

С.М. БОЙКО

Донецький національний університет
E-mail: bsm73@ukr.net

**ПОЛІМОРФІЗМ
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ
ІЗОФЕРМЕНТІВ *SCHIZOPHYLLUM
COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*)
НА ТЕРИТОРІЇ ДОНЕЦЬКОЇ ОБЛАСТІ**



Представлено результати дослідження поліморфізму внутрішньоклітинних ізоферментів культур *Schizophyllum commune* Fr., що зростають на території Донецької області. Наведено опис електрофоретичних спектрів *AMY*, *ADH*, *GPDH*, *GDH*, *SDH*, *EST*. Ферментні системи *ADH*, *GPDH* та *GDH* виявилися мономорфними. Найбільшою різноманітністю внутрішньоклітинних ізоформ відзначався фермент *EST*, у якого визначено шість чітких зон, для трьох з яких властивий поліморфізм.

© С.М. БОЙКО, 2011

Вступ. У справі вивчення біологічного різноманіття молекулярно-генетичні методи надають можливість визначити стан генетичних ресурсів компонентів екосистем, включаючи оцінку генетичної мінливості, характер її розподілу в межах ареалів видів та провести відбір цінного генофонду [1–3]. Одним з таких методів є ізоферментний аналіз, який дозволяє розмежовувати близькі види, реєструвати реорганізацію генетичного матеріалу, а також розрізняти гомота гетерозиготи [4–6]. Подібні дослідження застосовуються у першу чергу до грибів, які мають комерційне господарське значення або є патогенами, що завдають великих збитків. Найбільш вивченими у цьому плані є представники родів *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm., *Agaricus* L. та *Phytophthora* de Bary [2, 7–9]. Дереворуйнуючий базидіальний гриб *Schizophyllum commune* Fr. (*Sch. radiatum* (Sw.) Fr.) має досить широке географічне поширення та зафіксований майже у всіх біокліматичних зонах [10]. На даний момент він використовується як джерело препаратів проти-пухлинної, імуностимулюючої, протизапальної дії в медицині та косметології. Вивченню морфології та фізіології *Sch. commune* присвячена досить велика кількість робіт [11–16]. Однак генетичні особливості гриба вивчено недостатньо, у зв'язку з чим метою роботи було дослідження поліморфізму внутрішньоклітинних ізоферментів гриба *Sch. commune* з території Донецької області для можливого подальшого їхнього використання як генетичних маркерів.

Матеріал і методи. Об'єкт досліджень – дикаріотичні та моноспорові культури *Sch. commune*. Плодові тіла гриба були зібрані з різних порід дерев у природних і штучних насадженнях в межах Донецької області (Донецька міська агломерація та Національний природний парк «Святі гори») впродовж 2007–2008 рр.

Виділення чистих культур здійснювали у такий спосіб: попередньо очищене від часток ґрунту, рослинних залишків плодове тіло гриба розрізали на фрагменти 3 × 3 мм. Фрагмент тканини стерильним мікологічним гачком вносили у 5–10%-ний розчин H_2O_2 та витримували 1–2 хв [17]. В подальшому над полум'ям пальника оброблений фрагмент за допомогою мікологічного гачка вно-

сили у пробірку з картопляним агаром. Після появи чистого грибного міцелію частину його перенесли в іншу пробірку з живильним середовищем. Щоб уникнути замічення, робили кілька пересівів.

Одержання моноспорових культур здійснювали методом спорових відбитків, з яких надалі робився змив з наступним багаторазовим розведенням стерильною дистильованою водою. Однорідну водну суспензію базидіоспор висівали глибинно у чашки Петрі на агаризоване середовище й прощували у термостаті [18]. Чистоту та належність до моноспорових культур контролювали за допомогою мікроскопії. Загальна кількість досліджених культур становила 102, з яких дикаріотичних 12 (6 – Донецька міська агломерація, 6 – територія Національного природного парку «Святі гори») та 90 моноспорових культур, отриманих з плодівих тіл.

Одержані культури зрощували на стандартному рідкому глюкозо-пептонному сере-

довищі [18] протягом 14 діб у термостаті ТС-80М за температури 28 °С, рН 5,0.

Для аналізу ферментних систем використовували міцелій моноспорових та дикаріотичних культур, гомогенізований у буферній системі та профільтований [19]. Електрофоретичне розділення білків проводили у 11,25%-ному поліакриламідному гелі з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН 8,3). Гістохімічне виявлення зон активності здійснювали для наступних ферментів: α -амілаза (AMY) (КФ 3.2.1.1), алкогольдегідрогеназа (ADH) (КФ 1.1.1.1), α -гліцерофосфатдегідрогеназа (GPDH) (КФ 1.1.1.8), глутаматдегідрогеназа (GDH) (КФ 1.4.1.2), естераза (EST) (КФ 3.1.1.1), сорбітолдегідрогеназа (SDH) (КФ 1.1.1.14) [20].

Результати дослідження та їх обговорення. У процесі вивчення внутрішньоклітинних ізоферментів α -амілази було встановлено, що для досліджуваних культур *Sch. commune* характерна наявність двох зон, відповідальних за синтез α -амілази (рис. 1). AMY-1

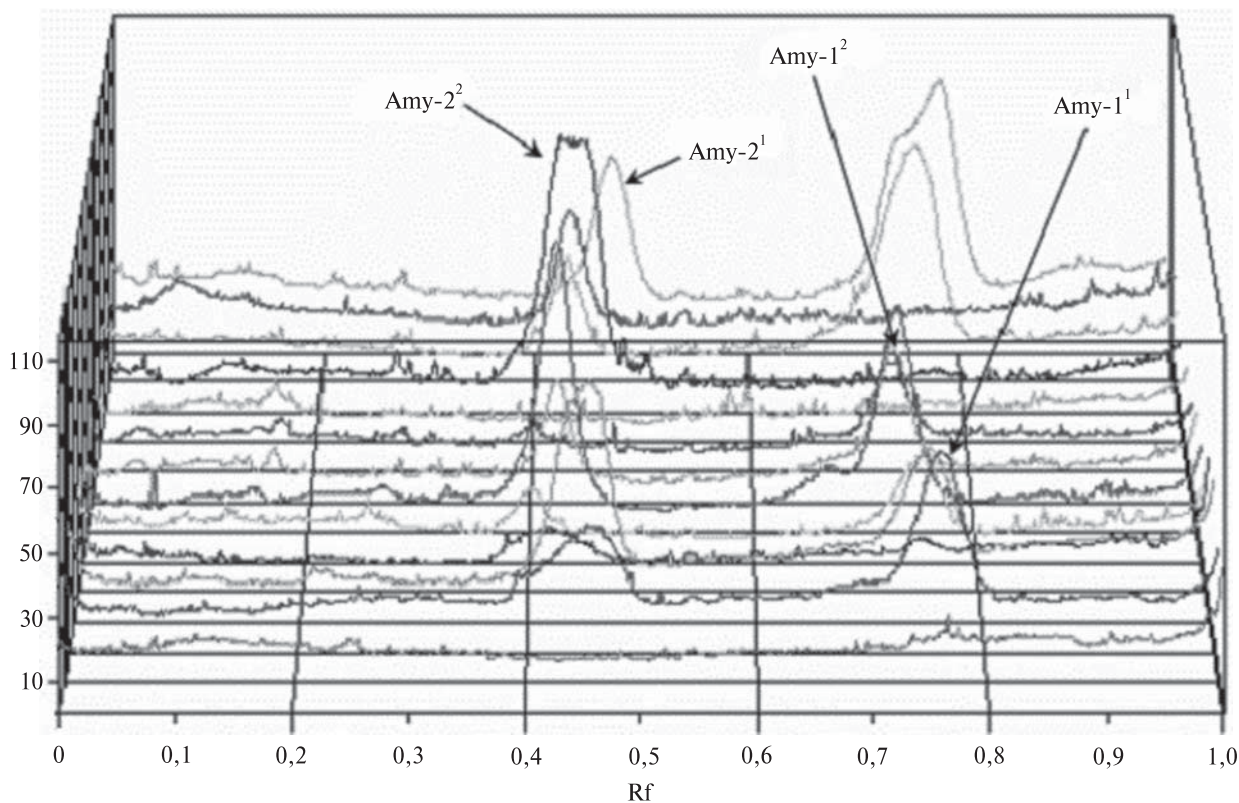


Рис. 1. Денситограма внутрішньоклітинних ізоформ α -амілази моноспорових культур *Schizophyllum commune*

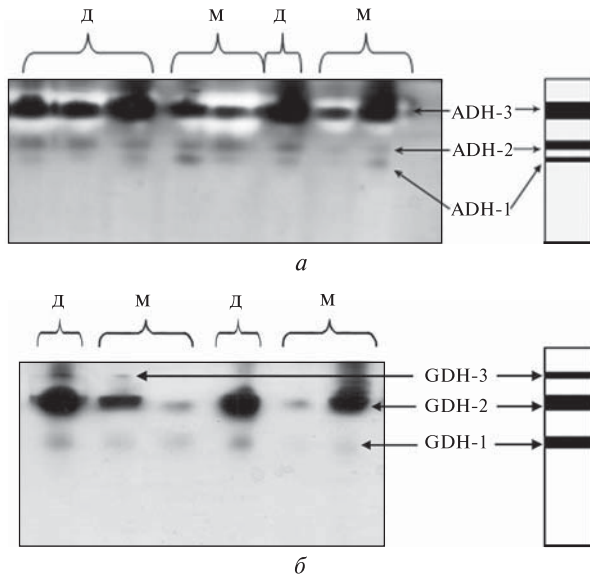


Рис. 2. Електрофореграма внутрішньоклітинних ізоферментів алкогольдегідрогенази (а) та глутаматдегідрогенази (б) культур *Schizophyllum commune* (м – моноспорова культура, д – дикаріотична культура)

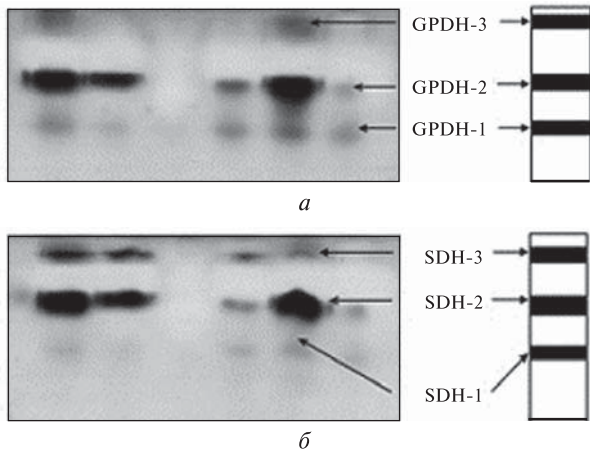


Рис. 3. Електрофореграма внутрішньоклітинних ізоферментів моноспорових культур *Schizophyllum commune*: а – α -гліцерофосфатдегідрогеназа; б – сорбітолдегідрогеназа

характеризується низькою ферментативною активністю, і цей факт викликає певні труднощі під час ідентифікації ферменту. Для деяких зразків була встановлена його відсутність. На електрофореграмах АМУ-1 представлена двома варіантами – Аму-1¹ та Аму-1². АМУ-2 характеризується високою ферментативною активністю і виявляється у всіх

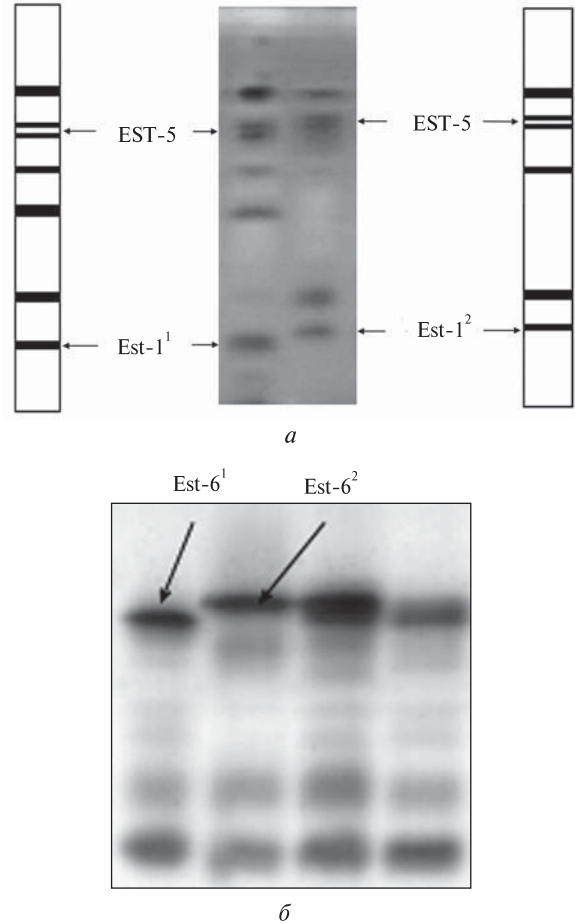


Рис. 4. Електрофоретична рухливість внутрішньоклітинних ізоферментів естерази моноспорових культур *Schizophyllum commune*: а – поліморфізм Est-1 та EST-5 ; б – поліморфізм Est-6

дослідних культурах. Як і АМУ-1, вона представлена двома варіантами – Аму-2¹ і Аму-2².

Алкогольдегідрогеназа представлена трьома смугами (рис. 2, а). Завдяки високій ферментативній активності найкраще з усіх досліджених зразків інтерпретувалася зона АДН-3. У дикаріотичних культур смуги АДН-1 та АДН-2 проглядалися набагато чіткіше у порівнянні з моноспоровими культурами. Усі три виявлені ізоформи алкогольдегідрогенази були мономорфними.

Електрофоретичний спектр внутрішньоклітинних ізоферментів глутаматдегідрогенази, α -гліцерофосфатдегідрогенази та сорбітолдегідрогенази проявляється у вигляді трьох смуг кожна (рис. 2, б і 3, а, б). Усі

зони ферментів виявилися мономорфними. Встановлено, що ізоформи GPDH-2, GDH-2 та SDH-2 у всіх випадках мали більшу активність порівняно з іншими формами, а GPDH-3 та GDH-3 були зафіксовані в невеликій кількості зразків. Слід також зазначити, що з огляду на електрофоретичну рухливість вивчених дегідрогеназ деякі їхні зони накладаються одна на іншу (ADH-3, GPDH-2, GDH-2, SDH-2). Не виключено, що у цьому випадку мова може йти про активність ізоформ якогось ферменту, який має низьку специфічність щодо субстрату.

Найбільша різноманітність ізоформ була виявлена для ферменту естерази. У цілому визначено шість добре зафіксованих зон з високою ферментативною активністю (рис. 4). Зона EST-4 була присутня у 100 % вивчених дикаріотичних та 95 % моноспорових культур, що, на наш погляд, можна пояснити меншою ферментативною активністю ферменту у останніх. EST-1, EST-5 та EST-6 були поліморфними. EST-1 та EST-6 мали по два варіанти – Est-1¹, Est-1² та Est-6¹, Est-6² (рис. 4, а, б). Зона EST-5 має більш складну архітектуру і проявляється в моноспорових культур у вигляді двох або трьох зон активності (рис. 4, а).

Висновки. Проведені дослідження з вивчення поліморфізму внутрішньоклітинних ізоферментів ізолятів виду *Sch. commune*, які було отримано з плодів грибів, що зростають у Донецькій обл., дозволили встановити чітку наявність щонайменше 20 зон активності ферментів. Виявлено мономорфність для всіх досліджених дегідрогеназ (алкогольдегідрогеназа, α -гліцерофосфатдегідрогеназа, глутаматдегідрогеназа). Найбільшою різноманітністю внутрішньоклітинних ізоформ характеризувалася естераза. Для цієї системи визначено шість чітких зон, для трьох з яких встановлений поліморфізм.

S.M. Voiko

POLYMORPHISM OF ENDOCELLULAR ISOENZYMES *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*) IN TERRITORY OF DONETSK AREA

Results of research of endocellular isoenzyme polymorphism of *Schizophyllum commune* Fr. cultures

growing on the territory of Donetsk region are presented. Description of AMY, ADH, GPDH, GDH, SDH, EST electrophoretic spectrum has been carried out. The enzyme systems ADH, GPDH and GDH were monomorphic. The greatest variety of endocellular isoforms was shown for EST. Well defined six zones were detected and for three of them the polymorphism was peculiar.

S.M. Boiko

ПОЛИМОРФИЗМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*) НА ТЕРРИТОРИИ ДОНЕЦКОЙ ОБЛАСТИ

Представлены результаты исследования полиморфизма внутриклеточных изоферментов культур *Schizophyllum commune* Fr. произрастающих на территории Донецкой области. Приведено описание электрофоретических спектров AMY, ADH, GPDH, GDH, SDH, EST. Ферментные системы ADH, GPDH и GDH оказались мономорфными. Наибольшим разнообразием внутриклеточных изоформ отличался фермент EST, для которого определено шесть четко разделяемых зон, для трех из них свойствен полиморфизм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коршиков І.І., Мудрик О.А., Лісничук А.М., Великоридько Т.І. Аналіз генетичної спорідненості реліктових популяцій *Pinus sylvestris* L. і *Pinus sylvestris* var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom. в Україні // Укр. бот. журн. – 2006. – 63, № 6. – С. 845–852.
2. Милотина Д.И. Генотипический состав популяций и устойчивость к некоторым фунгицидам штаммов *Phytophthora infestans* (Mont.) de Vauz из республики Марий Эл и Московской области : Автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.24. – М., 2008. – 24 с.
3. Шнырева А.В. Геносистематика и проблема вида у грибов // Иммунопатология. – 2009. – № 1. – С. 13–15.
4. McDonald B.A. The population genetics of fungi : Tools and techniques // Phytopathology. – 1997. – 87. – P. 448–453.
5. Royse D.J., May B. Identification and use of three new biochemical markers in *Agaricus bisporus* // Agric. Biol. Chem. – 1989. – 53. – P. 2861–2866.
6. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
7. Zervakis G., Sourdiz J., Balis C. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isoenzyme analysis // Mycol. Res. – 1994. – 98. – P. 329–341.
8. Urbanelli S., Della Rosa V., Fanelli C., Fabbri A.,

- Reverberi M.* Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Que'l and *Pleurotus ferulae* (DC.:Fr.) Que'l. // *Heredity*. – 2003. – **90**. – P. 253–259.
9. Шнырева А.В. Молекулярное генотипирование коммерческих штаммов культивируемых съедобных грибов // Школа грибоводства. – 2006. – № 4. – С. 48–51.
 10. *Cybertruffle's* robigalia. Observations of fungi and their associated organisms [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.cybertruffle.org.uk> (05.07.09).
 11. Зубкова Л.А., Степанова А.А. Ультраструктура базидий и спор *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. (*Schizophyllaceae*) в зависимости от типа субстрата // Микология и фитопатология. – 1998. – **32**, вып. 2. – С. 48–53.
 12. Ліновицька В.М., Бухало А.С. Культуральні та морфологічні особливості лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) на агаризованих живильних середовищах // Укр. бот. журн. – 2005. – **62**, № 1. – С. 78–86.
 13. *Clarke A.J., Yaguchi M.* Difference spectrophotometric study on the interaction of cellulase from *Schizophyllum commune* with substrate and inhibitors // *Biochim. et biophys. acta*. – 1986. – **870**. – P. 401–407.
 14. *Fowler T.J., Mitton M.F., Vaillancourt L.J., Raper C.A.* Changes in mate recognition through alterations of pheromones and receptors in the multisexual mushroom fungus *Schizophyllum commune* // *Genetics*. – 2001. – **158**. – P. 1491–1503.
 15. *Guettler S., Jackson E.N., Lucchese S.A., Hanaas L., Green A., Hittinger C.T., Tian Y., Lilly W.W., Gathman A.C.* ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media // *Fungal Genet. and Biol.* – 2003. – **39**. – P. 191–198.
 16. Белова Н.В., Ефремова И.Я. Препараты из высших базидиальных грибов – объект патентно-правовой охраны // Микология и фитопатология. – 1992. – **26**, № 4. – С. 321–324.
 17. Билай В.И. Основы общей микологии. – К.: Вища шк., 1980. – 360 с.
 18. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
 19. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот : Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
 20. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.

Надійшла 21.04.10