

УДК 577.112,582.284.51

## СИНТЕЗ АУКСИНА ВЫСШИМ ГРИБОМ *Lentinus edodes* (Berk.) Sing В ПРИСУТСТВИИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ ГРУППЫ ИНДОЛА

© 2012 г. О. М. Цивилева, Е. А. Лощина, О. Е. Макаров, В. Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

e-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2011 г.

Исследовано образование ауксина в глубинной культуре ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитаке). Выявлены биологически активные вещества индольной природы, “эффект малых доз” которых заключается не только в стимулировании роста мицелия (индолил-3-уксусная кислота,  $2 \times 10^{-7}$ – $2 \times 10^{-4}$  г/л), но и в индуцировании триптофан-независимого пути биосинтеза ауксина. Указанный путь реализуется в присутствии экзогенного индола ( $1 \times 10^{-3}$ – $1 \times 10^{-4}$  г/л), а также при индуцировании биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты ее микродобавками ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-8}$  г/л), и сопровождается образованием антраниловой кислоты (до 1.5 мг/л). Выявлена индукция генеративной стадии развития шиитаке индольным производным. Установлено, что среди изученных соединений только индолацетамид в концентрации порядка  $\times 10^{-4}$  г/л в культуральной жидкости *L. edodes* оказывает ярко выраженное стимулирующее влияние на формирование коричневой мицелиальной пленки шиитаке.

Свойства соединений фитогормональной природы, характеризующиеся высокой степенью изученности у высших растений и интенсивно исследуемые у почвенных ассоциативных микроорганизмов, лишь в несистематическом порядке и на явно недостаточном уровне описаны у макробазидиальных грибов. Ауксины являются наиболее изученной группой фитогормональных веществ. В качестве объекта исследований, наряду с другими микологическими объектами промышленного культивирования, особый интерес представляет высший гриб-ксилотроф, сочетающий высокую практическую значимость и явно недостаточно изученные физиолого-биохимические особенности, базидиомицет *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитаке). Достаточно давно выдвигаются предположения о том, что фитогормоны, в том числе представители группы ауксинов, принимают участие в процессах роста и цитодифференцировки не только у растений, но и у грибов. Однако этот вопрос до сих пор остается практически неисследованным.

Особый интерес вызывают эффекты и механизмы действия биологически активных веществ в “малых дозах”. В малых и сверхмалых концентрациях ( $10^{-20}$ – $10^{-13}$  моль/л) проявляют свою активность многие природные хемомедиаторы – токсины и противоядия, вещества, предупреждающие об опасности, феромоны, крипротекторы, другие соединения, в том числе фитогормоны [1]. Описан

парадоксальный характер действия низких концентраций токсичных веществ и лекарственных препаратов, который заключается, в частности, в бимодальной или полимодальной зависимости “доза–эффект”. Отмечается [2], что последствия от воздействия малых доз ксенобиотиков могут быть не менее серьезными, чем последствия от высоких разовых доз: под их влиянием могут меняться существующие связи, давать сбой некоторые системы адаптации, поскольку организм способен приспосабливаться лишь к эффектам, лежащим в обычном диапазоне действия.

Известно два основных пути биосинтеза фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) – триптофан-зависимый (Трп-зависимый), при котором предшественником ИУК служит аминокислота триптофан, и триптофан-независимый (Трп-независимый), когда ИУК образуется из индола, антраниловой кислоты, индолил-3-глицерофосфата [3]. Трп-зависимый синтез ИУК микроорганизмами может проходить по одному из 4 путей: через индолил-3-пировиноградную кислоту и индолил-3-уксусный альдегид (наиболее распространенный путь); через триптамин и индолил-3-уксусный альдегид; через индолил-3-ацетамид либо через индолил-3-уксусный нитрил. По некоторым данным, индолилацетальдоксим может также конвертироваться в ИУК через индолилацетальдегид [4, 5]. Многие фитопатогенные грибы и бактерии обладают несколькими путями биосинтеза ИУК.

Пути биосинтеза ИУК у макробазидиомицетов рассматривались, в лучшем случае, только на уровне положительного/отрицательного влияния добавок триптофана к среде выращивания.

Цель работы – исследование состава группы индольных метаболитов, сопровождающих продукцию ИУК базидиомицетом *Lentinus edodes*, установление, является ли этот путь биосинтеза ИУК Трп-зависимым, либо происходит переключение на Трп-независимый путь при выращивании ксилотрофа в присутствии экзогенных синтетических аналогов соединений – предшественников ИУК.

### МЕТОДИКА

В работе использовали культуру *Lentinus edodes*, штамм F-249, полученный из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Культуру гриба поддерживали на сусло-агаре при 4°C.

В качестве инокулята использовали 14-суточную культуру *L. edodes*, выращенную на агаризованном пивном сусле (4° по Баллингу). Температура выращивания – 26°C. Из полученного мицелия в стерильных условиях с помощью металлического пробойника диаметром 5 мм получали блоки, которыми инокулировали жидкие питательные среды из расчета 2 блока на 20 мл среды.

Глубинную культуру гриба выращивали на жидкой синтетической глюкозо-аспарагиновой среде (глюкоза – 9, L-аспарагин – 1.5 г/л), на пивном сусле (1.2° по Баллингу). Для определения сухой биомассы мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры и высушивали до постоянной массы.

Для исследования влияния соединений индольной природы их добавляли в виде растворов в смеси этанол – H<sub>2</sub>O (1 : 1, по объему) к подвергнутой автоклавированию глюкозо-аспарагиновой среде непосредственно перед посевом в стерильных условиях. Концентрации индольных соединений в питательной среде 0.1; 1; 10 и 100 мг/л. Действие ИУК на рост культуры изучали в интервале 10<sup>-8</sup>–10<sup>-1</sup> г/л.

Индольные соединения определяли в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием в качестве стандартов чистых коммерческих препаратов ИУК, Трп, триптамина (Там), индолилацетамида (ИААм), индолилпириновиноградной кислоты (ИПВК), индолилацетальдегида (ИААльд), индола, индолил-3-ацетонитрила, антраниловой кислоты и 5-гидрокси-индолил-3-ук-

сусной кислоты (5-гидрокси-ИУК). Для идентификации и количественного определения индольных соединений пробы культуральной жидкости отбирали в стерильных условиях в процессе роста культуры, фильтровали, используя фильтры фирмы “Millipore” (Ирландия) типа 0.22 мкм GVPP (торговой марки “Durgapore® membrane filters”), и анализировали. Распределительную обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на носителе с химически связанными гидрофобными остатками C<sub>18</sub> (5 мкм). Колонка (150 × 4.6 мм) “Luna 5μ C18(2)” (“Phenomenex”, США), снабженная предколонкой (типа Security Guard) той же марки. Элюент – смесь метанол–вода (36 : 64 либо 50 : 50, об./об.). Использовали детектор УФ-поглощения, работающий в диапазоне длин волн 250–300 нм. Объем пробы 20 мкл, давление 12 МПа.

Использовано массовое (*m/V*) выражение концентрации индольных соединений в жидких средах. Выбранный способ выражения концентрации используется в абсолютном большинстве опубликованных статей, имеющих отношение к представленной в настоящей работе тематике, и поэтому позволяет проводить сравнения в наиболее удобной для восприятия форме.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Промежуточные продукты биосинтеза ИУК у *L. edodes*.** Нашим предположением о существовании Трп-зависимого синтеза ИУК грибом способствовали следующие наблюдения.

1. Обнаружено явление биосинтеза внеклеточного Трп изученным штаммом *L. edodes*. На синтетической среде, изначально не содержащей этой аминокислоты, концентрации Трп изменялись в пределах от 14 на 7 сут до 24 мг/л на 21 сут. При этом снижение концентрации наблюдалось на 7 и 14 сут. Для всех изученных возрастов культуры внесение в среду добавок Трп (10 и 100 мг/л) привело к значительному повышению содержания этого вещества в культуральной жидкости по сравнению с исходным. Максимальное количество Трп, составившее около 330 мг/л, отмечено на 14 сут на среде с добавкой 100 мг/л этой аминокислоты.

2. Выявлено, что глубинная культура *L. edodes* F-249, растущая на глюкозо-аспарагиновой среде, способна к образованию экстрацеллюлярной ИУК. В контрольном опыте наибольшая концентрация этого ауксина (около 7.5 мг/л) наблюдалась на 21 сут. При экзогенном введении в питательную среду Трп содержание ИУК повысилось, а максимума (9.4 мг/л) достигло на 14 сут на среде с добавкой 100 мг/л аминокислоты, т.е. при наибольшей концентрации Трп.

Влияние индола на образование внеклеточных индольных соединений грибом *L. edodes* F-249

Условия опыта	Конечная концентрация в культуральной жидкости, мг/л					
	Время культивирования, сут	ГАм	ИААм	ИУК	ИПВК	Трп
Контроль (среда без индола)	3	3.7±	3.3	3.7	н.о.*	19.5±
	7	3.8	3.2	н.о.	н.о.	13.8
	10	4.2	3.1	н.о.	н.о.	18.6
	14	3.4	2.3	3.7	0.9	16.9
	21	3.9	3.7	7.4	7.7	23.9
0.1	3	3.1	3.4	4.0	1.0	17.5
	7	1.3	н.о.	н.о.	0.3	9.5
	10	1.9	н.о.	н.о.	0.7	10.8
	14	2.5	2.6	6.9	5.3	16.1
	21	3.3	3.4	9.0	11.6	20.5
1	3	2.5	2.7	5.5	н.о.	14.8
	7	1.3	н.о.	н.о.	0.4	8.3
	10	1.5	н.о.	н.о.	0.9	9.8
	14	2.3	2.3	5.6	2.8	16.2
	21	2.9	2.7	7.4	5.9	16.7
10	3	2.9	3.0	3.4	0.5	17.1
	7	1.9	н.о.	н.о.	0.3	9.9
	10	1.8	н.о.	н.о.	0.9	7.9
	14	2.4	2.2	6.2	4.7	15.6
	21	3.7	2.7	8.1	7.7	17.2
100	3	3.1	3.5	н.о.	0.2	13.9
	7	1.2	н.о.	н.о.	0.4	13.9
	10	1.2	н.о.	н.о.	0.4	10.1
	14	2.4	2.2	6.1	4.2	15.5
	21	3.3	2.2	2.2	16.7	19.1

\* н.о. — не определяется.

Таким образом, на стартовых позициях выявления способа образования фитогормона культурой гриба налицо была биосинтетическая способность гриба в отношении ИУК и ее предшественника Трп.

Основные известные пути биосинтеза ИУК связаны с Трп. Путь, не зависимый от триптофана (Трп-независимый), встречается у растений, а среди бактерий обнаружен у азоспирилл и цианобактерий. К настоящему времени превалирует мнение, что вклад Трп-независимого пути в биосинтез

ИУК незначителен, сам механизм этого пути биосинтеза ауксинов не изучен. И все-таки мнения исследователей разделились. Так, хотя предшествующие работы доказывают существование индолацетамидного пути у *Azospirillum brasilense* [6], приводят биохимические и генетические обоснования использования азоспириллами также пути через ИПВК [7, 8], и в то же время делают предположения о том, что 90% ИУК у *Azospirillum* биосинтезируется по триптофан-независимому пути [6].

Ранее полученные нами данные [9] показали, что в культуральной жидкости *L. edodes* F-249 присутствуют промежуточные соединения трех путей Трп-зависимого биосинтеза ИУК — через ТАм, ИААм и ИПВК (таблица). Это согласуется с известными данными, согласно которым способность синтезировать ИУК сразу по нескольким разным реакциям обнаружена у различных микроорганизмов, в том числе некоторых грибов. Интересно, что ИААльд, являющийся интермедиатом синтеза ИУК как из ИПВК, так и из ТАм, выявлен только на средах с добавкой ИПВК, где ИААльд накапливался в больших количествах, однако уровень ИУК в то же время был очень низким. Путь через ИПВК не реализуется до конца. Ни в одном из изученных образцов не был обнаружен индол-3-ацетонитрил, еще одно промежуточное соединение синтеза ИУК из Трп. Это согласуется с данными литературы, согласно которым у грибов случаев синтеза ИУК через это соединение до сих пор не было выявлено [5].

**Предпосылки Трп-независимого пути синтеза ИУК у шиитаке.** Наши предположения о возможности существования у изучаемой грибной культуры пути биосинтеза ИУК, отличного от Трп-зависимого, основывались изначально на следующем. Принято считать [10, 11], что бактериальный синтез ИУК — это путь детоксификации триптофана. Как указывают некоторые авторы [12], у бактерий, например *A. brasilense*, нет иного пути деградации токсичного для них Трп, кроме трансформации его в ИУК. Поэтому для бактериальных продуцентов именно Трп — наиболее эффективный и “целесообразный” предшественник ИУК [13].

Для изучаемого нами высшего гриба, в отличие от азоспирилл, Трп токсичным не является по крайней мере вплоть до относительно высоких концентраций, которые грибная культура создает при глубинном культивировании (до 330 мкг/мл, см. выше).

Трп-независимый путь связан с синтезом ИУК из индола, антраиловой кислоты, индолил-3-глицерофосфата. Одним из сложных моментов на пути доказательства Трп-независимости биосинтеза ИУК является то, что индол — вещество, которое может служить как предшественником ИУК при Трп-независимом биосинтезе, так и предшественником триптофана. Трп, синтезированный из индола, затем также может служить предшественником для ИУК [14].

В результате изучения биосинтеза ИУК бактериями многие авторы приходят к выводам, позволяющим им судить о предпочтительных веществах — предшественниках ИУК на пути ее биосинтеза. Аргументы таковы:

(1) бактерии не могут производить ИУК Трп-независимым путем при культивировании с индолом как предшественником этого фитогормона, потому что синтез ИУК не стимулировался при выращивании бактерий на средах с индолом [13]. Это предполагает, что индол не является предпочтительным предшественником ИУК в сравнении с Трп;

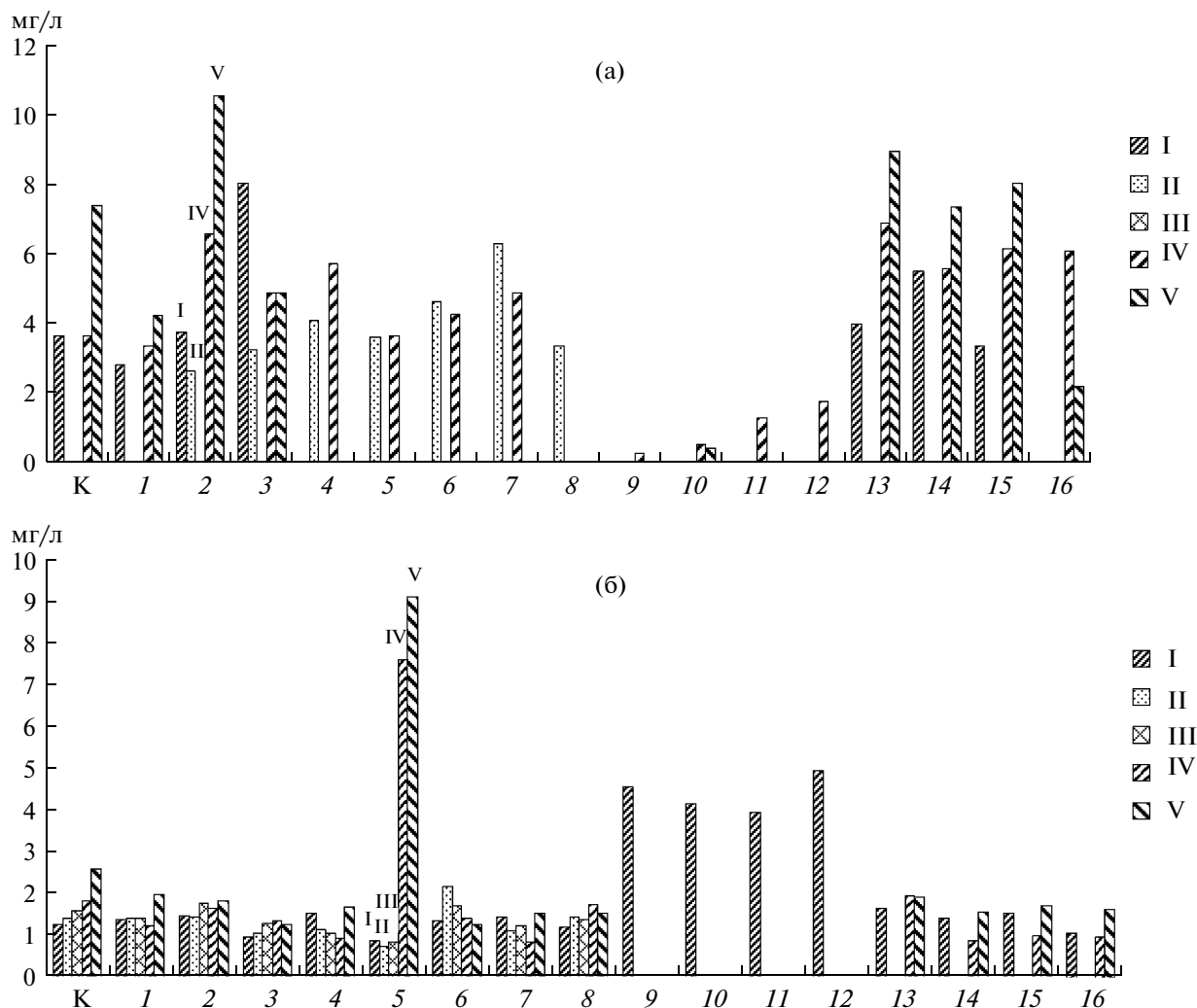
(2) использование микроорганизмами антраиловой кислоты или индола для синтеза ИУК “бестриптофанным” путем маловероятно, поскольку присутствие Трп в культуральной жидкости продемонстрировано во всех экспериментах.

На основании полученных в настоящей работе экспериментальных данных можно представить аргументы за и против сосуществования двух альтернативных путей биосинтеза ИУК у *L. edodes*, Трп-зависимого и Трп-независимого.

Среды с добавлением индола характеризовались достаточно высокими значениями ИУК (до 9 мг/л) на 14–21 сут культивирования, причем количества образовавшейся ИУК не зависели от исходной концентрации индола. Исключение составила среда со 100 мг/л индола, где на 21 сут уровень ИУК снизился, причем концентрация ИПВК в этой же точке резко увеличилась. Данные представлены в таблице. Таким образом, индол стимулировал синтез ИУК.

В наших экспериментах на синтетической среде, изначально не содержащей этого вещества, концентрации внеклеточного Трп колебались в пределах от 13.8 мг/л на 7 сут до 23.9 мг/л на 21 сут. То есть формально не отмечены случаи, когда ИУК синтезируется культурой в отсутствие триптофана, и Трп-зависимый путь биосинтеза ИУК имеет место у изучаемой грибной культуры. Тем не менее можно предположить, что происходит переключение на Трп-независимый путь или подключение этого альтернативного пути (что вероятнее), реализуемого в присутствии экзогенного индола в интервале концентраций  $1 \times 10^{-3}$ – $1 \times 10^{-4}$  г/л (таблица).

Необходимо оговориться в отношении добавок индола, что и в этом случае фоновый уровень Трп есть, но, во-первых, он практически неизменен в сравнении с контрольным опытом, а ИУК синтезируется в 1.5–1.9 раз больше (рис. 1а). И это несмотря на снижение биомассы гриба под воздействием индола, который явно не оказывал положительного влияния на ростовые показатели *L. edodes*. Он вызывал заметное снижение биомассы по сравнению с контролем (до 34% на среде с 100 мг/л индола) и сильно замедлял рост культуры (рис. 2).



**Рис. 1.** Синтез (мг/л) внеклеточной ИУК (а) и 5-гидрокси-ИУК (б) глубинной культурой *Lentinus edodes* F-249 на средах с добавлением индольных соединений при различной продолжительности культивирования (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21; К - контроль; ТАм (1 – 0.1; 2 – 1; 3 – 10; 4 – 100 мг/л); ИААм (5 – 0.1; 6 – 1; 7 – 10; 8 – 100 мг/л); ИПВК (9 – 0.1; 10 – 1; 11 – 10; 12 – 100 мг/л); индол (13 – 0.1; 14 – 1; 15 – 10; 16 – 100 мг/л).

Во-вторых, концентрация Трп в среде совершенно индифферентна в отношении возрастания уровня экзогенного индола в 1000 раз (от 0.1 до 100 мг/л), а потому индол предположительно не является в данном случае сколько-нибудь значимым предшественником Трп с дальнейшим превращением последнего в ИУК. Повышенный уровень индола в культуральной среде усиливал биосинтез ИУК, а не триптофана. Поэтому мы говорим о подключении Трп-независимого пути.

Не только в случае с экзогенным индолом имеются признаки этого пути, но также при индуцировании биосинтеза ИУК ее экзогенными микродобавками ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-8}$  г/л). Например, при исходной концентрации  $1 \times 10^{-7}$  г/л ИУК на 10 сут выращивания уровень фитогормона составил около

$4 \times 10^{-4}$  г/л, т.е. возрос в 4000 раз (рис. 3а). Появление антраниловой кислоты (до 1.5 мг/л) как признака Трп-независимого пути отмечено нами только в этих экспериментальных условиях (рис. 3б). В то же время сам Трп в культуральной жидкости не был обнаружен ни при одной из 8 исследованных концентраций добавки ИУК.

Кроме антраниловой кислоты, в присутствии низких концентраций ИУК ( $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-8}$  г/л) синтезируется ИПВК, однако появления ИААльд – продукта конверсии ИПВК на пути Трп-зависимого синтеза ИУК – не наблюдалось. Эта ситуация с ИААльд меняется со сдвигом экзогенной ИУК в область более высоких концентраций ( $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-1}$  г/л), когда на 10 сут роста, например, накапливалось от 3.6 до 8.7 мг/л ИААльд (рис. 4а).

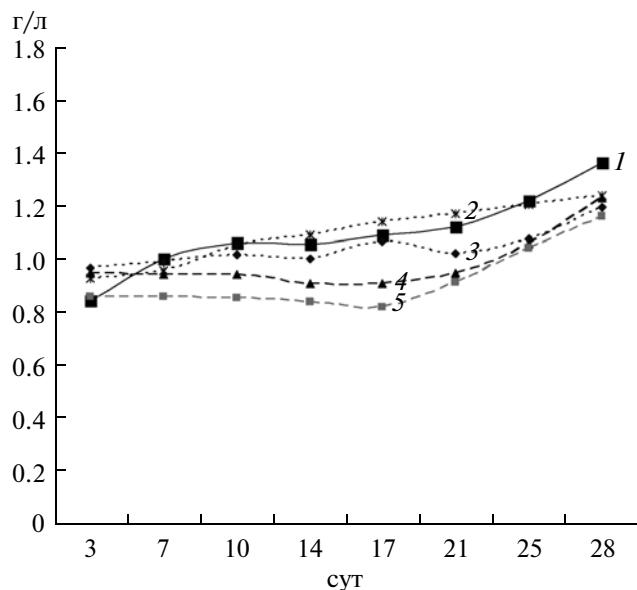


Рис. 2. Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоководной культурой *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут) на средах с добавлением индола (мг/л). 1 — 0; 2 — 0.1; 3 — 1; 4 — 10; 5 — 100.

Следовательно, обычно выдвигаемые в литературе причины отсутствия Трп-независимости биосинтеза ИУК у бактерий не имеют места в отношении *L. edodes*. Полученные результаты предполагают, что антраниловая кислота или индол достаточно эффективные предшественники ИУК по сравнению с Трп. А также позволяют выявить эффект низких концентраций экзогенных индольных соединений в изучаемой грибной культуре.

**Эффект малых доз ИУК в глубоководной культуре шиитаке.** Биологическая активность ИУК в низких концентрациях не изучена, окончательно не определен молекулярный механизм фитогормонального действия ИУК, нет объяснения двухфазности воздействия гетероауксина. Одно из проявлений указанной двухфазности обнаружено в работе С.М. Рогачевой [1]. При моделировании действия ИУК на популяцию использовалась культура зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. (водоросли этого рода продуцируют ИУК и накапливают ее в культуральной среде). В качестве показателя воздействия химического вещества на популяцию использовалось изменение ее численности. Оказалось, что ИУК в концентрациях  $10^{-17}$ – $10^{-11}$  моль/л сдерживает рост численности популяции, в концентрации  $5.7 \times 10^{-7}$  моль/л стимулирует рост, аналогичное действие наблюдается для высших растений. Установлен немонотонный дозозависимый характер воздействия ИУК на интенсивность фотосинтеза и дыхания гидробионтов. Показано, что в концен-

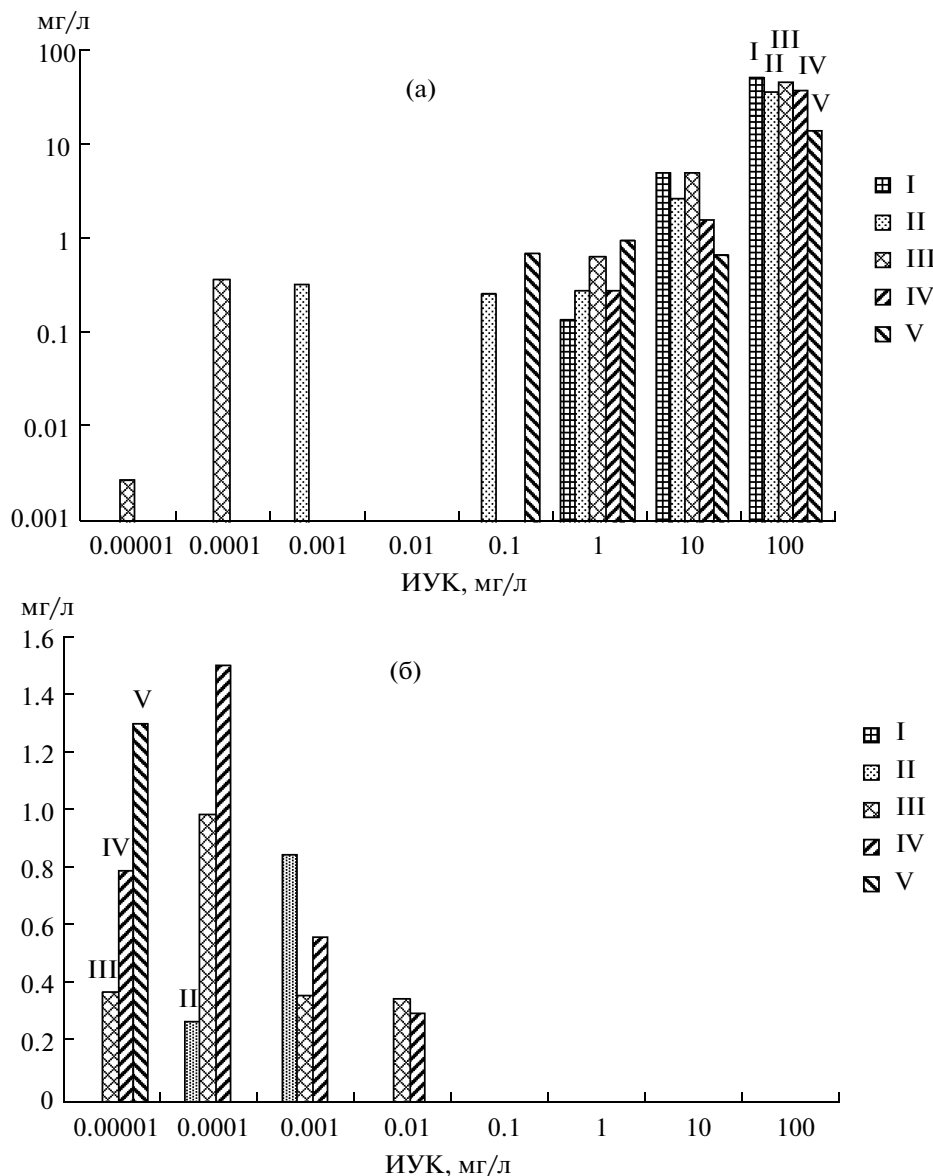
трации  $5.7 \times 10^{-11}$  моль/л ИУК стимулирует фотосинтез и ингибирует дыхание; в концентрациях  $5.7 \times 10^{-7}$  и  $5.7 \times 10^{-17}$  моль/л действует противоположным образом.

Кроме того, в работе [1] получены данные по адсорбции ИУК на границе раздела фаз вода–воздух в зависимости от концентрации. Они указывают на то, что теоретически ИУК должна вытесняться из поверхностных слоев воды, но характер экспериментально полученной зависимости позволяет заключить, что в отдельных концентрационных интервалах имеются области достоверного накопления вещества. Причем они хорошо совпадают с областями наиболее интенсивного светорассеяния. Т.е. ИУК в концентрациях порядка  $10^{-9}$  и  $10^{-15}$  моль/л лучше растворяется в воде поверхностных слоев, упорядочивает ее структуру, что может способствовать более эффективному взаимодействию с мембраной или рецептором. Таким образом, установлена способность ИУК в определенных концентрациях накапливаться на границе раздела фаз и вызывать фазовый  $\lambda$ -переход в структуре сетки водородных связей воды, что может обуславливать эффект малых доз и разнонаправленность биологического действия вещества.

В настоящей работе при использовании в качестве биологического объекта исследования культуры гриба шиитаке представляло интерес выявление “эффекта малых доз” биологически активных веществ индольной природы.

Под влиянием экзогенной ИУК наблюдали стимулирование роста глубоководного мицелия в определенном концентрационном интервале ауксина. Можно отметить, что набор кривых роста гриба (зависимости накопления сухой биомассы от продолжительности выращивания, рис. 5) практически во всем интервале значений по оси абсцисс делится на 2 группы кривых с пограничной кривой, соответствующей концентрации ИУК  $10^{-4}$  г/л. Выше последней — область активированного ауксином роста,  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  г/л ИУК. Ниже — область с зависимостями противоположного свойства, где уровень добавок ИУК составлял  $10^{-1}$ – $10^{-3}$  г/л. При продолжительности выращивания 3–7 и 12–28 сут (т.е. при всех изученных возрастах культуры, кроме интервала 8–11 сут) оптимальной концентрацией ИУК оказалась величина порядка  $10^{-7}$  г/л.

При исследовании влияния добавок экзогенной ИУК на ее содержание в культуральной жидкости *L. edodes* концентрация ауксина  $10^{-4}$  г/л оказалась переломной в том смысле, что уровень ИУК в среде стал выше исходного (рис. 3а). Концентрация добавки ИУК  $10^{-7}$  г/л ( $0.57 \times 10^{-9}$  моль/л) ока-



**Рис. 3.** Влияние добавок экзогенной ИУК (мг/л) на содержание (мг/л) ИУК (а) и антраниловой кислоты (б) в культуральной жидкости глубинной культуры *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21.

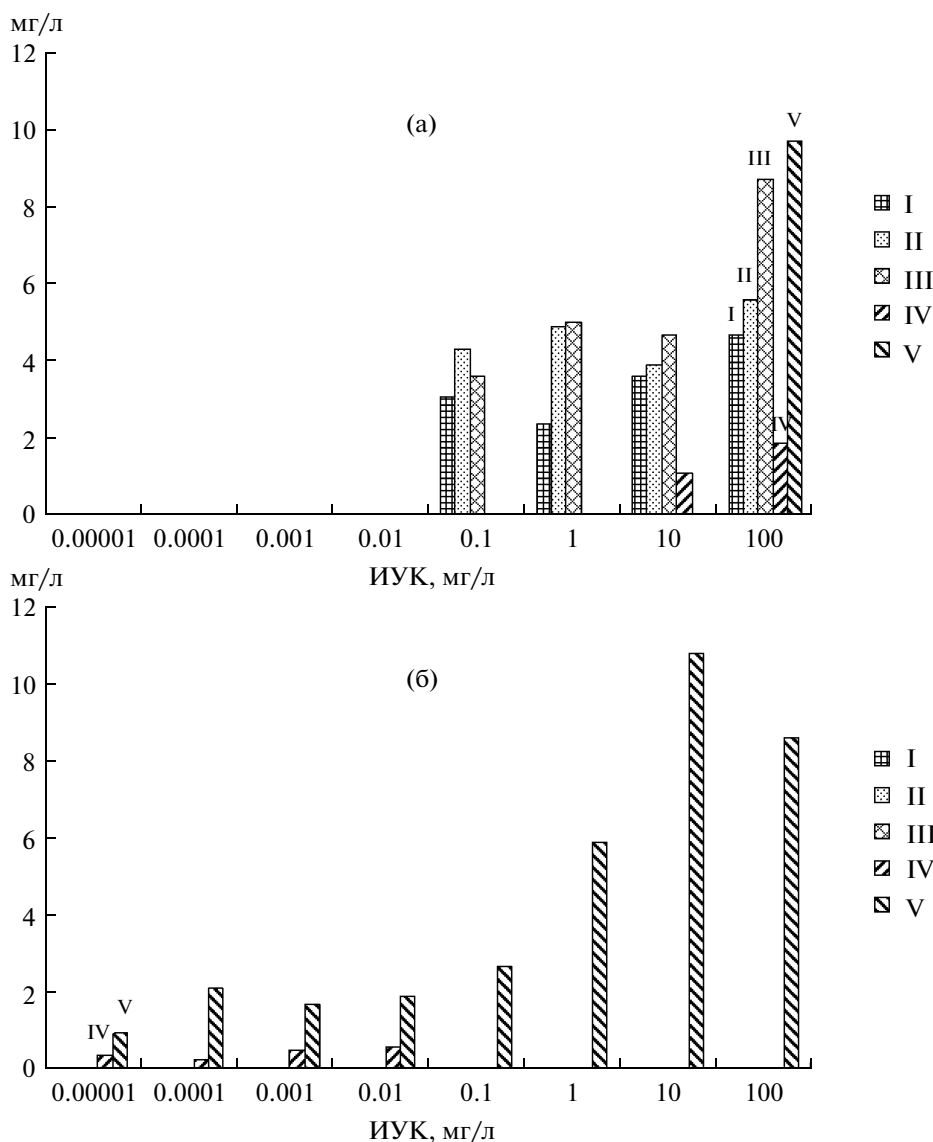
залась примечательна тем, что индуцировала возрастание уровня фитогормона в 4100 раз.

При добавлении ИУК наблюдалось весьма значительное стимулирование биосинтеза ИААльд — до 9.7 мг/л на 21 сут выращивания шиитаке (рис. 4а). Однако так происходило лишь до достижения величины  $10^{-4}$  г/л ИУК, ниже которой эффект отсутствовал.

Индолил-3-пировиноградная кислота накапливалась в среде через 21 сут культивирования гриба при любых концентрациях ауксина (рис. 4б), но лишь ниже величины  $10^{-4}$  г/л экзогенной ИУК удалось обнаружить ИПВК уже на 14 сут, причем в значимых количествах (0.56 мг/л).

Синтез внеклеточной антраниловой кислоты глубинной культурой *L.edodes* F-249 разного возраста на средах с добавлением ИУК не наблюдался вплоть до уровня экзогенного ауксина  $10^{-4}$  г/л (рис. 3б), ниже которого концентрация антранилата составила почти 0.4 мг/л уже на 10 сут культивирования. Максимум продукции антранилата (1.5 мг/л) приходился на вариант опыта с индуцирующей концентрацией ИУК порядка  $10^{-7}$  г/л ( $0.57 \times 10^{-9}$  моль/л).

В перечисленных разнонаправленных эффектах экзогенной ИУК получило дополнительную иллюстрацию вышеописанное действие малых доз фитогормона. Действительно, так же, как и в



**Рис. 4.** Влияние добавок экзогенной ИУК (мг/л) на содержание (мг/л) ИААльд (а) и ИПВК (б) в культуральной жидкости глубинной культуры *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21.

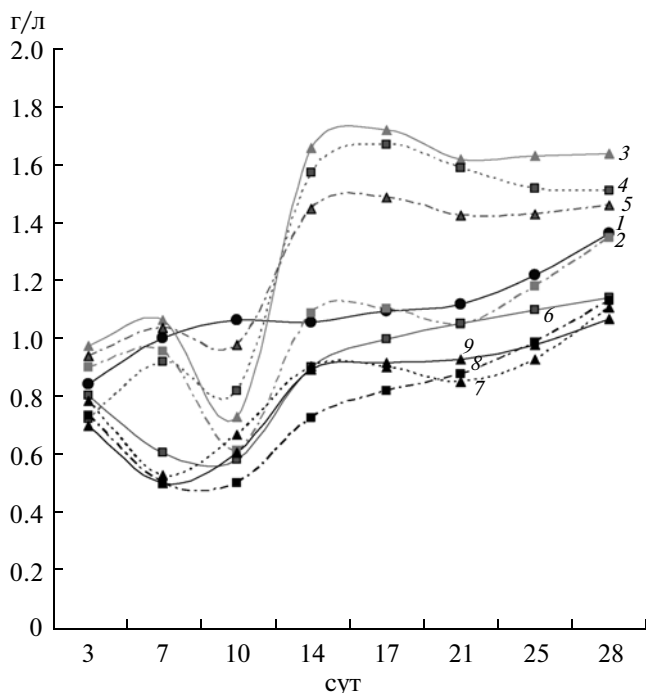
работе [1], своего рода точкой смены “знака” биологического действия ИУК стала концентрация  $5.7 \times 10^{-7}$  моль/л ( $1.0 \times 10^{-4}$  г/л). Кроме того, при использовании ИУК в концентрации порядка  $10^{-9}$  моль/л ( $1.75 \times 10^{-7}$  г/л), способствующей, по данным вышеуказанной работы, более эффективному взаимодействию ауксина с мембраной или рецептором, мы наблюдали абсолютные максимумы в соответствующей серии экспериментов (образование ИУК и антранилата).

**Влияние ИУК и ее предшественников на пигментацию глубинного мицелия *L. edodes* F-249.** Значение растительных гормонов для морфообразования высших грибов-ксилотрофов практически не исследовано.

Некоторые доказательства участия фитогормона ИУК в процессах морфогенетической дифференциации грибов рода *Lentinus*, полученные в ходе простых экспериментов, существуют достаточно давно, хотя и описаны в единичных работах [15, 16]. Эти авторы предполагают, что фитогормонам принадлежит важное место в дифференциации грибной культуры и что процесс морфогенеза тесно связан с динамикой уровня эндогенных регуляторов роста, в том числе ауксина ИУК.

Исследование роли фитогормональных веществ в метаболизме *L. edodes* приобретает особую актуальность на стадии, предшествующей плодоношению и характеризующейся у шиитаке формированием специализированного вегетативного об-



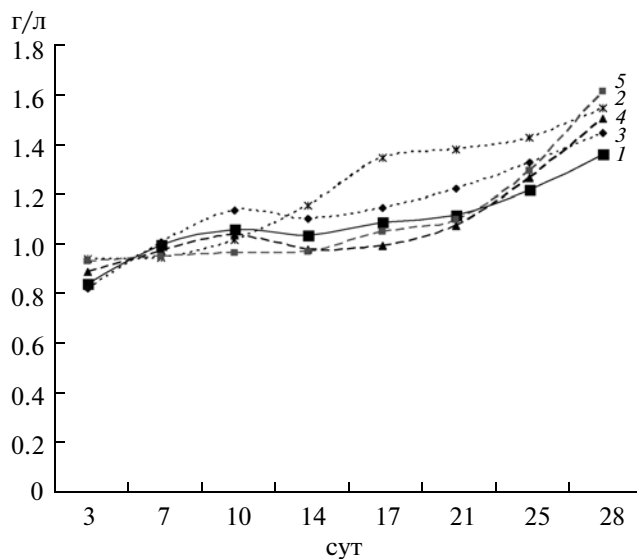


**Рис. 5.** Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоинной культурой *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут) на средах с добавлением ИУК (г/л):  
 1 – 0; 2 –  $10^{-8}$ ; 3 –  $10^{-7}$ ; 4 –  $10^{-6}$ ; 5 –  $10^{-5}$ ; 6 –  $10^{-4}$ ;  
 7 –  $10^{-3}$ ; 8 –  $10^{-2}$ ; 9 –  $10^{-1}$ .

разования – коричневой мицелиальной пленки (КМП), поскольку биохимические условия возникновения этой морфогенетической структуры до сих пор остаются малоизученными.

При изучении воздействия ИУК и ее предшественников – Трп, ТАМ, ИААм, ИПВК и индола – на рост погруженного мицелия *L. edodes* F-249 в большинстве случаев не наблюдалось изменений в морфологии культуры. Исключение составила среда с 0.1 мг/л ИААм. На данной среде отмечено сокращение времени появления коричневой мицелиальной пленки. Пленка появилась на среде с этой добавкой уже на 17 сут, тогда как в контрольном варианте, при других концентрациях ИААм и на средах с остальными индольными соединениями, ее образования не наблюдалось.

При исследовании интенсивности ростовых процессов *L. edodes* в присутствии ИААм оказалось, что именно уровень 0.1 мг/л ИААм в исходной питательной среде соответствовал наибольшему положительному эффекту в отношении накопления мицелиальной биомассы (рис. 6). При указанной оптимальной концентрации ИААм, в свою очередь, именно на 17 сут прирост биомассы был максимальным (24%).



**Рис. 6.** Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоинной культурой *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут) на средах с добавлением ИААм (мг/л).  
 1 – 0; 2 – 0.1; 3 – 1; 4 – 10; 5 – 100.

В исследованных нами образцах культуральной жидкости 5-гидрокси-ИУК – окисленная форма ИУК – присутствовала в контроле, на средах с ТАМ и ИААм при всех возрастах мицелия, концентрации ее при этом колебались в пределах от 0.78 до 2.63 мг/л (рис. 16). Исключение составила среда с 0.1 мг/л ИААм, где на 14–21 сут уровень 5-гидрокси-ИУК резко увеличился на порядок. Как было сказано выше, этот вариант опыта отличался от остальных ранним появлением коричневой мицелиальной пленки. На 14 сут наблюдалась заметная пигментация мицелия, а к 17 сут пленка полностью образовалась. Можно предположить, что 5-гидрокси-ИУК вовлекается в процесс формирования КМП.

Накопление значительной биомассы мицелия принадлежит к числу факторов, необходимых для перехода к морфогенетической стадии, предшествующей плодоношению (КМП у шиитаке), но не является достаточным условием развития КМП. В формирование пигментации мицелия должны быть вовлечены также окисленные производные индола, участие которых в превращениях 5,6-дигидроксииндол–индол-5,6-хинон-меланокром–меланин, в случае катализа грибными тирозиназами приводящих к образованию меланиновых пигментов грибов, известно достаточно давно [17].

Таким образом, при глубинном культивировании ксилотрофного базидиомицета *L. edodes* выявлена группа метаболитов индольной природы, состав и количественное соотношение которых позволяет судить о сосуществовании двух

альтернативных путей биосинтеза ИУК у *L. edodes*: Трп-зависимого (в основном через триптамин) и Трп-независимого, реализуемого не только в присутствии экзогенного индола в интервале концентраций  $1 \times 10^{-3}$ – $1 \times 10^{-4}$  г/л, но и при индуцировании биосинтеза ИУК ее экзогенными микробавками. Выявлено участие индоллил-3-ацетамида и 5-гидрокси-ИУК в морфогенетических процессах культуры *L. edodes*. Установлена взаимосвязь уровня ИААм и 5-гидрокси-ИУК с формированием коричневой мицелиальной пленки в глубинной культуре, с процессами роста и развития грибного мицелия при глубинном культивировании.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-БРФФИ, грант 10-04-90021-Бел\_а.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рогачева С.М.* Роль водной компоненты и полисахаридов клеточной поверхности в процессах коммуникации живых систем: анализ молекулярных моделей. Воронеж: Воронежский гос. университет, 2008. 40 с. <http://vak.ed.gov.ru/ru/dissertation/index.php?id54=1099>
2. *Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л.* // Биофизика. 2004. Т. 49. № 3. С. 551–564.
3. *Vaca B.E., Elmerich C.* // Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria, and Cyanobacterial Associations, chapter 6 / Eds. C. Elmerich, W.E. Newton. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. P. 113–143.
4. *Eckardt N.A.* // Plant Cell. 2001. V. 13. № 1. P. 1–3.
5. *Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C.W.* // Molec. Plant Pathol. 2008. V. 9. № 3. P. 339–355.
6. *Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H.* // Mol. Plant-Microb. Interact. 1993. V. 6. № 5. P. 609–615.
7. *Bar T., Okon Y.* // Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology / Eds. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 347–359.
8. *Costacurta A., Keijers V., Vanderleyden J.* // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 243. № 4. P. 463–472.
9. *Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Никитина В.Е., Макаров О.Е.* // Вавиловские чтения—2008: Материалы межд. научно-практ. конф. Саратов: ИЦ “Наука”, 2008. С. 30–32.
10. *Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A.* // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. V. 22. № 4. P. 325–334.
11. *Bar T., Okon Y.* // Symbiosis. 1992. V. 13. № 1–3. P. 191–198.
12. *Lebuhn M., Hartmann A.* // Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria / Eds. M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen. Australia: CSIRO, 1994. P. 145–147.
13. *Zakharova E.A., Shcherbakov A.A., Brudnik V.V., Skripko N.G., Bulkhin N.Sh., Ignatov V.V.* // Eur. J. Biochem. 1999. V. 259. № 3. P. 572–576.
14. *Dewick P. M.* // Nat. Prod. Rep. 1998. V. 15. № 1. P. 17–58.
15. *Rypacek V., Sladky Z.* // Mycopathologia et Mycologia applicata. 1972. V. 46. № 1. P. 65–72.
16. *Rypacek V., Sladky Z.* // Biologia Plantarum (Praha). 1973. V. 15. № 1. P. 20–26.
17. *Choi S.W., Sapers G.M.* // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. № 5. P. 1183–1189.

## Auxin Synthesis by the Higher Fungus *Lentinus edodes* (Berk.) Sing in the Presence of Low Concentrations of Indole Compounds

O. M. Tsivileva, E. A. Loshchinina, O. E. Makarov, and V. E. Nikitina

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru*

Received March 21, 2011

**Abstract**—The auxin formation in a submerged culture of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) (shiitake) is studied. Biologically active substances of an indole nature are identified, “the effect of small doses” of which lies in not only the stimulation of growth of the mycelium (indole-3-acetic acid,  $2 \times 10^{-7}$ – $2 \times 10^{-4}$  g/l), but also in the induction of tryptophan-independent paths of auxin biosynthesis. The above-mentioned path is realized in the presence of exogenous indole ( $1 \times 10^{-3}$ – $1 \times 10^{-4}$  g/l), as well as while inducing the biosynthesis of indole-3-acetic acid by its microadditives ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-8}$  g/l), and is accompanied by the formation of anthranilic acid (up to 1.5 mg/l). Induction of the generative development stage of shiitake by indole derivatives is revealed. It was found that among the studied compounds only indoleacetamide at a concentration of an order of  $\times 10^{-4}$  g/l in the culture fluid of *L. edodes* had a pronounced stimulatory effect on the formation of shiitake’s brown mycelial film.