

МОРФОГЕНЕЗ И УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОХОНДРИЙ БАЗИДИОМИЦЕТОВ РОДОВ *AGARICUS* И *PLEUROTUS*

© Е. В. Матророва, И. С. Мажейка, О. А. Кудрявцева, О. В. Камзолкина¹

Кафедра микологии и альгологии биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

¹ электронный адрес: o-kamzolkina@yandex.ru

Проведено прижизненное изучение митохондрий, окрашенных родамином, в клетках воздушного и глубинного мицелиев 31 штамма 9 видов рода *Agaricus* — *A. arvensis* Schaeff., *A. bisporus* (Lange) Imbach, *A. bitorquis* (Quel.) Sacc., *A. campestris* L., *A. excellens* (F. H. Møller), F. H. Møller, *A. macrocarpus* (F. H. Møller) F. H. Møller, *A. silvaticus* Schaeff., *A. silvicola* (Vittad.) Peck, *A. xanthodermus* Genev. — и 2 штаммов 2 видов рода *Pleurotus* — *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quel. Морфогенез митохондрий в клетках мицелия видов родов *Agaricus* и *Pleurotus* в целом имеет много общего в распределении митохондрий в клетках мицелия как при благоприятных условиях роста, так и при перестройке хондриома (деление или фрагментация митохондрий на мелкие субъединицы) под действием неблагоприятных условий роста или в процессе старения. При сбалансированном росте мицелия гетерокариотических штаммов видов родов *Agaricus* и *Pleurotus* в течение 7—14 сут на агаризованных средах, а также при культивировании мицелия штаммов вешенки и некоторых штаммов шампиньона в условиях погруженной культуры наблюдалось распределение митохондрий по типу 1 (мелкие зернистые митохондрии в апикальной зоне — 1, длинные палочковидные в субапикальной зоне — 2 и короткие палочковидные и зернистые, полученные в результате фрагментации палочковидных митохондрий в зрелых клетках мицелия — 3). При неблагоприятных условиях роста (голодание) в клетках мицелия гомокариотических штаммов шампиньона, при длительном культивировании всех штаммов и видов изучаемых родов и при культивировании на жидком сусле для большинства штаммов шампиньона наблюдали распределение митохондрий по типу 2 (шарообразные митохондрии во всех клетках наблюдаемых зон мицелия). На ультраструктурном уровне профили этих митохондрий имели специфические особенности в виде ассоциации наружной мембраны митохондрий с цитоплазматическими рибосомами и изменения структуры крист. Предварительный тест на апоптозоподобный фенотип клеток глубинного мицелия шампиньона Bs94, практически не растущего в глубинной культуре, дал положительный результат. Таким образом, морфогенез митохондрий в клетках мицелия видов рода *Agaricus* и видов рода *Pleurotus* при разных условиях и сроках культивирования протекает сходным образом и определяется комплексом физиологических и биохимических процессов, отражающих состояние клеток мицелия.

Ключевые слова: виды рода *Agaricus* и *Pleurotus*, морфогенез митохондрий, ультраструктура митохондрий.

Митохондрии являются органеллами клеток эукариотических организмов. Они изменчивы и пластичны в зависимости от штаммовой специфичности, фазы жизненного цикла и условий роста гриба. Размер, форма и число митохондрий в клетках могут сильно варьировать. Митохондрии постоянно растут, делятся и передаются от одной клетки к другой в процессе мицелиального роста и спорообразования у грибов. Митохондрии снабжают клетки АТФ, образуемым в процессе окислительного фосфорилирования, вовлечены в процесс биосинтеза многих клеточных метаболитов, выполняют функцию образования белковых молекул, содержащих железосерные кластеры (Lill, Mühlenhof, 2005), а также играют ключевую роль в регуляции программируемой смерти клеток (Desagher, Martinou, 2000; Lu, 2005). Поэтому митохондрии являются индикаторами жизнедеятельности и жизнеспособности эукариотических клеток.

Морфология митохондрий определяется процессами их слияния и деления. Показано, что факторами, ответст-

венными за морфологию митохондрий у сумчатых дрожжей *Schizosacharomyces pombe* и *Saccharomyces cerevisiae*, являются белки, локализованные на наружной мембране митохондрий (Burgess et al., 1994; Pelloquin et al., 1998; Prokisch et al., 2000). Эти белки консервативны по своей природе и у разных грибов они гомологичны (у дрожжей и у мицелиальных сумчатых грибов *Neurospora crassa* и *Podospira anserina*). У мутантов дрожжей в этих белках нарушен процесс передачи мтДНК дочерним клеткам, а у мутантов *N. crassa* блокируется процесс развития перитеция еще до образования аскоспор (эффект стерильности мицелия).

Соматические клетки высших эукариот, как правило, имеют ограниченную способность к пролиферации. Постепенное снижение скорости пролиферации клеток *in vitro*, приводящее в конечном счете к ее остановке, называют клеточным, или репликативным, старением. Синдром старения мицелия был детально изучен на примере *P. anserina*. Он был впервые описан как материнское на-

следование неблагоприятного процесса, кульминацией которого является остановка роста мицелия после 7—30 см прироста мицелия, полученного из проросшей аскоспоры (Rizet, 1953). Состояние старения, по некоторым данным, было вызвано увеличением концентрации цитоплазматического фактора (Marcou, 1961; Jamet-Vierny et al., 1999). Было показано, что старение всегда ассоциируется с реорганизацией митохондриального генома: амплификацией экстрахромосомальной митохондриальной ДНК, называемой *senDNA* (Stahl et al., 1978; Cummings et al., 1979; Belcour et al., 1981), и модификацией митохондриальной хромосомы (Jamet-Vierny et al., 1980; Belcour et al., 1981; Kurk et al., 1981; Borghouts et al., 1997). Корреляция между модификациями митохондрий и старением хорошо изучены, но остаются непонятным, являются ли эти модификации причиной состояния старения мицелия (Sellem, 2002).

Было показано, что активные формы кислорода, образующиеся в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* под действием окислительного стресса, который был вызван половым феромоном, запускают каскад биохимических и морфологических ответных реакций в клетках, приводящих к фрагментации митохондрий и, в конечном счете, к апоптозу клеток (Кнорре, 2005).

К настоящему времени получено большое количество экспериментальных данных о морфогенезе митохондрий исключительно аскомицетных грибов: одноклеточных — дрожжей (Altmann, Westermann, 2005) и мицелиальных — *Neurospora crassa* (Westermann, Prokisch, 2002; Levina, Lew, 2006). В то же время ограниченный вегетативный рост мицелия характерен не только для гомо- и гетерокариотических штаммов сумчатого гриба *P. anserina*, но и для гомокариотических штаммов базидиального гриба *Agaricus bisporus* (Камзолкина, 2005).

Настоящая работа посвящена исследованию морфологии митохондрий мицелия и изменения их структуры у гомо- и гетерокариотических штаммов базидиальных грибов из родов *Agaricus* и *Pleurotus* при поверхностном и глубинном культивировании на различных средах.

Материал и методика

Цитологическое исследование проводили на 31 штамме рода *Agaricus* — *A. arvensis* Schaeff., *A. bisporus* (Lange) Imbach, *A. bitorquis* (Quel.) Sacc., *A. campestris* L., *A. excellens* (F. H. Møller) F. H. Møller, *A. macrocarpus* (F. H. Møller) F. H. Møller, *A. silvaticus* Schaeff., *A. silvicola* (Vittad.) Peck, *A. xanthodermus* Genev. — и 2 штаммах 2 видов рода *Pleurotus* — *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quel. (табл. 1).

Поверхностное культивирование мицелия проводили в термостатируемых условиях на агаризованных средах при 24 ± 1 °C в течение 7, 14 и 28 сут.

Агаризованные среды. Картофельно-глюкозный агар (КГА) (Литвинов, 1969): 20%-ный картофельный отвар, 2%-ная глюкоза, 1.5%-ный агар. Сусло-агар (СА): 1.6 °Б сусло, 1.5%-ный агар. Голодный агар (ГА): 1.5%-ный агар.

Глубинное культивирование проводили на жидком сусле в колбах Эрленмейера на ротационной качалке при 200 об/мин (24 ± 1 °C) в течение 7—28 сут с объемами среды в колбе 50, 100, 150 мл.

Приготовление препаратов для микроскопии. В чашки Петри на СА инокулировали блок с мице-

лием, рядом с ним помещали стерильные кусочки диализной пленки. Чашки инкубировали в термостате при 24 ± 1 °C в течение 7, 14 или 28 сут.

Люминесцентная микроскопия. Наросший на стекло мицелий окрашивали прижизненно родамином 6Ж (0.3 мкМ) для выявления митохондрий (Butt et al., 1989).

Просмотр препаратов. Препараты просматривали на микроскопе Axioskop 40 FL при увеличениях объективов 40×, 100×. Для просмотра препаратов, окрашенных родамином, использовали светофильтры фирмы Zeiss № 15 (увеличение объектива 100×). Фотографировали с помощью камеры AxioCam MRc.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Для исследования методом ТЭМ образцы мицелия, полученного на поверхности диализных пленок на СА и выращенного в глубинной культуре, помещали в 2.5%-ный раствор глутаральдегида (Merck) на 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7.2) на 2 ч (при комнатной температуре). После промывки в Na-фосфатном буфере (3 раза по 15 мин) проводили постфиксацию в 1%-ном растворе OsO₄ 1 ч при комнатной температуре. Материал промывали в растворе буфера, обезжизивали и заливали в EPON (Ferak). Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 с использованием алмазных ножей, окрашивали водным раствором уранил-ацетата (60 мин) с последующим докрасиванием по Рейнольдсу (Reynolds, 1963) и исследовали с помощью микроскопов Jeol (JEM-100B) и U12 (Hitachi).

TUNEL-анализ проводили при использовании кита APO-BrdU-INC™ (BioVision, США). Для проведения теста на присутствие фрагментированных участков ДНК использовали 16-суточный поверхностно растущий и глубинный мицелий *A. bisporus* (штамм Vs94), выращенные на агаризованном и жидком сусле соответственно. Фиксацию фрагментов мицелия на стеклах проводили в 4%-ном растворе формальдегида, приготовленном на буфере PBS, pH 7.4. Далее перед пермеабиллизацией протеназой К мицелий обрабатывали 5 мин в литической смеси, полученной из культуральной жидкости *Trichoderma* (3.6 мг/мл в PBS, pH 7.4, при 0.5 М KCl), отмывали трехкратно в PBS, pH 7.4, и далее проводили пермеабиллизацию и последующие процедуры по инструкции кита. Параллельно проводили все процедуры на нанесенных на предметное стекло клетках-тестах (смесь апоптотических и нормальных клеток), которые прилагались к комплекту реактивов. После всех процедур мицелий помещали в глицерин и микроскопировали. Учет клеток мицелия, имеющих TUNEL-положительное окрашивание, проводили путем микроскопирования при увеличении 100× на микроскопе Axioskop 40 FL.

Результаты и обсуждение

Морфология митохондрий разных штаммов видов рода *Agaricus* при росте в поверхностной и глубинной культурах. Проведено прижизненное изучение митохондрий у клеток воздушного и глубинного мицелиев изучаемых видов, окрашенных родамином. Морфологию митохондрий изучали в трех зонах гифы: зона 1 — апикальный фрагмент гифы (до 30 мкм от апикального кончика); зона 2 — клетки мицелия, удаленные от апикального кончика (30—100 мкм); зона 3 — зрелые клетки мицелия (более 100 мкм от апикального кончика). Морфология митохондрий была изу-

Т а б л и ц а 1

Штаммы родов *Agaricus* и *Pleurotus*, используемые в работе

Вид	Штамм	Происхождение	Способ выделения	Ядерный статус
<i>A. arvensis</i>	Aahet	Краснодарский край	Скрещивание моноспоровых культур	Гетерокарион
	Aa 5.3	То же	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	Bs83	Москва	Культура ткани	Гетерокарион
	Bs83-4	Споровый отпечаток Bs83	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	Bs83-15	То же	То же	»
	Bs83-19	» »	» »	»
	Bs84	Москва	Культура ткани	Гетерокарион
	Bs84-1	Споровый отпечаток Bs84	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	Bs84-2	То же	То же	»
	Bs84-3	» »	» »	»
	Bs26	ИНКА, Франция	Мицелиальная культура	Гетерокарион
	Bs26/3	Споровый отпечаток Bs26	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	Bs94	INRA, Франция	Мицелиальная культура	Гетерокарион
	Bs423	То же	То же	Гомокарион
	U3	Совхоз «Заречье»	» »	Гетерокарион
	U3 1/1	Споровый отпечаток U3	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	U3 1/3	То же	То же	»
	Pc17-3	Споровый отпечаток Pc17 (Венгрия)	» »	»
	GDR-2-40	Споровый отпечаток GDR-2 (Германия)	» »	»
	<i>A. bitorquis</i>	Aba	Алтайский заповедник	Культура ткани
BiC		Москва	То же	»
Bit		Коллекция Л. В. Гарибовой	Мицелиальная культура	»
<i>A. campestris</i>	AcA	Москва	Культура ткани	»
	Ac83	»	То же	»
	Ac83-1	Споровый отпечаток Ac83	Моноспоровый изолят	Гомокарион
	Ac83-2	То же	То же	»
	Ac83-3	» »	» »	»
<i>A. excellens</i>	Ae145	Венгрия, Будапешт	Мицелиальная культура	Гетерокарион
<i>A. macrocarpus</i>	Am150	То же	То же	»
<i>A. silvaticus</i>	AsM	Московская обл.	Культура ткани	»
	AsY	То же	То же	»
<i>A. silvicola</i>	Aa284	БИН РАН им. В. Л. Комарова	Мицелиальная культура	»
<i>A. xanthodermus</i>	Ax1517	Коллекция Института ботаники им. Холодного, Киев	То же	»
<i>P. ostreatus</i>	НК-35	Коллекция ВВЦ	» »	Дикарион
<i>P. pulmonarius</i>	VP-1	Московская обл.	Культура ткани	»

чена на 3, 7, 12 и 28-е сут роста мицелия. На рис. 1 и 2 представлены типы распределения митохондрий в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus*.

В клетках воздушного мицелия на среде сусло-агар (СА) на 3-и и 7-е сут роста морфология митохондрий в клетках мицелия гетерокариотических штаммов рода *Agaricus* практически не различались. У всех исследуемых штаммов в зоне 1 наблюдали мелкие зернистые ярко светящиеся митохондрии и их скопления. В зоне 2 у всех штаммов наблюдали длинные нитевидные митохондрии (4—12 мкм длиной). Часто в переходной зоне между зоной 1 и зоной 2 наблюдали митохондрии переходного

типа: короткие, овальные (1—3 мкм длиной), тускло светящиеся. В более зрелых фрагментах мицелия (зона 3) наблюдали преимущественно зернистые шаровидные митохондрии или митохондрии переходного типа, что может быть связано с фрагментацией нитевидных митохондрий. Иногда между клетками с нитевидными митохондриями наблюдали клетку или несколько клеток с зернистыми митохондриями. В данном случае фрагментация митохондрий может быть связана с какими-либо повреждениями клетки. У ряда штаммов (виды *A. arvensis*, *A. campestris*, *A. silvicola*, *A. xanthodermus*) и в зоне 2 часто встречались скопления зернистых митохондрий.

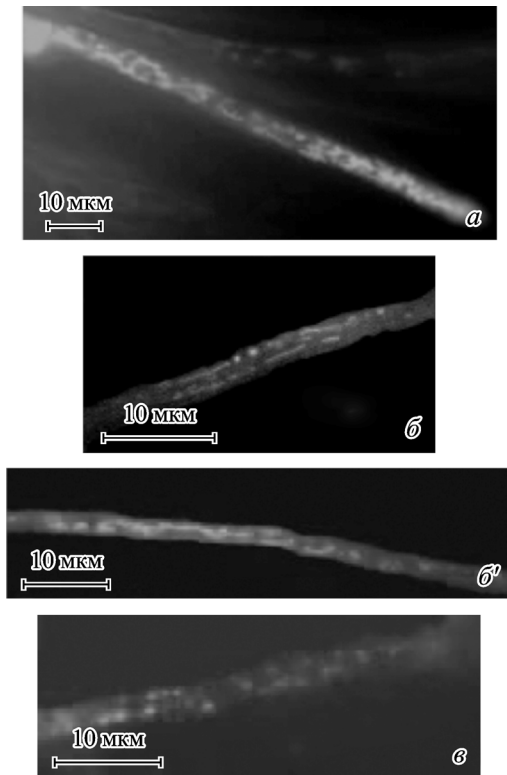


Рис. 1. 1-й тип распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus*.

a — зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика), штамм Am150 (*A. macrocarpus*); *б* и *б'* — зона 2 (30—100 мкм от апикального кончика) у штаммов Am150 (*A. macrocarpus*) и Aahet (*A. arvensis*) соответственно; *в* — зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика), штамм Aahet. Суло-агар (СА), 7-е сут роста.

По мере старения мицелия (12-е и 28-е сут роста) в зоне 2 увеличивалось количество клеток с зернистыми шаровидными митохондриями, диффузно светящихся при окрашивании клеток родамином. В мицелии ряда штаммов (виды *A. excellens*, *A. macrocarpus*, *A. silvaticus*, *A. silvicola*) на 28-е сут роста не наблюдали длинных нитевидных митохондрий.

У гомокариотических штаммов рода *Agaricus* во всех трех зонах наблюдали зернистые шаровидные митохондрии. Нитевидные митохондрии практически не встречались, часто наблюдали митохондрии переходного типа. На 28-е сут роста мицелий всех гомокариотических штаммов содержал большое количество диффузно окрашенных фрагментов мицелия.

У штаммов рода *Agaricus*, растущих на картофельно-глюкозном агаре (КГА), большинство гиф на 7-е сут роста имели морфологию митохондрий, аналогичную таковой при росте на СА. Однако у всех штаммов уже на 7—12-е сут роста клетки мицелия в зоне 2 содержали зернистые митохондрии. На 28-е сут роста в клетках большинства штаммов не обнаруживали нитевидных митохондрий.

Клетки штаммов, растущих на голодном агаре (ГА), содержали преимущественно зернистые митохондрии на всех этапах наблюдения. Палочковидные митохондрии редко встречали на 3-и и 7-е сут роста в зоне 2 у штаммов Bs26 (*A. bisporus*), Bs94 (*A. bisporus*), Bit (*A. bitorquis*), BiC (*A. bitorquis*).

В глубокой культуре большинство исследуемых штаммов рода *Agaricus* содержало отдельные зернистые

митохондрии и их скопления во всех трех зонах гифы. В клетках мицелия некоторых видов — *A. bisporus* (Bs26, Bs94), *A. excellens*, *A. macrocarpus*, *A. silvicola* — на 3-и сут роста изредка наблюдали длинные нитевидные митохондрии, которые не встречали на 7, 12 и 28-е сут роста. Исключение составляли штаммы BiC, Bit (*A. bitorquis*), у которых на всех этапах наблюдения присутствовали длинные нитевидные митохондрии в зоне 2; количество зернистых митохондрий в зоне 2 несколько возрастало на 28-е сут роста в жидком сусле, однако преобладание нитевидных митохондрий сохранялось.

Таким образом, можно выделить два основных типа морфологии митохондрий (состояний хондриома) при росте мицелия штаммов рода *Agaricus* на разных типах сред. Первое состояние мы наблюдали преимущественно у молодого (3—14 сут роста) мицелия исследуемых штаммов, выращенного на агаризованных средах (СА, КГА), а также в клетках глубоководного мицелия видов *A. bitorquis* (рис. 3). Для этого состояния характерны мелкие зернистые митохондрии в апикальной зоне — 1, длинные, палочковидные в субапикальной зоне — 2, короткие палочковидные и зернистые, полученные в результате фрагментации палочковидных митохондрий в зрелых клетках мицелия — 3.

Второй тип хондриома наблюдали преимущественно в клетках глубоководного и стареющего мицелиев при росте на СА штаммов рода *Agaricus* и в клетках мицелия гомокарионов, а также в клетках молодого и стареющего мицелиев штаммов *Agaricus* при росте на КГА и ГА (рис. 4). Для этого типа характерны шарообразные митохондрии в

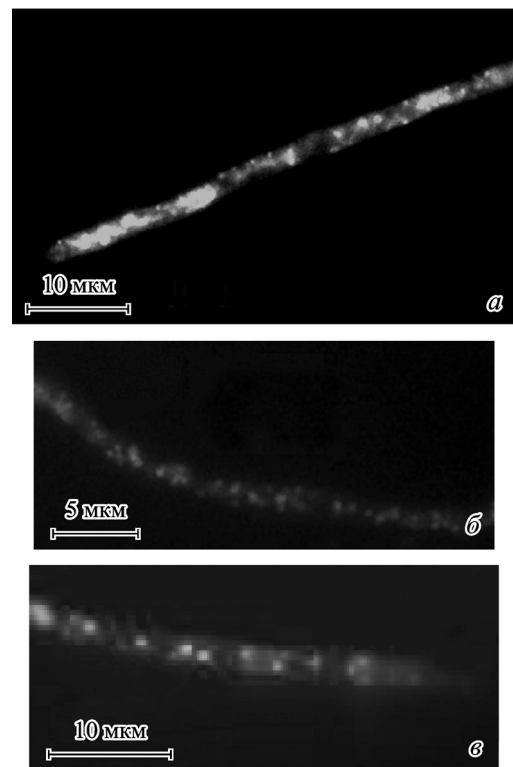


Рис. 2. 2-й тип распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus*.

a — зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика), штамм Aa284 (*A. silvaticus*); *б* — зона 2 (30—100 мкм от апикального кончика), штамм Aa284; *в* — зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика), штамм Aa284. Глубоководные культуры, 7-е сут роста.

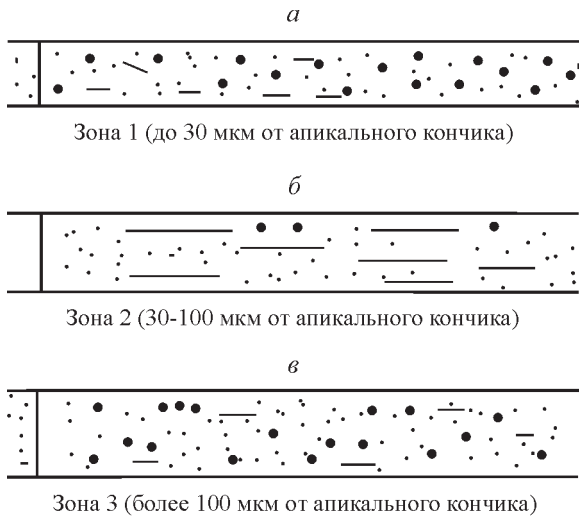


Рис. 3. Схема распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus* (тип 1).

а — зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика) — мелкие зернистые митохондрии; б — зона 2 (30—100 мкм от апикального кончика) — длинные палочковидные митохондрии; в — зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика) — короткие палочковидные и зернистые митохондрии, полученные в результате фрагментации палочковидных митохондрий.

апикальной клетке — 1, скопления шарообразных митохондрий в виде отдельных конгломератов или единичные шаровидные митохондрии в субапикальной зоне — 2 и отдельные шарообразные митохондрии в зрелых клетках мицелия — 3.

В табл. 2 приведены суммарные данные по распределению митохондрий в клетках мицелия у штаммов рода *Agaricus* при разных условиях культивирования.

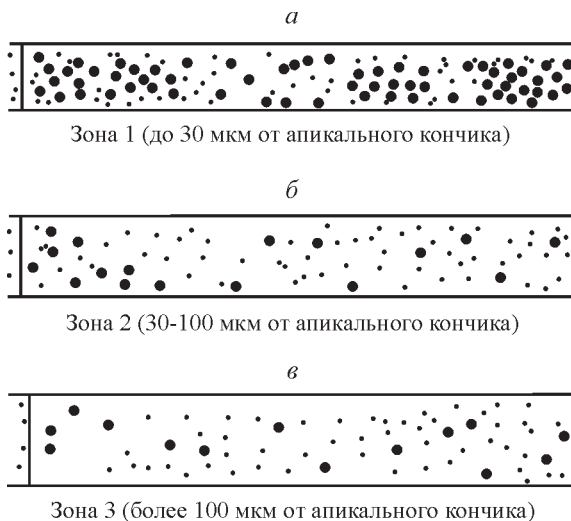


Рис. 4. Схема распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus* (тип 2).

а — зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика) — шарообразные митохондрии; б — зона 2 (30—100 мкм от апикального кончика) — скопления шарообразных митохондрий в виде отдельных конгломератов или единичные шаровидные митохондрии; в — зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика) — шарообразные митохондрии в зрелых клетках мицелия.

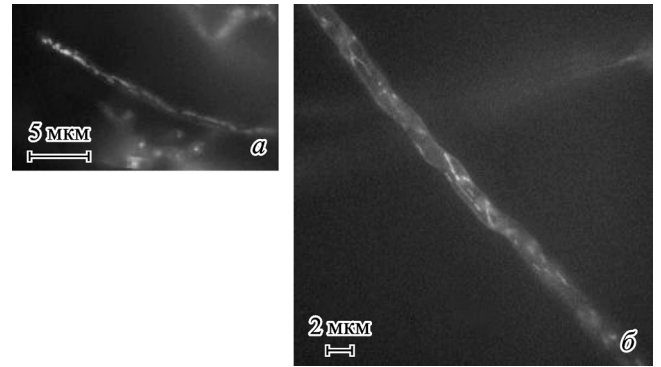


Рис. 5. Морфология митохондрий в апикальной (а, зона 1) и субапикальной (б, зона 2) зонах мицелия в поверхностной культуре. Штамм VP-1 (*P. pulmonarius*), СА, 7-е сут роста.

Морфология митохондрий разных штаммов видов рода *Pleurotus* при росте в поверхностной и глубинной культурах. Для клеток 7- и 14-суточного мицелия видов рода *Pleurotus* были характерны нитевидные и палочковидные митохондрии в зоне

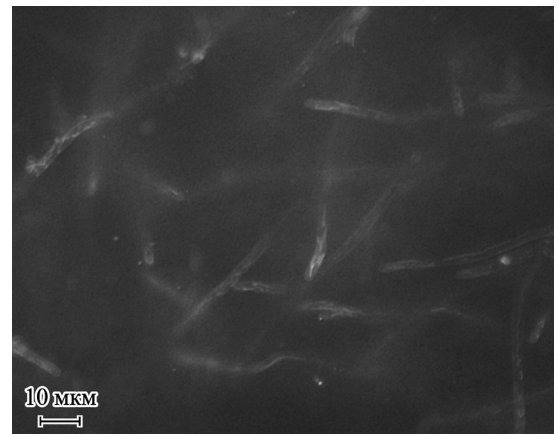


Рис. 6. Митохондрии в глубинной культуре. Штамм VP-1 (*P. pulmonarius*), 7-е сут роста.

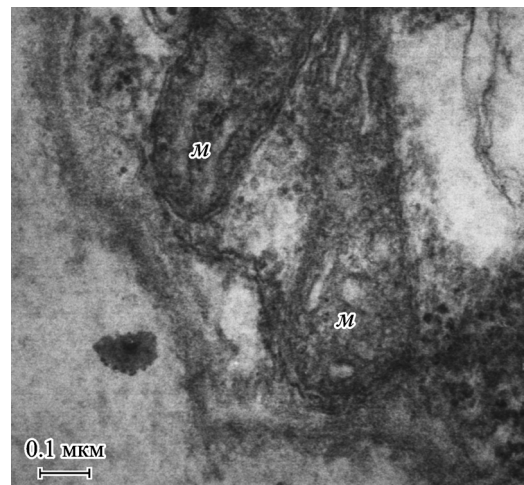


Рис. 7. Митохондрии в поверхностной культуре. Штамм Aahet (*A. arvensis*), СА, 7-е сут роста.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ); м — митохондрии.

Т а б л и ц а 2

Распределение митохондрий в клетках штаммов рода *Agaricus* при разных условиях культивирования

Вид	Штамм	Состояние хондриома				
		поверхностная культура				глубинная культура
		12-е сут роста			28-е сут роста	14-е сут роста
		среда СА	среда КГА	среда ГА	среда СА	среда жидкое сусло
<i>A. arvensis</i>	Aahet	1	2	2	2	2
	Aa5.3	1	—	—	2	2
<i>A. bisporus</i>	Bs26	1	1	2	2	2
	Bs94	1	1	2	2	2
	Bs423	2	2	2	2	2
	U3	1	—	—	2	2
	Bs83	1	—	—	2	2
	Bs84	1	—	—	2	2
	Гомокарионы	2	—	—	2	2
	<i>A. bitorquis</i>	Bit	1	1	2	1
	BiC	1	1	2	1	1
<i>A. campestris</i>	AcA	1	—	—	2	—
	Ac83	1	2	2	2	—
<i>A. excellens</i>	Ae145	1	2	2	2	2
<i>A. macrocarpus</i>	Am150	1	2	2	2	2
<i>A. silvaticus</i>	AsM	1	2	2	2	2
	AsY	1	2	2	2	2
<i>A. silvicola</i>	Aa284	1	2	2	2	2
<i>A. xanthodermus</i>	Ax1517	1	2	2	2	2

Примечание. СА — сусло-агар, КГА — картофельно-глюкозный агар, ГА — голодный агар. 1 — хондриом 1-го типа, 2 — хондриом 2-го типа, «—» — нет данных.

2 с единичными зернистыми митохондриями в апексе при росте на СА, КГА и в глубинной культуре, что соответствует распределению по типу 1 (рис. 5, 6). Следует напомнить, что виды рода вешенка хорошо растут в условиях глубинного культивирования, набирая биомассу сырого мицелия к 7-м сут роста порядка 50—70 г/л данной среды. Небольшое количество нитевидных митохондрий среди основной массы зернистых митохондрий наблюдали на 28-е сут роста на СА. При росте на голодном агаре преобладали зернистые митохондрии.

Исследование ультраструктуры митохондрий у видов родов *Agaricus* и *Pleurotus*. На срезах мицелия митохондрии выглядели довольно крупными структурами относительно размеров клетки, преимущественно удлинёнными или гантелеобразными в сечении. В среднем на клетку приходилось 3—6 крупных митохондриальных профилей. Число митохондриальных профилей на клетку значительно возрастало у всех исследуемых штаммов при культивировании в глубинной культуре (ГК) и достигало 15—20 на клетку. При этом форма митохондриальных профилей была преимущественно шаровидной, и размеры их были значительно меньше, чем размеры митохондриальных профилей в клетках поверхностной культуры (ПК). Митохондрии имели наружную и внутреннюю мембраны. Внутренняя мембра-

на формировала кристы, форма которых варьировала в зависимости от условий культивирования. В ПК у всех штаммов наблюдались преимущественно пластинчатые кристы (рис. 7), в то время как в ГК наблюдались митохондрии с сетчатыми кристами или митохондрии со слабо развитыми кристами (рис. 8). Наружная мембрана митохондрий часто была связана с рибосомами (рис. 9). Природа РНК-содержащих структур (рибосом) была нами показана ранее при обработке мицелия ферментом РНКазой с последующим окрашиванием РНК по Бернару (Камзолкина, 2005). У некоторых штаммов (Bs26 (*A. bisporus*), Bit (*A. bitorquis*), BiC (*A. bitorquis*), AcA (*A. campestris*), Ac83 (*A. campestris*)) наблюдали единичные случаи локализации рибосом на наружной мембране митохондрий в поверхностной культуре. У штаммов As284 (*A. silvicola*) и Bs423 (*A. bisporus*) наблюдали большое количество рибосом на наружной мембране митохондрий в поверхностной культуре. Для штамма Bs423, кроме того, характерно слабое окрашивание мембран митохондрий по сравнению с другими исследуемыми штаммами. Наружная мембрана митохондрий в ГК всех исследуемых штаммов, кроме штаммов вида *A. bitorquis* и штамма Bs423 (*A. bisporus*), была тесно ассоциирована с рибосомами. Степень выраженности данного признака напрямую связана со способностью роста штаммов в ГК. Так, у штаммов, лучше всего

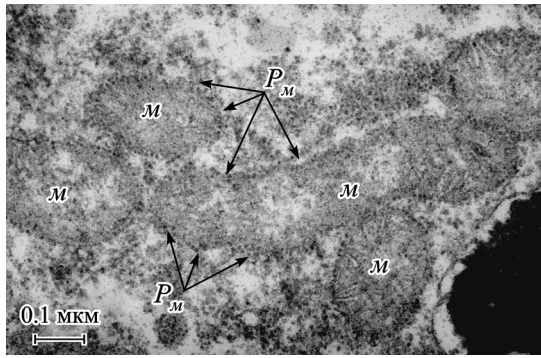


Рис. 8. Митохондрии (M) в глубокой культуре. Штамм Ae145 (*A. excellens*), ГК, 7-е сут роста.

ТЭМ; P_m — рибосомы, ассоциированные с мембраной митохондрий.

растущих в условиях глубокой культуры (*A. bitorquis*, Bs423), ассоциации митохондриальной мембраны с рибосомами обнаружено не было.

Митохондрии видов *Pleurotus* имеют типичное строение. Внутренняя мембрана образовывала многочисленные кристы (рис. 10). Матрикс крист выглядит электронно-плотным по сравнению с внутримитохондриальным матриксом. Строение митохондрий глубокого мицелия отличалось от поверхностного большей плотностью митохондриального матрикса по сравнению с матриксом крист, а также присутствием рибосом на наружной мемб-

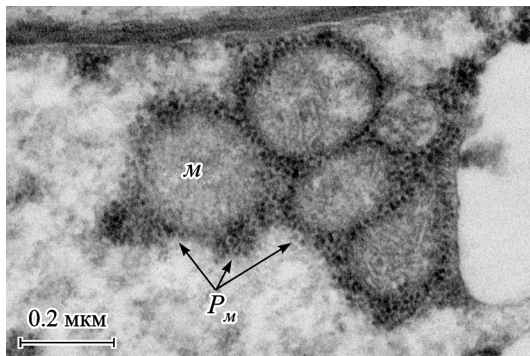


Рис. 9. Митохондрии в поверхностной культуре. Штамм Aa284 (*A. abruptibulbus*), СА, 7-е сут роста.

ТЭМ; M — митохондрии, P_m — рибосомы, ассоциированные с мембраной M.



Рис. 10. Фрагмент клетки поверхностного мицелия. Штамм VP 1 (*P. pulmonarius*), 7-е сут роста.

ТЭМ; M — митохондрии.

ране митохондрий (рис. 11). В некоторых случаях наблюдали единичные рибосомы в ассоциации с митохондриями у фрагментов клеток поверхностного мицелия (рис. 10) и значительно большее их количество в клетках глубокого мицелия (рис. 11).

Нами было высказано ранее предположение о том, что появление ассоциации рибосом и наружной мембраны митохондрий может быть предвестником ускоренного старения и гибели клеток мицелия шампиньона двустороннего (Камзолкина, 2005). Суть нашей гипотезы состоит в том, что под действием стрессового фактора (глубинное культивирование) запускаются митоптоз и апоптоз клеток мицелия.

В литературе описана связь внешней митохондриальной мембраны с цитоплазматическими рибосомами в клетках *Saccharomyces cerevisiae* (Kellems, Butow, 1972, 1974; Kellems et al., 1974, 1975; Watson, 1972), *Rhodotorula rubra* (Keyhani, 1973), в покоящихся спорах *Dictyostelium discoideum* (Cotter et al., 1969) и в клетках млекопитающих (Ades, Butow, 1980; Fünfschilling, Rospert, 1999; Mac Kenzie, Payne, 2004). Предполагается, что механизм связывания рибосом с внешней митохондриальной мембраной подобен механизму связи рибосом с ЭПР (Kellems, Butow, 1972). Показано, что количество связанных рибосом увеличивается в клетках, в которых идет активный синтез белков, и уменьшается, как только темпы синтеза протеинов падают (Loeb et al., 1967; Lee et al., 1971; Kellems et al., 1975). Предполагают, по аналогии с ЭПР, что связанные рибосомы селективно осуществляют перенос митохондриальных белков, синтезируемых на цитоплазматических рибосомах, внутрь митохондрий котрансляционно или сразу после окончания трансляции. На основании этих данных можно предположить, что в случае с глубинным культивированием штаммов рода *Agaricus* происходит интенсивный синтез белков, связанных с процессом ускоренного старения грибной клетки.

Все исследования связи рибосом с митохондриями, описанные в литературе, были проведены *in vitro*, получены только косвенные доказательства существования связи рибосом с митохондриями *in vivo*. Неизвестно также,

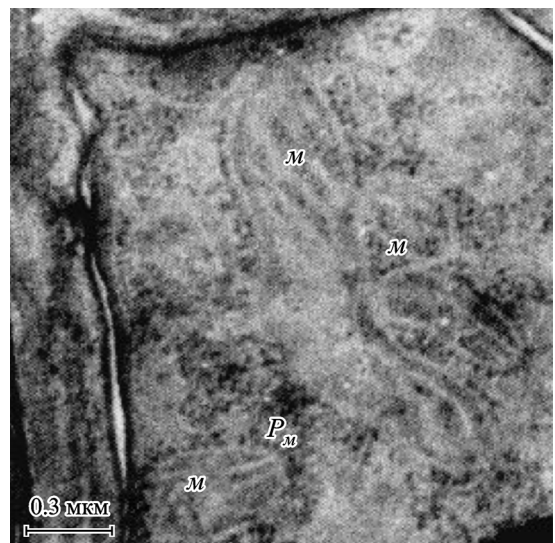


Рис. 11. Ассоциация митохондрий и рибосом в клетках глубокого мицелия. Штамм VP 1 (*P. pulmonarius*), 14-е сут роста.

M — митохондрии, P_m — рибосомы, ассоциированные с мембраной M.



Рис. 12. Клетки поверхностного мицелия Bs94 (*A. bisporus*) после TUNEL-окрашивания на 16-е сут роста.

осуществляется ли *in vivo* импорт протеинов котрансляционно, как в системе *in vitro*, или посттрансляционно. Остается неясной функция связанных с митохондриями рибосом в клетках, в которых не идет активный синтез белков.

Изменения структуры митохондрий и ассоциации их с рибосомами при неблагоприятных условиях культиви-

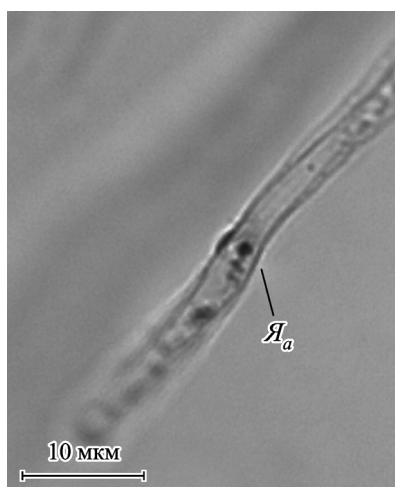


Рис. 13. Клетки глубинного мицелия Bs94 (*A. bisporus*) после TUNEL-окрашивания на 16-е сут роста.

Ja — апоптотическое ядро.

рования для штаммов шампиньона двуспорового являются предвестниками гибели клеток мицелия. Для того чтобы понять, является ли запрограммированной гибель клеток мицелия шампиньона, мы использовали тест на фрагментацию ДНК ядра — TUNEL-анализ, который используется для выявления апоптотических клеток у эукариотических организмов. Проведенный анализ показал присутствие единичных ядер, TUNEL-положительных, в клетках поверхностного мицелия, в то время как в клетках глубинного мицелия наблюдали в несколько раз больше таких ядер (рис. 12, 13). Полученные данные свидетельствуют о выраженном в большей степени апоптозоподобном фенотипе клеток глубинного мицелия по сравнению с поверхностными клетками.

Таким образом, проведенное исследование морфогенеза хондриома в клетках поверхностного и глубинного мицелиев разных штаммов и видов родов *Agaricus* и *Pleurotus* выявило следующие закономерности.

Морфогенез митохондрий в клетках мицелия видов родов *Agaricus* и *Pleurotus* в целом имеет много общего. Это касается распределения митохондрий в клетках мицелия как при благоприятных условиях роста, так и при перестройке хондриома (деление или фрагментация митохондрий на мелкие субъединицы) под действием неблагоприятных условий роста и в процессе старения. Изучалось распределение митохондрий при благоприятных условиях роста мицелия гетерокариотических штаммов видов рода *Agaricus* и *Pleurotus* в течение 7—14 сут на агаризованных средах СА и КГА, а также при культивировании мицелия штаммов вешенки и некоторых штаммов шампиньона в условиях погруженной культуры. Показано, что митохондрии были распределены следующим образом: по типу 1 (мелкие зернистые митохондрии в апикальной зоне — 1, длинные палочковидные в субапикальной зоне — 2 и короткие палочковидные и зернистые, полученные в результате фрагментации палочковидных митохондрий в зрелых клетках мицелия — 3). При неблагоприятных условиях роста (голодание) у мицелия гомокариотических штаммов шампиньона, при длительном культивировании всех штаммов и видов изучаемых родов и при культивировании на жидком сусле для большинства штаммов шампиньона наблюдали распределение митохондрий по типу 2 (шарообразные митохондрии во всех клетках наблюдаемых зон мицелия). На ультраструктурном уровне профили этих митохондрий имели специфические особенности в виде ассоциаций наружной мембраны митохондрий с цитоплазматическими рибосомами и в виде изменения структуры крист. А предварительный тест на апоптозоподобный фенотип клеток глубинного мицелия шампиньона Bs94, практически не растущего в глубинной культуре, дал положительный результат.

Таким образом, морфогенез митохондрий в клетках мицелия видов рода *Agaricus* и видов рода *Pleurotus* при разных условиях и сроках культивирования протекает сходным образом и определяется комплексом физиологических и биохимических процессов, отражающих состояние клеток мицелия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00274).

Список литературы

- Камзолкина О. В. 2005. Микроморфология и ультраструктура агарикоидных грибов на разных стадиях жизненных циклов: Дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ. 251 с.
- Кюппе Д. А. 2005. Программируемая клеточная смерть *Saccharomyces cerevisiae*, вызываемая феромоном: Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ. 157 с.
- Лутвинов М. А. 1969. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука. 64 с.
- Altman K., Westermann B. 2005. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 5410—5417.
- Belcour L. 1981. Mitochondrial DNA and senescence in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 4 : 81—182.
- Borghouts C., Kimpel E., Osiewacz H. D. 1997. Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 10 768—10 773.
- Burgess S. M., Delannoy M., Jensen R. E. 1994. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* 126 : 1375—1391.
- Butt T. M., Hoch H. C., Staples R. C., Leger R. Y. S. 1989. Use of fluorochromes in the study of fungal cytology and differentiation. *Exp. Mycol.* 13 : 303—313.
- Cotter D. A., Miura-Santo L. Y., Hohl H. R. 1969. Ultrastructural changes during germination of *Dyctiostelium discoideum* spores. *J. Bacteriol.* 100 : 1020—1026.
- Cummings D. J., Belcour L., Grandchamp C. 1979. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. *Mol. Gen. Genet.* 171 : 239—250.
- Desagher S., Martinou J. C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10 : 369—377.
- Fünfschilling U., Rosper S. 1999. Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 3289—3299.
- Jamet-Viery C., Begel O., Belcour L. 1980. Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence. *Cell.* 21 : 189—194.
- Jamet-Viery C., Boulay J., Begel O., Silar P. 1999. Contribution of various classes of defective mitochondrial DNA molecules to senescence in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 27 : 26—35.
- Kellems R. E., Allison V. F., Butow R. A. 1974. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 249 : 3297—3303.
- Kellems R. E., Allison V. F., Butow R. A. 1975. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J. Cell Biol.* 65 : 1—14.
- Kellems R. E., Butow R. A. 1972. Cytoplasmic-type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosome binding sites on yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 247 : 8043—8050.
- Kellems R. E., Butow R. A. 1974. Cytoplasmic-type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. III. Changes in the amount of bound ribosomes in response to changes in metabolic state. *J. Biol. Chem.* 249 : 3304—3310.
- Keyhani E. 1973. Ribosomal granules associated with outer mitochondrial membrane in aerobic yeast cells. *J. Cell Biol.* 58 : 480—484.
- Kürk U., Stahl U., Esser K. 1981. Plasmid-like DNA is part of the mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 3 : 151—156.
- Lee S. Y., Krsmanovic V., Brawerman G. 1971. Attachment of ribosomes to membrane during polysome formation in mouse sarcoma 180 cells. *J. Cell Biol.* 49 : 683—691.
- Lewina N. N., Lew R. R. 2006. The role of tip-localized mitochondria in hyphal growth. *Fungal Genet. Biol.* 43 : 65—74.
- Lill R., Mühlenhoff U. 2005. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 30 : 133—141.
- Loeb J. N., Howell R. R., Tomkins G. M. 1967. Free and membrane-bound ribosomes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 242 : 2069—2074.
- Lu B. C. 2006. Programmed cell death in fungi. *The Mycota I. Growth Differentiation and Sexuality.* 167—187.
- Mac Kenzie J. A., Payne R. M. 2004. Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 279 : 9803—9810.
- Marcou D. 1961. Notion de longéité et nature cytoplasmique du déterminant de la senescence chez quelques champignons. *Ann. Sci. Nat. Bot.* 12 : 653—764.
- Pelloquin L., Belenguer P., Menon Y., Ducommun B. 1998. Identification of a fission yeast dynamic-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 : 720—726.
- Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2000. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 2961—2971.
- Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 17 : 208.
- Rizet D. 1953. Sur la longévité des souches de *Podospora anserina*. *CR. Acad. Sci.* 237 : 1106—1109.
- Sellem C. H. 2002. Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging. *Curr. Genet.* 40 : 365—373.
- Stahl U., Lemke P. A., Tudzynski P., Kürk U., Esser K. 1978. Evidence for plasmid like DNA in filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 162 : 341—343.
- Watson K. 1972. The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 55 : 721—726.
- Westermann B., Prokisch H. 2002. Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 36 : 91—97.

Поступила 29 V 2008

MORPHOGENESIS AND ULTRASTRUCTURE OF BASIDIOMYCETES
AGARICUS AND *PLEUROTUS* MITOCHONDRIAE. V. Matrosova, I. S. Mazeyka, O. A. Kudryavtseva, O. V. Kamzolkina¹

Moscow State University, Biological Faculty, Mycology and Algology Department;

¹ e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru

Mitochondrial morphogenesis in 31 strains of 9 species of *Agaricus* — *A. arvensis* Schaeff., *A. bisporus* (Lange) Imbach, *A. bitorquis* (Quel.) Sacc., *A. campestris* L., *A. excellens* (F. H. Möller) F. H. Möller, *A. macrocarpus* (F. H. Möller) F. H. Möller, *A. silvaticus* Schaeff., *A. silvicola* (Vittad.) Peck, *A. xanthodermus* Genev — and 2 strains of *Pleurotus* — *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quel. — has many common features in mitochondria distribution under favorable growth conditions (type 1) and in reconstruction

of chondriom (fission or fragmentation) under unfavorable growth conditions and aging (type 2). The first type of mitochondria distribution was observed in heterokaryotic mycelium of some *Agaricus* strains and *Pleurotus* grown in agar medium during 7—14 days, and also in submerged mycelium of some *Agaricus* strains and *Pleurotus*. The second type of mitochondria distribution was observed in homokaryotic *Agaricus* strains under condition of starvation, in aging mycelium (28 days of growth), and in submerged mycelium of most of *Agaricus* strains. The first type of chondriom consists of small granular mitochondria in the apical cells and long snake-like network in subapical cells, and restores almost completely the mitochondrial network in the aging mycelium cells. The second type of chondriom consists of small granular mitochondria in all cells of mycelium. The surface of chondriom type 2 mitochondrial membrane was usually closely associated with ribosomes and changed crists. Such mycelium cells in *A. bisporus* strain Bs94 were TUNEL positive. So, the types of mitochondria morphogenesis in the *Agaricus* and *Pleurotus* mycelium cells are similar at different time and growth conditions and depend on complex of physiological and biochemical process in the mycelium cells.

Key words: mitochondria morphogenesis, mitochondria ultrastructure, species of *Agaricus* and *Pleurotus* genera.
