

ОЦЕНКА СВЯЗИ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МИЦЕЛИИ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ И ЛИГНОЛИТИЧЕСКИХ ГРИБОВ С СОДЕРЖАНИЕМ МЕТОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В СУБСТРАТЕ

Г. В. Ильина¹, Д. Ю. Ильин², А. А. Воробьева³, А. Р. Дашкина⁴

^{1, 2, 3, 4} Пензенский государственный аграрный университет, Россия, 440014, г. Пенза, ул. Ботаническая, 30

¹ilyina.g.v@pgau.ru, ²ilyin.d.u@pgau.ru, ³vorobieva.a.a@pgau.ru, ⁴albinadashkina99@gmail.com

Аннотация. Актуальность и цели. Исследование роли среды обитания в реализации онтогенетической программы организмов является актуальным аспектом современной экологии. Определенный интерес представляет изучение влияния трофических компонентов питательного субстрата на обменные процессы и темпы развития микроорганизмов, в частности, роли интермедиатов деструкции лигнина как регулятора обменных процессов и развития целлюлозо- и лигнолитических грибов. Целью исследований стало изучение роли метоксильных групп лигнина как фактора, стимулирующего переход к стадии вторичного метаболизма и телеоморфы у грибов различных групп. *Материалы и методы.* Для достижения поставленной цели проведена серия лабораторных экспериментов с мицелиальными культурами грибов различных систематических групп, обладающих комплексами целлюлозо- и лигнолитических ферментов. Работы с грибными культурами проводили по общепринятым методикам. Эксперименты проводили с использованием перколятов лигнина Классона. Определение содержания эргостерина в мицелии проводили газохроматографическим методом. Способность базидиомицетов к формированию телеоморфы изучена в стерильных условиях. *Результаты.* Проведенные исследования позволили установить особенности воздействия метоксильных групп лигнина, привнесенных в питательные среды, на рост, развитие, синтез эргостерина мицелием. Получены результаты, свидетельствующие о стимуляции перехода мицелиальных культур к вторичному метаболизму за счет указанных компонентов среды. Установленные факты стимуляции синтеза эргостерина мицелием, а также проявления характерных морфологических признаков, биохимическим эквивалентом которых является вторичный метаболизм, говорят о роли метоксильных групп как индукторов наступления репродуктивной фазы культуры. Формирование развитых плодовых тел у базидиомицетов, а также дифференцированных примордиев на субстратах обогащенных метоксильными группами свидетельствует о том, что эти компоненты лигнина (концентрация которых заметно выше в древесине, уже подвергшейся процессам деструкции в природе) могут служить факторами плодоношения не только в искусственных, но и в естественных условиях. *Выводы.* Такие компоненты лигнина, как метоксильные группы, способны оказывать воздействие на темпы развития и метаболические процессы мицелия грибов-деструкторов. Установленные факты стимуляции синтеза эргостерина мицелием, а также проявления характерных морфологических признаков, биохимическим эквивалентом которых является вторичный метаболизм, говорят о роли метоксильных групп как индукторов наступления репродуктивной фазы культуры.

Ключевые слова: лигнин, метаболизм грибов, метоксильные группы, онтогенез мицелиальной культуры, вторичный метаболизм, телеоморфа

Для цитирования: Ильина Г. В., Ильин Д. Ю., Воробьева А. А., Дашкина А. Р. Оценка связи онтогенетических процессов в мицелии целлюлозолитических и лигнолитических грибов с содержанием метоксильных групп в субстрате // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2021. Vol. 6 (4). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-4-4>

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP OF ONTOGENETIC PROCESSES IN THE MYCELIUM OF CELLULOSOLITIC AND LIGNOLYTIC FUNGI WITH THE METOXYL GROUPS CONTENT IN THE SUBSTRATE

G. V. Ilyina¹, D. Yu. Ilyin², A. A. Vorobieva³, A. R. Dashkina⁴

Penza State Agrarian University, 30 Botanicheskaya street, Penza, 440014, Russia

¹ilyina.g.v@pgau.ru, ²ilyin.d.u@pgau.ru, ³vorobieva.a.a@pgau.ru, ⁴albinadashkina99@gmail.com

Abstract. Background. The study of the role of the environment in implementing the ontogenetic program of organisms is an important aspect of modern ecology. Of particular interest is the study of the effect of trophic

components of the nutrient substrate on metabolic processes and the rate of development of microorganisms, in particular, the role of lignin destruction intermediates as a regulator of metabolic processes and the development of cellulose and lignolytic fungi. The aim of the research was to study the role of methoxyl groups of lignin as a factor stimulating the transition to the stage of secondary metabolism and teleomorphism in fungi of various groups. **Materials and methods.** To achieve this goal, a series of laboratory experiments was carried out with mycelial cultures of fungi of various systematic groups with complexes of cellulose- and lignolytic enzymes. Works with fungal cultures were carried out according to generally accepted methods. The experiments were carried out using Klasson's lignin percolates. Determination of the content of ergosterol in the mycelium was carried out by gas chromatography. The ability of basidiomycetes to form a teleomorph was studied under sterile conditions. **Results.** The conducted studies made it possible to establish the features of the effect of the methoxyl groups of lignin introduced into nutrient media on the growth, development, and synthesis of ergosterol by mycelium. The results were obtained, indicating the stimulation of the transition of mycelial cultures to secondary metabolism due to the indicated components of the medium. The established facts of stimulation of ergosterol synthesis by mycelium, as well as the manifestation of characteristic morphological features, the biochemical equivalent of which is secondary metabolism, indicate the role of methoxyl groups as inducers of the onset of the reproductive phase of culture. The formation of developed fruiting bodies in basidiomycetes, as well as differentiated primordia on substrates enriched in methoxyl groups, indicates that these lignin components (the concentration of which is noticeably higher in wood that has already undergone degradation processes in nature) can serve as fruiting factors not only in artificial, but also in natural conditions. **Conclusions.** Such components of lignin as methoxyl groups can affect the rate of development and metabolic processes of the mycelium of destructor fungi. The established facts of stimulation of ergosterol synthesis by mycelium, as well as the manifestation of characteristic morphological features, the biochemical equivalent of which is secondary metabolism, indicate the role of methoxyl groups as inducers of the onset of the reproductive phase of culture.

Keywords: lignin, fungal metabolism, methoxyl groups, mycelial culture ontogeny, secondary metabolism, teleomorph

For citation: Ilyina G.V., Ilyin D.Yu., Vorobieva A.A., Dashkina A.R. Evaluation of the relationship of ontogenetic processes in the mycelium of cellulolytic and lignolytic fungi with the methoxyl groups content in the substrate. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2021;6(4). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-4-4>

Введение

По мнению ряда авторов, лигнин как компонент природного субстрата грибов – представителей разных систематических групп, способных к деструкции древесины и растительных остатков, может влиять на морфогенез грибов в естественных условиях [1]. В процессе микробиологического разложения субстратов, содержащих лигнин, образуются разнообразные соединения как фенольной, так и нефенольной природы, которые могут выполнять ростовые, индукторные, корректирующие и целый ряд прочих функций, влияющих на ход развития мицелия [2, 3]. Сведения, касающиеся значения разных форм лигнина в качестве трофического и регуляторного фактора для чистых культур, в настоящее время довольно ограничены. Возможность влияния на ход развития гриба со стороны его природного субстрата (органической массы на разных стадиях разложения, а также интермедиатов, образующихся в процессе деструкции, в том числе производных лигнина, активных форм кислорода и других) представляет существенный интерес. В этой связи целесообразно изучение влияния промежуточных продуктов распада лигнина на онтогенетические процессы мицелия, культивируемого в модельных условиях. Целью исследований стало изучение роли метоксильных групп лигнина как фактора, стимулирующего переход

к стадии вторичного метаболизма и телеоморфы у грибов различных групп.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования послужили штаммы ксилотрофных базидиальных макромицетов (грибов белой гнили): *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát; *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx., *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Schizophyllum commune* Fr., *Pholiota aurivella* (Batsch) P. Kumm., а также мицелиальных почвенных грибов-деструкторов растительных остатков *Trichoderma viride* Pers, *Aspergillus terreus* Thom, *Penicillium chrysogenum* Thom, которые поддерживаются в коллекции мицелиальных культур Пензенского ГАУ. Культивирование мицелия проводили в глубинных условиях на среде Чапека и в поверхностной культуре на картофельно-глюкозном агаре по общепринятым методикам [4, 5]. Эксперименты проводили с использованием перколятов лигнина Классона, полученного как из нативных экстрагированных дубовых опилок, так и из обогащенных метоксильными группами ($-OCH_3$). Последние были получены в ходе предварительной обработки (метанолиза). Метанолиз – предварительная подготовка лигнин-содержащего материала, позволяющая суще-

ственно увеличить в нем число доступных метоксильных групп и олигомерных фрагментов лигнина путем воздействия 5 % раствора хлороводорода в метаноле [6]. Затем обе формы были подвергнуты перколяции. По литературным сведениям, в процессе перколяции до 40 % материала переходит в раствор [7]. При этом такие полимеры, как целлюлозы и гемицеллюлозы нативного субстрата (например, опилок), разрушаются до олигомерных и мономерных компонентов (в основном целлобиозы, глюкозы, ксилозы и т.д.). Таким образом, можно судить о влиянии со стороны метоксильных групп лигнанов, перешедших в раствор. Влияние же олигомерных и мономерных компонентов учесть сложно, но и исключить нельзя, поскольку их спектр (как качественный, так и количественный) чрезвычайно широк. В этой связи логичным представляется полное удаление углеводной составляющей из лигноцеллюлозного субстрата, т.е. получение модельного лигнина (лигнина Классона) [8].

О степени утилизации метоксильных групп мицелием судили по динамике их содержания в среде. Определение содержания метоксильных групп в субстратах осуществлялось методом Цейзеля в модификации с применением газожидкостной хроматографии [6].

Параметры развития мицелиальных культур оценивали по средней скорости роста мицелия, а также по интенсивности синтеза эргостерина как иллюстрации подготовки культуры к вторичному метаболизму [9, 10]. Определение содержания эргостерина в мицелии проводили методом с дериватизацией неомыляемой фракции липидов, экстрагированных из мицелия по методу Фолча в триметилсилильные производные [11]. В качестве стандарта использовали стандарт эргостерина фирмы «Merck». В работе использовали хроматограф «Кристалл-2000 М» с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный набивной колонкой с насадкой 5 % SE-30 на инертоне. После оценки влияния метанолизных групп субстратов на рост мицелия и синтез мицелием эргостерина была исследована способность культур ксило-трофных базидиомицетов к формированию телеоморфы в стерильных условиях.

Статистическая обработка проводилась с помощью программы для обработки и анализа данных «Statistica 6.0».

Результаты исследований

В целях проведения исследования два варианта модельных лигнинов были получены удалением углеводов из лигноцеллюлозных материалов (нативных и метанолизных опилок). Изначально содержание метоксильных групп

в нативных опилках составляло 18,9 мг/г материала или 0,61 мМ/г; содержание метоксильных групп в опилках, подвергшихся метанолизу, было более чем вдвое выше и составляло 41,6 мг/г (1,32 мМ/г). После сернокислотного гидролиза полученные модельные лигнины (лигнины Классона) подвергали кипячению на протяжении 48 часов с целью получения водорастворимых фракций. Полученные экстракты отфильтровывали от исходного материала и упаривали в ротационном испарителе до сухого остатка. Сухое вещество анализировали на количественное содержание метоксильных групп. Результаты анализа продуктов перколяции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Table 1

Содержание метоксильных групп
в продуктах перколяции
лигнина Классона, мМ/г

The content of methoxyl groups
in percolation products
of Klasson lignin, mM/g

Исходный лигноцеллюлозный субстрат для получения лигнина Классона	
Нативные опилки	Метанолизные опилки
2,50 ± 0,06	7,45 ± 0,03

Перколяты лигнинов вносили в глубинные питательные среды (среды Чапека модифицированные) для культивирования мицелия на микробиологической качалке. Мицелий развивался в течение 7 суток, по истечению которых его отфильтровывали от культуральной жидкости и высушивали до постоянной массы в условиях вакуумного роторного испарителя. Затем оценивали массу полученных образцов и проводили пробоподготовку для определения содержания в них эргостерина. Интенсивность накопления эргостерина – основного грибного стерина, играющего ключевую роль в формировании структуры мембран, а также представляющего собой исходное вещество для синтеза многих продуктов стероидной природы, многие из которых рассматриваются как вторичные метаболиты – служит иллюстрацией перехода культуры к вторичному метаболизму [12].

Исходя из предположений о стимулирующем влиянии избытка метоксильных групп лигнина на стимуляцию перехода культуры к идиофазе, интерес представляла оценка влияния метанолизного лигнина на содержание эргостерина. Биомассу воздушно-сухого мицелия, полученную в ходе глубинного культивирования на среде Чапека (контроль) и среде Чапека с добавлением перколятов нативного (первый

вариант) и метанолизного лигнина Классона, помещали в стеклянные эксикаторы, заливали смесью хлораформа в метаноле, полученные экстракты фракционировали. У каждого из изученных видов для настоящего исследования

были отобраны навески биомассы самых продуктивных штаммов (табл. 2). Определение содержания эргостерина в мицелии проводили газохроматографическим методом с дериватизацией в триметилсилильные производные.

Таблица 2

Table 2

Показатели содержания эргостерина (% от воздушно-сухой массы) в воздушно-сухом мицелии штаммов исследованных грибов (26 °C, 7 сут. развития, повторность трехкратная)

Indicators of ergosterol content (% of air-dry mass) in air-dry mycelium of the studied fungi strains (26 °C, 7 days of development, threefold repetition)

Вид, штамм	Контроль (среда Чапека)		Экстракт нативного лигнина		Экстракт метанолизного лигнина	
	Масса навески (мг)	% эргостерина	Масса навески (мг)	% эргостерина	Масса навески (мг)	% эргостерина
<i>I. obliquus</i> , IO-2	2983,7±182,1 ^a	0,74±0,04 ^{a*}	3113,3±133,1 ^a	0,79±0,02 ^{a*}	3023,0 ^a ±104,3	1,31±0,02 ^{b*}
<i>G. lucidum</i> , Gl-3	3638,2±74,2 ^a	0,87±0,01 ^{a*}	3104,4±121,1	0,91±0,02 ^{a*}	5303,2±139,1 ^b	1,49±0,02 ^{b*}
<i>F. fomentarius</i> , Nic-02	3081,7±83,7 ^a	1,06±0,04	5831,3±160,3 ^b	1,20±0,06 ^{a*}	4107,2±182,6 ^a	1,42±0,05 ^{b*}
<i>P. cinnabarrinus</i> , PyC-1	3292,2±90,3	1,11±0,13 ^{a*}	5062,8±144,8 ^b	1,19±0,02 ^{a*}	3619,5±172,9 ^a	1,50±0,03 ^{b*}
<i>F. velutipes</i> , FV-3	5782,1±80,7	0,37±0,07 ^{a*}	6108,1±78,9 ^a	0,41±0,02 ^{a*}	6832,3±132,1 ^b	0,42±0,06 ^{a*}
<i>P. ostreatus</i> , PlO(23)-08	3179,3±102,2	0,70±0,09	4321,8±122,5 ^a	1,08±0,03 ^{a*}	4751,1±144,4 ^b	1,03±0,09 ^{a*}
<i>S. commune</i> , SZ-1	2894,3±100,2 ^b	0,65±0,01 ^{a*}	2774,3±102,9 ^b	0,68±0,03 ^{a*}	1652,3±23,9 ^a	0,76±0,04 ^{b*}
<i>P. aurivella</i> , PhoA-5	2093,3±89,6	1,60±0,04 ^{a*}	3575,7±113,1 ^a	1,72±0,04 ^{b*}	4643,4±84,8 ^b	1,56±0,06 ^{a*}
<i>A. terreus</i> , Ater-12	2093,3±89,6	1,32±0,04 ^{a*}	3575,7±113,1 ^a	1,72±0,04 ^{b*}	4643,4±84,8 ^b	1,98±0,06 ^{b*}
<i>P. chrysogenum</i> , Pch-19	3781,1±36,7	1,37±0,07 ^{a*}	4109,1±18,9 ^a	1,41±0,02 ^{a*}	4977,3±19,1 ^b	1,92±0,06 ^{b*}
<i>T. viride</i> , TV-18	7308,1±78,9 ^a	0,78±0,13 ^{a*}	7529,5±151,5 ^a	0,83±0,04 ^{a*}	7506,1±153,8 ^a	1,24±0,01 ^{b*}

П р и м е ч а н и я. 1. * $p \leq 0,05$. 2. Результаты теста Дункана: **a**, **b** – маркировка групп по достоверным различиям в показателях биомассы; **a***, **b*** – по содержанию эргостерина.

Установлено, что содержание эргостерина закономерно выше в образцах мицелия, выращенного на средах с добавлением перколятов метанолизного лигнина. Навески биомассы, полученные за 7 суток культивирования, существенно различаются по массе у разных видов, что определяется ростовыми и трофическими особенностями видов и штаммов. Обнаружено, что внесение в питательные среды метанолизного лигнина может как стимулировать, так и угнетать рост биомассы у разных видов. Вероятно, это может быть связано с трофической специализацией и разной способностью включать углерод метоксидов в анаболические процессы. Стимуляция процессов образования эргостерина также не обнаруживает достоверной корреляции с процессами стимуляции накопления биомассы мицелия: например, средняя биомасса *I. obliquus* (штамм IO-2), зафиксированная в опытах, почти не превосходила среднюю биомассу, накапливаемую культурой в контроле, а содержание эргостерина в опыте с экстрактом метанолизного лигнина увеличилось в 1,71 раза. Пропорционально увеличилось накопление биомассы и содержание эргостери-

на в опытных вариантах по сравнению с контролем у *F. fomentarius* (штамм Nic-02) – в 1,33 и 1,32 раза соответственно увеличились оба показателя. Биомасса *G. lucidum* (штамм Gl-3) увеличилась в опыте по сравнению с контролем в 1,45 раза, а содержание эргостерина – в 1,31 раза. Интересный результат получен при оценке влияния метоксильных групп на изменение содержания эргостерина у *P. cinnabarrinus* (штамм PyC-1): на фоне отсутствия достоверного влияния на накопление биомассы показатели содержания эргостерина увеличились в 1,38 раза. У представителей почвенных микроорганизмов наблюдалась практически единообразная реакция на присутствие в среде метанолизного лигнина. На фоне незначительного влияния на процесс накопления биомассы выявлено достоверное влияние метоксидов на процесс синтеза эргостерина у *A. terreus* (штамм Ater-12) и *P. chrysogenum* (штамм Pch-19). Влияния на накопление биомассы в эксперименте с *T. viride* (штамм TV-18) не обнаружено, однако показана заметная стимуляция накопления эргостерина в мицелии под влиянием метоксильных групп субстрата. В целом максимальное коли-

чество достоверных отличий в содержании эргостерина отмечено для опыта с использованием именно метанолизного лигнина, что свидетельствует о роли в реализации данного эффекта именно метоксильных групп.

Отсутствие прямой связи между процессами накопления биомассы мицелия и интенсивностью синтеза эргостерина в опыте и в контроле свидетельствует о том, что помимо затрат этого вещества на пластический обмен культуры накапливают материал для синтеза на его основе веществ и образования структур на последующих стадиях развития. По всей вероятности, это резерв для синтеза вторичных метаболитов, связанных с протеканием репродуктивных процессов. В этой связи установленные закономерности предполагают исследование влияния изученных компонентов лигнина на процессы образования репродуктивных структур.

Для оценки роли метоксильных групп питательного субстрата на стимуляцию наступления телеоморфы в эксперимент было отобрано

по три штамма изученных видов. Предварительно проведенная серия экспериментов обеспечила возможность установления оптимальных пропорций лигноцеллюлозных материалов в составе питательных сред (2 % от массы среды). Исходя из особенностей роста культур на средах, содержащих лигноцеллюлозные компоненты в установленных оптимальных концентрациях, можно судить о том, что именно метанолизные опилки в качестве компонента питательной среды являются более доступным, чем материал нативных опилок, субстратом, поскольку выступают как фактор, положительно влияющий на развитие (табл. 3). Полученные результаты могут объясняться тем, что при добавлении небольшого количества опилок в агаризованную среду был создан «эффект разбавления», элиминирующий токсическое действие избытка метоксильных групп и олигомерных соединений лигнина, устранены такие лимитирующие развитие факторы, как дефицит легкодоступных сахаров и влаги.

Таблица 3

Table 3

Скорость роста культур грибов на плотных питательных средах (картофельно-глюкозный агар, КГА) с добавлением нативного и метанолизного источников лигнина, 2 % от массы среды (мм/сут $\pm\Delta^*$, 26 °C, повторность трехкратная)

The growth rate of mushroom cultures on solid nutrient media (potato-glucose agar, CGA) with the addition of native and methanolysis sources of lignin, 2% of the medium mass (mm/day $\pm \Delta^*$, 26 °C, threefold repetition)

Вид	Штамм	Питательные среды		
		КГА (контроль)	КГА, опилки	КГА, опилки метанолизные
1	2	3	4	5
<i>I. obliquus</i>	ЮО-1	3,17 $\pm$ 0,08 ^a	3,06 $\pm$ 0,06	3,9 $\pm$ 0,04 ^b
	ЮО-2	2,75 $\pm$ 0,05	3,14 $\pm$ 0,08 ^a	4,0 $\pm$ 0,09 ^b
	ЮО-3	1,43 $\pm$ 0,03	2,05 $\pm$ 0,21 ^a	3,5 $\pm$ 0,03 ^b
<i>G. lucidum</i>	ГЛ-1	9,60 $\pm$ 0,10 ^a	8,67 $\pm$ 0,03	12,52 $\pm$ 0,05 ^b
	ГЛ-3	12,07 $\pm$ 0,03 ^a	10,02 $\pm$ 0,16	13,39 $\pm$ 0,06 ^b
	ГЛ-6	5,97 $\pm$ 0,14 ^a	6,13 $\pm$ 0,25 ^a	9,92 $\pm$ 0,03 ^b
<i>F. fomentarius</i>	АН-96	6,20 $\pm$ 0,10	8,22 $\pm$ 0,15 ^a	12,31 $\pm$ 0,13 ^b
	Нс-02	4,13 $\pm$ 0,07	9,61 $\pm$ 0,12 ^a	14,07 $\pm$ 0,22 ^b
	Лр-05	4,40 $\pm$ 0,06	7,09 $\pm$ 0,05 ^a	14,40 $\pm$ 0,07 ^b
<i>P. cinnabarinus</i>	РсС-1	5,17 $\pm$ 0,09	5,51 $\pm$ 0,04 ^a	11,2 $\pm$ 0,19 ^b
	РсС-2	6,40 $\pm$ 0,10 ^a	6,53 $\pm$ 0,01 ^a	9,37 $\pm$ 0,12 ^b
	РсС-4	6,67 $\pm$ 0,08 ^a	7,72 $\pm$ 0,04 ^a	9,12 $\pm$ 0,24 ^b
<i>F. velutipes</i>	ФВ-1	5,55 $\pm$ 0,01 ^a	5,33 $\pm$ 0,06	6,14 $\pm$ 0,01 ^b
	ФВ-3	4,98 $\pm$ 0,04	5,92 $\pm$ 0,03 ^a	6,18 $\pm$ 0,02 ^b
	ФВ-9	6,14 $\pm$ 0,01	8,13 $\pm$ 0,02 ^b	7,12 $\pm$ 0,02 ^a
	Фп-3	9,32 $\pm$ 0,16 ^a	7,56 $\pm$ 0,13	11,15 $\pm$ 0,15 ^b
<i>P. ostreatus</i>	ПЛО(23)-08	9,33 $\pm$ 0,11 ^a	11,01 $\pm$ 0,09 ^b	9,30 $\pm$ 0,07 ^a
	ПЛО(Lam)-08	10,01 $\pm$ 0,03	9,97 $\pm$ 0,01 ^a	10,59 $\pm$ 0,02 ^b
	ПЛО(23)-08	11,99 $\pm$ 0,07	13,03 $\pm$ 0,12 ^a	14,22 $\pm$ 0,06 ^b
<i>S. commune</i>	СЗ-1	10,89 $\pm$ 0,04 ^a	12,01 $\pm$ 0,09 ^b	10,61 $\pm$ 0,05
	СЗ-2	12,13 $\pm$ 0,12	12,66 $\pm$ 0,11 ^a	13,98 $\pm$ 0,09 ^b
	СЗ-3	13,11 $\pm$ 0,16	13,03 $\pm$ 0,04 ^a	13,10 $\pm$ 0,01 ^a
<i>P. aurivella</i>	PhoA-3	5,88 $\pm$ 0,16 ^a	8,32 ^b $\pm$ 0,09 ^b	6,75 $\pm$ 0,12 ^b
	PhoA-4	6,05 $\pm$ 0,08	9,01 $\pm$ 0,09 ^b	8,03 $\pm$ 0,19 ^a
	PhoA-5	5,32 $\pm$ 0,11	7,77 $\pm$ 0,04 ^a	8,15 $\pm$ 0,13 ^b

Окончание табл. 3

Table 3 continuation

1	2	3	4	5
<i>A. terreus</i>	Ater-12	7,07±0,03	9,93±0,07 ^a	10,43±0,10 ^b
	Ater-12	8,23±0,13	9,46±0,11 ^a	11,54±0,24 ^b
	Ater-12	6,10±0,10	10,03±0,04 ^a	10,36±0,20 ^a
<i>P. chrysogenum</i>	Pch-19	4,79±0,08 ^a	6,24±0,02	7,72±0,06 ^a
	P.chys-11	6,93±0,03	8,32±0,05 ^a	9,72±0,07 ^b
	Pch-16	5,88±0,02 ^a	7,84±0,08 ^a	8,88±0,01 ^a
<i>T. viride</i>	TV-4	11,13±0,09	12,46±0,07 ^a	14,11±0,04 ^a
	TV-10	12,97±0,06	13,72±0,03 ^a	13,9±0,04 ^a
	TV-18	13,95±0,03	15,03±0,02 ^a	15,34±0,03 ^a

П р и м е ч а н и я. 1. * $p \leq 0,05$. 2. Результаты теста Дункана: **a, b** – маркировка групп по достоверным различиям в показателях.

В первом варианте опыта (внесение опилок механического размола в КГА) существенных отличий от контроля (КГА) выявлено не было, хотя для отдельных штаммов установлена незначительная стимуляция роста. Во втором варианте (метанолизные опилки, КГА) следует отметить факт достоверной стимуляции роста большинства штаммов как видов – представителей ксилотрофных базидиомицетов, так и представителей почвенных микромицетов. Особенно заметная стимуляция роста мицелия выявлена у видов (в порядке убывания эффекта стимуляции) *F. fomentarius*, *P. cinnabarinus*, *I. obliquus*, *S. crispa*, *A. terreus*.

Таким образом, на видовом уровне прослеживается разная степень стимуляции развития мицелия путем добавления к питательному субстрату источников метоксильных групп

лигнина. Несомненен факт включения таких источников углерода в метаболизм культур, а «рыхлое» состояние молекул в дериватизированном лигнине делает его более доступным для ферментативных систем гриба.

Образование примордиев (зачатков плодовых тел) наблюдалось у изученных видов грибов базидиомицетов – *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *P. cinnabarinus*, *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *S. commune* и *P. aurivella* на 20–25 сутки развития на стерильных агаризованных питательных субстратах. Как правило, узелки примордиев не проявляли выраженной тенденции к дифференциации. Однако в вариантах с добавлением к питательной среде метанолизных опилок и – реже – в вариантах с нативными у зачатков плодовых тел этих видов появлялась тенденция к дифференциации (табл. 4).

Таблица 4

Table 4

Формирование зачатков плодовых тел на мицелии штаммов изученных видов ксилотрофных базидиомицетов на разных средах в стерильных условиях

Formation of rudiments of fruiting bodies on the mycelium of strains of the studied species of xylophilic basidiomycetes on different media under sterile conditions

Вид, штамм	Сроки появления зачатков плодовых тел (сутки после холодильника) и их дифференцирование на разных средах*											
	КГА (контроль)				КГА + нативные опилки				КГА + метанолизные опилки			
	12	15	20	25	12	15	20	25	12	15	20	25
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>I. obliquus</i> , IO-1	–	–	–	–	+	+	+	+д	+	+	+д	+д
<i>Ph. tremulae</i> , Pht-1	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+
<i>S. crispa</i> , AI-10								+			+	+д
<i>F. pinicola</i> , Fpi-2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. sulphureus</i> , PD-01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G. applanatum</i> , G-1	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+д
<i>G. lucidum</i> , Gl-1	–	–	+	+д	+	+	+д	+д	+	+д	+д	+д
<i>F. fomentarius</i> , Nic-02	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+д	+д	+д
<i>P. cinnabarinus</i> , PyC-1	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+д	+д
<i>H. annosum</i> , Han-2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. hepatica</i> , Fh-5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. velutipes</i> , FV-9	–	–	+	+д	–	+	+д	+д	–	+д	+д	+д
<i>P. ostreatus</i> , PIO(23)-08	–	–	+д	+д	–	+	+д	+д	–	+	+д	+д

Окончание табл. 4

Table 4 continuation

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>S. commune</i> , SZ-2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+д	+д
<i>P. aurivella</i> , PhoA-5	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+д	+д

П р и м е ч а н и я. * «–» – примордиев не отмечено; «+» отмечены зачаточные структуры примордиев (узелки); «д» – дифференцированные примордии, заметен гименофор.

При изучении развития данных видов почвенных микромицетов обнаружены более ранние сроки начала споруляции (*A. terreus*, *P. chrysogenum*) на средах, содержащих источники метоксильных групп, в вариантах с нативными и метанолизными опилками, на 1–2 суток относительно контроля. Установлено также усиление пигментации мицелия *T. viride* (рис. 1). В литературе встречаются сведения

о корректирующем влиянии на развитие мицелия и конкурентные отношения видов со стороны фенольных и близких к ним компонентах субстрата [13–15]. Роль интермедиатов лигнина в развитии почвенных микроорганизмов представляет несомненный интерес [16–18]. Полученные результаты свидетельствуют о стимуляции наступления репродуктивной фазы онтогенеза культуры.

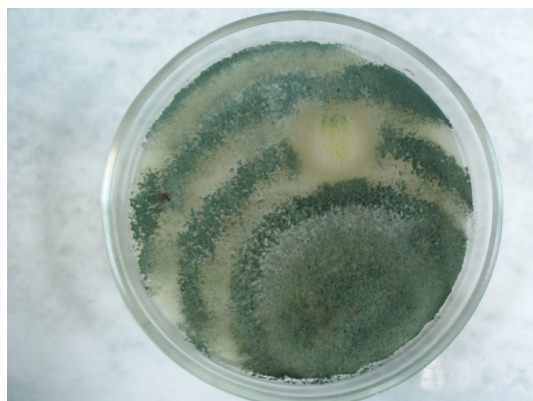


Рис. 1. Яркая пигментация колонии *T. viride* (штамм TV-18) на вторые сутки развития культуры на среде с добавлением метанолизного лигнина

Fig. 1. Bright pigmentation of *T. viride* colony (strain TV-18) on the second day of culture development on the medium with the addition of methanolysis lignin

Виды ксилотрофных базидиомицетов *P. ostreatus* и *F. velutipes*, в целом склонные к формированию телеоморфы на стерильных средах, приступили к плодоношению в присутствии источников метанолизного лигнина в субстрате

в более ранние сроки. Примордии на таких средах характеризовались, по сравнению с контрольными вариантами, более выраженными, типичными для видов габитусами с хорошо выраженной дифференциацией (рис. 2, 3).



Рис. 2. Образование дифференцированных примордиев культурой *P. ostreatus*, штамм PIO(23)-08 на стерильной среде, содержащей метанолизные источники лигнина

Fig. 2. The formation of differentiated primordia by the culture of *P. ostreatus*, strain PIO(23)-08 on a sterile medium containing methanolysis sources of lignin



Рис. 3. Миниатюрные базидиомы, образованные культурой *F. velutipes*, штамм FV-9 на стерильной среде, содержащей метанолизные источники лигнина

Fig. 3. Miniature basidiomas formed by the culture of *F. velutipes*, strain FV-9 on a sterile medium containing methanolysis sources of lignin

У вида *I. obliquus* была отмечена склонность к образованию зачатков плодовых тел на стерильной среде, но в контроле не было выявлено

такой яркой морфологии примордиев и их дифференциации, как в вариантах с нативными и метанолизными опилками (рис. 4).



а)



б)



в)

Рис. 4. Образование примордиев на стерильной среде культурой штамма IO-1 *I. obliquus*: а – вариант с добавлением нативных опилок, 15-е сутки; б – вариант с добавлением нативных опилок, 25-е сутки; в – вариант с добавлением метанолизных опилок, 25-е сутки

Fig. 4. Formation of primordia on a sterile medium by culture of strain IO-1 *I. obliquus*: а – variant with the addition of native sawdust, day 15; б – variant with the addition of native sawdust, day 25; в – variant with the addition of methanolysis sawdust, day 25

Заметно, что дифференциация примордиев активнее происходила в варианте с метанолизными опилками. Дифференциация зачатков плодовых тел и формирование типичной для данных видов структуры гименофоров на питательных средах, содержащих источники метанолизного лигнина,

были отмечены у видов *F. fomentarius* (штамм Nic-02), *P. cinnabarinus* (штамм PyC-1), *P. aurivella* (штамм PhoA-5) (рис. 5–7). Причем ни в контроле, ни в варианте с нативными опилками в эти сроки образования примордиев с тенденцией к дифференциации не отмечено.



Рис. 5. Зачаток гименофора на мицелии *F. fomentarius* (штамм Nic-02), сформированный на среде с добавлением метанолизных опилок, 15-е сутки

Fig. 5. Hymenophore germ on the mycelium of *F. fomentarius* (strain Nic-02), formed on a medium with the addition of methanolysis sawdust, day 15



Рис. 6. Базидиома *P. cinnabarinus* (штамм PyC-1), сформированная на среде с добавлением метанолизных опилок, 20-е сутки

Fig. 6. *P. cinnabarinus* basidioma (PyC-1 strain), formed on the medium with the addition of methanolysis sawdust, day 20



Рис. 7. Базидиома *P. aurivella* (штамм PhoA-5), сформированная на среде с добавлением метанолизных опилок, 20-е сутки

Fig. 7. Basidioma of *P. aurivella* (strain PhoA-5) formed on the medium with the addition of methanolysis sawdust, day 20

Достаточно ценные с практических позиций результаты были получены при изучении возможностей стимуляции посредством обогащения питательной среды источниками метанолизного лигнина процесса плодообразования в чистой культуре у такого ценного в биотехно-

логии вида, как *G. lucidum*. Образование примордиев у данного вида активно происходит и в контрольных вариантах (рис. 8).

Однако более четкая тенденция к дифференциации базидиомы прослеживается также под влиянием метанолизных источников лигнина (рис. 9).



Рис. 8. Примордии на мицелии *G. lucidum* (штамм Gl-1), сформированные на картофельно-глюкозном агаре (контроль), 25-е сутки

Fig. 8. Primordia on the *G. lucidum* (strain Gl-1) mycelium formed on potato-glucose agar (control), day 25



Рис. 9. Дифференцированный примордий на мицелии *G. Lucidum* (штамм Gl-1), сформированный на среде с добавлением метанолизных опилок, 20-е сутки

Fig. 9. Differentiated primordia on the *G. Lucidum* (strain Gl-1) mycelium formed on the medium with the addition of methanolysis sawdust, day 20

Следует отметить, что при обычном хранении вне настоящего эксперимента данный штамм *G. lucidum* не проявляет выраженной склонности к плодообразованию на агаризованных средах. Известные из литературы модельные опыты с различными метоксилированными фенолами показали, что грибы белой гнили активно деметилируют метоксильные группы [1]. Опыты с меченым (^{14}C) лигнином свидетельствуют, что при разложении такими грибами конечный продукт метаболизма CO_2 образуется главным образом из метоксильных групп и в небольшой степени из углерода пропановых цепей и ароматических колец. Таким образом, нет сомнения в том, что метоксильные группы не-

безразличны для культуры *G. lucidum* как типичного представителя грибов белой гнили.

Установленная в экспериментах стимуляция плодообразования путем обогащения питательной среды источниками метанолизного лигнина свидетельствует о том, что метоксильные группы в определенной степени могут играть роль регуляторов вторичного метаболизма, а, возможно, своеобразного триггерного фактора в процессе плодообразования. Формирование развитых плодовых тел у базидиомицетов, а также дифференцированных примордиев на субстратах обогащенных метоксильными группами свидетельствует о том, что эти компоненты лигнина (концентрация которых за-

метно выше в древесине, уже подвергшейся процессам деструкции в природе) могут служить факторами плодоношения не только в искусственных, но и в естественных условиях.

Выводы

Такие компоненты лигнина, как метоксильные группы, способны оказывать воздействие

на темпы развития и метаболические процессы мицелия грибов-деструкторов. Установленные факты стимуляции синтеза эргостерина мицелием, а также проявления характерных морфологических признаков, биохимическим эквивалентом которых является вторичный метаболизм, говорят о роли метоксильных групп как индукторов наступления репродуктивной фазы культуры.

Список литературы

1. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина (химия, ультраструктура, реакции) : пер. с англ. / под ред. А. А. Леоновича. М. : Лесная промышленность, 1988. 512 с.
2. Айзенштадт М. А., Боголицын К. Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 5–18.
3. Решетникова И. А. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. М., 1997. 197 с.
4. Бисько Н. А., Дудка И. А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка. Киев, 1987. 148 с.
5. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев : Наукова думка, 1988. 144 с.
6. Закис Г. Ф. Функциональный анализ лигнинов и их производных. Рига : Зинатне, 1987. 230 с.
7. Грушников О. П., Елкин В. В. Достижения и проблемы химии лигнина. М. : Наука, 1973. 296 с.
8. Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы : учеб. пособие для вузов. М. : Экология, 1991. 320 с.
9. Лыков Ю. С., Ильина Г. В., Ильин Д. Ю. Возможности стимуляции синтеза эргостерина мицелием ксилотрофных базидиомицетов в условиях глубинной культуры // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского. 2011. № 25. С. 290–294.
10. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М. : Просвещение, 1987. 815 с.
11. Folch J., Lees M., Sloane G. H. Stanley Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues // The Journal of Biological Chemistry. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
12. Smith J. E., Rowan N. J., Sullivan R. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Glasgow : University of Strathclyde, 2002. 256 p.
13. Стручкова И. В., Лазарева Е. С., Смирнов В. Ф. Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *Aspergillus terreus* при его росте на новых полимерных материалах // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 591–595.
14. Guo F., Qin S., Xu L. [et al.]. Thermal degradation features of soil humic acid sub-fractions in pyrolytic treatment and their relation to molecular signatures // Science of The Total Environment. 2020. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142318
15. Henderson M. E., Farmer V. C. Utilization by soil fungi of p-hydroxybenzaldehyde, ferulic acid, syringaldehyde and vanillin // J Gen Microbiol. 1955. Vol. 12, № 1. P. 37–46. doi:10.1099/00221287-12-1-37
16. Mhlongo S. I., Viljoen-Bloom M., Van Zyl W. H., Den Haan R. Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance // Enzyme and Microbial Technology. 2015. Vol. 81. P. 16–22. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.07.005
17. Lee S., Monnappa A. K., Mitchell R. J. Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds // BMB Reports. 2012. Vol. 45, № 5. P. 265–274. doi:10.5483/bmbrep.2012.45.5.265
18. Zhang D., Yan D., Cheng H. [et al.]. Effects of multi-year biofumigation on soil bacterial and fungal communities and strawberry yield // Environ Pollut. 2020. doi:10.1016/j.envpol.2019.113415

References

1. Fengel D., Vegener G. *Drevesina (khimiya, ul'trastruktura, reaktsii): per. s angl.* = . Moscow: Lesnaya promyshlennost', 1988:512. (In Russ.)
2. Ayzenshtadt M.A., Bogolitsyn K.G. Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* = Chemistry of plant raw materials. 2009;(2):5–18. (In Russ.)
3. Reshetnikova I.A. *Destruktsiya lignina ksilotrofnymi makromitsetami. Nakoplenie selena i fraktsionirovanie ego izotopov mikroorganizmami* = Destruction of lignin by xylophilic macromycetes. Selenium accumulation and fractionation of its isotopes by microorganisms. Moscow, 1997:197. (In Russ.)
4. Bis'ko N.A., Dudka I.A. *Biologiya i kul'tivirovanie s'edobnykh gribov roda veshenka* = Biology and cultivation of edible mushrooms of the genus oyster mushroom. Kiev, 1987:148.
5. Bukhalo A.S. *Vysshie s'edobnye bazidiomitsety v chistoy kul'ture* = Higher edible basidiomycetes in pure culture. Kiev: Naukova dumka, 1988:144.

6. Zakis G.F. *Funktsional'nyy analiz ligninov i ikh proizvodnykh* = Functional analysis of lignins and their derivatives. Riga: Zinatne, 1987:230.
7. Grushnikov O.P., Elkin V.V. *Dostizheniya i problemy khimii lignin* = Achievements and problems of lignin chemistry. Moscow: Nauka, 1973:296. (In Russ.)
8. Obolenskaya A.V., El'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy: ucheb. posobie dlya vuzov* = Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose: textbook for universities. Moscow: Ekologiya, 1991:320. (In Russ.)
9. Lykov Yu.S., Il'ina G.V., Il'in D.Yu. Possibilities of stimulating ergosterol synthesis by mycelium of xylotrophic basidiomycetes under conditions of submerged culture. *Izvestiya Penzenskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta im. V. G. Belinskogo* = V.G. Belinsky Penza State Pedagogical University proceedings. 2011;(25):290–294. (In Russ.)
10. Ovchinnikov Yu.A. *Bioorganicheskaya khimiya* = Bioorganic chemistry. Moscow: Prosveshchenie, 1987:815. (In Russ.)
11. Folch J., Lees M., Sloane G.H. Stanley Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957;226:497–509.
12. Smith J.E., Rowan N.J., Sullivan R. *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. Glasgow: University of Strathclyde, 2002:256.
13. Struchkova I.V., Lazareva E.S., Smirnov V.F. Amylase and oxidoreductase activity of the mycodestructor *Aspergillus terreus* in the course its growth on new polymeric materials. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo* = N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod University proceedings. 2010;(2):591–595. (In Russ.)
14. Guo F., Qin S., Xu L. [et al.]. Thermal degradation features of soil humic acid sub-fractions in pyrolytic treatment and their relation to molecular signatures. *Science of The Total Environment*. 2020. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142318
15. Henderson M.E., Farmer V.C. Utilization by soil fungi of p-hydroxybenzaldehyde, ferulic acid, syringaldehyde and vanillin. *J Gen Microbiol*. 1955;12(1):37–46. doi:10.1099/00221287-12-1-37
16. Mhlongo S.I., Viljoen-Bloom M., Van Zyl W.H., Den Haan R. Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015;81:16–22. doi:10.1016/j.enzmtec.2015.07.005
17. Lee S., Monnappa A.K., Mitchell R.J. Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds. *BMB Reports*. 2012;45(5):265–274. doi:10.5483/bmbrep.2012.45.5.265
18. Zhang D., Yan D., Cheng H. [et al.]. Effects of multi-year biofumigation on soil bacterial and fungal communities and strawberry yield. *Environ Pollut*. 2020. doi:10.1016/j.envpol.2019.113415