

## РОСТ И РАЗВИТИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ВЕРХУШЕК ГИФ *NEUROSPORA CRASSA* В СРЕДЕ С СОРБИТОМ

© Т. В. Потапова,<sup>1,\*</sup> Л. Ю. Бойцова,<sup>1</sup> С. А. Голышев,<sup>1</sup>  
А. Я. Дунина-Барковская,<sup>1</sup> Т. А. Белозерская<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234,

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,  
Москва, 119192, и

<sup>3</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071;

\* электронный адрес: potapova@genebee.msu.su

Известно, что замена в среде легко утилизируемой глюкозы на трудно утилизируемый сорбит приводит у *Neurospora crassa* к активации большого числа ранее репрессированных генов и изменениям метаболизма, которые на клеточном уровне проявляются в значительной вакуолизации цитоплазмы. Исследование морфологических параметров и характеристик роста изолированных верхушечных фрагментов гиф *N. crassa* показало, что в среде с сорбитом изоляция от материнского мицелия приводит к таким же нарушениям согласованности удлинения, ветвления и септирования, как и описанные нами ранее для среды с глюкозой. Изменения метаболизма, вызванные заменой источника углерода, не влияют на размер сегмента гифы и на расстояние от точки роста до 1-й септы, а также на морфологию и распределение ядер.

Ключевые слова: *Neurospora crassa*, верхушечный рост, ветвление, септирование, распределение ядер, межклеточные взаимодействия, сорбит.

Принятые сокращения: ВР — верхушечный рост, CFW — calcofluor white, DAPI — 4',6-диамино-2-фенилиндолил,  $E_m$  — мембранный потенциал,  $V_{el}$  — скорость удлинения гифы.

Мицелиальные грибы осваивают внешнюю среду путем верхушечного роста (ВР) — удлинения на передних концах вегетативных гиф. Для ВР взрослой вегетативной гифы *Neurospora crassa* характерна строгая структурная упорядоченность переднего конца длиной 100—200 мкм по следующим параметрам.

1. Непосредственно на переднем конце располагается Spitzenkorper, или центр распределения везикул (который состоит из везикул, рибосом, актиновых волокон и аморфного материала неизвестной природы) (Davis, 2000). 2. На переднем участке длиной ~20—30 мкм обнаруживаются скопления нитевидных митохондрий (Потапова и др., 2013). 3. На расстоянии ~20—30 мкм от точки роста отсутствуют ядра («зона, свободная от ядер») (Davis, 2000; Freitag et al., 2004; Потапова и др., 2016). 4.  $H^+$ -АТФазы — основные генераторы  $E_m$  у *N. crassa* — встраиваются в плазматические мембраны на расстоянии не ближе ~120 мкм от точки роста (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013). 5. Значение  $E_m$  на переднем участке длиной 150—200 мкм существенно ниже, чем в дистальной части гифы (Slayman, Slayman, 1962; Potapova et al., 1988). 6. На переднем участке длиной 100—150 мкм принципиально меняется характер движения микротрубочек: они уже перемещаются не потоком цитоплазмы, а с помощью собственной векторной сборки-разборки, требующей расхода АТФ, и при этом ориентируются строго

параллельно оси гифы (Mouriño-Pérez et al., 2006; Sugden et al., 2007; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). 7. Первая септальная перегородка образуется на расстоянии не ближе ~150 мкм от точки роста взрослой гифы (Delgado-Álvarez et al., 2014; Потапова и др., 2016).

В создание описанной выше структурно-молекулярной «машины удлинения» (Потапова и др., 2016) может вносить вклад продольное электрическое поле, охарактеризованное в свое время для *N. crassa* в электрофизиологических экспериментах (Slayman, Slayman, 1962; Potapova et al., 1988; Takeuchi et al., 1988).

Мы предлагаем (Потапова и др., 2016; Potapova, Golyshev, 2016) новую экспериментальную модель: верхушечные фрагменты гиф длиной ~400 мкм, которые после изоляции от мицелия продолжают рост в прежнем направлении, но с уменьшением диаметра и скорости удлинения, что очень удобно для количественной оценки параметров флуоресценции. Принципиальное отличие роста и развития этой модели от интактных гиф, связанных с мицелием, — нарушение в стандартных лабораторных условиях ритмичности ветвления с появлением аномально больших межузловых расстояний.

В настоящей работе мы проверили поведение этой модели в условиях замены в среде глюкозы на сорбит. Мицелий *N. crassa*, как правило, выращивают в лабораториях на питательной среде, содержащей легкодоступные

источники углерода — сахарозу или глюкозу (2 %), что приводит к катаболитной репрессии, а именно к ингибированию транспортеров и ферментов, связанных с усвоением альтернативных источников углерода, таких, например, как манноза, мальтоза или галактоза. Удаление из среды легкодоступных источников углерода приводит к «дерепрессии», когда последовательно активируются участки генома, управляющие транспортерами и ферментами, необходимыми для усвоения других углеводных субстратов (Davis, 2000). По оценкам активности 1335 генов *N. crassa*, 19 % из них активируются в условиях дефицита глюкозы (Xie et al., 2004).

Мы исследовали параметры удлинения, септирования и ветвления изолированных верхушек гиф *N. crassa*, а также морфологию и распределение ядер в условиях замены в культуральной среде 2 % глюкозы (легко утилизируемого источника углерода) на 2 % сорбита, утилизация которого требует дополнительных метаболических усилий.

## Материал и методика

**Объект и его выращивание.** Споры *N. crassa* (дикого типа штамма RL3-8a [FGSC 2218]), любезно предоставленные Fungal Genetics Stock Center (Kansas, США), высевали на поверхность агаризованной среды Фогеля, обогащенной 2 % глюкозы; формирующийся мицелий выращивали в течение 1 сут при 24 °С, а затем помещали на 2—3 сут в холодильник при 4 °С. Для экспериментов вырезали из этой запасной культуры небольшой агаровый блок и перекладывали мицелием вниз на такую же среду, покрытую целлофаном. Инкубацию мицелия и все операции проводили при 22—24 °С при освещении красным светом, чтобы избежать перевозбуждения мицелия синей частью светового спектра (Potarova et al., 1984; Соколовский, Белозерская, 2000). Через 15—18 ч вырезали кусочки целлофана размером ~2 × 2 см с передними краями мицелия, тщательно промывали средой Фогеля, содержащей 2 % сорбита вместо глюкозы, и перекладывали мицелием вверх в малые чашки Петри с агаризованной средой, также содержащей сорбит. Через 2 ч, когда верхушки лидирующих гиф выходили на агар за край целлофана на расстояние >2000 мкм, проводили контрольную фотосъемку для оценки скорости удлинения ( $V_{el}$ ) лидирующих верхушек. Для дальнейших экспериментов использовали культуры со значением  $V_{el} > 20$  мкм/мин. У лидирующих гиф изолировали верхушечные фрагменты длиной 300—700 мкм, как описано ранее (Потапова и др., 2011), и наблюдали за их ростом и развитием в течение ~6 ч.

Для визуализации септ кусочек агарового блока с интактными гифами или с изолированными фрагментами вырезали и перекладывали мицелием вниз в камеру с дном из покровного стекла в каплю среды, содержащую 10 мкМ Calcofluor white (CFW, Molecular Probes, США), который благодаря интенсивной флуоресценции при связывании с хитином широко используется для выявления у грибов клеточной стенки и септ (Hickey et al., 2005).

Для выявления ядер культуры фиксировали 3.5%-ным раствором формальдегида в малых чашках Петри в среде Фогеля в течение 10 мин и промывали водой. Затем вырезали кусочек агарового блока с интактными гифами или с изолированными фрагментами и перекладывали мицелием вниз в камеру с дном из покровного стекла в раствор

DAPI (1 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США) — флуоресцентного маркера ядерной ДНК, широко используемого при исследовании грибов (Schnedl et al., 1977; Thompson-Coffee, Zicker, 1994).

**Регистрация и анализ изображений.** С помощью микроскопа Люмам-5 (ЛОМО, Россия), оборудованного согласованной с компьютером фотокамерой EOS 300D (Canon Inc., Китай), с интервалом 1—2 ч проводили фотосъемку в красном свете передних концов гиф или изолированных фрагментов. По этим изображениям оценивали  $V_{el}$  и количество боковых ветвей.

Сигналы CFW и DAPI регистрировали с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), управляемого программным комплексом Axiovision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и оборудованного объективами Plan-Neofluar с увеличениями 10× (NA 0.5) и 100× (NA 1.3). Сигналы CFW и DAPI регистрировали в синем канале (полоса пропускания возбуждающего фильтра 365/12 нм, делительного зеркала — 395 нм и запирающего широкополосного фильтра — 397 нм). Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Для регистрации изображений использовали цифровую камеру ORCA II ERG-2 (Hamamatsu Photonics, Япония).

Анализ изображений проводили с помощью программы AxioVision LE. В качестве характеристик ВР использовали следующие параметры:  $L_0$  — исходная длина изолированного фрагмента;  $\Delta T$  — время после изоляции фрагмента;  $V_{el}$  — скорость удлинения, полученная делением прироста длины на соответствующее время;  $L_{apic}$  — длина апикального сегмента (расстояние от точки роста до 1-й септы);  $L_s$  — длина гифального сегмента (расстояние между соседними септами);  $\Delta T_s$  — средняя продолжительность формирования сегмента. Расстояния и длины измеряли с помощью программы AxioVision LE (Carl Zeiss Microimaging, Германия).

## Результаты и обсуждение

Минимальная длина верхушечного фрагмента, продолжавшего удлиняться после изоляции, составляла примерно 300 мкм. Более короткие фрагменты, как правило, опустевали после операции. Можно предположить, что у 2—3-й септальных перегородок, вновь сформировавшихся на переднем конце, септальные поры еще не способны к закупориванию, которое защищает цитоплазматическое содержимое от вытекания (рис. 1). Изолированные фрагменты длиной около 300 мкм удлиняются намного медленнее, чем соседние с ним ветви гиф, связанные с мицелием, которые в течение ~1 ч закрывают изолированные фрагменты от наблюдения. В связи с этим для продолжительных наблюдений мы после изоляции верхушечных фрагментов механически удаляли материнский мицелий.

По данным, полученным для 51 изолированного верхушечного фрагмента, 5 фрагментов длиной от 150 до 220 мкм полностью потеряли цитоплазму, 19 верхушек длиной от 150 до 400 мкм сохранили цитоплазму, но прекратили удлинение после изоляции, 27 верхушек длиной от 260 до 580 мкм продолжили удлиняться со скоростью от 1.1 до 9.3 мкм/мин, что заметно меньше, чем у интактных гиф.

Изолированный фрагмент, представленный на рис. 2, а с начальной длиной  $L_0 = 330$  мкм, сохранил направление

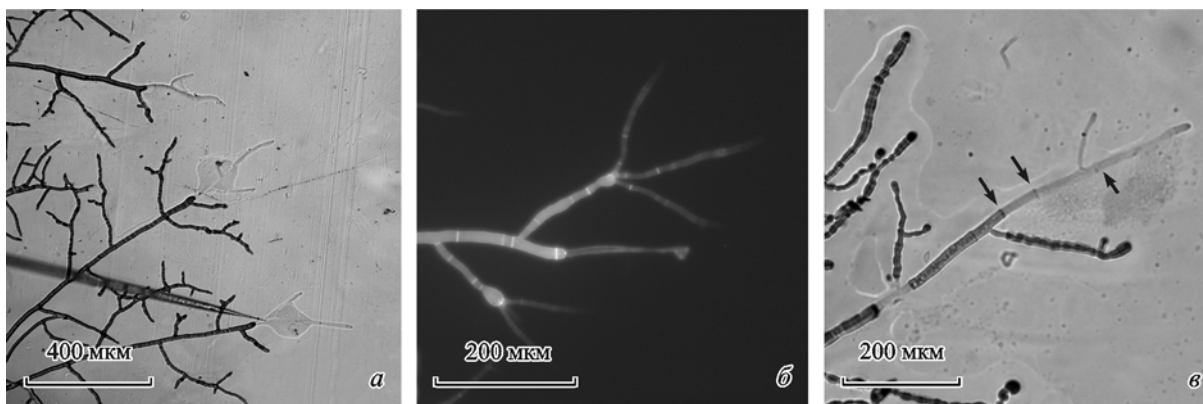


Рис. 1. Эффекты, вызываемые повреждением клеточной стенки и плазмалеммы гиф *Neurospora crassa* микроиглой, зависят от расстояния между зоной повреждения и точкой роста.

*a, б* — повреждение нанесено перед первым узлом ветвления; *a* — фазовый контраст; *б* — флуоресценция Calcofluor white (CFW). *в* — повреждение нанесено вблизи второго узла ветвления (стрелками указано положение септы).

удлинения. Через 3 ч роста без связи с мицелием, когда  $V_{el}$  этого фрагмента составляла 5.5 мкм/мин, у него была изолирована верхушка длиной ~400 мкм с помощью локального повреждения микроиглой (рис. 2, б). Эта операция привела к уменьшению  $V_{el}$  до 1.8 мкм/мин, но не изменила направление удлинения. После 60-минутного автономного роста этого фрагмента он состоял из верхушечного сегмента длиной 154 мкм и еще 6 сегментов длиной соответственно 90, 66, 45, 64, 45 и 47 мкм (рис. 2, в). Еще через 30 мин  $V_{el}$  этого фрагмента увеличилась до 4.0 мкм/мин и у него сформировалась 1 новая септа, так что появился верхушечный сегмент длиной 214 мкм и следом за ним — сегмент длиной 55 мкм (рис. 2, г). На рис. 2, д у этого фрагмента видна интенсивная вакуолизация цитоплазмы, характерная для изменений метаболизма при дефиците глюкозы.

Вакуоли у *N. crassa* принимают участие в запасании и утилизации питательных веществ, поддержании рН и ионного баланса и т. п. (Robertson, Rizvi, 1968; Davis, 2000; Slayman et al., 1994; Potapova et al., 2007; Bowman, Bowman, 2010). Усиленное образование вакуолей начинается через несколько минут после помещения гриба в среду с дефицитом глюкозы, а через несколько часов вакуоли уже занимают до 80 % внутригифального пространства (Slayman, Potapova, 2006; Potapova et al., 2007; Потапова и др., 2008).

В таблице и на рис. 3 суммированы данные для 20 интактных гиф и 9 изолированных фрагментов, имевших в среднем  $L_0 = 462 \pm 86$  мкм. При росте в среде с сорбитом, как и в среде с глюкозой (Потапова и др., 2016), оказалось нарушенным ветвление, но сохранились стабильными величина сегмента гифы и расстояние от точки роста до 1-й септы.

Благодаря сниженной скорости удлинения и меньшему диаметру гиф у изолированных фрагментов мы отчетливо наблюдали ядра (рис. 4) и смогли количественно оценить их расположение и морфологию, не обнаружив по этим показателям принципиальных отличий от известных для вегетативных гиф *N. crassa* в стандартных лабораторных условиях (Davis 2000). На верхушках гиф была зона, свободная от ядер, за пределами которой ядра располагались друг за другом через 4—7 мкм. Иногда ядра образовывали небольшие группы с промежутками между ними 10—15 мкм.

Таким образом, независимо от метаболических изменений, вызываемых заменой в среде источника углерода, изолированные верхушечные фрагменты гиф *N. crassa*, во-первых, продолжают удлиняться в прежнем направлении, но с меньшим диаметром и с меньшей скоростью по сравнению с интактным мицелием; во-вторых, поддерживают такими же, как у интактного мицелия, длину сегмента и расстояние от точки роста до 1-й септы; в-третьих, не образуют боковых ветвей в первые 1—2 ч после изоляции; в-четвертых, не обнаруживают изменений в морфологии и распределении ядер.

В настоящее время не очень понятны детали метаболизма сорбита у *N. crassa*. Предполагается, что у этого гриба сорбит поступает из среды с помощью переносчика аквапорина. Аквапорины (акваглицеропорины) относятся к группе трансмембранных переносчиков полиолов. Они встречаются у разных видов грибов (Pettersson et al., 2005; Hohmann, 2007) и принимают участие в защите от осмотического стресса (Liu et al., 2015).

Близкий родственник *N. crassa* гриб-аскомицет *Aspergillus niger*, также как *N. crassa*, способен использовать сорбит как источник углерода. У этого гриба есть сорбитолдегидрогеназа, которая катализирует превращение сорбита во фруктозу, используя как кофактор NAD (Desai et al., 1969; Jennings, 1985). Полученная фруктоза используется в процессе гликолиза. В геноме *N. crassa* присутствуют два гена аквапорина *NCU01905* и *NCU07022*. Аминокислотная последовательность предполагаемого белка, кодируемого *NCU07022*, на 24.9 % идентична аминокислотной последовательности сорбитолдегидрогеназы *A. niger* (UniProt: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A117E3U8>). Функциональные свойства этого белка *N. crassa* пока не изучены.

Наиболее консервативными и стабильными параметрами ВР, устойчивыми к замене легко метаболизируемого источника углерода на более трудно метаболизируемый, оказались величина сегмента (расстояние между соседними септами) и расстояние от точки роста до 1-й септальной перегородки. При анализе этих данных мы выявили еще один характерный параметр — время формирования сегмента, который оказался в непосредственной зависимости от скорости удлинения (рис. 5). Если у интактных гиф, растущих со скоростью 20 мкм/мин и более, время формирования сегмента составляет 2—3 мин,

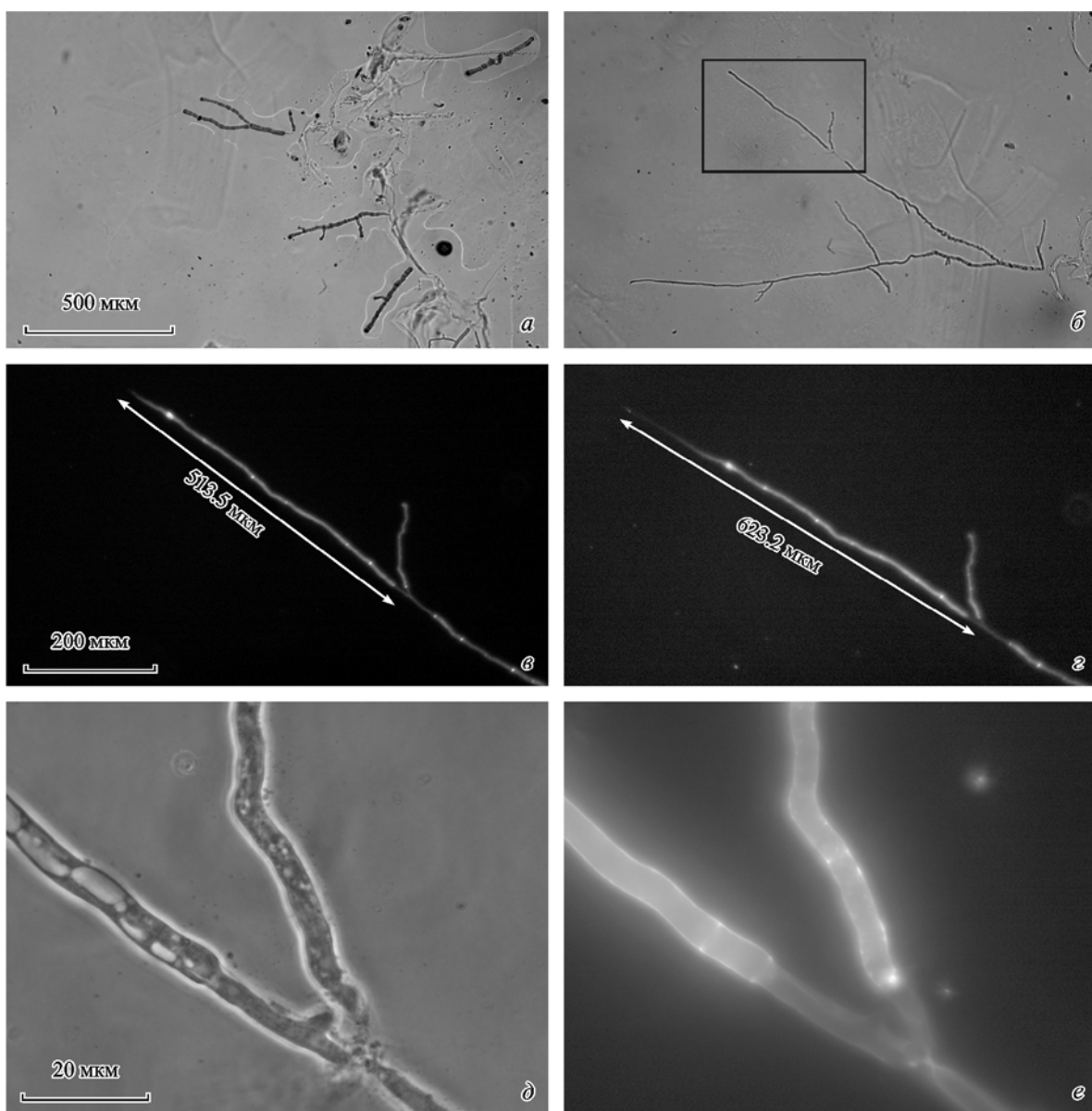


Рис. 2. Удлинение и развитие типичных изолированных верхушечных фрагментов *Neurospora crassa*.

*a* — три фрагмента длиной 330, 320 и 260 мкм полностью отделены от материнского мицелия; *б* — спустя 3 ч верхушка фрагмента  $L_0 = 330$  мкм была изолирована вторично путем нанесения локального повреждения микроиглой (выделено рамкой): длина повторно изолированного фрагмента ~400 мкм; *в* — флуоресценция CFW в повторно изолированном фрагменте через 60 мин после изоляции; *г* — тот же фрагмент еще через 30 мин; *д, е* — зона локального повреждения: фазовый контраст (*д*) и флуоресценция CFW (*е*). Масштабные отрезки: *а, б* — 500 мкм; *в, г* — 200 мкм; *д, е* — 20 мкм.

#### Характеристики ВР интактных гиф и изолированных верхушек гиф в среде с сорбитом

Вариант опыта	Диаметр, мкм	$V_{el}$ , мкм/мин	Длина, мкм				$\Delta T_s$ — время формирования нового сегмента, мин
			от точки роста до 1-го узла ветвления	апикального сегмента	гифы между двумя узлами ветвления	$L_s$ (расстояние между двумя септами)	
Интактные гифы (n = 20)	$11.6 \pm 0.4$	$18.9 \pm 1.0$	$171.0 \pm 2.4$	$209.5 \pm 9.3$	$161 \pm 24$	$70.3 \pm 1.7$	$4.3 \pm 0.5$
Изолированные верхушки гиф (n = 9)	$7.2 \pm 0.3$	$8.9 \pm 1.5$	$473 \pm 71$	$239 \pm 15$	Не было ветвлений	$72.1 \pm 3.9$	$11.6 \pm 2.0$

Примечание. Даны средние величины и их ошибка. Для интактных гиф  $V_{el}$  измеряли непосредственно по ходу регистрации свечения CFW, для изолированных от мицелия фрагментов — вычисляли как отношение прироста к соответствующему интервалу времени. Для интактных гиф  $\Delta T_s$  вычисляли исходя из данных о длине участка верхушки, наблюдаемого в поле зрения (600—700 мкм), числа сегментов в данном поле зрения и непосредственно регистрируемой  $V_{el}$ . Для фрагментов  $\Delta T_s$  вычисляли как время после изоляции, деленное на число вновь образовавшихся сегментов.

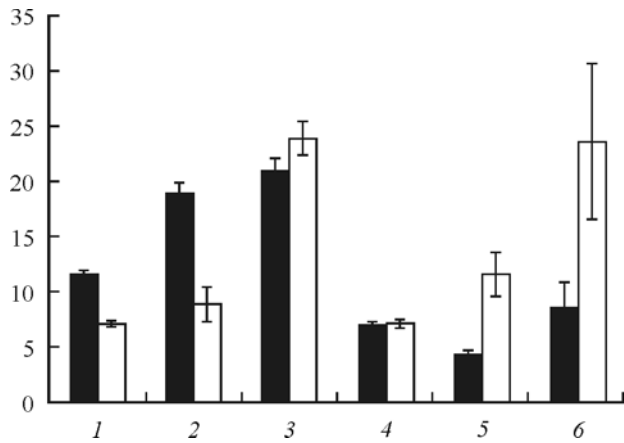


Рис. 3. Морфологические характеристики intactных гиф *Neurospora crassa* (черные столбики) и изолированных верхушечных фрагментов (белые столбики) в среде с сорбитом вместо глюкозы.

1 — диаметр, 2 — скорость роста, 3 — средняя длина верхушечного сегмента (показано 0.1 длины), 4 — средняя длина сегмента (показано 0.1 длины), 5 — среднее время формирования сегмента, 6 — среднее расстояние от верхушки до первого узла ветвления (показано 0.05 расстояния). По вертикали — значения параметров 1, 3, 4, 6, мкм; 2 — мкм/мин; 5 — мин. Вертикальные отрезки — стандартная ошибка среднего.

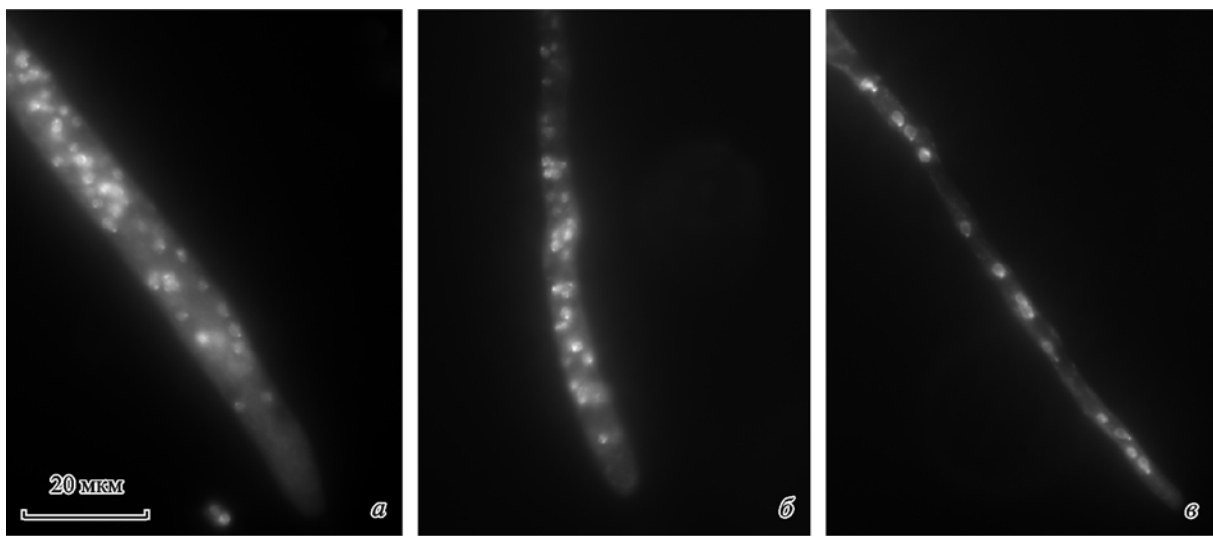
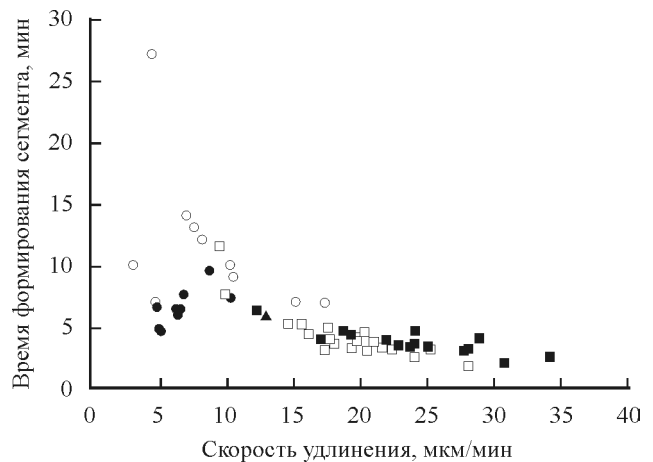


Рис. 4. Распределение ядер в верхушках гиф.

*a* — лидирующая верхушка гифы, связанной с мицелием; *b* — апикальный сегмент ветви первого порядка связанной с мицелием гифы; *в* — лидирующая верхушка фрагмента, изолированного от материнского мицелия. Ядра окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Рис. 5. Связь между скоростью удлинения гиф и временем формирования септ (сегментов).

Квадратики — intactный мицелий, кружки — изолированные верхушечные фрагменты. Светлые символы — среда с сорбитом, темные символы — среда с глюкозой (показано для сравнения по: Потапова и др., 2016). Темный треугольник — значение, полученное для intactных гиф в среде с глюкозой в экспериментах с GFP (Delgado-Álvarez et al., 2014).



то у изолированного фрагмента, представленного на рис. 2, при  $V_{el} = 1.8$  мкм/мин на формирование сегмента длиной 55 мкм потребовалось 29.5 мин.

Важнейшей функцией септальных перегородок является деление гифы на сегменты, которые при локальном повреждении смогут выжить и дать начало новому мицелию. Очевидно, что такой сегмент должен обладать набором структур, необходимых и достаточных для выживания и дальнейшего развития. С помощью прижизненных флуоресцентных маркеров описана на молекулярно-генетическом уровне последовательность событий при формировании 1-й септы в процессе ВР (Mouriño-Pérez, 2013; Mouriño-Pérez, Riquelme, 2013; Delgado-Álvarez et al., 2014; Riquelme, Martínez-Núñez, 2016). Сначала на расстоянии ~165 мкм от точки роста в кортикальном слое цитоплазмы появляется особый актомиозиновый клубок (SAT), который затем преобразуется в сократимое актомиозиновое кольцо (CAR) одновременно с локальным впячиванием плазматической мембраны, затем CAR сокращается, продолжается впячивание мембраны, и образуется поперечная клеточная стенка. После образования поперечной стенки часть молекул, составляющих SAT (актина и миозина-2), покидает это место и мигрирует к следующему месту септирования, где SAT закоривается и дает начало новому CAR.

Увеличенная длина 1-го сегмента по сравнению с остальными может быть обусловлена особой структурной упорядоченностью передних 100—200 мкм, в частности наличием на этом участке гифы жесткой системы микротрубочек (Sugden et al., 2007) и скопления нитевидных митохондрий (Potapova 2012; Потапова и др., 2013). Вся эта совокупность внутриклеточных структур может чисто механически препятствовать приближению SAT к точке роста. Тем не менее остается вопрос: что служит сигналом к закориванию SAT, когда нет механических препятствий к продвижению вперед, и как этот механизм отслеживает расстояние от предыдущей септы?

Формирование боковых ветвей оказалось в среде с сорбитом, как и ранее в среде с глюкозой (Потапова и др., 2016), чувствительно к изоляции от мицелия. Принято считать, что для нормального ВР необходимо поступление на передний конец гифы ядер из участков гифы, удаленных на ~960 мкм. В каждом сегменте взрослой гифы содержится 20—30 ядер размером 2—3 мкм, которые делятся асинхронно с периодом 80—90 мин (Davis, 2000) и переносятся вдоль гифы потоком цитоплазмы (Abadeh, Lee, 2013). Время задержки в ветвлении изолированных фрагментов примерно соответствует продолжительности цикла деления ядер, однако для установления конкретных механизмов роли временного дефицита ядер в нарушении ветвления при ВР изолированных от мицелия фрагментов необходимы дополнительные исследования.

Авторы благодарны К. Л. Слэйману (C. L. Slayman, Yale Univ., США) за обсуждение полученных результатов, а также И. Н. Сытенко (ООО «ДиакомLTD») за предоставленную цифровую камеру Canon.

Работа выполнена в рамках государственной программы № 0120.0 894191.

## Список литературы

- Потапова Т. В., Алексеевский Т. А., Бойцова Л. Ю. 2008. Особенности роста изолированных верхушек гиф *N. crassa* при углеродном голодании. Докл. РАН. 421 (3) : 278—281. (Potapova T. V., Alekseevskii T. A., Boitsova L. Y. 2008. The growth of the isolated hyphal apices of *Neurospora crassa* under carbon starvation. Dokl. Biol. Sci. 421 : 278—281.)
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю., Гольшев С. А., Дунина-Барковская А. Я. 2016. Верхушечный рост *Neurospora crassa* при дефиците ресурсов: нарушение согласованности удлинения, ветвления и септирования. Цитология. 58 : 634—645. (Potapova T. V., Boitsova L. Yu., Golyshhev S. A., Dunina-Barkovskaya A. Ya. 2016. Tip growth of *Neurospora crassa* upon resource shortage: disturbances of the coordination of elongation, branching, and septation. Cell Tissue Biol. 10 (6) : 486—499.)
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю., Гольшев С. А., Попинако А. В. 2013. Организация митохондрий в растущих гифах *Neurospora crassa*. Цитология. 55 (11) : 828—836. (Potapova T. V., Boitsova L. Yu., Golyshhev S. A., Popinako A. V. 2014. The organization of mitochondria in growing hyphae of *Neurospora crassa*. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). 8 (2) : 166—174.)
- Abadeh A., Lee R. R. 2013. Mass flow and velocity profiles in *Neurospora* hyphae: partial plug flow dominates intra-hyphal transport. Microbiology. 159 : 2386—2394.
- Bowman E. J., Bowman B. J. 2010. Vacuoles in filamentous fungi. In: Cellular and molecular biology of filamentous fungi. Washington: ASM Press. Ch. 14 : 179—190.
- Davis R. H. 2000. *Neurospora*: contributions of a model organism. Oxford: Oxf. Univ. Press. 576 p.
- Delgado-Álvarez D. L., Bartnicki-García S., Seiler S., Mouriño-Pérez R. R. 2014. Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. PLoS ONE. 9 (5) : e96744. Doi 10.1371/journal.pone.0096744.
- Desai B. M., Modi V. V., Shah V. K. 1969. Studies on polyol metabolism in *Aspergillus niger*. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase. Arch. Microbiol. 67 : 16—20.
- Fajardo-Somera R. A., Bowman B., Riquelme M. 2013. The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell. 12 : 1097—1105.
- Freitag M., Hickey P. C., Raju N. B., Selker E. U., Read N. D. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 41 : 897—910.
- Held M., Edwards C., Nicolau D. V. 2010. Temporal and spatial *in vivo* optical analysis of microtubules in *Neurospora crassa*. In: Imaging, manipulation, and analysis of biomolecules, cells, and tissues. VIII. San Francisco: SPIE. 7568 : 75680V-1.
- Hohmann S. 2007. Integrative analysis of yeast osmoregulation. In: Stress in yeast and filamentous fungi. New York: Acad. Press. Ch. 8 : 109—128.
- Jennings D. H. 1985. Polyol metabolism in fungi. Advances Microb. Physiol. 25 : 150—193.
- Liu X.-D., Wei Y., Zhou X.-Y., Pei X., Zhang S.-H. 2015. *Aspergillus glaucus* aquaglyceroporin gene *glpF* confers high osmosis tolerance in heterologous organisms. Appl. Environ. Microbiol. 81 : 6926—6937.
- Mouriño-Pérez R. R. 2013. Septum development in filamentous ascomycetes. Fungal Biol. Rev. 27 : 1—9.
- Mouriño-Pérez R. R., Riquelme M. 2013. Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. Advan. Genet. 83 : 99—134.
- Mouriño-Pérez R. R., Robertson R. W., Bartnicki-García S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. Fungal Gen. Biol. 43 : 389—400.
- Pettersson N., Filipsson C., Becit E., Brive L., Hohmann S. 2005. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. Biol. Cell. 97 : 487—500.
- Potapova T. V. 2012. Cell-to-cell communication in the tip growth of mycelial fungi. In: Biocommun. Fungi. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 103—114.

- Potapova T. V., Alexeevskii T. A., Boitzova L. Yu., Slayman C. L. 2007. Endogeneous energization of growth in *Neurospora*, during carbon starvation. Abstracts of XV Congress of European Mycologists. St. Petersburg, Russia. September, 16—21, 2007. 176.
- Potapova T. V., Aslanidi K. B., Belozerskaya T. A., Levina N. N. 1988. Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. (Transfer of energy from proximal to apical cells.) FEBS Lett. 241 : 173—176.
- Potapova T. V., Golyshev S. A. 2016. Revisiting a special structural order of a growing tip of the *Neurospora crassa* hypha. Fungal Genom Biol. 6 : 135—138.
- Riquelme M., Freitag M., Leon-Hing E. S., Bowman B. 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newsl. 52 (Suppl.) : 53.
- Riquelme M., Martinez-Nunez L. 2016. Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: a model organism for all seasons. F1000Research. 5 : 2801. Doi 10.12688/f1000research.9679.1.
- Riquelme M., Yarden O., Bartnicki-Garcia S., Bowman B., Castro-Longoria E., Free S. J., Fleibner A., Freitag M., Lew R., Mouriño-Pérez R., Plamann M., Rasmussen C., Richthammer C., Roberson R. W., Sanchez-Leon E., Seiler S., Watters M. K. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha — a model cell for polarized growth. Fungal Biol. 115 : 446—474.
- Robertson N. F., Rizvi S. R. H. 1968. Some observations on the water-relations of the hyphae of *Neurospora crassa*. Ann. Bot. 32 : 279—291.
- Roca M. G., Kuo H.-Ch., Lichius A., Freitag M., Read N. D. 2010. Nuclear dynamics, mitosis and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. Eukar. Cell. 9 : 1171—1183.
- Roper M., Ellison C., Taylor J. W., Glass N. L. 2011. Nuclear and genome dynamics in multinucleate ascomycete fungi. Curr. Biol. 21 : R786—R793.
- Roper M., Simonin M., Hickey P. C., Leeder A., Glass N. L. 2013. Nuclear dynamics in a fungal chimera. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 110 : 12 875—12 880.
- Slayman C. L., Moussatos V. V., Webb W. W. 1994. Endosomal accumulation of pH indicator dyes delivered as acetoxymethyl esters. J. Exp. Biol. 196 : 419—438.
- Slayman C., Potapova T. 2006. Origin and significance of vacuolar proliferation during nutrient restriction. In: *Neurospora* 2006. Poster Abstracts. № 27. <http://www.fgsc.net/asil2006/2006PosterAbstracts.htm>.
- Slayman C. L., Slayman C. W. 1962. Measurements of membrane potential in *Neurospora*. Science. 136 : 876—877.
- Sugden K. E. P., Evans M. R., Poon W. C. K., Read N. D. 2007. Model of hyphal tip growth involving microtubule-based transport. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys Rev. E75 : 031 909. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.75.031909>.
- Takeuchi Y., Schmid J., Caldwell J. H., Harold F. M. 1988. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae. J. Membr. Biol. 101 : 33—41.
- Xie X., Wilkinson H. H., Correa A., Lewis Z. A., Bell-Pedersen D., Ebbole D. J. 2004. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 41 : 1104—1119.

Поступила 5 X 2017

#### GROWTH AND DEVELOPMENT OF ISOLATED HYPHAL TIPS OF *NEUROSPORA CRASSA* IN THE SORBITOL-CONTAINING MEDIUM

T. V. Potapova,<sup>1,\*</sup> L. Yu. Boitzova,<sup>1</sup> S. A. Golyshev,<sup>1</sup>  
A. Ya. Dunina-Barkovskaya,<sup>1</sup> T. A. Belozerskaya<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow M. V. Lomonosov State University, Moscow, 119234,

<sup>2</sup> Biology Department, Moscow M. V. Lomonosov State University, Moscow, 119192, and

<sup>3</sup> A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071;

\* e-mail: potapova@genebee.msu.su

It is known that replacement of easily metabolized glucose by non-utilizable sorbitol in the growth medium induced activation of previously repressed genes in *Neurospora crassa* and alterations in metabolism manifested in a substantial vacuolization of the cytoplasm. Studies of morphological parameters and growth characteristics of *N. crassa* isolated hyphal tips have shown that isolation from the mycelium led to the same impairments in the elongation, branching, and septation coherence as were described earlier for the isolated tips growing in glucose-supplemented medium. Metabolic shifts induced by the substitution of the carbon source did not affect hyphal segment size, distance between growing tip and the first septum, and morphology and spatial distribution of the nuclei.

**Key words:** *Neurospora crassa*, tip growth, branching, septation, distribution of the nuclei, intercellular interactions, sorbitol.