

Участие ионов кальция в процессах мицелиального диморфизма *Thielavia terrestris*

Е. Н. Громозова*, И. С. Блажчук

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 154

Изучено влияние солей кальция на морфогенез *T. terrestris*. Показано, что различные концентрации CaCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ не изменяют диффузной формы гриба. Однако 15 мМ CaCl_2 , 10 мМ CaSO_4 и более высокие концентрации этих солей переключают пеллетный рост на диффузный. Этот процесс наблюдали после внесения CaCl_2 в лаг-фазе развития аскомицета, т. е. фазе роста, чувствительной к морфогенному сигналу. Морфогенное действие ионов кальция подтверждено в опытах с использованием веропамила. На основании полученных с хлорпромазином данных обсуждается участие в этом процессе кальмодулина. Выдвинуто предположение об опосредованном аденилатной системой действию ионов кальция на морфогенетическую программу развития *T. terrestris*.

Введение. В настоящее время все больше данных свидетельствует о роли ионов кальция как вторичного посредника в восприятии ряда внеклеточных сигналов клетками грибов. Регуляторное действие кальция установлено для таких важных в развитии микромицетов событий, как спорообразование [1], половой процесс [2, 3], прорастание спор [4], продвижение гифы [5], синтез хитина [6, 7] и т. д. Особый интерес представляют работы по выяснению роли кальция в процессах диморфизма. Так, изменение дрожжевой формы на мицелиальную отмечено при внесении кальция в среду культивирования *Ophiostoma ulmi* [8], *Candida albicans* [9], *Zygomycetes mobilis* [10]. На примере *Ceratocystis ulmi* [10, 11] показано участие в этом процессе кальмодулина. В то же время в научной литературе практически отсутствуют данные о значении ионов кальция для формирования таких структур глубинного мицелия, как шарики (пеллеты) и равномерно распределенные в объеме гифы (диффузный мицелий).

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния ионов кальция на морфогенез *T. terrestris* в условиях погруженного культивирования.

Материалы и методы. Объектом исследования служил *T. terrestris* (*Apinis*) Malloch et Cain из коллекции отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины. Гриб выращивали на среде Чапека в колбах Эрленмейера ($V = 100$ мл). Культивирование *T. terrestris* осуществляли на качалках при температуре 35 ± 1 °C и 160 об/мин. Концентрация споровой суспензии составляла $(2-4) \cdot 10^5$ спор в 1 мл. Различные мицелиальные формы аскомицета получали титрованием питательной среды под

*Correspondence address.

контролем рН-метра 340 H_2SO_4 до рН 4,0 (диффузный мицелий) или NaOH до рН 6,5 (пеллетная форма).

В работе использовали соли марки «хч»: хлористый кальций (в концентрациях 1—100 мМ), уксуснокислый кальций (1—30 мМ), сернокислый кальций (0,1—100 мМ), углекислый кальций (1—100 мМ), азотнокислый кальций (1—500 мМ).

При изучении действия ионов кальция на формирование *T. terrestris* использовали морфогенную концентрацию $CaCl_2$ — 30 мМ. Соль вносили на различных стадиях роста гриба: в лаг-фазе (набухание конидий), в период прорастания, в стадии ветвления гиф и в период септирования мицелия.

В качестве ингибитора кальмодулина применяли хлорпромазин (5—200 мкМ), а ингибитора кальциевых каналов — веропамил (1 мМ).

Результаты и обсуждение. При культивировании пеллетной формы *T. terrestris* в условиях увеличения концентрации $CaCl_2$ наблюдали появление более частого ветвления, усиление спорогенеза и постепенное изменение формы. До концентрации хлористого кальция 10 мМ гриб образовывал шарики (рис. 1, б). При увеличении концентрации соли (15 мМ) в среде культивирования *T. terrestris* рос в виде пеллетов (рис. 1, в) либо представ-

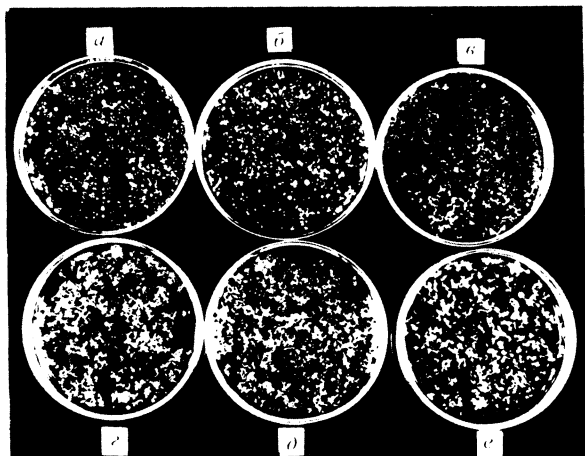


Рис. 1. Влияние различных концентраций $CaCl_2$ на морфогенез пеллетной формы *T. terrestris*: а — контроль; б — 10; в — 15; г — 15; д — 30; е — 50 мМ $CaCl_2$

лял собой шарики мицелия и отдельные гифальные нити (рис. 1, г). Более высокие концентрации $CaCl_2$ (30—50 мМ) вызывали образование диффузного мицелия (рис. 1, д, е). Таким образом, концентрации хлористого кальция 15 мМ и выше являются морфогенными для пеллетной формы.

Показано, что внесение хлористого кальция в случае развития диффузного мицелия не влияло на форму роста, но с увеличением его концентрации в среде усиливалось ветвление мицелия и спорообразование.

Уксуснокислый кальций в концентрации 1 мМ не влиял на пеллетную форму гриба. Однако ветвление гиф было реже, чем в контроле, и визуально такие пеллеты выглядели более «пушистыми». При концентрации соли 10 мМ наблюдали смешанный рост, а при 15 мМ и выше — взвесь. Микроскопические исследования образцов показали, что взвесь представляла собой хлопьевидный осадок среды, сбитый в пеллетообразные агломераты, содержащие гифы гриба. При концентрации 20 мМ $Ca(CH_3COO)_2$ и выше рост как пеллетной, так и диффузной форм полностью отсутствовал.

Концентрации уксуснокислого кальция 1—10 мМ в случае диффузного мицелия способствовали появлению смешанного роста. При микроскопировании этих проб фиксировался сбитый в комки мицелий с частотой

ветвления, как в контроле, или более частой. При концентрации 5 мМ уксуснокислого кальция в культуральной среде наблюдали много спор. Во всех случаях наряду с нормальными клетками мицелия отмечаются гипертрофированные.

Углекислый кальций в концентрации от 1 до 5 мМ не влиял на рост гриба как диффузной, так и пеллетной форм. Концентрации соли 10—15 мМ способствовали смешанному росту *T. terrestris*, 20—100 мМ — образованию так называемых «мылообразных» агрегатов. Микроскопирование образцов показало наличие твердых частиц CaCO_3 , пронизанных гифами мицелия. Интересно также отметить, что в культуральной среде при всех исследуемых концентрациях углекислого кальция наблюдали значительное количество спор. Так, при внесении 5 мМ CaCO_3 концентрация конидий составляла 10^7 спор в 1 мл, в то время когда посевной материал сдержал 10^5 спор в 1 мл. По всей вероятности, углекислый кальций повышает усиленное спороношение культуры.

Сернокислый кальций в концентрациях 0,1—5,0 мМ не влиял на пеллетную форму роста *T. terrestris*. Однако при варьировании концентрации CaSO_4 от 10 до 50 мМ наблюдали смену формы на диффузную. Причем гифы, сплетаясь, образовывали длинные «тяжи». Следует отметить, что в низких концентрациях (1 мМ) сульфат кальция стимулировал рост гриба, тогда как высокие концентрации не изменяли природу биомассы.

В случае задаваемого диффузного роста внесение сульфата кальция в среду от 1 до 100 мМ не нарушало программы развития. Гифы диффузного мицелия имели частоту ветвления такую же, как в контрольной пробе. Концентрация 30 мМ способствовала образованию незначительного количества «утолщенных» клеток. При добавлении 50—100 мМ CaSO_4 наблюдали менее плотную «упаковку» гиф в скоплении мицелия, чем для низких концентраций данной соли.

Азотнокислый кальций в концентрациях от 1 до 300 мМ не влиял на пеллетную форму *T. terrestris*. Во всех случаях наблюдали рост мелких пеллет. При концентрации 400—500 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ гриб рос в форме мелких пеллет ($d = 0,36 \pm 0,04$ мм). Концентрация соли 400 мМ способствовала сильному удлинению редковетвящихся гиф. При концентрации 500 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ пеллеты имели лизированные срединные участки и утонченные короткие гифы.

Биомасса гриба с увеличением концентрации азотнокислого кальция плавно снижалась (рис. 2, кривая 1). При концентрациях соли 100 и 200 мМ диаметр пеллет увеличивался до $2,64 \pm 0,14$ и $2,78 \pm 0,10$ мм соответственно (рис. 2, кривая 2). Микроскопические исследования показали, что эти сложные пеллеты, имеющие идеально круглую форму, состояли из мелких ($d = 0,5 \pm 0,05$ мм) пеллетиков (от 3 до 30).

Диффузный мицелий аскомицета при любых концентрациях $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ формы не менял.

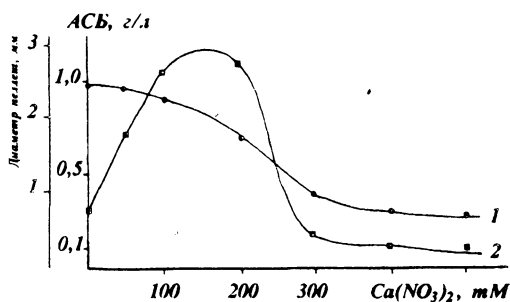


Рис. 2. Влияние различных концентраций азотнокислого кальция на рост *T. terrestris*: 1 — биомасса гриба, г/л; 2 — диаметр образовавшихся пеллет, мм

Таким образом, в результате исследований установлено, что ионы кальция оказывают влияние на развитие *T. terrestris*. Степень воздействия зависела как от концентрационных границ, так и от анионной части вносимых солей. Низкие концентрации Ca^{2+} (до 5 мМ) увеличивали выход биомассы, но не влияли на задаваемую форму роста. В то же время в случае CaCl_2 (15 мМ и выше) и CaSO_4 (10 мМ) наблюдалось изменение пеллетной формы роста на диффузную. В зависимости от вносимой соли рост *T. terrestris* или угнетался (20 мМ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), или был незначительным ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и CaSO_4), либо достигал 6—7 г/л (CaCl_2). Изучение действия Ca^{2+} в составе CaSO_4 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ было затруднено в связи со слабой растворимостью солей и возможным их влиянием на характер роста микромицета как гетерогенных частиц.

Подтверждением того, что именно ионы кальция могут менять программу развития пеллетного мицелия на диффузный, явились опыты проведенные с веропамилом. Как известно, это вещество блокирует вход кальция в клетку, и поэтому внесение его в среду культивирования позволяет полностью исключить действие экзогенного кальция. В этом случае, по нашим данным, морфогенного влияния кальция не отмечалось. Другими словами, при внесении 15—30 мМ CaCl_2 перехода от пеллетной программы развития к диффузной не происходило. Сам по себе веропамил в концентрации 1 мМ не влиял на развитие гриба.

Внесение хлористого кальция в морфогенной концентрации на разных этапах развития *T. terrestris* (рис. 3) позволило еще раз убедиться в

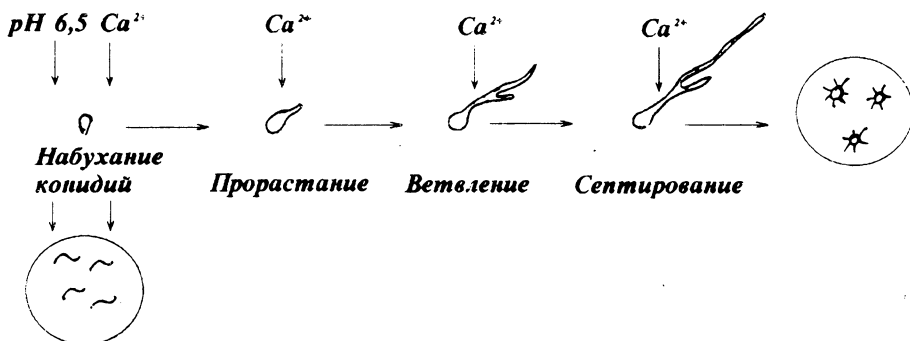


Рис. 3. Эффект действия ионов кальция на формообразование *T. terrestris* на различных стадиях развития

правильности сделанных ранее выводов о том, что только на стадии лаг-фазы проявляется эффект как величины pH, температуры, концентрации посевного материала [12, 13], так и добавления в среду цАМФ [14] и кальция. Именно в этот период микромицет чувствителен к восприятию морфогенного сигнала.

Проведенное нами исследование с использованием ингибитора кальмодулина хлорпромазина показало, что этот кальцийзависимый белок играет определенную роль в процессах развития гриба: при высоких концентрациях ингибитора (100—200 мМ) видимого роста не отмечалось. Однако внесение хлорпромазина в различных концентрациях в среду культивирования не меняло программы развития пеллетного и диффузного мицелия. Можно предположить, что эндогенный кальций через систему кальмодулина не участвует в процессах выбора морфопрограмм. С другой стороны, введение экзогенного кальция на фоне действия хлорпромазина позволило выявить интересную закономерность. При низких концентрациях ингибито-

ра (5—10 мкМ) ионы кальция не меняют характера роста, что, возможно, обусловлено действием кальмодулина на морфогенез при больших нагрузках экзогенного кальция (15—30 мМ). При более высоких концентрациях хлорпромазина и той же нагрузке экзогенного кальция наблюдается постепенный (через смешанный рост) переход от пеллетного мицелия к диффузному:

Концентрация хлорпромазина, мкМ	Форма роста микромицета
5—10	Пеллетная
25	Смешанная
50	Диффузная
100	Смешанная

Другими словами, ингибирующее действие хлорпромазина снимается. Об этом свидетельствует и наличие роста в тех пробах, где при внесении только хлорпромазина в высоких концентрациях он отсутствовал. Можно лишь предположить, что в данном случае ионы кальция начинают действовать «в обход» кальмодулина или же каким-то образом снимают блокирование кальмодулина высокими концентрациями хлорпромазина. Механизм этого процесса не установлен. Возможно, определенную роль при этом играет и способность хлорпромазина влиять на энергизацию мембраны.

Таким образом, как показали наши исследования, ионы кальция в определенных условиях могут изменять программу пеллетного роста на диффузную. В то же время внесение Ca^{2+} в среду с «диффузной» программой развития не приводит к перестройке заданной формы. Этот фактор имеет значение для морфогенеза в лаг-фазе, т. е. в фазе, как было показано нами ранее [12, 13], чувствительной к морфогенному сигналу. Ведущая роль вторичного мессенджера в передаче морфогенного сигнала принадлежит цАМФ [15]. Вероятно, ионы кальция действуют опосредованно, подключаясь к аденилатной системе в различных ее звеньях, и при блокировании отдельных ее областей участвуют в восстановлении цепи передачи сигнала. Известно, что ионы кальция ингибируют действие на фосфодиэстеразу *Neurospora crassa*. Возможно, именно ингибированием фосфодиэстеразы и соответствующим увеличением концентрации цАМФ объясняется «переключение» программы пеллетного роста на диффузную при внесении 15—30 мМ хлористого кальция.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета по науке и технике при Кабинете министров Украины.

О. М. Громозова, І. С. Блажчук

Участь іонів кальцію у процесах міцеліального диморфізму *Thielavia terrestris*

Резюме

Вивчено вплив солей кальцію на морфогенез *T. terrestris*. Показано, що різні концентрації CaCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ та $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ не змінюють дифузної форми гриба. Але 15 мМ CaCl_2 , 10 мМ CaSO_4 та вищі концентрації цих солей переключують пелетний ріст на дифузний. Цей процес спостерігали після внесення хлористого кальцію у лаг-фазі розвитку аскоміцета, тобто у фазі росту, чутливій до дії морфогенного сигналу. Морфогенну дію іонів кальцію підтверджено в досліді з використанням веропамілу. За висновками експериментів з хлорпромазином обговорюється участь в цьому процесі кальмодуліна. Висунуто припущення про опосередковану через аденилатну систему дію іонів кальцію на морфогенетичну програму розвитку *T. terrestris*.

Participation of calcium ions in the process of mycelial dimorphism of *Thielavia terrestris*

Summary

Calcium ions are the intermediates between signals of external medium and cells' reaction. The influence of different salts of calcium on the morphogenesis of *T. terrestris* was studied. It was shown that different concentrations of CaCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Ca}(\text{Ca}_3\text{COO})_2$ didn't change diffuse form of fungus. However, 15 mM of CaCl_2 and 10 mM of CaSO_4 and higher concentrations of these salts switched over pellet's growth to the diffuse one. The process was observed after CaCl_2 adding lag-phase of growth being sensitive to morphogenic signal. Morphogenic action of calcium ions was confirmed by the experiments with using of veropamil. On the basis of obtained with chlorpromasin data the calmodulin participation in this process is discussed. The calcium ions effect by means of adenylate system on morphogenetical program of *T. terrestris* development is supposed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rekabi A. L., Sijal A. Effect of calcium vegetative growth and sporangia production of *Achlya proliferans* // J. Biol. Sci. Res.—1987.—18, N 3.—P. 69—74.
2. Cooper-Palomar J. L., Powell M. J. Sites of calcium concentration during sexual reproduction of *Achlya ambisexualis* // Mycologia.—1988.—80, N 6.—P. 783—789.
3. O'Day D. H., Lydan M. A. The regulation of membrane fusion during sexual development in *Dictyostelium discoideum* // Biochem. Cell. Biol.—1989.—67, N 7.—P. 321—326.
4. Leder R. J. St., Butt T. M., Staples R. C., Roberts D. W. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metazhizum anisophiliae* // J. Gen. Microbiol.—1990.—136, N 9.—P. 1779—1789.
5. Takeuchi Yuko, Yan Schimid. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae // J. Memb. Biol.—1988.—101, N 1.—P. 33—42.
6. Martines-Canada G., Ruiz-Herrera J. Activation of chitin synthetase from *Phycomyces blakesleanus* by calcium and calmodulin // Arch. Microbiol.—1987.—147, N 4.—P. 280—285.
7. Ruiz-Herrera J., Valenzuela C. G., Martines-Canada G., Obergon A. Alternations in the vesicular pattern and wall growth of *Phycomyces* induced by the calcium ionophore A23187 // Protoplasma.—1989.—148, N 1.—P. 15—25.
8. Brunton A. H., Gadd G. M. Evidence for an inositol lipid signal pathway in the yeast — mycelium transition of *Ophiostoma ulmi* the dutch elm disease fungus // Mycol. Res.—1991.—95, N 4.—P. 484—491.
9. Vijay Paranjape, Roy B. G., Datta A. Involvement of calcium, calmodulin and protein phosphorylation in morphogenesis of *Candida albicans* // J. Gen. Microbiol.—1990.—136, N 11.—P. 2149—2154.
10. Ganapathy Muthukumar, Nickerson K. W. Ca(II) — calmodulin regulation of fungal dimorphism in *Ceratocystis ulmi* // J. Bacteriol.—1984.—159, N 1.—P. 390—392.
11. Clarke M., Bazari W. L., Kayman S. C. Isolation and properties of calmodulin from *Dictyostelium discoideum* // Ibid.—1980.—141, N 1.—P. 397—400.
12. Громозова Е. Н., Блажчук И. С. Влияние некоторых факторов на характер роста *Thielavia* sp. в погруженной культуре // Микробиол. журн.—1989.—59, № 4.—С. 30—31.
13. Шемшур Т. В., Громозова Е. Н., Подгорский В. С. Влияние условий культивирования на характер роста микромицетов в погруженной культуре // Там же.—№ 3.—С. 30—33.
14. Громозова О. М., Блажчук И. С., Подгорский В. С. Дослідження пула аденозин-3'-5'-монофосфата в процесі формування міцеліальних структур *Thielavia terrestris* в умовах глибинного культивування // Укр. бот. журн.—1995.—52, № 5.
15. Blumberg D. D., Comer J. F., Walton E. M. Calcium antagonists distinguish different requirements for cyclic AMP-mediated gene expression in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* // Differentiation.—1989.—41, N 1.—P. 14—21.
16. Соколовский В. Ю., Филиппович С. Ю., Афанасьева Т. П. и др. Действие Ca^{2+} на активность некоторых ферментов, участвующих в регуляции каротиногенеза у *Neurospora crassa* // Прикл. биохимия и микробиология.—1987.—28, № 1.—С. 71—77.