

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕЧЕНИЯ ВЫСШЕГО ГРИБА *Neonothopanus nambi*

Тяглик А.Б., Шпак Б.А.,

научный руководитель д-р биол. наук Бондарь В.С.

Сибирский федеральный университет

ИБФ СО РАН

Биолюминесценция - широко распространенное в живой природе явление и, в том числе, в царстве грибов. Изучение биолюминесценции высших грибов проводятся более ста лет. Однако природа этого феномена у данных живых организмов остается не установленной, в отличие от свечения бактерий и животных, для многих видов которых механизм излучения расшифрован за последние десятилетия и послужил основой создания новой отрасли – биолюминесцентной аналитики. Биолюминесцентные тесты создаются на уровне геномов, ферментов, клеток и целых светящихся организмов и находят широкое применение в биологии, медицине, биотехнологии и экологическом контроле.

Светящиеся грибы в этом отношении пока не изучены и заслуживают пристального внимания, поскольку удаленность этого таксона от других форм жизни позволяет ожидать, что грибная система свечения может иметь отличия от уже известных излучающих систем. Однако у специалистов, работающих в данной области, до сих пор нет единого мнения о молекулярно-клеточной организации люминесцентной системы и механизме свечения этих живых организмов. Относительно механизмов грибной биолюминесценции в настоящий момент существует два альтернативных мнения. Согласно первому, свечение грибов определяется функционированием классической фермент-субстратной системы люциферазы – люциферин [1,2]. Согласно второму, свечение грибов связано с окислением органических субстратов оксидазами и происходит без участия специализированного фермента [3,4].

Мы исследовали особенности свечения высшего гриба *Neonothopanus nambi*, обитающего в тропических лесах Южного Вьетнама [5,6]. Для экспериментов использовали глобулы мицелия, полученные при глубинном выращивании гриба *N. nambi* в жидкой питательной картофельно-сахарозной среде [7]. Свечение глобул измеряли на люцинометре БЛМ 8801 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия) и регистрировали световые сигналы с помощью самописца (модель 2210) фирмы «ЛКВ» (Швеция). Экстракты из биомассы гриба получали после механического разрушения мицелия в деионизованной (DI) воде (Milli-Q system, «Millipore», США) с помощью гомогенизатора (система стекло-стекло) и удаления клеточных обломков центрифугированием при 16000 g (Centrifuge 5415R, «Eppendorf», Германия) в течение 15 мин при 10°C.

В ходе исследований было показано, что технология глубинного выращивания позволяет получать глобулы мицелия *N. nambi* шарообразной формы (Рис. 1), имеющие шероховатую поверхность за счет большого количества выростов. При таком способе культивирования диаметр получаемых мицелиарных глобул может варьировать в диапазоне 2 - 7 мм.



Рис. 1. Внешний вид глобул мицелия *N. nambi*, получаемых при глубинном культивировании гриба.

Эксперименты с глобулярным мицелием *N. nambi* показали, что глобулы, внесенные в измерительную кювету из питательной среды, не обладают свечением, то есть уровень свечения не имеет достоверных отличий от фонового шума измерительной системы (люцинометра). Кроме того, было показано, что глобулы не реагируют на различные добавки, либо отвечают

незначительным повышением люминесценции с очень медленной (десятки минут) кинетикой подъема. Однако было установлено, что инкубация глобул мицелия *N. nambi* в DI воде в течение 12 - 24 часов приводит к значительному повышению уровня их люминесценции. Глобулы, внесенные в измерительную кювету после инкубирования в DI воде, дают однотипный люминесцентный сигнал (Рис. 2). Регистрируемые сигналы различаются только начальным уровнем свечения, зависящим от размера тестируемой глобулы, и имеют быструю (3 - 5 мин) кинетику затухания с последующим выходом на стационарный уровень (Рис. 2). Начальный подъем интенсивности свечения можно объяснить незначительным механическим воздействием на мицелий в момент переноса глобулы в измерительную кювету.

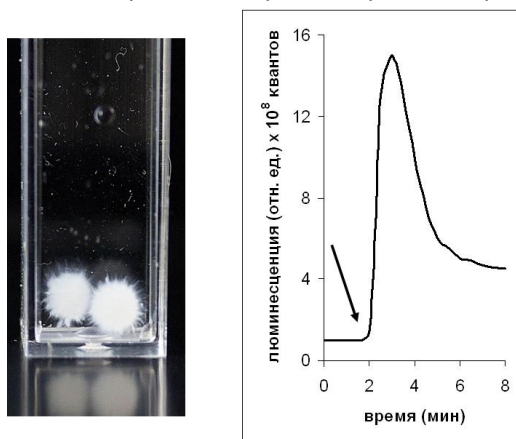


Рис. 2. Глобулы мицелия *N. nambi* в измерительной кювете люминометра (слева), типичный сигнал, регистрируемый от одной глобулы, помещенной в измерительную кювету (справа).

Исследования показали, что перекись водорода (финальная концентрация 8.8 мМ) стимулирует свечение глобул *N. nambi* (Рис. 3). Эти данные хорошо согласуются с полученными ранее результатами при исследованиях мицелия этого вида гриба при его выращивании в жидкой среде на чашках Петри [7]. Было обнаружено, что экстракты из глобул *N. nambi* активируют свечение гриба (Рис. 3). На основании этих исследований был сделан вывод, что экстракты из мицелия *N. nambi* содержат активатор его люминесценции (возможно, эмиттер реакции), который получил название намбин (nambin) [8] по аналогии с паналем - эмиттером свечения гриба *Panellus stipticus*, выделенного Осаму Шимомурой [9]. Поскольку при добавках экстракта и H_2O_2 к глобулам их ответный сигнал развивается быстро (несколько секунд) (Рис. 3), это может указывать на расположение люминесцентной системы гриба *N. nambi* на клеточной стенке или в ее структурных элементах. Такое предположение согласуется с полученными ранее данными о том, что механическое разрушение мицелия *N. nambi* приводит к полной утрате его свечения [7].

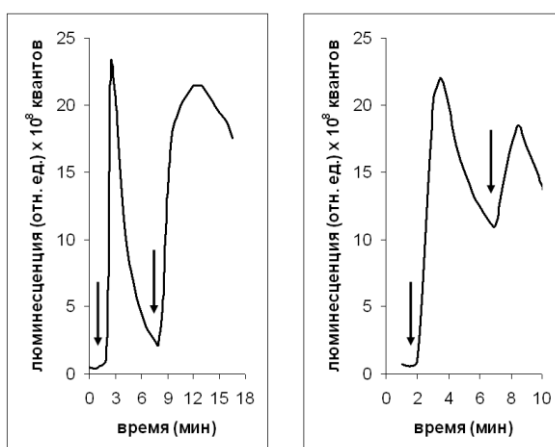


Рис. 3. Стимуляция свечения глобул мицелия *N. nambi* добавками перекиси водорода (слева) и экстракта, полученного из гриба (справа). Стрелками показаны моменты внесения глобул в измерительную кювету и последующие добавки компонентов.

В ходе исследований было установлено, что обнаруженный активатор люминесценции *N. nambi* является низкомолекулярным, термоустойчивым компонентом. Было показано, что активатор выявляется в подмембранной фракции после ультрафильтрации экстрактов (система Amicon, США) через мембрану с пределом исключения 10 kDa. Показано также, что стимулирующий эффект экстрактов сохраняется после их кипячения при 100°C в течение 1 - 3 мин и концентрирования на роторном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf, Германия) при температурах 45°C и 60°C в течение 2 и 1.5 часов соответственно.

Выше говорилось, что при отдельных добавках экстракта и H₂O₂ к глобулам мицелия наблюдается подъем их свечения, развивающийся быстро (несколько секунд) и, как правило, не превышающий начального уровня люминесценции внесенной в кювету глобулы (Рис. 3). Однако в дальнейших исследованиях было установлено, что если эти компоненты добавляются вместе, уровень люминесценции глобул значительно превышает начальный уровень их свечения (Рис. 4). Причем, кинетика наблюдаемого эффекта активации свечения под действием перекиси и экстракта зависит от последовательности добавки компонентов. При добавках – сначала H₂O₂ и затем экстракт, наблюдается медленная (десятки минут) кинетика возрастания свечения. В случае обратной последовательности добавок, интенсивность сигнала возрастает быстро (за 0.5-1.5 минуты) и ее величина может превышать начальный уровень свечения на 2 порядка и более. Интенсивность свечения может быть столь велика, что видна в темноте невооруженным глазом.

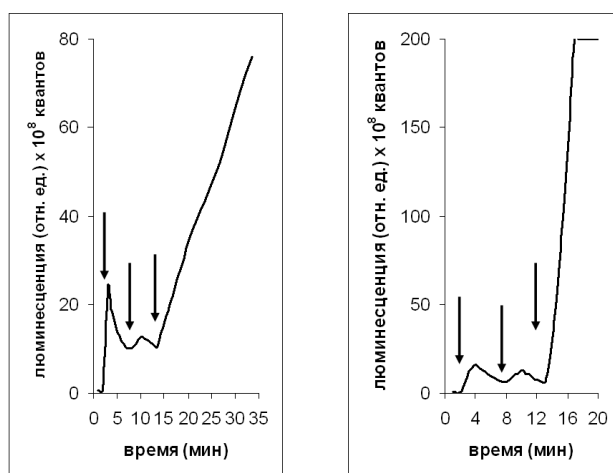


Рис. 4. Стимуляция свечения глобул мицелия *N. nambi* последовательными добавками: (слева) - сначала H₂O₂ и затем экстракта, (справа) - сначала экстракта и затем H₂O₂. Стрелками показаны моменты внесения глобул в измерительную кювету и последующие добавки компонентов.

Было показано, что высокая интенсивность активированного двумя компонентами свечения может регистрироваться в течение 1.5-3.5 часов, после чего она медленно снижается до исходного уровня. При последующих добавках только H₂O₂ (без дополнительного внесения экстракта) снова наблюдается быстрый всплеск излучения аналогичной интенсивности. Из этого следует, что активатор, участвующий в реакции излучения, вероятно, не расходуется в ходе нее, благодаря чему возможно многократное стимулирование свечения добавками перекиси. Активированное светоизлучение глобул заметным образом подавляется при добавках этилового спирта (финальная концентрация 0.1 - 1%) и аскорбиновой кислоты (финальная концентрация 3 - 5 мМ), что может говорить в пользу радикальных процессов, лежащих в основе свечения.

Таким образом, исследованы некоторые особенности биолюминесценции высшего гриба *Neonothopanus nambi*. Получены новые данные, развивающие представления о структурной организации и физико-химических свойствах люминесцентной системы данного гриба. Результаты исследований свидетельствуют в пользу локализации светоизлучающей системы гриба на его клеточной стенке или в ее структурных элементах. В экспериментах с глобулярным мицелием *N. nambi* выявлены два компонента, активирующих люминесценцию гриба: низкомолекулярный, термостабильный активатор (предполагаемый эмиттер реакции излучения) и перекись водорода - при добавлении этих компонентов наблюдается значительная стимуляция свечения. На основании анализа полученных данных и аналогии с общеизвестной хемилюминесцентной

реакцией люминол - H₂O₂ высказана гипотеза о возможном механизме свечения высших грибов, в котором участвуют активные формы кислорода [8]. Приоритетной задачей дальнейших исследований является выделение активатора (предполагаемый эмиттер реакции излучения) в чистом виде, изучение его структуры и физико-химических свойств.

Работа поддержана Программой Правительства РФ «О мерах по привлечению ведущих ученых в учебные заведения России» (грант № 11. G34.31.0058).

Литература:

1. Airth R.L., McElroy W.D. (1959) Light emission from extracts of luminous fungi. *J. Bacteriol.* V.77. P.249-250.
2. Oliveira A.G., Desjardin D.E., Perry B.A., Stevani C.V. (2012) Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. V.11. P.848-852.
3. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. Singapore: World Sci. Publ., 2006. P.266-300.
4. Гительзон И.И., Бондарь В.С., Медведева С.Е., Родичева Э.К., Выдрякова Г.А. (2012) Хемилюминесцентное свечение тканей плодовых тел высших грибов. *ДАН.* Т.443. С.624-627.
5. Дао Т.В. (2009) Культивирование светящегося гриба *Omphalotus aff. illudent* (*Neonothopanus nambi*). *Биотехнология.* №6. С.74-78.
6. Vydryakova G.A., Dao T.V., Shoukouhi P., Psurtseva N.V., Bissett J. (2012) Intergenomic and intragenomic ITS sequence heterogeneity in *Neonothopanus nambi* (Agaricales) from Vietnam. *Mycology.* V3. P.89-99.
7. Бондарь В.С., Пузырь А.П., Пуртов К.В., Медведева С.Е., Родичева Э.К., Гительзон И.И. (2011) О люминесцентной системе светящегося гриба *Neonothopanus nambi*. *ДАН.* Т.438. С.705-707.
8. Бондарь В.С., Родичева Э.К., Медведева С.Е., Тюлькова Н.А., Тяглик А.Б., Шпак Б.А., Гительзон И.И. (2013) О механизме свечения гриба *Neonothopanus nambi*. *ДАН.* Т.449. С.223-227.
9. Shimomura O. (1989) Chemiluminescence of panal (a sesquiterpene) isolated from the luminous fungus *Panellus stipticus*. *Photochem. Photobiol.* V.49. P.355-360.