УДК: 575.21: 582.287.112

С.Л. Мірось, Н.С. Бобрешова, В.О. Кучеров, К.П. Буга, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

МОДИФІКАЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ *AURICULARIA AURICULA-JUDAE* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ

Мета. *Визначення особливостей модифікаційної мінливості вегетативного міцелію Auricularia auricula-judae залежно від складу поживного середовища за ростовим коефіцієнтом, морфологією колоній та множинними молекулярними формами карбоксилестераз у вегетативному міцелії.* ***Методи.*** *Вегетативний міцелій Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Quél. штаму ONU F201 вирощували на таких середовищах: агаризоване пивне сусло (СА) – контрольний варіант, пшеничний агар (ПА), вівсяний агар (ВА), ячмінний агар (ЯА), гречаний агар (ГА), просяний агар (ПрА), картопляно-глюкозний агар з підвищеним вмістом глюкози (КГА 10 %). Визначали модифікований ростовий коефіцієнт (PKj) та морфологію отриманих колоній. За допомогою електрофоретичного розділення у 7% поліакриламідному гелі встановлювали кількість множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестераз у міцелії з кожного варіанту. Статистичну обробку даних проводили згідно з використанням непараметричного критерію Уілкоксона.* ***Результати.*** *Показано, що залежно від складу субстрату характер росту колоній може змінюватися від щільної, ватоподібної, високої, швидкозростаючої до павутиноподібної, невисокої, повільнозростаючої, кількість ізоформ ферменту варіює від 2 до 10. Причому порядок ранжування за кількістю ізоформ не збігається з таковим за ростовим коефіцієнтом міцелію.* ***Висновки.*** *Вегетативний міцелій A. auricula-judae виказує широку модифікаційну мінливість при культивуванні на різних середовищах, як за морфологічними так і за біохімічними ознаками. Залежно від складу поживного середовища у міцелії A. auricula-judae експресується від 2 до 10 ізоформ карбоксилестерази, з яких тільки дві – з Rf 0,50 та 0,54, виявляються у всіх варіантах досліджуваних поживних середовищ.*

Ключові слова: Auricularia auricula-judae,модифікаційна мінливість, ростовий коефіцієнт, морфологія колоній, ізоформи карбоксилестерази.

Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Quél., або іудине вухо – широко відомий лікарський базидіоміцет, що поступово вводиться у промислове культивування у різних країнах світу з метою отримання біологічно активних речовин [1, 2]. У зв'язку з цим актуальним стає дослідження його модифікаційної мінливості не тільки на рівні морфології колоній, а й на рівні ферментних систем.

Як демонструють дослідження, карбоксилестерази, що відносяться до групи неспецифічних серинових гідролаз є достатньо показовими у цьому плані ферментами [3–5]. Вивчення експресивності множинних молекулярних форм

© С.Л. Мірось, Н.С. Бобрешова, В.О. Кучеров, К.П. Буга, В.О. Іваниця, 2014

ферментів разом з мінливістю морфологічних ознак може дати уявлення про те, на якому саме етапі трапляються модифікаційні зміни.

Метою дослідження було вивчення особливостей модифікаційної мінливості вегетативного міцелію *A. auricula-judae* залежно від складу поживного середовища за ростовим коефіцієнтом, морфологією колоній та множинними молекулярними формами карбоксилестераз у вегетативному міцелії.

Матеріали та методи

У роботі використовували штам *Auricularia auricula-judae* (Bull.: Fr.) Quél. ONU F201. Вивчення швидкості росту вегетативного міцелію, його культуральних та морфологічних особливостей проводили на щільних середовищах (табл. 1): агаризоване пивне сусло (СА) – контрольний варіант, пшеничний агар (ПА), вівсяний агар (ВА), ячмінний агар (ЯА), гречаний агар (ГА), просяний агар (ПрА), картопляно-глюкозний агар з підвищеним вмістом глюкози (КГА 10 %).

Таблиця 1

Компоненти експериментальних поживних середовищ

Table 1

Components of experimental culture media

Середовище	Компоненти	Кількість
Агаризоване пивне сусло (СА) pH 6,0	Пивне сусло 8 % Агар-агар	1 л 20 г
Пшеничний агар (ПА) pH 5,5	Зерно пшениці H_2O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Вівсяний агар (ВА) pH 6	Зерно вівса H_2O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Ячмінний агар (ЯА) pH 5,8	Зерно ячменю H_2O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Гречаний агар (ГА) pH 5,8	Зерно гречки H_2O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Просяний агар (ПрА) pH 6,0	Зерно проса H_2O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Картопляно-глюкозний агар (КГА 10 %) pH 6,5	Картопля H_2O Глюкоза Агар-агар	300 г 1000 мл 100 г 20 г

Зерно відповідного злаку заливали холодною водопровідною водою і залишали на 2–3 год. Набрякле зерно нагрівали на водяній бані 30 хв при температурі 60 °С, потім охолоджували та фільтрували. Далі відвар переливали у скляні колби, додавали агар та автоклавували при 1 атм впродовж 30 хв. Після стерилізації середовище розливали в чашки Петрі, охолоджували та засівали маточним міцелієм 7 добової культури *A. auricula-judae*, вирощеної на сусло-агарі. Вирізаний агаровий блок з вегетативним міцелієм діаметром 1 см поміщали у центр поверхні дослідного середовища та переносили у камеру з температурою 27 °С без освітлення. Експеримент проводили у трьох повторах.

Модифікований ростовий коефіцієнт (*PKj*) розраховували за формулою [6]:

$$PKj = \frac{dhgj}{t},$$

де *d* – діаметр колонії, мм; *h* – висота колонії, мм; *g* – щільність колонії в балах (оцінюються за трибальною шкалою: 1 – павутинна, 2 – середня, 3 – щільна); *j* – однорідність колонії в балах (оцінюється за чотирьохбальною шкалою: 1 – міцелій неоднорідний, з островками щільного, або повітряного міцелію, 2 – неоднорідна колонія, міцелій відрізняється за морфологією тільки в окремій зоні, 3 – присутність міцелію, який відрізняється за морфологією незначна, 4 – міцелій однорідний); *t* – вік колонії, доба.

Вивчення культурально-морфологічних ознак вищих базидіоміцетів на різних агаризованих середовищах проводили, використовуючи критерії, описані А.С. Бухало [7]. Враховували тип колонії та її колір, щільність колонії, край та характер її зовнішньої лінії.

Статистичну обробку даних проводили згідно [8] з використанням непараметричного критерію Уілкоксона.

Визначення множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестераз проводили за допомогою електрофоретичного розділення у 7% поліакриламідному гелі згідно стандартної методики [9], оптимізованої для вивчення карбоксилестераз грибів [10]. Вегетативний міцелій для приготування екстрактів для електрофорезу відбирали з чашок Петрі після того, як він досягав максимального діаметру. Як екстрагент використовували 0,1 М гліцин-NaOH буфер з 1% тритону Х-100. Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомогою комп'ютерної програми «АнаИС».

Результати та їх обговорення

Вивчення морфологічних ознак досліджуваного штаму показало, що значення модифікованого ростового коефіцієнту при культивуванні *A. auricula-judae* на еталонному середовищі – сусло-агарі, що зазвичай використовується для первинної ідентифікації штаму за морфологією міцеліальної колонії [11], складало 37,9 (табл. 2).

Таблиця 2

Значення модифікованого ростового коефіцієнту при культивуванні *A. auricula-judae* ONU F201 на різних поживних середовищах

Table 2

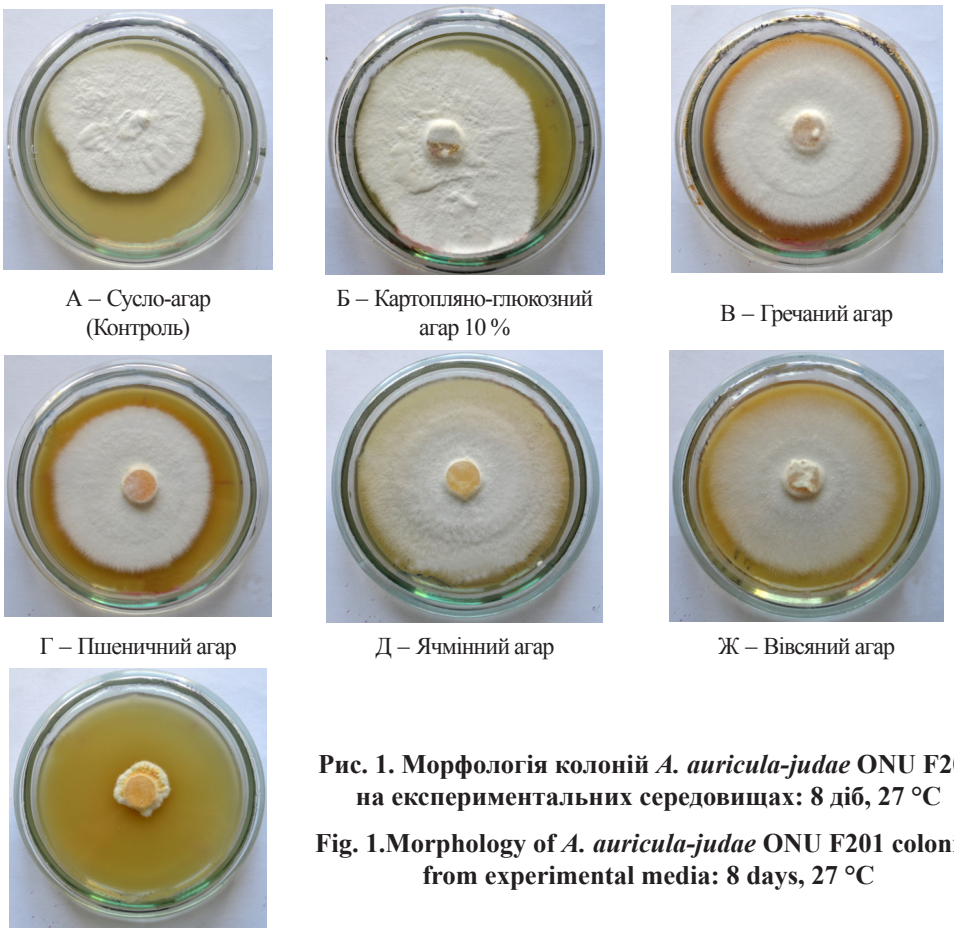
The value of the modified growth coefficient of *A. auricula-judae* ONU F201 cultivated on different media

СА (контроль)	КГА 10 %	ГА	ПА	ЯА	ВА	ПрА
37,9	77,6*	56,6 *	37,6	35,6	26,4*	5,0*

Примітка:* – відмінності у порівнянні з контролем (СА) достовірні при статистичному рівні значущості $p \leq 0,05$

Note: * – differences compared with controls (CA) are valid at statistical significance level $p \leq 0,05$

За класифікацією А.С. Бухало [7] таку колонію відносять до такої, що повільно росте. Міцелій, отриманий на цьому середовищі був досить щільним та утворював неоднорідну високу білу ватоподібну колонію (рис. 1 А). У інших варіантах досліджень ростовий коефіцієнт коливався від 5,0 до 77,6.



А – Сусло-агар (Контроль)

Б – Картопляно-глюкозний агар 10 %

В – Гречаний агар

Г – Пшеничний агар

Д – Ячмінний агар

Ж – Вівсяний агар

З – Просяний агар

Рис. 1. Морфологія колоній *A. auricula-judae* ONU F201 на експериментальних середовищах: 8 діб, 27 °С

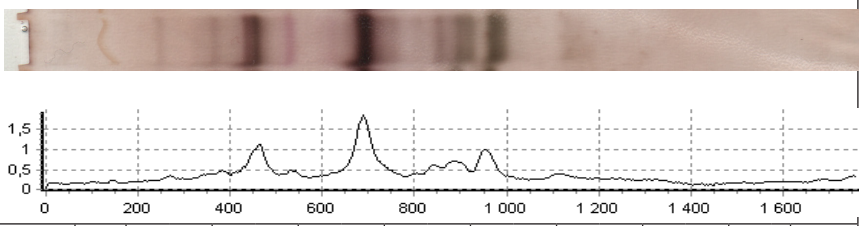
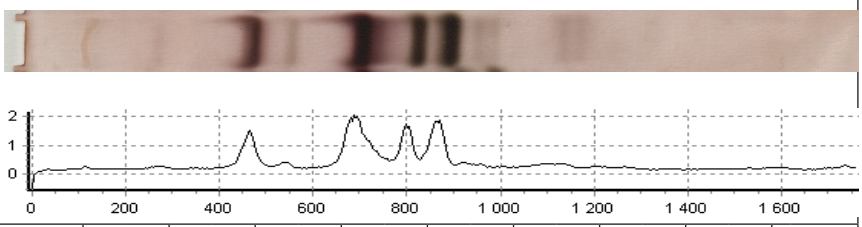
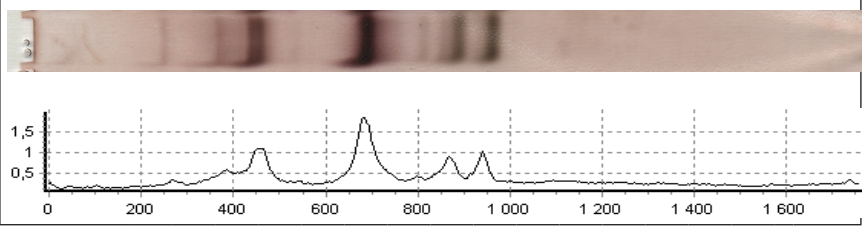
Fig. 1.Morphology of *A. auricula-judae* ONU F201 colonies from experimental media: 8 days, 27 °C

Картопляно-глюкозне агаризоване середовище з підвищеним вмістом глюкози виявилося найкращим з дослідних для *A. auricula-judae*. Міцелій у цьому варіанті мав найвищий ростовий коефіцієнт (77,6) характерний для культур, що ростуть з середньою швидкістю. Морфологія колонії була подібна еталонній (рис. 1 Б). Колонія, отримана на гречаному агарі була нижчою, але також щільною, більш рівномірною і ватоподібною, з ростовим коефіцієнтом 56,6 (рис. 1 В).

Варіант на пшеничному агарі за ростовим коефіцієнтом не відрізнявся від контролю, але утворена ним колонія була менш щільною та високою і більш однорідною (рис. 1 Г).

На ячмінному (рис. 1 Д) та вівсяному агарі (рис. 1 Ж) гриб утворював павутиноподібні невисокі колонії, що мали низький ростовий коефіцієнт (35,6 та 26,4, відповідно). Найгірший результат отримано на просяному агарі, де ростовий коефіцієнт був мінімальним (рис. 1 З).

Досліджено мінливість електрофоретичних спектрів *A. auricula-judae* ONU F201 залежно від складу поживного середовища. На рис. 2 наведено електрофореграми карбоксилестераз у порядку зменшення кількості їх ізоформ у дослідних варіантах.

Середовище, Kj	Значення Rf
ВА 26,4	0,15 | 0,22 | **0,26** | 0,31 | **0,39** | 0,46 | 0,48 | 0,50 | 0,54 | 0,63 
ГА 56,6	0,15 | | **0,26** | 0,31 | **0,39** | 0,45 | 0,48 | 0,52 | 0,54 | 0,62 | 0,64 
ЯА 35,6	0,15 | 0,22 | **0,26** | | **0,39** | 0,45 | | 0,50 | 0,54 | 

продовження рис. див на с. 69

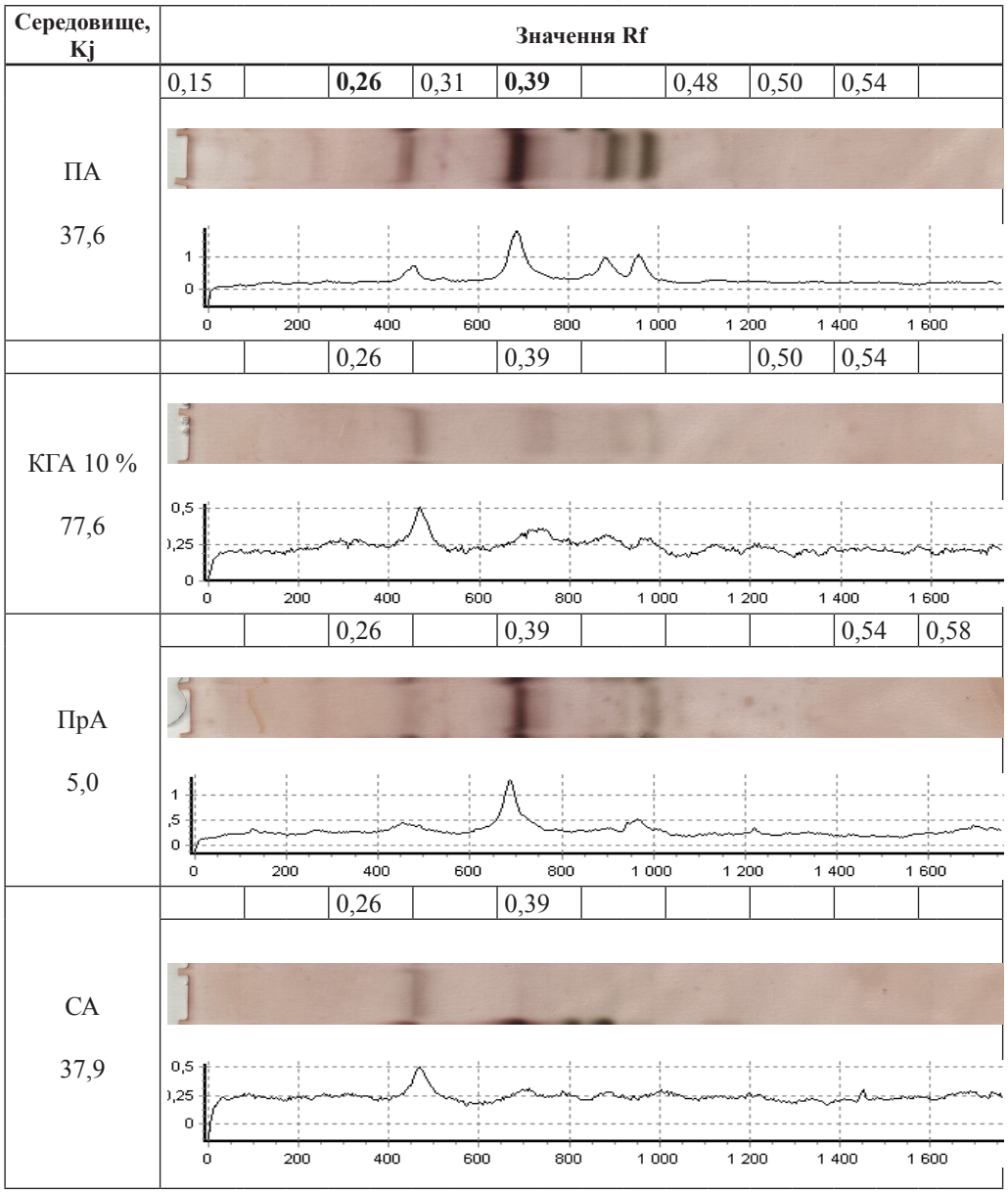


Рис. 2. Експресивність ММФ карбоксилестераз *A. auricula-judae* ONU F201 залежно від складу поживного середовища

Fig. 2. Expressivity of MMF of *A. auricula-judae* ONU F201 carboxylesterases depending on growing media composition

З наведених даних видно, що найменша кількість ММФ карбоксилестераз (2) спостерігається у міцелії, що виріс на контрольному середовищі СА. Аналогічні результати отримано при дослідженні ММФ карбоксилестераз *G. lucidum* у попередніх дослідженнях [10, 12]. Така закономірність, ймовірно, обумовлена

функціями карбоксилестераз грибів, що полягають у гідролізі ефірних зв'язків широкого спектру речовин з наявних субстратів [13].

На інших середовищах кількість ідентифікованих ізоформ коливалася до 10 (ВА і ГА), причому порядок ранжування за кількістю ізоформ не збігається з таким за ростовим коефіцієнтом.

З усього спектру ММФ, що було визначено, тільки дві ізоформи, що спостерігалися у контрольному варіанті (СА) проявлялися в усіх досліджених варіантах – це слаборухлива форма з Rf 0,26 та середньорухлива з Rf 0,39. Виходячи з цього можна припустити, що у *A. auricula-judae* існує шонайменше два неалельних гени, які кодують карбоксилестеразу. Наявність інших, визначених форм може бути результатом посттрансляційної модифікації продуктів зазначених генів, тому що показники їх відносної рухливості знаходяться близько до визначених конститутивних смуг. Причиною таких модифікацій може бути зміна складу поживного середовища, але не виключено існування й інших локусів, гени яких активуються тільки при культивуванні грибів на певних субстратах. Продуктами таких генів можуть бути ізоформи з Rf 0,50 та 0,54. Тому не можна напевно стверджувати чи є варіабельні смуги на електрофореграмах ізоферментами, що різняться на генетичному рівні, чи власно множинними формами, що зазнали посттрансляційної модифікації.

Вегетативний міцелій *A. auricula-judae* виказує широку модифікаційну мінливість при культивуванні на різних середовищах, як за морфологічними так і за біохімічними ознаками. Залежно від складу поживного середовища у міцелії *A. auricula-judae* експресується від 2 до 10 ізоформ карбоксилестерази, з яких тільки дві – з Rf 0,50 та 0,54, виявляються у всіх варіантах досліджуваних середовищ.

С.Л. Мирось, Н.С. Бобрешова, В.А. Кучеров, К.П. Буга, В.О. Иваныця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e- mail: kafgen@onu.edu.ua

МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *AURICULARIA AURICULA-JUDAE* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Реферат

Цель. *Определение особенностей модификационной изменчивости вегетативного мицелия A. auricula-judae в зависимости от состава питательной среды по ростовому коэффициенту, морфологии колоний и множественными молекулярными формами карбоксилэстеразы.* **Методы.** *Вегетативный мицелий Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Quél. штамма ONU F201 выращивали на*

таких средах: агаризованное пивное сусло (СА) – контрольный вариант, пшеничный агар (ПА), овсяный агар (ВА), ячменный агар (ЯА), гречишный агар (ГА), просяной агар (ПРА), картофельно-глюкозный агар с повышенным содержанием глюкозы (КГА 10%). Определяли модифицированный ростовой коэффициент (PKj) и морфологию полученных колоний. С помощью электрофоретического разделения в 7 % полиакриламидном геле устанавливали количество множественных молекулярных форм (ММФ) карбоксилэстеразы в мицелии каждого варианта. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. **Результаты.** *Показано, что в зависимости от состава субстрата характер роста колоний может изменяться от плотной, ватообразной, высокой, быстрорастущей до паутинообразной, невысокой, медленнорастущей; количество изоформ фермента варьирует от 2 до 10. Причем порядок ранжирования по количеству изоформ не совпадает с таковым по ростовому коэффициенту мицелия.* **Выводы.** *Вегетативный мицелий A. auricula-judae проявляет широкую модификационную изменчивость при культивировании на различных средах, как по морфологическим так и по биохимическим признакам. В зависимости от состава питательной среды в мицелии A. auricula-judae экспрессируется от 2 до 10 изоформ карбоксилэстеразы, из которых только две – с Rf 0,50 и 0,54, проявляются во всех вариантах исследуемых питательных сред.*

Ключевые слова: Auricularia auricula-judae, модификационная изменчивость, ростовой коэффициент, морфология колоний, изоформы карбоксилэстеразы.

S. Miros, N. Bobreshova, V. Kucherov, V. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

MODIFICATION VARIABILITY OF *AURICULARIA AURICULA-JUDAE*, CULTURED ON MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITIONS

Summary

Aim. *Defining features of modification variability of A. auricula-judae vegetative mycelium depending on the composition of the nutrient medium at the coefficient of growth, colony morphology and multiple molecular forms of carboxylesterases.* **Methods.** *Vegetative mycelium of Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Quél. ONU F201 strain was grown in the following environments: wort agar (CA) – control variant, wheat agar (ПА), oatmeal agar (BA), barley agar (ЯА), buckwheat agar (ГА), millet agar (ПрА), potato and glucose agar with high glucose content (КГА 10%). The modified coefficient of growth (PKj) and morphology of the obtained colonies were determined. Using electrophoretic separation on 7% polyacrylamide gels the number of multiple molecular forms (MMF) of carboxylesterases in mycelium of each option were established. Ste statistical analysis of the data was performed using non-parametric Wilcoxon test. The growth character of the colonies ranged from dense cottony, fast growing to arachnoid, slow growing; the number of isoformes*

of the enzyme varied from 2 to 10, depending on the composition of the substrate. The rank order of the number of isoformes did not match the rank of the coefficient of growth of mycelium. **Conclusions.** *Vegetative mycelium of A. auricula-judae has extensive modification variability cultured on different media, both morphological and biochemical characteristics. Depending on the composition of the nutrient medium in the mycelium A. auricula-judae expressed from 2 to 10 isoforms of carboxylesterases, only two of which – with Rf 0.50 and 0.54, were determined in all the variants of studied culture media .*

Key words: Auricularia auricula-judae, modification variability, coefficient of growth, morphology of colonies, carboxylesterase isoformes.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Wu Q., Tan Z., Liu H., Gao L., Wu S., Luo J., Zhang W., Zhao T., Yu J., Xu X.* Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice // Int J Biol Macromol. – 2010. – № 46(3). – P. 8–248.

2. *Huang X.G., Quan Y.L., Guan B., Hu Y.* Research progress in *Auricularia auricula* polysaccharide // Science and Technology of Cereals, Oils and Foods. – 2010. – № 10. – P. 25–29.

3. *Zhao Z., Liu H., Wang C., Xu J.-R.* Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi // BMC Genomics. – 2013. – P. 1–15. [Доступ до препринту: http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/274]

4. *Gupta V. K., Misra A.K., Gaur R., Pandey R., Chauhan U.K.* Studies of genetic polymorphism in the isolates of *Fusarium solani* // Australian Journal of Crop Science. – 2009. – V. 3(2). – P. 101–106.

5. *Постнова Е. Л.* Исследование внутреннего полиморфизма штаммов *Ganoderma lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst.: дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. – Москва, 2009. – 23 с.

6. *Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В.* Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Под общ. ред. И.А. Дудки. – К. : Наук. думка, 1983. – 312 с.

7. *Бухало А.С.*Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К. : Наукова думка, 1988. – 144 с.

8. *Атраментова Л.О., Утєвська О.М.* Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.

9. *Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Ароштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П.* Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.

10. *Мірось С.Л., Дуденко Ю.Ю.,Бобрешова Н.С., Гудзенко Т.В., Іваниця В. О.* Електрофоретичні спектри карбоксилестераз *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P.Karst. залежно від умов екстрагування та субстрату вирощування // Мікробіологія і біотехнологія. – №2(18). – 2012. – С. 52–59.

11. *Биологические* особенности лекарственных макромицетов в культуре : Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – К. : Альтерпрес, 2011. − 212 с.

12. *Мірось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Бобрешова Н.С., Багаєва О.С., Іваниця В.О.* Експресивність ізоформ карбоксилестерази (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P.Karst.) за культивування на середовищах різного складу // Мікробіологія і біотехнологія. – № 2. – 2011. – С. 34–40.

13. *Lenfant N., Hotelier T., Velluet E., Bourne Y., Marchot P., Chatonnet A.* ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 423–429.

Стаття надійшла до редакції 17.03.2014 р.