стерильного та слабофертильного монокаріотів, відмічено досить високий вміст мРНК, специфічних щодо плодоношення і присутніх у дикаріотах, які формують плоді тіла (Yli-Mattila et al., 1989). Імовірно, досліджені гени являють собою гени-регулятори.

У дикаріотичному плодоношенні має місце мейотична рекомбінація, яка відіграє головну роль в еволюції. Незалежно від сексуального циклу, монокаріотичне плодоношення тільки з можливістю соматичної рекомбінації, є тупіковою гілкою еволюції. Однак є дані щодо мейозу і в монокаріотичних базидіокарпах (Oishi et al., 1982). Він відмічений у мутанта *Coriolus macrohizus*. Причому мейотична реплікація ДНК відбувається після каріогамії, в той час як в дикаріотичних базидіях вона має місце до каріогамії.

Відкриття такого типу плодоутворення та його дослідження має, без сумніву, практичний інтерес. З'являється можливість покращення культивуємих штамів грибів шляхом їх рекомбінації з дикими штамми, які знайдені в природі. Така процедура є стандартною на даний час у застосуванні щодо вищих рослин. Можливим стає також отримання метаболітів, які виявлені тільки в плодових тілах грибів за допомогою ферментерів. Можливість одержувати фертильні штами із стерильних, використовуючи штами з членом $fb+$, може привести до нових досягнень в біотехнології. Особливе значення відіграє той факт, що гриб *F. velutipes*, який має унікальну здатність до монокаріотичного плодоношення, в останні роки привертає увагу мікологів, біотехнологів та медиків (Фалина и др., 1978; Ingold, 1991; Псурцева, Мнухина, 1996). У функціональній взаємодії між генами типу схрещення та генами плодоутворення можливо проникнути, використовуючи техніку генної інженерії та методи клонування. Однак ще залишаються нез'ясованими і фізіологічні механізми, що пов'язані з цими генетичними змінами. Хоча у деяких видів спостерігаються певні закономірності. З'ясовано, що у монокаріотичних штамів *Schizophyllum commune*, як і дикаріотичних, була знайдена фенолоксидазна активність під час утворення плодових тіл. Якщо монокаріоти стерильні, вони можуть проявляти або не проявляти таку активність (Lesli, Leopard, 1979).

Таким чином, селекція *F. velutipes* в цьому напрямку може мати суттєвий комерційний ефект у вирощуванні не тільки їстівного гриба в промислових умовах, але і у використанні його як продуцента біологічно активних речовин.

Таблиця 1. Види базидомецетів, що здатні формувати монокаріотичні плодові тіла

Назва виду	Наявність на території України
<i>Agrocybe aegerita</i> Fr.	Агроцибе теплолюбивий –
<i>Armillaria mucida</i> (Fr.) Kumm.	Удемансієла слизька +
<i>Collybia tuberosa</i> (Fr.) Kumm.	Колібія шишкувата +
<i>Coprinus curtus</i> Fr.	р. Гноевики –
<i>C. ephemerus</i> (Fr.) Fr.	Гноевик ефемерний +
<i>C. fimentarius</i> Fr.	р. Гноевики –
<i>C. lagopus</i> (Fr.) Fr.	Гноевик волосистоногий +
<i>C. macrorhizus</i> (Fr.) Real.	Гноевик сірий +
<i>C. niveus</i> (Fr.) Fr.	Гноевик сніжно-білий +
<i>Fomes cajanderi</i> Karst.	р. Фомес –
<i>Hygrocybe ceracea</i> (Fr.) Kumm.	Гігрофор восковий +
<i>H. conica</i> (Fr.) Kumm.	Гігрофор конічний +
<i>Hygrophorus constans</i> (Fr.) Fr.	р. Гігрофор –
<i>H. virgineus</i> (Fr.) Fr.	Гігрофор дівочий +
<i>Lenzites trabea</i> Fr.	Коріолопсис трабеа +
<i>Mycena galericulata</i> (Scop. ex Fr.) S.F.Gray	Міцена ковпаковидна +
<i>M. pseudopicta</i>	р. Міцена –
<i>M. quercus-ilicis</i>	р. Міцена –
<i>M. speirea</i> (Fr. ex Fr.) Gill.	Міцена тонконога +
<i>Omphalina ericetorum</i> (Fr. ex Fr.) M Lange	Омфаліна зонтична +
<i>O. luteolilaccina</i>	р. Омфаліна –
<i>O. luteovitelina</i>	р. Омфаліна –
<i>Panaeolus campanulatus</i> (Fr.) Quel.	Панеол дзвониковидний +
<i>Peniophora ludoviciana</i>	р. Пеніофора –
<i>Pholiota nameko</i>	р. Фоліота –
<i>Polyporus brumalis</i> (Pers.: Fr.) Fr.	Поліпор зимовий +
<i>P. ciliatus</i>	р. Поліпор –
<i>Psilocybe paneoliformis</i>	р. Псілоцибе –
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	Схізофил звичайний +
<i>Sistotrema brinkmannii</i> (Bres.)	р. Сістотрема –
<i>Stereum bicolor</i> Fr.	р. Стереум –

РЕЗЮМЕ

Приводятся данные о редком явлении среди высших базидальных грибов – монокаріотическом плодообразовании. На примере конкретного вида – ксилотрофного гриба – *Flammulina velutipes* проведено сравнительное изучение морфологии плодовых тел ди- и монокаріотических изолятов. Рассмотрено влияние факторов несовместимости на процесс плодообразования.

SUMMARY

Data on monokariotic fruit body formation of some Higher Basidiomycetes are presented. This is nontypical production of basidiocarp. Peculiarities of formation and development

of haploid sporocarp of *Flammulina velutipes* are described. It is discovered that the fact of monokaryotic fruit body formation would be used in selection of fungi.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бисько Н.А., Дудка И.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка – Киев: Наук. думка. – 1987. – 144 с.
2. Бисько Н.А., Соломко Є.Ф., Митропольская Н.Ю. Физиология роста *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. в поверхностной и глубинной культуре. – Матер. I Международной конф.: Методологические основы познания биологических особенностей грибов. 1-4 окт. 1997 г. – Донецк. 1997. – С.32-34.
3. Негруцкий С.Ф. *Flammulina velutipes* и возможные перспективы его использования. Там же. – С.6-8.
4. Псурцева Н.С., Мнухина А.Я. Культуральная характеристика и активность экзопротеиназ базидиомицетов рода *Flammulina*. 1: Поверхностное культивирование. Микол. и фитопатол. – 1996. – 30. – №1. – С.44-50.
5. Фалина Н.Н., Морозова Э.Н., Денисова Н.П. и др. Препарат фибринолитического действия из зимнего опенка (*Flammulina velutipes*) – Прикл. биохим. и микробиол. – 1978. – 14. 5. – С.699-701.
6. Eger G. Rapid method for breeding *Pleurotus ostreatus*. – Mushroom Science IX. Proc. IX Intern. Sci. Congr. Cultivat. Edible Fungi (Japan). – 1974. – P.575-583.
7. Esser K. Genetic control of fruit body formation in higher basidiomycetes. – Mushroom Science X. Proc. X Sci. Intern. Congr. Cultivat. Edible Fungi (France). – 1978. – P.1-12.
8. Esser K., Hoffman P. Genetic basis for speciation in basidiomycetes with special referrence to the genus *Polyporus*. – In: The Species Concept in Hymenomycetes. Cramer. Vaduz. – 1977. – P.189-214.
9. Esser K., Stahl U. A genetic correlation between dikaryotic and monokaryotic fruiting in basidiomycetes. – Proc. 1 st Intersect Congr IAMS (Japan). Part 1. – 1975. – 294-300.
10. Ingold C.T. Dikaryon developmaent in *Flammulina velutipes*. – Mycol. Res. – 1991. – 95. – P.636-639.
11. Kues U., Casselton L.A. Fungal matting type genes-regulators of sexual development. – Mycol. Res. – 1992. – 96. – №12. – P.993-1006.
12. Lesli J.F., Leopard T.J. Monokaryotic fruiting in *Schizophyllum commune*: phenoloxidases. – Mycologia. – 1979. – 71. – №5. – P.1082-1085.
13. Lesli J.F., Leopard T.J. Nuclear control of monokaryotic fruiting in *Schizophyllum commune*. – Mycologia. – 1984. – 76. – №4. – P.760-763.
14. Mutasa E.S., Tymon A.M., Gottgens B., Mellon E.M., Little P.F.R., Casselton L.A. Molecular organization of an A mating type factor of the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. – Curr. Genet. – 1990. – 18. – №3. – P.223-229.
15. Oishi K., Uno T., Ishikawa T. Timing of DNA replication the meiotic process in monokaryotic basidiocarps of *Coprinus macrorrhixus*. – Arch. Microbiol. – 1982. – 132. – №4. – P.372-374.
16. Raper J.R., Raper C.A. Incompatibility factors: regulatory genes for sexual morphogenesis in higher fungi. – Brookhaven Symp. Biol. – 1973. – №25. – P.19-39.
17. Wakefield E.M. Uber die Bedingungen 1 der Fruchtkorper-bildng sowie das Auftelen fertiler und steriler Stamme bei Hymenomyceten. – Naturwiss. Z. Forst. Landwirtsch. – 1909. – №7. – P.521.
18. Yli-Mattila T., Ruiters M.H.J., Wessels J.G.H., Raudaskoki M. Effect of inbreeding and light on monokaryotic and dikaryotic fruiting in the homobasidiomycetete *Schizophyllum commune*. – Mycol. Res. – 1989. 93. №4. P.535-542.
19. Zattler F. Vererbungsstudien an Hutpilzen (Basidimyceten). – Zeisehr.Bot. 16. P.433-499.

Надійшла до редакції 18.09.1997 р.