

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СТРЕССОВЫХ МЕТАБОЛИТОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Е.А. Лощина, В.Е. Никитина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, loshchinina@yandex.ru

Аннотация. Проведено сравнительное исследование изменений в содержании стрессовых соединений в глубинном мицелии базидиомицетов *L. edodes* и *G. frondosa* при совместном культивировании с ростостимулирующими бактериями рода *Azospirillum* и конкурентными микромицетами *Trichoderma*. При росте с азоспириллой и триходермой в мицелии базидиомицетов наблюдалось увеличение содержания стрессового маркера малонового диальдегида и протекторного углевода трегалозы, значительно более выраженное при совместном росте с конкурентными микромицетами.

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, совместное культивирование, биотический стресс, трегалоза, малоновый диальдегид

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-479-483

Стрессовые состояния играют важнейшую роль в жизнедеятельности базидиомицетов. Особое значение в метаболизме грибов при стрессорных воздействиях принадлежит протекторным соединениям, защищающим основные клеточные биополимеры и липиды от повреждений [Феофилова, 1994; Osun et al., 2007]. Одним из наиболее распространенных протекторных соединений у грибов является дисахарид трегалоза, принимающий участие в защите грибных клеток от негативного влияния повышенных температур, а также других абиотических факторов, включая окислительный, осмотический, химический стрессы, голодание, обезвоживание. При стрессовых воздействиях трегалоза стабилизирует белки и мембранные липиды, защищая их от разрушения [Сергеева и др., 2010]. К числу биомолекул, наиболее сильно подверженных окислительному стрессу, относятся липиды, основным продуктом перекисного окисления которых является малоновый диальдегид [Del Rio et al., 2005]. Этот высокотоксичный альдегид служит биомаркером уровня окислительного стресса [Draper, Hadley, 1990; Mendes et al., 2009].

Среди различных внешних воздействий, которым подвергаются базидиальные грибы, важное место занимают биотические факторы – воздействие бактерий, плесневых грибов и других микроорганизмов, с которыми базидиомицеты сосуществуют в естественных условиях. Одни из этих микроорганизмов могут оказывать благоприятное влияние, стимулируя рост базидиомицетов за счет фиксации атмосферного азота, синтеза биологически активных веществ, подавления патогенной микрофлоры, другие, напротив, выступают в роли патогенов и конкурентов за питательные субстраты. Механизмы адаптационных процессов, протекающих при контакте базидиальных грибов с антагонистической и мутуалистической микрофлорой, до сих пор исследованы недостаточно.

Низкая устойчивость съедобных базидиомицетов к посторонней микрофлоре представляет серьезную проблему для промышленного грибоводства. Одними из наиболее распространенных контаминантов культивируемых грибов являются микроскопические грибы рода *Trichoderma* [Stamets, Chilton, 1983; Savoie, Mata, 1999]. Эффективным биотехнологическим приемом для получения быстрорастущего, устойчивого к микробной контаминации посевного мицелия может быть выращивание

грибов в двойной культуре с ростостимулирующими бактериями, которое позволило бы повысить урожайность грибов и ускорить процесс формирования плодовых тел. Ризосферные бактерии рода *Azospirillum* принадлежат к числу микроорганизмов, способных благоприятно воздействовать на растения за счет азотфиксации, гормональной регуляции, улучшения минерального питания, способности подавлять рост фитопатогенных грибов и бактерий [Цавкелова и др., 2006; Red'kina, 1990; Bashan, de-Bashan, 2010]. Симбиотические взаимодействия между бактериями и базидиальными грибами также известны исследователям, хотя механизмы, ответственные за благоприятное воздействие бактерий на базидиомицеты, до сих пор мало изучены. К числу азотфиксирующих микроорганизмов, вступающих в ассоциации с высшими грибами, относятся бактерии рода *Azospirillum* [Tilak et al., 1989; Li, Strzelczyk, 2000; Dahm et al., 2005].

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование соединений стресса, индуцированного у ксилотрофных базидиомицетов под воздействием биотических факторов – почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* и микромицетов *Trichoderma*.

В работе были использованы культуры *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler, штамм F-249, и *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, штамм 0917. Для изучения совместного культивирования *L. edodes* и *G. frondosa* с ассоциативными и антагонистическими микроорганизмами в работе были использованы бактерии *Azospirillum brasilense*, штамм Sp7 и микромицеты *Trichoderma* sp. Базидиомицеты выращивали при 26 °C в условиях жидкофазного погруженного культивирования на среде с глюкозой и L-аспарагином в течение 7 сут, затем к ним подсеивали культуры *A. brasilense* (48-часовая культура, $2 \cdot 10^7$ клеток/мл) или *Trichoderma* sp. Образцы отбирали в динамике роста грибов. Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали, механически измельчали, экстрагировали дистиллированной водой, центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и отбирали супернатант. Экстракты мицелия и культуральные жидкости пропускали через мембранные фильтры "Dugapore", 0,22 мкм ("Millipore", Ирландия) и анализировали на наличие трегалозы и малонового диальдегида. Спектрофотометрические измерения проводили на фотометре Multiskan Ascent ("ThermoLabsystems", Финляндия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН). Содержание трегалозы в составе мицелия и культуральных жидкостей *L. edodes* и *G. frondosa* определяли трегалазным методом [Kienle et al., 1993]. Трегалозу гидролизуют до глюкозы с использованием трегалазы (EC 3.2.1.28) ("Sigma", США), а затем определяют изменение уровня глюкозы в образцах с использованием Glucose (GO) Assay Kit ("Sigma", США). Содержание малонового диальдегида определяют реакцией с тиобарбитуровой кислотой ("Aldrich", США) [Fernandez et al., 1997].

Азоспириллы являются ассоциативными бактериями-азотфиксаторами и обладают способностью стимулировать рост растений. Нами было показано, что на базидиомицеты *L. edodes* и *G. frondosa* бактерии рода *Azospirillum* также оказывают положительное влияние, вызывая увеличение накопления биомассы глубинной культуры грибов на 50 и 40% соответственно. В отличие от азоспирилл, микроскопические грибы рода *Trichoderma* являются антагонистами данных базидиомицетов и одними из основных контаминантов съедобных грибов при их искусственном культивировании, вызывая поражение грибных субстратов зеленой плесенью и подавляя плодоношение. При исследованных нами условиях выращивание *L. edodes* и *G. frondosa* совместно с триходермой приводило к ингибированию

накопления мицелиальной биомассы базидиомицетов на 30–35%. Таким образом, два биотических фактора окружающей среды, изученных в данной работе, – влияние азоспирилл и триходермы при совместном культивировании базидиомицетов с этими микроорганизмами, – принципиально различаются по характеру воздействия. Триходерма проявляет антагонизм в отношении изученных базидиомицетов, тогда как азоспириллы оказывают ростостимулирующее влияние.

Анализ изменений концентрации малонового диальдегида в составе мицелия, а также в фильтратах культуральных жидкостей глубинных культур *L. edodes* и *G. frondosa*, происходящих под влиянием совместного культивирования с *A. brasilense* Sp7 и *Trichoderma* sp., показал, что культуральная жидкость обоих видов базидиомицетов на протяжении всего времени выращивания содержала лишь незначительные количества малонового диальдегида как в монокультуре, так и при совместном культивировании с *A. brasilense* Sp7 и *Trichoderma* sp. При этом различий в содержании стрессового маркера в культуральных жидкостях между ростостимулирующими бактериями *Azospirillum* и плесневыми грибами-антагонистами *Trichoderma* не наблюдалось. В то же время в мицелии *L. edodes* и *G. frondosa* уровень малонового диальдегида был достаточно высоким и повышался по мере роста культур. При совместном культивировании с азоспириллой концентрация малонового диальдегида в мицелии базидиомицетов возрастала на 50–65%, а с триходермой – в 2–3 раза. Можно заключить, что совместное культивирование с обоими микроорганизмами является для исследованных базидиомицетов стрессорным фактором, однако в случае с триходермой это влияние выражено значительно сильнее, на что указывает более высокий уровень стрессового маркера – малонового диальдегида.

Как и в случае с малоновым диальдегидом, культуральная жидкость обоих видов базидиомицетов на протяжении всего времени выращивания содержала незначительные количества трегалозы как в монокультуре, так и при совместном росте с ростостимулирующими бактериями *Azospirillum* и микроскопическими грибами *Trichoderma*. Совместное культивирование обоих видов исследованных макромицетов с азоспириллой и триходермой вызывало повышение содержания трегалозы в мицелии базидиальных грибов на 30–35 и 45–55% соответственно. Изменение уровня малонового диальдегида и трегалозы в мицелии *L. edodes* и *G. frondosa* указывает на активацию протекторных механизмов при совместном выращивании базидиомицетов с ассоциативной и конкурентной микрофлорой.

Таким образом, мы провели анализ изменений в содержании малонового диальдегида и трегалозы у глубинных культур базидиомицетов *L. edodes* и *G. frondosa* при стрессе, индуцированном воздействием биотических факторов – почвенных ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* и микромицетов рода *Trichoderma*. При совместном культивировании с азоспириллой концентрация малонового диальдегида в мицелии базидиомицетов возрастала на 50–65%, а при росте с триходермой – в 2–3 раза. Совместное культивирование обоих видов исследованных макромицетов с азоспириллой и триходермой также вызывало повышение содержания трегалозы в мицелии базидиальных грибов на 30–35 и 45–55% соответственно. В отличие от мицелия, в культуральной жидкости *L. edodes* и *G. frondosa* содержалось незначительное количество изучаемых метаболитов как в монокультуре, так и при совместном росте с микроорганизмами. Изменение уровня стрессовых метаболитов в мицелии указывает на активацию окислительных процессов и протекторных механизмов при совместном выращивании базидиомицетов с ассоциативной и конкурентной микрофлорой.

Изучение стрессовых метаболитов при адаптации грибов к различным внешним факторам необходимо не только для расширения сведений о ростовых процессах и

метаболизме базидиомицетов, их взаимодействиях с патогенами и симбионтами, но также имеет практическое значение для искусственного выращивания съедобных и лекарственных грибов и предотвращения их контаминации конкурентной микрофлорой. Необходимость исследования биохимических процессов, происходящих при совместном культивировании съедобных высших грибов с различными микроорганизмами, определяется большой важностью разработки методов повышения урожайности базидиомицетов и их защиты от контаминирующих микроскопических грибов при получении плодовых тел и мицелиальной биомассы в промышленном грибоводстве.

Литература

- Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Феофилова Е.П. О новой функции трегалозы и особенностях липидообразования у мицелиальных грибов // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 470–474.
- Феофилова Е.П. Биохимическая адаптация грибов к температурному стрессу // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 5. – С. 757–776.
- Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Е.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – стимуляторы роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment // Advances in Agronomy. – 2010. – V. 108. – P. 77–136.
- Dahm H., Wrotniak W., Strzelczyk E., Li C.Y., Bednarska E. Diversity of culturable bacteria associated with fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi // Phytopathol. Pol. – 2005. – V. 38. – С. 51–62.
- Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress // Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. – 2005. – V. 15. – P. 316–328.
- Draper H.H., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation // Methods in Enzymology. – 1990. – V. 186. – P. 421–431.
- Fernández J., Páirez-Blvarez J.A., Fernández-Lopez J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat // Food Chemistry. – 1997. – V. 59, № 3. – P. 345–353.
- Kienle I., Burgert M., Holzer H. Assay of trehalose with acid trehalase purified from *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. – 1993. – V. 9, № 6. – P. 607–611.
- Li C.Y., Strzelczyk E. Belowground microbial processes underpin forest productivity // Phyton. – 2000. – V. 40, № 4. – P. 129–134.
- Mendes R., Cardoso C., Pestana C. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test // Food Chemistry. – 2009. – V. 112. – P. 1038–1045.
- Ocyn A., Hampp R., Requena N. Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi // New Phytologist. – 2007. – V. 174. – P. 879–891.
- Red'kina T.V. Fungistatic activity of bacteria of the genus *Azospirillum* // Agrokhemia es Talajtan (Agrochemistry and Soil Science). – 1990. – V. 39, № 3–4. – P. 465–468.
- Savoie J.-M., Mata G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 1999. – V. 15. – P. 369–373.
- Stamets P., Chilton J.S. The mushroom cultivator: A practical guide to growing mushrooms at home – Olympia, Washington: Agaricon Press, 1983. – 416 p.
- Tilak K.V.B.R., Li C.Y., Ho I. Occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi // Plant and Soil. – 1989. – V. 116, № 2. – P. 286–288.

CHANGES IN THE STRESS METABOLITES CONTENT IN THE XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES UNDER THE INFLUENCE OF MICROORGANISMS

E.A. Loshchinina, V.E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plant and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia, *loshchinina@yandex.ru*

Abstract. A comparative study of the changes in the stress compounds content in the submerged mycelium of the basidiomycetes *L. edodes* and *G. frondosa* grown in co-culture with growth-promoting bacteria *Azospirillum* and competitive micromycetes *Trichoderma* was conducted. Growth with *Azospirillum* and *Trichoderma* resulted in the increase of the stress marker malonic dialdehyde and the protecting carbohydrate trehalose in the basidiomycetes mycelium, which was significantly more pronounced in the co-culture with competitive micromycetes.

Keywords: *xylotrophic basidiomycetes, co-cultivation, biotic stress, trehalose, malonic dialdehyde*