

С.М. Бойко

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АЛЛОЗИМОВ У *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY (BASIDIOMYCETES)

Stereum hirsutum (Willd.) Gray, изоферменты, монокариотическая культура

Введение

Информация о генетических особенностях организма на современном этапе развития биологических наук является наиболее ценной и востребованной. Методы получения подобных знаний очень разнообразны и базируются в основном на полиморфизме участков ДНК (RFLP, AFLP, ISSR, RAPD и др.) и аллозимов биологических объектов [7, 10, 11, 12]. Последний метод выделяет относительная простота и повторяемость получаемых данных.

В ведущих мировых лабораториях успешно используется метод электрофореза белков для идентификации неизвестных таксонов грибов, уровня плоидности на различных этапах жизненного цикла, создания паспорта патентных штаммов, анализа генетического разнообразия в популяциях [8, 13, 14]. Дереворазрушающий базидиальный гриб *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray является космополитом, морфологические и физиологические особенности которого хорошо известны [6, 9]. При этом остается значительный пробел в вопросе его генетических особенностей. Наши предварительные исследования позволили выделить ферментные системы *S. hirsutum*, четко проявляющиеся при электрофоретическом исследовании белков [3].

Цель исследований

Цель работы – определение генетического контроля ферментных систем *S. hirsutum*.

Объекты и методика исследований

Объектом исследований были ди- и монокариотические культуры *S. hirsutum*. Дикариотические культуры были получены из плодовых тел грибов, произрастающих в Донецкой, Ивано-Франковской областях и АР Крым.

Выделение чистых культур осуществляли следующим образом: предварительно очищенное плодовое тело гриба разрезали на фрагменты 3×3 мм, которые стерильным микологическим крючком переносили в 8% раствор H₂O₂ и выдерживали 1–2 мин [2]. Далее обработанный фрагмент переносили в пробирку с картофельным агаром. После появления чистого грибного мицелия часть его переносили в другую пробирку с питательной средой.

Получение монокариотических культур осуществляли методом споровых отпечатков, с которых в дальнейшем проводили смыв. Однородную водную суспензию базидиоспор после многократного разведения высевали глубинно в чашки Петри на агаризированной среде [4]. Чистоту и принадлежность к моноспоровым культурам контролировали при помощи микроскопии.

Полученные изоляты культивировали на жидкой глюкозо-пептонной среде в течение 15–18 суток в термостате ТС-80М при температуре 24°C. Начальная кислотность питательной среды составляла pH 5,0.

Электрофоретическое разделение внутриклеточных белков осуществляли в 7,5% полиакриламидном геле с использованием трис-глициновой буферной системы (pH 8,3). Гистохимическое проявление зон активности осуществляли для следующих ферментных систем: алкогольдегидрогеназа (ADH) (КФ 1.1.1.1), α-глицерофосфатдегидрогеназа (GPDH) (КФ 1.1.1.8), глутаматдегидрогеназа (GDH) (КФ 1.4.1.2), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) (КФ 2.6.1.1), сорбитолдегидрогеназа (SDH) (КФ 1.1.1.14), супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1) [5]. Генетический контроль выявленных электрофоретических вариантов ферментов изучали методом анализа их

сегрегации среди монокариотических культур, полученных с каждой дикариотической культуры. В соответствии с менделевскими закономерностями, при моногенном наследовании признака, гетерозиготного по какому-либо локусу, аллельные варианты (в нашем случае аллозимы) сегрегируют в соотношении 1:1. Степень соответствия наблюдаемых соотношений аллозимов ожидаемым оценивали с помощью критерия χ^2 [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Электрофоретический анализ 6 внутриклеточных ферментных систем моно- и дикариотических культур *S. hirsutum* позволил выявить 15 ген-ферментных локусов. Соотношение наблюдаемого и ожидаемого распределения аллозимов у монокариотических культур соответствовало распределению 1:1 ($P < 0,05$). Схематическое их расположение представлено на рисунке.

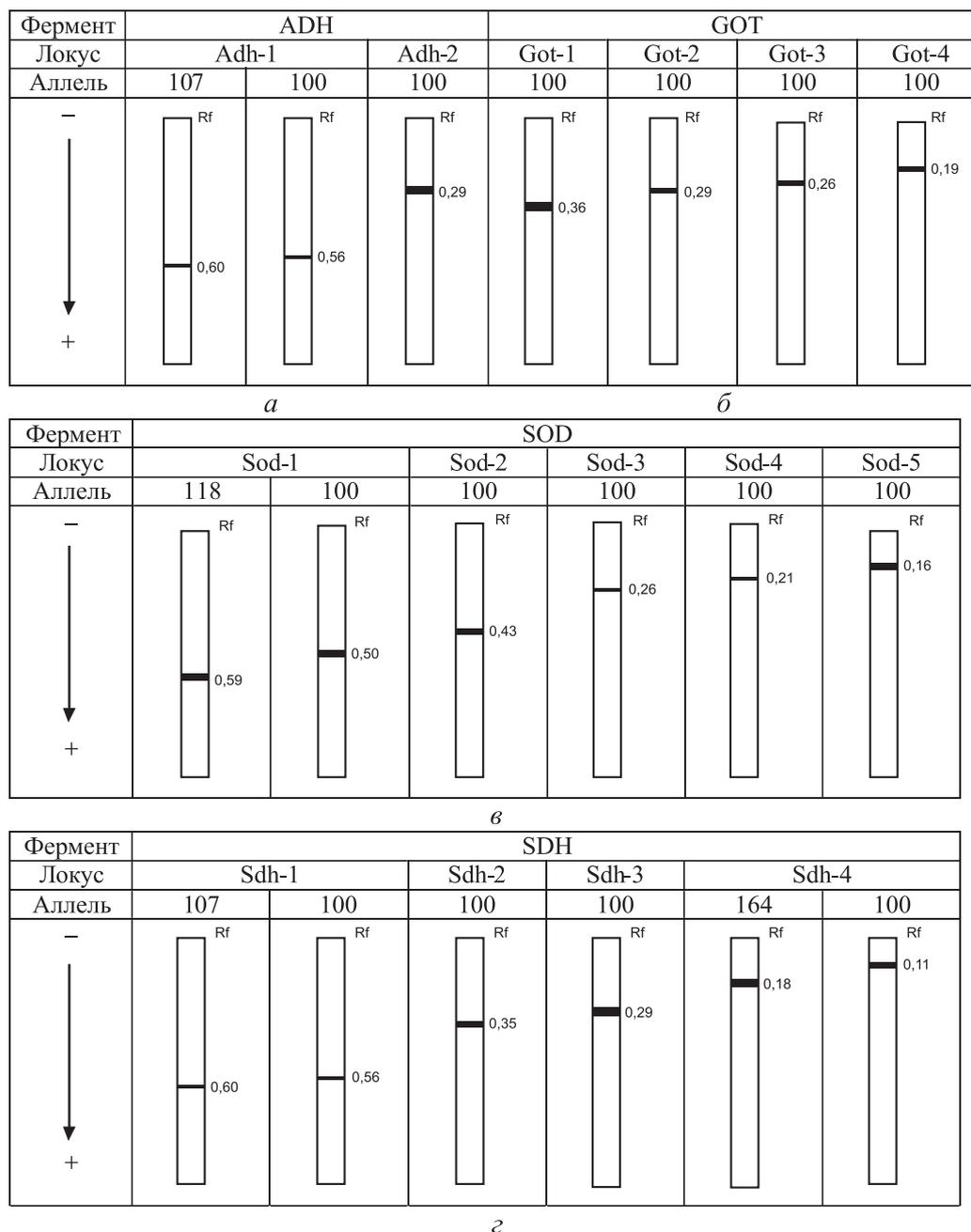


Рис. Схематическое изображение аллельных вариантов ген-ферментных локусов *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray:

a – алкогольдегидрогеназы; *б* – глутаматоксалоацетаттрансаминазы; *в* – супероксиддисмутазы; *г* – сорбитолдегидрогеназы (Rf – относительная электрофоретическая подвижность).

Алкогольдегидрогеназа (ADH, 1.1.1.1), глутаматдегидрогеназа (GDH, 1.4.1.2) и α -глицерофосфатдегидрогеназа (GPDH, 1.1.1.8). Данные дегидрогеназы были нами объединены по причине того, что на электрофореграммах они проявлялись в одних зонах и с равной интенсивностью. Это позволило предположить, что в данном случае работают одни и те же ферменты, которые имеют слабую субстратную специфичность. Поэтому нами было отмечено всего два ген-ферментных локуса Adh-1 и Adh-2 (для других ферментных систем соответственно: Gdh-1, Gdh-2 и Gpdh-1, Gpdh-2), из которых локус Adh-1 имеет 2 аллеля (Adh-1¹⁰⁰, Adh-1¹⁰⁷). Так же следует отметить, что все изученные дегидрогеназы характеризуются достаточно быстрой потерей своей активности, по сравнению с другими ферментными системами, особенно контролируемая локусом Adh-1.

Поэтому для более качественного проявления данных ферментных систем у культур *S. hirsutum*, мы рекомендуем максимально сократить время от экстракции ферментов до их проявления. Локус Adh-2 был мономорфен и показал 100% присутствие у исследуемых монокариотических культур, что дает возможность использовать его в качестве маркера.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, 2.6.1.1). Электрофоретический спектр данного фермента представлен четырьмя зонами активности, кодируемыми четырьмя локусами Got-1, Got-2, Got-3, Got-4. Каждый из представленных локусов был мономорфен.

Супероксиддисмутаза (SOD, 1.15.1.1). Гистохимическое окрашивание гелевых пластинок позволило выявить шесть хорошо фиксируемых зон активности фермента, кодируемых пятью локусами. Локус Sod-1 оказался диаллельным, причем Sod-1¹⁰⁰ фиксировался практически у 100% исследуемого дикариотического материала, а Sod-1¹¹⁸ был крайне редким. Во всех моно- и дикариотических образцах присутствовал локус Sod-4, что также делает его перспективным в качестве возможного маркера.

Сорбитолдегидрогеназа (SDH, 1.1.1.14). Данная ферментная система имеет ряд особенностей в отличие от ранее описанных дегидрогеназ. На электрофореграммах отмечено шесть зон активности, которые кодируются четырьмя локусами. Диаллельный локус Sdh-1 и локус Sdh-3 являются общими для всех дегидрогеназ (как отмечалось ранее, синтезируемый фермент имеет слабую субстратную специфичность), а ферменты, контролируемые локусами Sdh-2 и Sdh-4, строго специфичны по субстрату. Две наиболее интенсивно окрашенные зоны соответствуют локусам Sdh-3 и Sdh-4. Локус Sdh-2 является мономорфным и достаточно редким.

Выводы

Таким образом, для гриба *S. hirsutum* проведен аллозимный анализ шести ферментных систем, который позволил нам установить пятнадцать ген-ферментных локусов. 73% из них оказались мономорфными, а 20% – константно фиксировались у культур вне зависимости от ядерного статуса. Полученные нами данные позволят в дальнейшем более полно исследовать генетическую структуру и дифференциацию природных популяций *S. hirsutum*.

1. Айала Ф. Введение в популяционную генетику / Ф. Айала. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
2. Билай В.И. Основы общей микологии / В.И. Билай. – К.: Виц. шк., 1980. – 360 с.
3. Бойко С.М. Різноманітність внутрішньоклітинних ферментних систем *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray (*Basidiomycetes*) на території Донецької області // Укр. ботан. журн. – 2012. – Т. 69, № 2. – С. 286–291.
4. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
5. Корочкин Л.И. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. – М.: Наука. – 1977. – 275 с.
6. Лессо Т. Грибы: Определитель / Т. Лессо. – М.: ООО «Издательство АСТ», 2003. – 304 с.
7. Abesha E. Population genetics and spatial structure of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* in a Norwegian sand dune ecosystem / E. Abesha, G. Caetano-Anollers // Mycologia. – 2003. – Vol. 95, № 6. – P. 1021–1031.
8. Grigoriev I.V. Fueling the future with fungal genomics / I.V. Grigoriev, D. Cullen, S. Goodwin et al. // Mycology. – 2011. – Vol. 2, №3. – P. 192–209.

9. *Heilmann-Clausen J.* Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species / J. Heilmann-Clausen, L. Boddy // *Microbial ecology*. – 2005. – Vol. 49. – P. 399–406.
10. *Kausserud H.* Regional and local population structure of the pioneer wood-decay fungus *Trichaptum abietinum* / H. Kausserud, T. Schumacher // *Mycologia*. – 2003. – Vol. 95, №3. – P. 416–425.
11. *Klaassen C.H.W.* *Aspergillus* strain typing in the genomics era / C.H.W. Klaassen, N. Oshero // *Studies in Mycology*. – 2007. – Vol. 59. – P. 47–51.
12. *Pollastro S.* Usage of molecular markers (PCR-RAPD) for studying genetic variability in *Phellinus (Fomitiporia) sp.* / S. Pollastro, A. Abbatecola, C. Dongiovanni, F. Faretra // *Phytopathol. Mediterr.* – 2000. – Vol. 39. – P. 107–111.
13. *Shafiquzzaman S.* Allozyme variations of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications / Shafiquzzaman Siddiquee, Faridah Abdullah, Tan Soon Guan, Leng Min See // *Aust. J. of Basic and Appl. Sci.* – 2007. – Vol. 1, № 1. – P. 30–37.
14. *Urbanelli S.* Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Que'l and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Que'l / S. Urbanelli, V. Della Rosa, C. Fanelli, A. Fabbri, M. Reverberi // *Heredity*. – 2003. – Vol. 90. – P. 253–259.

Донецкий национальный университет

Получено 24.09.2012

УДК 575.113:582.284

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АЛЛОЗИМОВ У *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY
(BASIDIOMYCETES)

С.М. Бойко

Донецкий национальный университет

Изучен генетический контроль шести ферментных систем у сапротрофного гриба *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray. Установлено пятнадцать ген-ферментных локусов, из которых 73% – мономорфные. Отмечена перспективность локусов Adh-2, Sod-4 и Sdh-3 в качестве молекулярных маркеров. Наибольшее изоферментное разнообразие отмечено для ферментных систем супероксиддисмутазы и сорбитолдегидрогеназы.

UDC 575.113:582.284

GENETIC CONTROL OF ALLOZYMES OF THE *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY
(BASIDIOMYCETES)

S.M. Boiko

Donetsk National University

Genetic control of six enzyme systems in *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray, a saprotrophic fungus, has been studied. Fifteen gene-enzyme loci have been identified, 73 % which were monomorphic. Perspectiveness of loci Adh-2, Sod-4 and Sdh-3 as molecular markers was determined. The highest isoenzyme variety was noted for enzyme systems of superoxide dismutase and sorbitol dehydrogenase.