

ВЕРХУШЕЧНЫЙ РОСТ *NEUROSPORA CRASSA* ПРИ ДЕФИЦИТЕ РЕСУРСОВ: НАРУШЕНИЕ СОГЛАСОВАННОСТИ УДЛИНЕНИЯ, ВЕТВЛЕНИЯ И СЕПТИРОВАНИЯ

© Т. В. Потапова,¹ Л. Ю. Бойцова, С. А. Голышев, А. Я. Дунина-Барковская

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991;

¹ электронный адрес: potapova@genebee.msu.su

У мицелиального гриба *Neurospora crassa* исследованы (с помощью внутриклеточных флуоресцентных маркеров) особенности удлинения, ветвления, септирования и морфологии ядер при росте изолированных от мицелия верхушек гиф длиной ~400 мкм в течение нескольких часов. У вновь развивающихся ветвей: 1) сохраняется ранее существовавшая ориентация при уменьшении диаметра (от 10—20 до 6.5 ± 0.4 мкм) и скорости удлинения (от 24 ± 1 до 6.7 ± 0.5 мкм/мин); 2) нарушается ритмичность ветвления с появлением аномально больших межузловых расстояний (до 1471 мкм) и останавливаются в развитии некоторые зачатки боковых ветвей; 3) сохраняются ритмичность септирования и относительное постоянство длины сегмента гифы (68 ± 2 мкм). У дочерних ветвей изолированных фрагментов размеры безъядерной зоны на верхушках (от 5 до 33 мкм) и удаленность 1-й септы от точки роста (210 ± 15 мкм) примерно такие же, как у гиф, связанных с мицелием, но среднее расстояние от точки роста до 1-й боковой ветки (492 ± 127 мкм) и разброс значений этого показателя больше, чем у интактных гиф. Морфология ядер и размеры безъядерной зоны вблизи точки роста не отличаются от этих показателей, известных для вегетативных гиф *N. crassa* в норме. Полученная экспериментальная модель может быть полезна для выяснения деталей молекулярно-генетических механизмов регуляции взаимодействий внутриклеточных структур, обеспечивающих верхушечный рост гиф *N. crassa*.

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

Принятые сокращения: ВР — верхушечный рост, L — длина фрагмента, CFW — Calcofluor White, DAPI — 4',6-диамино-2-фенилиндола, E_m — мембранный потенциал, $V_{удл}$ — скорость удлинения, d — диаметр гифы.

Мицелиальный гриб *Neurospora crassa* — один из популярных модельных объектов с полностью расшифрованным геномом и обширной базой мутантных линий, предоставляемых Fungal Genetic Stock Center (<http://www.fgsc.net/>). Основная структурная единица мицелия *N. crassa* — вегетативная гифа с диаметром (d), равным приблизительно 10—20 мкм, — непрерывно удлиняется на переднем конце со скоростью ($V_{удл}$) 20—30 мкм/мин (при комнатной температуре) и дает боковые ветви, которые также осваивают пространство за счет верхушечного роста (ВР) (Davis, 2000). Гифа *N. crassa* разделена на сегменты длиной 50—100 мкм септами, так что пора в центре септы свободно пропускает цитоплазму и органеллы, включая ядра, однако способна закупориваться специальными структурами (тельцами Воронина, кристаллами эргостерола, актиновыми нитями). Септальные поры *N. crassa* не только позволяют двигаться вдоль гифы потокам вещества, но и обеспечивают электрическую связь с такими же кабельными характеристиками, как у щелевых контактов между животными клетками (Чайлахян и др., 1984).

В каждом сегменте гифы *N. crassa* содержится несколько десятков ядер, которые свободно перемещаются

вдоль гифы, проникая сквозь септальные поры, вращаются и асинхронно делятся каждые 80—90 мин (Davis, 2000). Считается, что при высокой $V_{удл}$ для обеспечения ядрами апикального отдела гифы в него должны поступать ядра из более взрослой части гифы длиной 800—900 мкм (Roper et al., 2011, 2013). В целом для обеспечения ВР гифы с указанными выше параметрами необходимо поступление к точке роста веществ из более взрослых зон, удаленных на 10—12 мм от верхушки (Davis, 2000).

При сбалансированном росте мицелия *N. crassa* согласованно увеличиваются длина гиф, число ветвей и число септ, количество ядер и митохондрий, ДНК и РНК, белков и полимеров клеточной стенки и в целом сухая масса (Trinchi et al., 1994). На плоской поверхности гифа образует двухмерное дерево, у которого $V_{удл}$ верхушек так согласована с периодичностью ветвлений, что сохраняется постоянное отношение суммарной длины всех ветвей к числу растущих верхушек — гифальная единица роста (HGU), равная ~360 мкм (Davis, 2000). В десятках лабораторий мира с использованием современных технологий исследуются молекулярно-генетические детали ВР

гиф *N. crassa*, однако, несмотря на солидные массивы данных, остаются непонятными механизмы запуска процессов удлинения, ветвления и септирования, а также закономерности их согласования между собой и с активностью ядер (Roper et al., 2011).

В настоящей работе исследованы особенности роста и развития в течение нескольких часов коротких фрагментов гифальных верхушек, лишенных материальной поддержки со стороны взрослого мицелия. У дочерних ветвей таких фрагментов уменьшены d и $V_{удл}$, что упрощает количественные оценки распределения внутриклеточных флуоресцентных маркеров. Обнаружены закономерные нарушения ветвления при относительном постоянстве характеристик септирования. Морфология и распределение ядер на передних концах дочерних ветвей изолированных фрагментов не отличаются от известных для гиф *N. crassa* в норме.

Материал и методика

Объект и его выращивание. Споры *N. crassa* (штамм R-2 из коллекции Т. А. Белозерской, ИБХ им. А. Н. Баха РАН) высевали на поверхность агаризованной среды Фогеля, обогащенной 2 мМ глюкозы; формирующийся мицелий выращивали в течение 1 сут при 24 °C, а затем помещали на 2—3 сут в холодильник при 4 °C. Для опытов вырезали из этой запасной культуры небольшой агаровый блок и перекладывали мицелием вниз на такую же среду, покрытую целлофаном. Инкубацию мицелия и все операции проводили при 22—24 °C при освещении красным светом, чтобы избежать перевозбуждения мицелия синей частью светового спектра (Potapova et al., 1984).

Через 15—18 ч роста мицелия вырезали кусочки целлофана размером около 2×2 см² вплотную к верхушкам гиф, тщательно промывали средой Фогеля и перекладывали мицелием вверх в малые чашки Петри с агаризованной средой. Примерно через 2 ч, когда верхушки лидирующих гиф выходили на агар и удалялись от края целлофана на расстояние >2000 мкм, проводили контрольную фотосъемку для оценки $V_{удл}$ лидирующих верхушек. Для дальнейших опытов использовали культуры с $V_{удл} > 20$ мкм/мин. У лидирующих гиф изолировали верхушечные фрагменты длиной 300—700 мкм, как описано ранее (Потапова и др., 2011), и наблюдали за их ростом и развитием около 6 ч.

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

Для выявления ядер культуры в малых чашках Петри фиксировали 3.5%-ным раствором формальдегида в среде Фогеля в течение 10 мин и промывали водой. Затем вырезали кусочек агарового блока с интактными гифами или с изолированными фрагментами и перекладывали мицелием вниз в камеру с дном из покровного стекла в раствор (1 мкг/мл) DAPI (Sigma-Aldrich, США) — флуоресцентного маркера ядерной ДНК, широко используемого при исследовании грибов (Schnedl et al., 1977; Thompson-Cofee, Zicker, 1994; Minke et al., 1999a, 1999b).

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

Сигналы CFW и DAPI регистрировали с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), управляемого программным комплексом Axiovision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и оборудованного объективами Plan-Neofluar с увеличениями 10× (NA 0.5) и 100× (NA 1.3). Сигналы CFW и DAPI регистрировали в синем канале (возбуждающий фильтр 365/12 нм, делительное зеркало 395 нм и запирающий широкополосный фильтр 397 нм). Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Для регистрации изображений использовали цифровую камеру ORCA II ERG-2 (Hamamatsu Photonics, Япония). Анализ изображений проводили с помощью программы AxioVision LE.

Результаты

Удлинение, ветвление и септирование гиф, связанных с мицелием, и изолированных фрагментов. У использованного нами штамма *N. crassa*, по оценкам, проведенным для 15 гиф (рис. 1; табл. 1), параметры BP не отличались от обычных для этого гриба (Davis, 2000). При изоляции верхушечных фрагментов гиф на расстоянии ~400 мкм от точки роста часть фрагментов пустела, часть сохраняла внутреннее содержимое, но переставала расти (рис. 2), а часть продолжала удлиняться. Как правило, дочерние ветви изолированных фрагментов сохраняли ориентацию роста, но имели меньший диаметр и удлинялись с меньшей скоростью, чем гифы, связанные с мицелием (рис. 2, 3; табл. 2). У некоторых фрагментов наблюдался ретроградный рост, т. е. удлинение в противоположном направлении.

У лидирующих дочерних ветвей фрагментов по сравнению с обычными гифами практически не меняется расстояние от точки роста до ближайшей септы, слабо меняется длина сегмента, однако существенно меняется характер ветвления (рис. 2—4).

На рис. 2 представлены два фрагмента длиной ~420 мкм, один из которых после изоляции продолжил рост двумя лидирующими ветвями. У фрагмента, продолжившего рост, в момент изоляции было 4 боковые ветки и 4 септальные перегородки. $V_{удл}$ верхней ветви фрагмента увеличивалась по мере роста от 4.9 мкм/мин в первые 3 ч роста до 9.4 мкм/мин в следующие 2.5 ч. У этой ветви через 4 ч после изоляции фрагмента произошло 1 боковое ветвление и сформировалось 18 септальных перегородок (табл. 1). В этот момент ближайшая к верхушке септа находилась на расстоянии 226 мкм от точки роста, а ближайшая боковая ветка — на расстоянии 1471 мкм от точки роста. Примерно через 6 ч после изоляции фрагмента к его дочерним ветвям приблизились верхушки соседних гиф, связанных с мицелием; у них заметно больше диаметр и более интенсивное ветвление (рис. 2).

Фрагмент, представленный на рис. 3, в момент изоляции имел длину 360 мкм и 1 боковую ветку на расстоянии

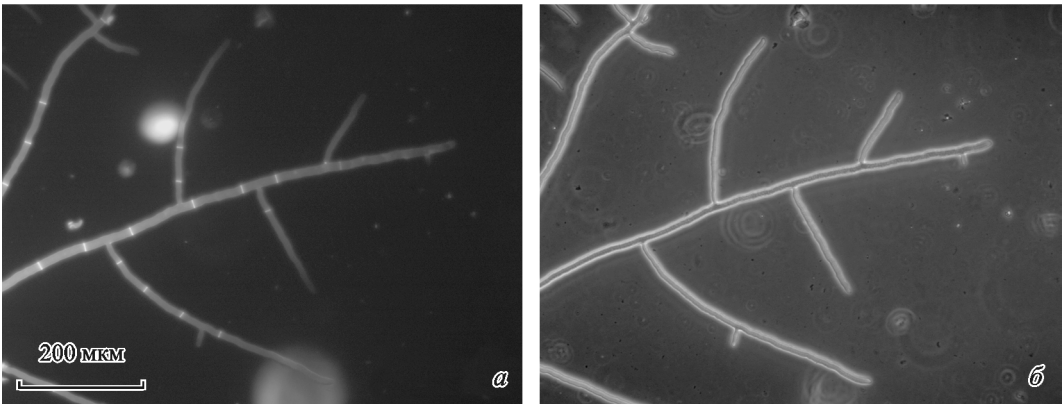


Рис. 1. Лидирующая верхушка гифы, связанной с мицелием.
а — флуоресценция зонда CFW; б — фазово-контрастное изображение. Световая микроскопия, об. 10×.

100 мкм от верхушки. Эта ветка остановила рост, но за время наблюдения в старой части фрагмента появились еще 3 боковые ветки, а также росток из корневой части, успешно удлинявшийся с формированием новых боковых ветвей и септ. Верхушечная часть фрагмента сохранила ранее существовавшую ориентацию роста и удлинялась, но ее d был меньше, чем до операции, а $V_{удл}$ постепенно возрастала от 1.4 в первые 2 ч до 4.4 мкм/мин в течение следующего часа и далее до 7.5 мкм/мин. За 5 ч наблюдения лидирующая дочерняя ветвь фрагмента удлинилась на 1417 мкм и сформировала 16 новых септ. После 5-часового роста у нее сначала появились 2 боковые ветви, развивавшиеся очень медленно, затем 1 за-

чаток боковой ветви, не получивший развития, и наконец, 1 полноценная боковая ветвь на переднем конце. У лидирующей ветви ближайшая к верхушке септа располагалась на расстоянии 300 мкм от точки роста, а ближайшая боковая ветка — на расстоянии 726 мкм от точки роста.
Всего мы исследовали характеристики удлинения, ветвления и септирования у 7 фрагментов длиной от 272 до 487 мкм в течение 3—6 ч после изоляции от мицелия. У трех фрагментов сразу после операции стали независимо развиваться по 2 верхушки, так что общее число наблюдений составило 10 дочерних лидирующих ветвей (табл. 2). Все фрагменты продолжили рост с уменьшени-

Т а б л и ц а 1

Расположение узлов ветвления и септ на верхушках лидирующих гиф, связанных с мицелием					
$V_{удл}^a$ мкм/мин	Длина фрагмента (L), ^б мкм				Время ФС, ^в мин
	до 1-й ветки	до 1-й септы	между узлами	между септами	
24.0	81	209	220	110, 69, 52, 107, 94	3.6
24.0	346	217	209, 88, 11	154, 22, 74, 187	4.6
28.0	238	199	490	19, 66, 58, 50, 66	3.3
30.6	344	297	377	110, 88, 132, 27, 22	2.1
22.9	161	184	297, 27, 206	88, 88, 88, 28, 56, 129	3.5
34.0	220	253	350	102, 96, 69, 102, 140, 16	2.6
27.8	660	333	41	148, 85, 66, 50	3.1
28.7	113	268	104, 517	96, 88, 88, 173	3.9
22.0	250	226	14, 264	102, 82, 91, 88, 69, 80	3.9
19.2	49	187	163, 115, 120, 240	101, 59, 77, 110, 75, 81	4.4
12.4	67	181	80, 198, 100, 178	83, 72, 43, 76, 95, 74, 94	6.2
18.8	80	172	78, 113, 28, 213	66, 157, 84, 89, 35	4.6
23.7	315	222	150	66, 100, 56, 100, 82	3.4
25.0	335	302	149	88, 66, 88, 94, 89	3.4
17.0	372	193	118	74, 73, 43, 63, 79, 81	4.0
20.0 ± 1.2 (n = 15)	242 ± 42 (n = 15)	230 ± 13 (n = 15)	175 ± 24 (n = 30)	83 ± 4 (n = 79)	3.8 ± 0.2 (n = 15)

Примечание. Оценки проведены на передних концах гиф длиной ~700 мкм. ^а $V_{удл}$ измерены одновременно с регистрацией флуоресценции CFW. ^бВсе оценки L получены путем измерений на соответствующих кадрах с помощью программы AxioVision LE. ^вФС (формирование септы), временные оценки получены для каждого участка гифы путем деления суммарной длины всех сегментов на этом участке на величину конкретной $V_{удл}$ и количество сегментов. В конце каждого столбца указаны средние величины ± стандартные ошибки, в скобках — число измерений (n).

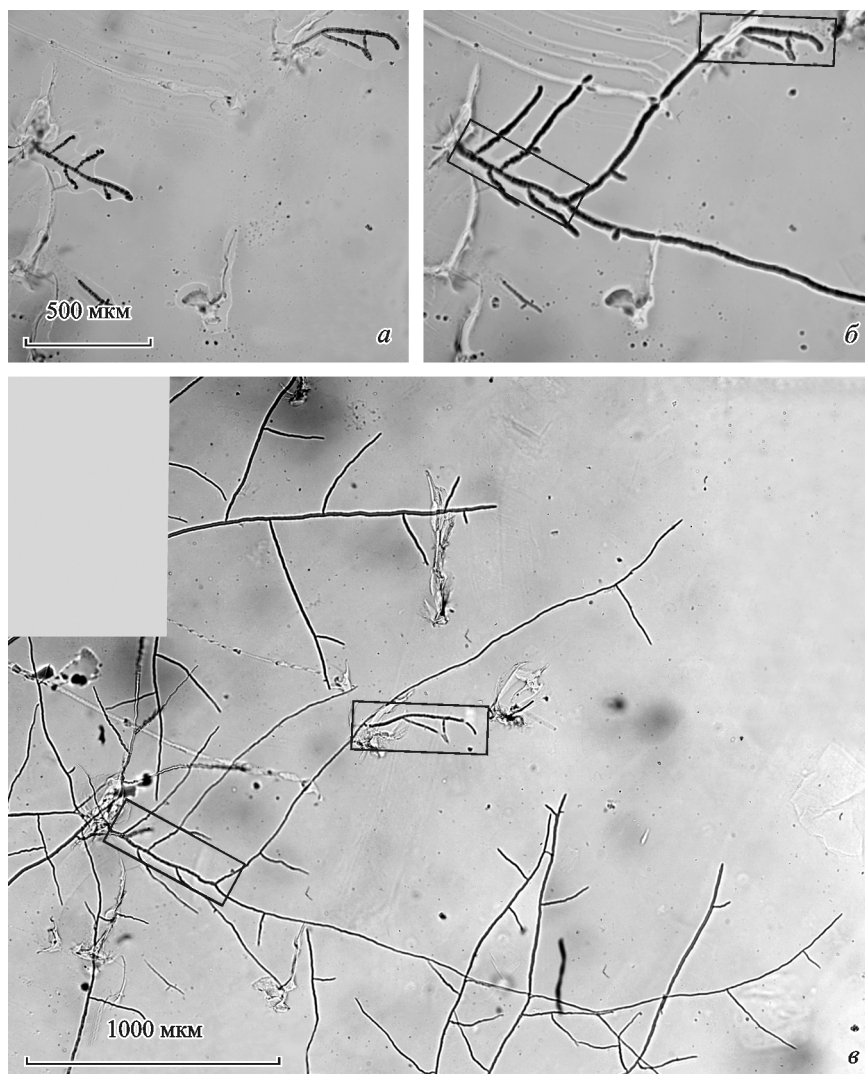


Рис. 2. Динамика роста и развития изолированных фрагментов длиной 420 мкм.

a — сразу после изоляции: в дальнейшем *левый фрагмент* продолжил рост двумя верхушечными ветвями (см. табл. 2), а *правый* не рос; *б, в* — соответственно через 3 и 6 ч после изоляции: *прямоугольными рамками* обозначены границы фрагментов сразу после изоляции. Через 6 ч после изоляции в поле зрения появились верхушки гиф, связанных с мицелием. Световая микроскопия, об. 10×.

ем d и $V_{удл}$. За все время наблюдений у каждой из 10 дочерних ветвей образовалось от 1 до 6 боковых ветвей со средним расстоянием между ними 369 ± 90 мкм и от 16 до 40 новых септ со средним расстоянием между ними 68 ± 2 мкм, так что время формирования 1 септы составило в среднем 6.5 ± 0.4 мин. Существенно отметить, что прекращение ветвлений или задержка в развитии зачатков боковых ветвей наблюдалась в первые 1–2 ч роста изолированных фрагментов. Через 2–3 ч роста после изоляции, как правило, ветвления восстанавливались. В период задержки ветвления у отдельных фрагментов наблюдались межузловые расстояния более 1000 мкм длиной, на которых насчитывалось до 20 септ и более (рис. 3). На рис. 4 графически представлены параметры ВР гиф, изолированных от мицелия, и гиф, связанных с мицелием.

Морфология и распределение ядер в дочерних ветвях изолированных фрагментов. Благодаря небольшому диаметру дочерних ветвей фрагментов в них можно было отчетливо наблюдать морфологические особенности и распределение отдельных ядер

(табл. 3; рис. 5, 6). Для одного из фрагментов через 90 мин после изоляции мы оценили морфологию и распределение ядер на передних концах лидирующей дочерней ветви и 5 отходящих от нее ветвей 1-го и 2-го порядков (рис. 5; табл. 3). В табл. 3 видно, что размеры безъядерной зоны вблизи от точки роста заметно варьируют в пределах одного фрагмента и не зависят напрямую от $V_{удл}$, а зависят, скорее, от статуса ветви (максимум — у лидирующего направления). В каждой ветви ядра располагались группами по 3–5 штук через 10–15 мкм. При этом соседние ядра значительно различались и по форме, и по ориентации (рис. 6).

Морфология и распределение ядер у других исследованных нами изолированных фрагментов также не отличались принципиально от этих характеристик, известных для гиф, связанных с мицелием. Большинство ядер имело округлую или грушевидную форму ($d \cong 2$ мкм) и ярко светящийся участок на поверхности, соответствующий, по литературным данным, полярному тельцу веретена, обеспечивающему взаимодействие ядра с микротрубочками (Thompson-Cofee, Zicker, 1994; Minke et al., 1999a,

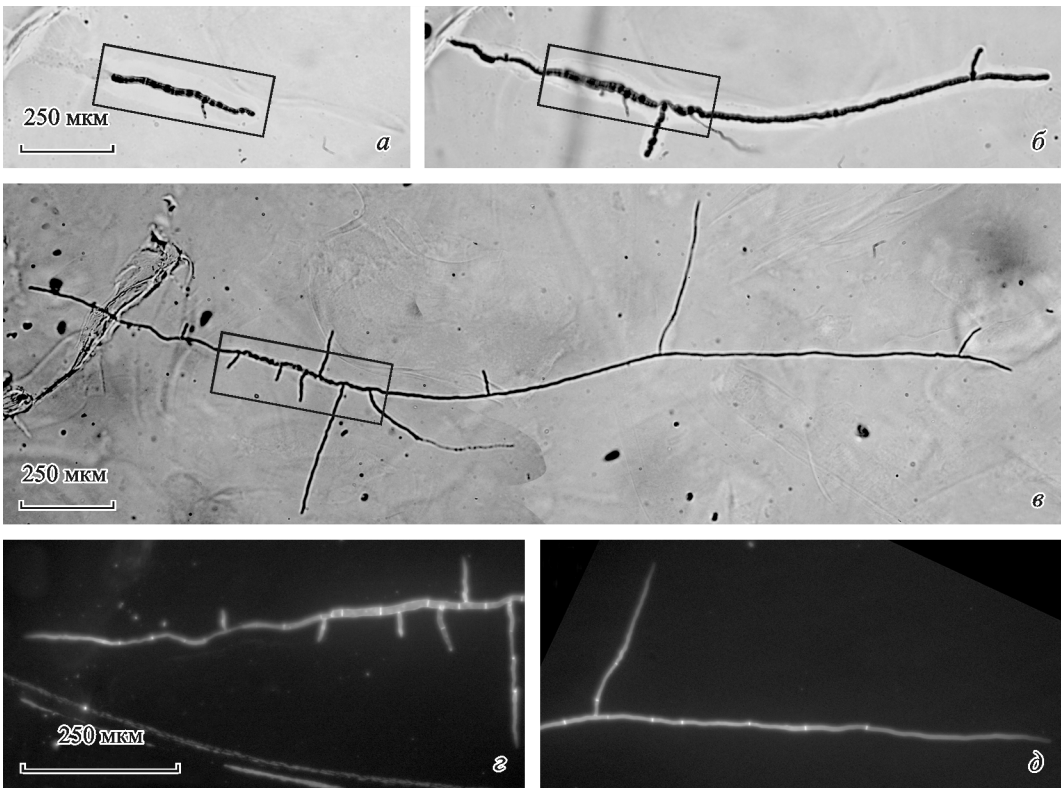


Рис. 3. Динамика роста и развития изолированного фрагмента (выделен *прямоугольными рамками*) длиной 380 мкм. *а* — сразу после изоляции; *б, в* — через 3 и 6 ч после изоляции соответственно; *г* — флуоресценция зонда CFW в исходном фрагменте через 4.5 ч после изоляции; *д* — то же на переднем конце дочерней ветви фрагмента. *а–в* — световая микроскопия; *г, д* — флуоресцентная микроскопия; об. 10×.

Т а б л и ц а 2

Расположение узлов ветвления и септ на верхушках лидирующих дочерних ветвей фрагментов
через 4–5 ч после изоляции от мицелия

L ₀	d ₀	V _{удл} ^а мкм/мин	d _к	L до 1-й ветки	L между НВ	L до 1-й септы	Расстояния между новыми септами, мкм	ВФНС ^б
420	11	6.90	5.5	188	1329, 223	188	35, 33, 38, 58, 39, 54, 68, 87, 46, 51, 78, 63, 32, 54, 86, 38, 96, 88, 71, 119, 67, 98, 88, 66, 83, 90	7.6
420	11	4.90	5.5	1471	213	226	64, 43, 51, 28, 56, 71, 114, 97, 101, 63, 86, 68, 86, 54, 78, 71, 78, 68	6.5
360	11	6.70	5.5	430	303, 1393	244	136, 90, 99, 85, 85, 118, 143, 125, 57, 128, 59, 101, 38, 79, 102, 39, 85, 41, 80, 78, 59, 81	6.4
487	14	10.45	8.0	120	242, 701, 880, 28, 108, 251, 85	152	80, 38, 113, 118, 140, 91, 41, 77, 99, 82, 63, 55, 66, 55, 58, 58, 60, 55, 88, 41, 19, 60, 55, 50, 82, 25, 33, 50, 28, 55, 38, 44, 33, 36, 36, 19, 41, 19, 30, 19	7.3
272	14	6.45	8.2	205	110, 630, 486, 253, 197	186	30, 57, 78, 47, 51, 32, 105, 34, 28, 62, 28, 31, 42, 40, 56, 73, 54, 67, 94, 84, 39, 78, 52, 115, 63, 90, 36, 55, 47	6.1
272	14	6.50	5.5	341	212, 647, 526, 127, 85	223	49, 57, 30, 49, 49, 62, 38, 109, 71, 47, 96, 72, 66, 36, 52, 102, 110, 88, 82, 88, 85, 94, 69	5.9

Таблица 2 (продолжение)

L_0	d_0	$V_{удл}^a$ мкм/мин	d_k	L до 1-й ветки	L между НВ	L до 1-й септы	Расстояния между новыми септами, мкм	ВФНС ^b
380	11	5.20	5.5	722	470, 310, 73	293	72, 100, 69, 54, 78, 66, 80, 100, 104, 103, 40, 99, 86, 105, 44, 76	4.7
310	14	6.40	5.5	712	222, 770	140	92, 72, 76, 78, 66, 82, 83, 72, 29, 31, 52, 58, 31, 46, 75, 76, 75, 70, 79, 72, 37, 91, 91, 34, 41, 41, 69	6.4
310	14	5.10	5.5	468	212, 223, 452	191	52, 58, 58, 106, 50, 46, 58, 47, 28, 22, 96, 77, 94, 55, 77, 106, 100, 66, 60, 51	4.8
476	14	8.80	8.0	265	65, 265, 1838, 436, 143	252	41, 66, 33, 55, 74, 28, 50, 63, 69, 33, 104, 36, 110, 38, 94, 102, 77, 74, 85, 135, 124, 132, 60, 82, 104, 110, 50, 104, 82, 50, 104, 72, 41, 82, 60, 28	9.5
371 ± 25 n = 10	12.8 ± 0.5 n = 10	6.7 ± 0.5 n = 10	6.3 ± 0.4 n = 10	492 ± 127 n = 10	369 ± 90 n = 19	210 ± 15 n = 10	68 ± 2 n = 257	6.5 ± 0.4 n = 10

Примечание. L_0 — L исходная длина, d_0 , d_k — d исходный и конечный диаметры соответственно, измерены в мкм с помощью программы AxioVision LE на кадрах, полученных при регистрации флуоресценции CFW^a. $V_{удл}$ рассчитывали как отношение прироста длины по лидирующему направлению ко времени наблюдения за данным фрагментом. ^b ВФНС (время формирования сегмента) рассчитывали для конкретной лидирующей дочерней ветви фрагмента путем деления времени роста этой ветви до момента регистрации флуоресценции CFW на число сегментов, сформировавшихся в ней к этому моменту. В конце каждого столбца указаны средние величины $\pm$ стандартные ошибки, в скобках — число измерений (n).

1999b; Riquelme et al., 2002; Ramos-Garcia et al., 2009; Roca et al., 2010). Кроме округлых и грушевидных ядер во многих ветках мы видели бесформенные ядра увеличенного размера (до 4 мкм), часто с 2 полярными тельцами. Некоторые из ядер увеличенного размера были сильно вытянуты, а более ярко флуоресцирующие полярные тельца располагались у них на противоположных концах, что является очевидным признаком расхождения этих ядер после деления (Roca et al., 2010).

Таким образом, для ВР коротких верхушечных фрагментов, изолированных от материнского мицелия, т. е. развивающихся при дефиците ресурсов, характерно следующее: 1) уменьшение d гифы (примерно вдвое); 2) значительное уменьшение $V_{удл}$ гифы при сохранении ранее существовавшей ориентации; 3) нарушение ритма ветвления гифы с появлением аномально больших расстоя-

ний между соседними ветвями, а также остановка в развитии некоторых зачатков боковых ветвей; 4) сохранение ритмичности септирования и относительного постоянства размера сегмента гифы; 5) формирование 1-й септы примерно на том же расстоянии от точки роста, что и у материнских гиф; 6) нестабильность расстояния от 1-й боковой ветки до точки роста по сравнению с материнскими гифами; 7) наличие безъядерной зоны на участке 5—33 мкм от точки роста.

Обсуждение

Традиционно считалось, что основной движущей силой ВР является тургор, однако ряд наблюдений ставит под сомнение эту точку зрения, отводя тургору роль дви-

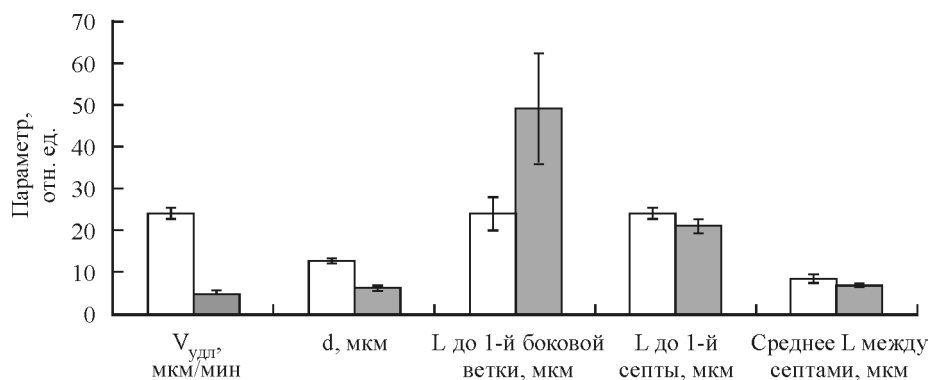


Рис. 4. Характеристики верхушечного роста гиф, связанных с мицелием (светлые столбики) и лидирующих дочерних ветвей изолированных фрагментов (темные столбики).

Величины расстояний (L) уменьшены в 10 раз.

Т а б л и ц а 3

Характеристики распределения ядер на передних участках ветвей фрагмента, представленного на рис. 5, через 1.5 ч после изоляции от мицелия

Положение исследованного участка на рис. 5	$V_{удл}^a$ мкм/мин	d^b мкм	L без ядер, b мкм	L , занятая ядрами, b мкм	Доля ядер с 2 тельцами
(1)	7.65	4.64	33.00	36	1 из 10
(2)	5.10	3.14	16.00	78	1 из 13
(3)	5.10	3.44	9.00	110	1 из 7
(4)	2.56	3.73	5.21	135	1 из 17
(5)	10.20	3.82	12.43	112	2 из 10
(6)	5.10	3.44	6.47	89	3 из 7

^a $V_{удл}$ определяли непосредственно перед фиксацией фрагмента. ^b L и d определяли с помощью программы AxioVision LE на соответствующих кадрах, полученных при регистрации флуоресценции DAPI.

жущей силы не столько для роста гифы, сколько для продвижения сквозь твердые субстраты или проникновения в ткани других организмов (Money, 2001). Помимо тургора в обеспечении ВР принимают участие механические силы, генерируемые на уровне цитоскелета. Разнообразные механохимические АТФазы используют энергию АТФ для перемещения вдоль линейных треков органелл или других внутриклеточных структур.

Благодаря достижениям современной экспериментальной биологии накоплен большой объем данных о структуре и динамике внутриклеточных систем, принимающих участие в ВР вегетативных гиф *N. crassa*, составлены карты-схемы многих метаболических путей, описа-

но большое количество молекул-участников, в том числе белков-регуляторов. Создание целостной картины молекулярно-генетической регуляции взаимодействий молекул и внутриклеточных структур при ВР осложняется тем, что растущая верхушка гифы *N. crassa* решает одновременно несколько задач — удлинение (с высокой скоростью), ориентирование в пространстве, накопление вещества про запас и т. д., которые управляются разными генами (Brand, Gow, 2009).

В десятках лабораторий мира ведутся интенсивные исследования связи активности генома с функциями *N. crassa*, при этом анализ ВР представляет наибольшие трудности (Seiler, Plamann, 2003; Borkovich et al., 2004;

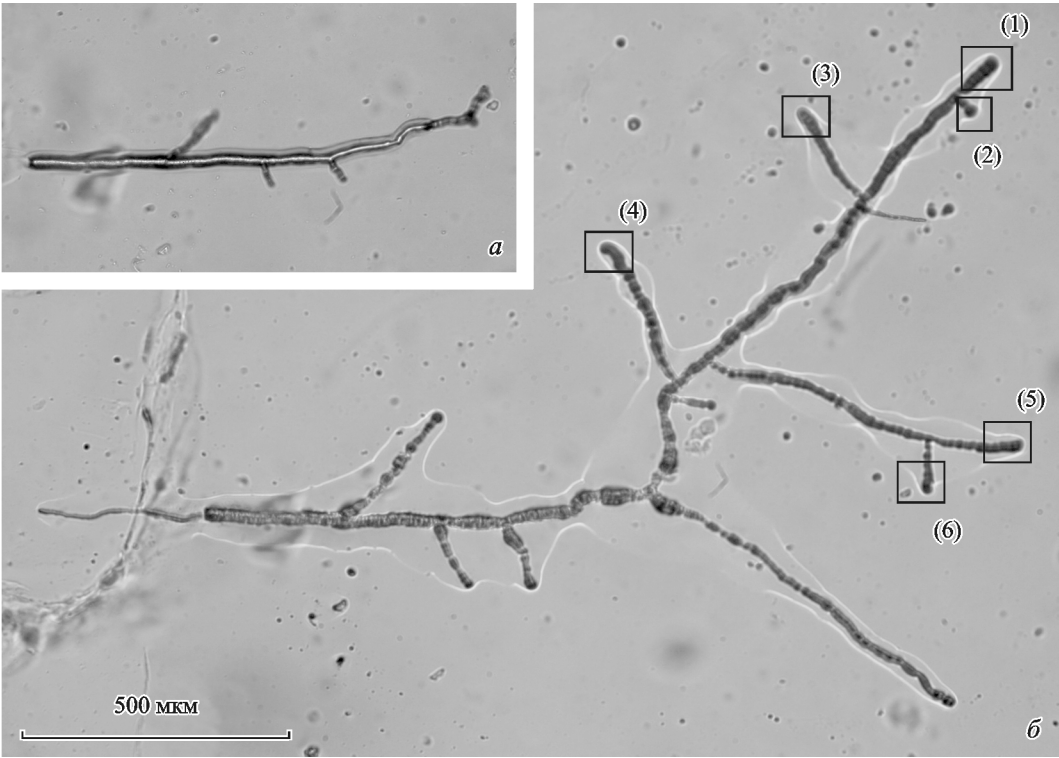


Рис. 5. Динамика роста и развития изолированного фрагмента длиной 700 мкм.

a — сразу после изоляции. *б* — через 90 мин; после оценки $V_{удл}$ фрагмент был зафиксирован и окрашен DAPI. На передних концах лидирующей ветви фрагмента и ближайших к ней боковых ветвей были зарегистрированы ядра. Данные для участков, выделенных прямоугольными рамками и обозначенных цифрами, представлены в табл. 3.

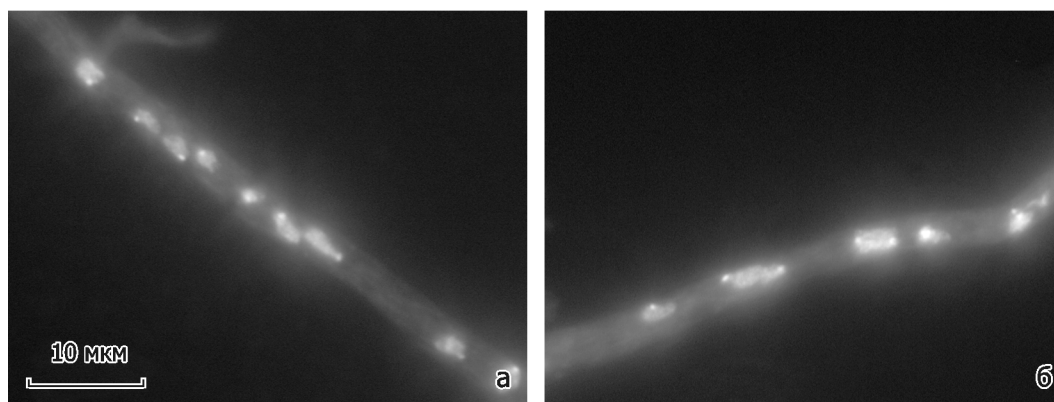


Рис. 6. Флуоресценция DAPI в дочерних ветвях фрагмента, представленного на рис. 5 и в табл. 3.

а — округлые и грушевидные интерфазные ядра; *б* — телофазные ядра удвоенного размера с двумя полярными тельцами. Флуоресцентная микроскопия. об. 100×.

Потапова, 2014). Хотя уже ясно, что для реализации ВР существенна активность по меньшей мере 50 генов (Riquelme et al., 2011), пока не установлены точные соответствия между отдельными процессами, лежащими в основе клеточного морфогенеза, — передачей сигналов, организацией цитоскелета, поляризованной секрецией и формированием клеточной стенки. Определенные надежды авторы обзорной работы (Riquelme et al., 2011) связывают с новыми техническими возможностями исследования клеточной биологии *N. crassa*, такими как использование прижизненно флуоресцирующих белков (Freitag, Giuffetti, 2001; Fuchs et al., 2002; Freitag et al., 2004).

На протяжении десятилетий эффективным инструментом исследования молекулярно-генетических основ функциональной активности вегетативного мицелия *N. crassa* было использование мутантных линий этого гриба с определенными дефектами тех или иных функций. Мы предлагаем принципиально иной подход: использование генетически неизменной линии гриба в легко реализуемых экспериментальных условиях (изоляция верхушки вегетативной гифы от материнского мицелия), приводящих к выраженной несогласованности таких важных параметров ВР, как удлинение, септирование и ветвление. Важное свойство предлагаемой нами модели — возможность оценивать расположение и морфологию каждого отдельного ядра (благодаря уменьшению диаметра дочерних гиф изолированного фрагмента).

В работе Рока с соавторами (Roca et al., 2010) с помощью зеленого флуоресцентного белка были детально исследованы изменения морфологии ядра *N. crassa* в ходе митотического цикла. Мы получили примерно такие же показатели для ядер, окрашенных DAPI, в дочерних ветвях изолированных фрагментов *N. crassa* (табл. 3; рис. 6). В наших экспериментах форма ядер тоже варьировала от округлой до грушевидной и на их поверхности также обнаруживались особые более ярко флуоресцирующие образования, соответствующие полярному тельцу, связывающему ядро с микротрубочками (Thompson-Cofee, Zicker, 1994; Minke et al., 1999a, 1999b; Riquelme et al., 2002; Ramos-Garcia et al., 2009). По нашим наблюдениям (табл. 3; рис. 6), соседние ядра на передних концах растущих дочерних ветвей изолированных фрагментов делятся асинхронно, как и у гиф, связанных с мицелием (Minke et al., 1999a; Roca et al., 2010).

Исследования последних лет создают представления об особой структурной упорядоченности переднего кон-

ца гифы длиной 120—150 мкм, включающей в себя следующие характеристики: 1) первая септальная перегородка образуется не ближе примерно 165 мкм от точки роста взрослой гифы (Trinci, 1978, 1979; Delgado-Álvarez et al., 2014); 2) H⁺-АТФазы (основные генераторы E_m у *N. crassa*) встраиваются в плазматические мембраны не ближе примерно 120 мкм от точки роста (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013); 3) на передних 150—200 мкм гифы E_m существенно ниже, чем в дистальной части гифы (Slayman, Slayman, 1962; Potapova et al., 1988); 4) на переднем участке длиной 100—150 мкм принципиально меняется характер движения микротрубочек: они ориентируются строго параллельно оси гифы и перемещаются уже не потоком цитоплазмы, а с помощью собственной векторной сборки—разборки, требующей расхода АТФ (Mouriño-Pérez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011); 5) на расстоянии 20—30 мкм от точки роста концентрируются нитевидные митохондрии (Потапова и др., 2011, 2013); 6) на расстоянии 20—30 мкм от точки роста отсутствуют ядра («зона, свободная от ядер» (Davis, 2000; Freitag et al., 2004)).

Для проростков спор *N. crassa* (Roca et al., 2010) показано, что структурная упорядоченность переднего конца гифы формируется постепенно: когда проросток достигает длины около 150 мкм, на его переднем конце появляется Spitzenkorper (центр агрегации везикул), располагаются в определенном порядке внутриклеточные органеллы, появляется «зона, свободная от ядер». Аналогичная постепенность формирования структурной упорядоченности переднего конца гифы описана в исследованиях поведения митохондрий и микротрубочек при боковом ветвлении.

В растущих гифах периодически происходят ветвления: либо путем деления верхушки, либо почкованием на некотором расстоянии от зоны роста. Ранее мы наблюдали, что верхушечные скопления нитевидных митохондрий, которые обычно продвигаются вперед вместе с удлинением гифы, при раздвоении верхушки гифы распределяются между новыми верхушками и далее двигаются вместе с ними (Потапова и др., 2011, 2013). В то же время при образовании боковой ветви сначала наблюдается беспорядочное интенсивное движение в нее внутриклеточного содержимого из прилежащих апикальных и дистальных частей гифы, и лишь через несколько минут на верхушках растущих ветвей формируются скопления нитевидных митохондрий.

В связи с ветвлениями гифы описаны и два разных типа поведения микротрубочек: 1) при вершущем ветвлении скопления микротрубочек в зоне роста делятся и расходятся по новым верхушкам; 2) при боковом ветвлении разрозненные микротрубочки сначала беспорядочно и достаточно быстро переносятся в новую боковую ветвь током цитоплазмы, но затем меняют характер движения: оно замедляется, но становится более организованным (Mourino-Perez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011).

Все эукариотические клетки обладают эффективными механизмами доставки митохондрий к местам, где эти органеллы функционально необходимы (Trinci et al., 1994; Lee, 1999; Levina, Lew, 2006; Westermann, 2008). В гифах *N. crassa* митохондрии движутся вдоль микротрубочек, имея необходимый набор молекулярно-генетических деталей для взаимодействий с этими структурами (Prokisch et al., 2000; Davis, Perkins, 2002; Borkovich et al., 2004; Harold, 2005; Kato et al., 2010; Requelme et al., 2011; Wideman et al., 2012). Возможно, что нитевидная форма — один из признаков наличия такого взаимодействия, так как при остановке роста или на удалении более 100 мкм от точки роста, где микротрубочки располагаются хаотично, отсутствуют и скопления нитевидных митохондрий (Потапова и др. 2013).

С помощью GFP показано, что микротрубочки *N. crassa* быстро разбираются и собираются вновь, а также двигаются с потоком цитоплазмы к растущей верхушке гифы через каналы в межклеточных септах и проникают в новые боковые ветви. При этом в стволовой части гифы все внутриклеточные органеллы движутся вместе с потоком цитоплазмы, но на переднем участке длиной 100—150 мкм микротрубочки ориентируются строго параллельно оси гифы и двигаются вперед уже с помощью собственной векторной сборки (разборки), образуя на переднем конце гифы упорядоченный ансамбль (Mourino-Perez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). По оценкам в рамках математической модели, количественно характеризующей работу микротрубочек по транспорту везикул к переднему концу гифы *N. crassa* (Sugden et al., 2007), упорядоченный ансамбль примерно из 10 микротрубочек способен решать задачу доставки с необходимой скоростью в зону роста достаточного количества везикул с материалами, необходимыми для удлинения гифы.

При рассмотрении возможных механизмов создания и поддержания упорядоченного ансамбля микротрубочек и митохондрий на переднем конце растущей гифы мы предположили, что какую-то роль в этом процессе может играть электрическая гетерогенность переднего конца гифы (Потапова и др., 2011, 2013; Potapova, 2012).

По данным электрофизиологических измерений и теоретического модельного анализа (Potapova et al., 1988; Takeuchi et al., 1988; Асланиди и др., 1997; Смолянинов, Потапова, 2003; Потапова, 2004), передние концы гиф длиной около 200 мкм ведут себя как участки, лишенные генераторов E_m . У *N. crassa* основными генераторами E_m являются H^+ -АТФазы плазматических мембран (Slayman, 1997), а плазматические мембраны верхушек вегетативных гиф *N. crassa* лишены H^+ -АТФаз (Riquelme et al., 2005; Fajardo-Somera et al., 2013).

Сравнительно высокие значения E_m на верхушках гиф при наличии электрической связи верхушек с дистальными частями гифы создаются генераторами E_m более взрослых клеток, расположенных на расстоянии

800—1000 мкм от растущего конца (Potapova et al., 1988). По данным наших измерений с помощью внутриклеточных микроэлектродов на расстоянии 100 мкм (L_1) от переднего конца гиф *N. crassa*, E_m равен приблизительно -130 мВ (E_{m1}), а на расстоянии 400 мкм (L_2) — приблизительно -160 мВ (E_{m2}) (Potapova et al., 1988; Потапова, Бойцова, 1997; Потапова, 2004). Исходя из этих величин можно оценить напряженность электрического поля (E) вдоль переднего конца гифы:

$$E = (E_{m2} - E_{m1}) / (L_2 - L_1) = 30 \text{ мВ} / 300 \text{ мкм} = 100 \text{ В/м}.$$

Изолированные микротрубочки в растворе ориентируются и меняют скорость движения под влиянием электрического поля напряженностью $2 \cdot 10^3$ В/м (Böhmet et al., 2005; Dujovne et al., 2008). Возможно, что в условиях живой клетки электрическое поле на порядок меньшей величины может оказать регуляторное влияние на ориентацию, расположение и скорость движения ансамбля микротрубочек. Более точный анализ этого предположения требует создания адекватной математической модели.

Пока еще много загадочного и непонятного в образовании новых боковых ветвей у растущих гиф. В течение многих лет согласованность появления на переднем конце растущей гифы сначала новой септы, а затем новой боковой ветки заставляла предполагать причинно-следственную связь между этими явлениями: считалось, что появление септы тормозит поток внутриклеточного содержимого вдоль гифы и инициирует боковое ветвление. На мутантных линиях с блокадой различных стадий процесса ветвления показано (Dunlap et al., 2007), что процесс ветвления регулируется генетически и состоит по крайней мере из четырех стадий: 1) определения точки нового ветвления; 2) развития этой точки в зону роста; 3) появления новой ветки сначала в виде почки; 4) развития новой ветви с участием микротрубочек.

По нашим наблюдениям за ветвлениями верхушечных фрагментов, растущих после изоляции от мицелия, возможна независимая блокада по крайней мере двух последних стадий этого процесса; на рис. 3 представлены зачатки боковых ветвей, не получивших развития. Торможение ветвлений в первые часы после изоляции от мицелия с последующим восстановлением ветвлений говорит о том, что по мере удлинения гифы накапливаются какие-то ресурсы, необходимые для ветвления. Для детализации этих представлений необходимы дополнительные исследования. Интересная особенность предлагаемой нами экспериментальной модели состоит в том, что если при ВР в условиях изоляции от мицелия все-таки появляются боковые ветки, то их положение никак не коррелирует ни с расстоянием до точки роста, ни с положением и количеством септ.

В обзорной работе Харрис (Harris, 2008) рассмотрел ряд причинно-следственных связей между ветвлением и септированием гифы в процессе ее удлинения, а также признаки координации ветвлений с митозом. Автор предполагает, что инициация ветвления может быть как связана с септированием (в том числе может быть вызвана скоплением актиновых нитей, которое почему-то не завершилось созданием септы), так и происходить независимо от септирования.

Особенности процессов ветвления и септирования при дефиците поступления ресурсов со стороны материнского мицелия свидетельствуют о независимости ветвле-

ния и септирования при ВР, а также в пользу значительного автоматизма процесса септирования.

На молекулярном уровне для *N. crassa* описаны три стадии формирования септы (Mouriño-Pérez, 2013; Mouriño-Pérez, Riquelme, 2013; Delgado-Álvarez et al., 2014): 1) скопление в определенном месте клубка длинных нитей актомиозина («septal actomyosin tangle», SAT); 2) превращение этого клубка в плотное кольцо («contractile actomyosin ring», CAR); 3) сокращение CAR одновременно с впячиванием внутрь плазматической мембраны и формированием поперечной клеточной стенки.

В литературе приводятся данные о динамике появления ключевых белков, принимающих участие в септировании (Delgado-Álvarez et al., 2014). Показано, что при средней скорости гиф $V_{удл} \cong 13$ мкм/мин образование каждой новой септы происходит примерно за 6 мин. Септы формируются через 93 ± 2 мкм ($n = 36$), но 1-я септа появляется на расстоянии 165 ± 3 мкм ($n = 50$) от точки роста. SAT состоит из тропомиозина и актомиозина II класса, связанных с актиновыми нитями, и представляет собой клубок размером около 35 мкм в месте закладывания септы. Начинается процесс септирования с появления в определенном месте в кортикальном слое актиновых нитей. Формирование SAT занимает около 3 мин, и еще около 2 мин уходит на формирование CAR. По мере формирования CAR клубок SAT, по крайней мере частично, мигрирует к следующему месту септирования со скоростью 0.4 мкм/с ($n = 5$), что вдвое меньше $V_{удл}$ гиф. Иногда миграция SAT не приводит к формированию септы; тогда весь клубок движется дальше и создает септу в другом месте. В образовании CAR участвует ряд белков (тропомиозин, миозин, формин и фимбрин), которые исчезают после завершения септирования. После образования CAR начинается врастание внутрь новой мембраны и появляется активность хитинсинтаз, завершающих образование септальной перегородки.

По нашим данным, новый сегмент у взрослых гиф с $V_{удл} = 20.0 \pm 1.2$ мкм/мин формируется вдвое быстрее (3.8 ± 0.2 мин; табл. 1), чем у гиф с $V_{удл} = 13$ мкм/мин (6 мин по: Delgado-Álvarez et al., 2014) и чем у дочерних ветвей изолированных фрагментов (6.5 ± 0.4 мин при $V_{удл} = 6.7 \pm 0.5$ мкм/мин; табл. 2). Объяснение этого явления требует дополнительных исследований.

На основании анализа собственных данных и данных из литературы по удлинению, ветвлению и септированию верхушек гиф *N. crassa* при дефиците ресурсов (изолированные фрагменты) и полноценной ресурсной поддержке со стороны материнского мицелия (гифы, связанные с мицелием) мы можем представить следующую иерархию структурных задач, обеспечивающих ВР: наличие организованного ансамбля внутриклеточных структур на переднем конце гифы длиной 100—150 мкм, не допускающего формирования 1-й септы на расстоянии, ближе чем ~150 мкм от точки роста; ритмичность септирования с примерно постоянным расстоянием между септами; очевидная зависимость развития новых боковых ветвей от поступления ресурсов со стороны более взрослых участков гифы.

Растущая верхушка гифы *N. crassa* одновременно осуществляет несколько функций — удлинение, ориентирование в пространстве, запасание веществ и т. д. Об особой важности функции удлинения свидетельствует то, что даже в условиях дефицита ресурсов (при изоляции растущей гифы от мицелия) обслуживающий удлинение высокоорганизованный ансамбль внутриклеточ-

ных структур в области передних 150 мкм полноценно функционирует, ограничивая местоположение септы, ближайшей к точке роста.

Разработанная нами экспериментальная модель несогласованности процессов ветвления и септирования при ВР, позволяющая оценивать морфологию и расположение отдельных ядер на переднем конце гифы, может оказаться полезной при экспериментальном анализе молекулярно-генетических механизмов регуляции взаимодействий внутриклеточных структур, обеспечивающих верхушечный рост вегетативной гифы *N. crassa*.

Авторы выражают искреннюю признательность Т. А. Белозерской за предоставление штамма *N. crassa* и культуральных сред.

Работа выполнена в рамках государственной темы № 0120.0 804191.

Список литературы

- Асланиди К. Б., Асланиди О. В., Вачадзе Д. М., Морнев О. М., Потапова Т. В., Чайлахян Л. М., Штеманетян Е. Г. 1997. Анализ электрических явлений, сопровождающих рост гифы *N. crassa*. Теория и эксперимент. Биол. мембр. 14 (3): 285—298. (Aslanidi K. B., Aslanidi O. V., Vachadze D. M., Mornev O. M., Potapova T. V., Chailakhyan L. M., Shtemanetian E. G. 1997. Analysis of electrical phenomena accompanying the growth of *Neurospora crassa* hyphae. Theory and experiment. Membr. Cell Biol. 11 (3): 349—365.)
- Потапова Т. В. 2004. Межклеточные взаимодействия в гифах *Neurospora crassa* — двадцать лет спустя. Биол. мембр. 21 (3): 163—191. (Potapova T. V. 2004. Intercellular interactions in the *Neurospora crassa* hyphae — twenty years later. Biol. Membr. (in Russian). 21 (3): 163—191.)
- Потапова Т. В. 2014. Структурная и функциональная организация растущих верхушек *Neurospora crassa*. Биохимия. 79 (7): 753—769. (Potapova T. V. 2014. Structural and functional organization of growing tips of *Neurospora crassa* hyphae. Biochemistry (Moscow). 79 (7): 593—607.)
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю. 1997. Структура, функция, управление. Возможности экспериментального анализа в группах невозбудимых клеток, связанных проницаемыми контактами. Биол. мембр. 14 (6): 661—670. (Potapova T. V., Boitsova L. Ju. 1998. Structure, function, regulation: Experimental analysis in groups of non-exitable cells coupled via permeable junctions. Membr. Cell Biol. 11 (6): 817—829.)
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю., Голышев С. А. 2011. К вопросу об организации взаимодействий внутриклеточных структур *N. crassa* при верхушечном росте. Докл. РАН. 436 (6): 834—838. (Potapova T. V., Boitsova L. Ju., Golyshev S. A. 2011. Problem of interactions between intracellular structures during the *Neurospora crassa* tip growth. Doklady Biochem. Biophys. 436: 44—48.)
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю., Голышев С. А., Попинако А. В. 2013. Организация митохондрий в растущих гифах *Neurospora crassa*. Цитология. 55 (11): 828—836. (Potapova T. V., Boitsova L. Ju., Golyshev S. A., Popinako A. V. 2014. The organization of mitochondria in growing hyphae of *Neurospora crassa*. Cell Tissue Biol. 8 (2): 166—174.)
- Смолянинов В. В., Потапова Т. В. 2003. Оценка критической длины фрагмента гифы *Neurospora crassa*. Биол. мембр. 20 (4): 304—312. (Smolianinov V. V., Potapova T. V. 2003. Estimation of the critical length of the growing *Neurospora crassa* hyphae. Biol. Membr. (in Russian). 20 (4): 304—312.)
- Чайлахян Л. М., Левина Н. Н., Белозерская Т. А., Потапова Т. В. 1984. Изучение межклеточных взаимодействий у мицелиального гриба *Neurospora crassa* в связи с фотоэлектрическими изменениями в мембранах. Биол. мембр. 1 (1): 44—55.

- (Chailakhyan L. M., Levina N. N., Belozerskaya T. A., Potapova T. V. 1984. Investigation of intercellular interactions in mycelial fungi *Neurospora crassa* in connection with the photoelectrical changes in membranes. Biol. Membr. (in Russian). 1 (1) : 44—55.)
- Böhm K. J., Nikolaos E., Mavromatos N. E., Michette A., Stracke R., Unger E. 2005. Movement and alignment of microtubules in electric fields and electric-dipole-moment estimates. Electromag. Biol. Med. 24 : 319—330.
- Borkovich K. A., Alex L. A., Yarden O., Freitag M., Turner G. E., Read N. D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., Plamann M., Goodrich-Tanrikula M., Schulte U., Manhaupt G., Nargang F. E., Radford A., Selitrennikoff C., Galagan J. E., Dunlap J. C., Loros J. J., Catchside D., Inoue H., Aramayo R., Polymenis M., Selker E. U., Sachs M. S., Marzluff G. A., Paulsen I., Davis R., Ebbole D. J., Zelter A., Kalkman E. R., O'Rourke R., Bowring F., Yeadon J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W., Pratt R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 : 1—108.
- Brand A., Gow N. A. R. 2009. Mechanisms of hypha orientation of fungi. Curr. Opin. Microbiol. 12 : 350—357.
- Davis R. H. 2000. *Neurospora*: contributions of a model organism. Oxford: Oxford Univ. Press. 498 p.
- Davis R. H., Perkins D. D. 2002. *Neurospora*: a model of model microbes. Nature Rev. Genet. 3 : 7—13.
- Delgado-Álvarez D. L., Bartnicki-García S., Seiler S., Mouriño-Pérez R. R. 2014. Septum development in *Neurospora crassa*: the septal actomyosin tangle. doi: 10.1371/journal.pone.0096744.
- Dujovne I., van den Heuvel M., Shen Y., de Graaff M., Dekker C. 2008. Velocity modulation of microtubules in electric fields. Nano Lett. 8 : 4217—4220.
- Dunlap J. C., Borkovich K. A., Henn M. R., Turner G. E., Sachs M. S., Glass N. L., McCluskey K., Plamann M., Galagan J. E., Birren B. W., Weiss R. L., Townsend J. P., Loros J. J., Nelson M. A., Lambregts R., Colot H. V., Park G., Collopy P., Ringelberg C., Crew C., Litvinkova L., DeCaprio D., Hood H. M., Curilla S., Shi M., Crawford M., Koehrsen M., Montgomery P., Larson L., Pearson M., Kasuga T., Tian C., Bastürkmen M., Altamirano L., Xu J. 2007. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora*. Functional genomics project. Adv. Genet. 57 : 49—96.
- Fajardo-Somera R. A., Bowman B., Riquelme M. 2013. The plasma membrane proton pump PMA-1 is incorporated into distal parts of the hyphae independently of the Spitzenkörper in *Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell. 12 : 1097—1105.
- Freitag M., Giuffetti L. M. 2001. Expression and visualization of green fluorescent protein (GFP) in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newslett. 48 : 15—19.
- Freitag M., Hickey P. C., Raju N. B., Selker E. U., Read N. D. 2004. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 41 : 897—910.
- Fuchs F., Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. J. Cell Sci. 115 : 1931—1937.
- Harold F. M. 2005. Molecules into cells: specifying spatial architecture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69 : 544—564. doi: 10.1128/MMBR.69.4.544-564.
- Harris S. D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. Mycologia. 100 : 823—832.
- Held M., Edwards C., Nicolau D. V. 2010. Temporal and spatial *in vivo* optical analysis of microtubules in *Neurospora crassa*. In: Imaging, manipulation, and analysis of biomolecules, cells, and tissues. VIII. San Francisco: SPIE. 75680V. doi: 10.1117/12.841328.
- Hickey P. C., Swift S. R., Roca M. G., Read N. D. 2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. Methods in Microbiol. 34 : 63—87.
- Kato F., Kurashima K., Chae M., Sawada S., Hatakeyama S., Tanaka S., Inoue H. 2010. Deletion of a novel F-Box protein, MUS-10, in *Neurospora crassa* leads to altered mitochondrial morphology, instability of mtDNA and senescence. Genetics. 185 : 1257—1269. doi: 10.1534/genetics.110.117200.
- Lee R. R. 1999. Comparative analysis of Ca and H flux magnitude and location along growing hyphae of *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. Eur. J. Cell Biol. 78 : 892—902.
- Levina N. N., Lew R. R. 2006. The role of tip-localized mitochondria in hyphal growth. Fungal Genet. Biol. 43 : 65—74.
- Minke P. F., Lee I. H., Plamann M. 1999a. Microscopic analysis of *Neurospora crassa* mutants defective in nuclear distribution. Fungal Biol. Rev. 28 : 55—67.
- Minke P. F., Lee I. H., Tinsley J. H., Bruno K. S., Plamann M. 1999b. *Neurospora crassa* ro-10 and ro-11 genes encode novel proteins required for nuclear distribution. Mol. Microbiol. 32 : 1065—1076.
- Money N. P. 2001. Functions and evolutionary origin of hyphal turgor pressure. In: Cell biology of plant and fungal tip growth. NATO Sci. Ser. Amsterdam etc.: IOS Press. 328 : 161—170.
- Mouriño-Pérez R. R. 2013. Septum development in filamentous ascomycetes. Fungal Biol. Rev. 27 : 1—9. doi: 10.1016/j.fbr.2013.02.002.
- Mouriño-Pérez R. R., Riquelme M. 2013. Recent advances in septum biogenesis in *Neurospora crassa*. Advan. Genet. 83 : 99—134. doi: 10.1016/b978-0-12-407675-4.00003-1.
- Mouriño-Pérez R. R., Robertson R. W., Bartnicki-García S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 43 : 389—400.
- Potapova T. V. 2012. Cell-to-cell communication in the tip growth of mycelial fungi. In: Biocommunication of fungi. Berlin—Heidelberg: Springer-Verlag. 103—114.
- Potapova T. V., Aslanidi K. B., Belozerskaya T. A., Levina N. N. 1988. Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. (Transfer of energy from proximal to apical cells). FEBS Lett. 241 : 173—176.
- Potapova T. V., Levina N. N., Belozerskaya T. A. 1984. Investigation of electrophysiological responses of *Neurospora crassa* to blue light. Arch. Microbiol. 137 : 262—265.
- Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2000. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell. 11 : 2961—2971.
- Ramos-García S. L., Roberson R. W., Freitag M., Bartnicki-García S., Mouriño-Pérez R. R. 2009. Cytoplasmic bulk flow propels nuclei in mature hyphae of *Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell. 8 : 1880—1890. doi: 10.1128/EC.00062-09.
- Riquelme M., Freitag M., Leon-Hing E. S., Bowman B. 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newslett. 52 (Suppl.) : 53.
- Riquelme M., Roberson R. W., McDaniel D. P., Bartnicki-García S. 2002. The effect of ropy-1 mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 37 : 171—179.
- Riquelme M., Yarden O., Bartnicki-García S., Bowman B., Castro-Longoria E., Free S. J., Fleibner A., Freitag M., Lew R., Mouriño-Pérez R., Plamann M., Rasmussen C., Richthammer C., Roberson R. W., Sanchez-Leon E., Seiler S., Watters M. K. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha — a model cell for polarized growth. Fungal Biol. 115 : 446—474. doi: 10.1016/j.funbio.2011.02.008.
- Roca M. G., Kuo H.-Ch., Lichius A., Freitag M., Read N. D. 2010. Nuclear dynamics, mitosis and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. Eukaryotic Cell. 9 : 1171—1183. doi: 10.1128/EC.00329-09.
- Roper M., Ellison C., Taylor J. W., Glass N. L. 2011. Nuclear and genome dynamics in multinucleate ascomycete fungi. Curr. Biol. 21 : R786—R793. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.042.
- Roper M., Simonin M., Hickey P. C., Leeder A., Glass N. L. 2013. Nuclear dynamics in a fungal chimera. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 110 : 12 875—12 880.
- Schnedl W., Roscher U., van der Ploeg M., Dann O. 1977. Cytofluorometric analysis of nuclei and chromosomes by DAPI staining. Cytophysiology. 15 : 337—362.

- Seiler S., Plamann M. 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell. 14 : 4352—4364. doi : 10.1091/mbc.E02-07-0433.
- Slayman C. L. 1987. The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: A proton-pumping electroenzyme. J. Bioenerget. Biomemb. 19 : 1—20.
- Slayman C. L., Slayman C. W. 1962. Measurements of membrane potential in *Neurospora*. Science. 136 : 876—877.
- Sugden K. E. P., Evans M. R., Poon W. C. K., Read N. D. 2007. Model of hyphal tip growth involving microtubule-based transport. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys. Rev. E75 : 031909. doi : <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.75.031909>.
- Takeuchi Y., Schmid J., Caldwell J. H., Harold F. M. 1988. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae. J. Membr. Biol. 101 : 33—41.
- Thompson-Cofee C., Zicker D. 1994. How the cytoskeleton recognizes and sorts nuclei of opposite mating type during the sexual cycle of filamentous ascomycetes. Develop. Biol. 165 : 257—271.
- Trinci A. P. J. 1978. The duplication cycle and vegetative development in moulds. In: The filamentous fungi. London: Edward Arnold. III. 132—163.
- Trinci A. P. J. 1979. The duplication cycle and branching. In: Fungal wall and hyphal growth. London: Cambridge Univ. Press. 319—358.
- Trinci A. P. J., Wiebe M. G., Robson G. D. 1994. The mycelium as an integrated entity. In: The mycota I. Growth, differentiation and sexuality. Berlin—Heidelberg: Springer-Verlag. 175—193.
- Westermann B. 2008. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. J. Biol. Chem. 283 : 13 501—13 505.
- Wideman J. G., Go N. E., Klein A., Redmond E., Lackey S. W. K., Tao T., Kalbacher H., Rapaport D., Neupert W., Nargang F. E. 2012. Roles of the Mdm1, Tom7, Mdm12, and Mmm1 proteins in the assembly of mitochondrial outer membrane proteins in *Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell. 21 : 1725—1736. doi : 10.1091/mbc.E09-10-084.

Поступила 23 III 2016

TIP GROWTH OF *NEUROSPORA CRASSA* IN THE CONDITIONS OF THE RESOURCE DEFICIENCY: IMPAIRMENTS IN THE COHERENCE OF ELONGATION, BRANCHING, AND SEPTATION

T. V. Potapova,¹ L. Yu. Boitsova, S. A. Golyshev, A. Ya. Dunina-Barkovskaya

A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow M. V. Lomonosov State University, Moscow, 119991;

¹ e-mail: potapova@genebee.msu.su

With the aid of intracellular fluorescent probes, peculiarities of elongation, branching, septation, and nucleus morphology have been studied in isolated 400- μm -long apical fragments of *Neurospora crassa* hyphae growing for several hours without the influx of the nutrient materials from the mycelium. We found that: 1) the diameter and growth rate of newly developing branches decreased as compared to intact mycelium (from 10—20 to $6.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ and from 24 ± 1 to $6.7 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$, respectively), but the initial orientation of growth did not change; 2) the branching rhythm was altered; abnormally long internode distances appeared (up to 1471 μm), and the development of some side-branch buds ceased; 3) the character of the septation remained unchanged, as well as the hyphal segment length ($68 \pm 2 \mu\text{m}$). In hyphae growing for 4.5—5.0 h in isolation from the whole mycelium, the distance between the tip and the first septum was $210 \pm 15 \mu\text{m}$, which was comparable with the respective value in intact mycelium, whereas the mean distance between the growth tip and the first side branch ($492 \pm 127 \mu\text{m}$) and the dispersion of this parameter was considerably higher than in intact mycelium. In branches growing in isolation from the intact mycelium for 1.5—4.5 h, the length of the nucleus-free apical zones near the growth tip (from 5 to 33 μm) and the nucleus morphology were similar to the respective characteristics known for the *N. crassa* mycelium. The experimental model described here can be used for the investigations of molecular and genetic mechanisms regulating the interactions between intracellular structures involved in the tip growth of *N. crassa*.

Key words: *Neurospora crassa*, tip growth, branching, septation, nuclear distribution, intercellular interactions.