

АЛЛОЗИМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ У МОНО- И ДИКАРИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (BASIDIOMYCETES)

С.М. БОЙКО

Донецкий национальный университет
E-mail: bsm73@ukr.net

Изучен аллозимный полиморфизм ряда ферментных систем у моно- и дикариотических культур гриба Schizophyllum commune Fr., которые получены из базидиокарпов, отобранных в Ивано-Франковской, Черниговской, Донецкой областях Украины и АР Крым. В результате обнаружено 16 аллельных вариантов семи ген-ферментных локусов. Перспективность использования в популяционно-генетических исследованиях гриба продемонстрирована для локусов Amy-2, Got, Asp, Sod и Est-1.

Key words: *Schizophyllum commune*, *Basidiomycetes*, *co-dominant*, *gene-enzyme loci*.

Введение. Современное развитие микологии требует знаний, которые отражают генетические особенности изучаемых объектов. Эта информация позволит понять процессы, протекающие внутри популяций, решать вопросы филогении, выявлять генетические маркеры видов, а также представляет определенный интерес для биотехнологии грибов [1–4]. Одним из подходов, применяемых для решения подобных задач, является электрофоретический анализ изоферментов. Упомянутый метод отличает относительная простота анализа и воспроизводимость получаемых результатов.

Базидиальный гриб *Schizophyllum commune* Fr. регулярно привлекает к себе внимание ученых [5–9]. Благодаря своим морфофизиологическим особенностям и систематическому положению вид часто используют как модельный объект при различных исследованиях [8, 10–13]. Для использования изоферментов в качестве молекулярно-генетических маркеров в генетических исследованиях необходимо иметь информацию о характере их наследования. Например, кодоминантный тип наследования маркеров позволит достаточно легко изучать генетические особенности гриба, основываясь на сегрегации признаков (аллозимов). Согласно литературным источникам основная часть гене-

тического материала «клеток» грибов реализуется именно кодоминантно [13, 15–17]. Подобная информация для *Sch. commune* отсутствует, поэтому целью нашего исследования было установить особенности реализации аллозимов у этого объекта.

Материалы и методы. Объектом исследования были ди- и монокариотические культуры *Sch. commune*. Дикариотические культуры получены из базидиокарпа грибов, собранных в Ивано-Франковской, Черниговской, Донецкой областях Украины и АР Крым.

Выделение чистых дикариотических культур осуществляли следующим образом: предварительно очищенное плодовое тело гриба разрезали на фрагменты 3 × 3 мм, которые стерильным микологическим крючком переносили в 8%-ный раствор H₂O₂ и выдерживали 1–2 мин. Обработанный фрагмент помещали в пробирку с картофельным агаром, а после появления чистого грибного мицелия проводили повторный пересев на чистые питательные среды [18].

Получение монокариотических культур осуществляли методом споровых отпечатков. Однородную водную суспензию базидиоспор, полученных из смыва споровых отпечатков, после многократного разведения высевали глубинно в чашки Петри на агаризованной среде [19]. Чистоту и принадлежность к моноспоровым культурам контролировали при помощи микроскопии. Общее число дикариотических культур составило 38, а моноспоровых, полученных из базидиокарпов, более 160. Изоляты культивировали на жидкой глюкозо-пептонной среде в течение 15–18 сут в термостате ТС-80М при температуре 28 °С [20]. Начальная кислотность питательной среды составляла pH 5,0.

Мицелий грибов промывали и высушивали при помощи вакуумной фильтрации, далее гомогенизировали в трис-цитратной буферной системе и фильтровали. Количество внесенного



Рис. 1. Электрофореграмма аллозимов α -амилазы *Schizophyllum commune* Fr.: 1 – исходная дикариотическая культура; 2–10 – монокариотические культуры, полученные методом спорных отпечатков от исходной дикариотической культуры

белка в каждую лунку колебалось в пределах 40–60 мкг. Электрофоретическое разделение внутриклеточных белков осуществляли в 7,5 и 11,25 % полиакриламидном геле с использованием трис-глициновой буферной системы (рН 8,3). Гистохимическое проявление зон активности осуществляли для следующих ферментных систем: глутаматдегидрогеназа (GDH) (КФ 1.4.1.2), супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) (КФ 2.6.1.1), эстераза (EST) (КФ 3.1.1.1), кислая фосфатаза (АСР) (КФ 3.1.3.2), α -амилаза (АМУ) (КФ 3.2.1.1) [21, 22]. Генетический контроль выявленных электрофоретических вариантов ферментов изучали методом анализа их сегрегации среди монокариотических культур. В соответствии с менделевскими закономерностями при моногенном наследовании признака, гетерозиготного по какому-либо локусу, аллельные варианты (в нашем случае аллозимы)

Таблица 1. Сегрегация аллозимов у культур *Schizophyllum commune* Fr.

Генотип	Количество культур	Соотношение аллелей	Критерий χ^2
Got ^{82/100}	5	23 : 26	0,49
Got ^{91/100}	6	31 : 24	0,89
Got ^{91/109}	3	12 : 18	1,20
Amy-2 ^{95/100}	5	20 : 28	1,33
Amy-2 ^{95/106}	2	7 : 10	0,53
Amy-2 ^{95/110}	2	15 : 7	2,90
Amy-2 ^{100/106}	3	11 : 19	2,13
Amy-2 ^{100/110}	3	13 : 18	0,81
Asp ^{118/108}	2	7 : 11	0,89
Asp ^{118/100}	2	11 : 6	1,47
Asp ^{108/100}	4	15 : 23	1,68

сегрегируют в соотношении 1:1. Степень соответствия наблюдаемых соотношений аллозимов ожидаемым оценивали с помощью критерия χ^2 [23].

Результаты исследования и их обсуждение.

Полученные данные позволили установить, что часть выявленных аллозимов может быть использована при проведении популяционно-генетических исследований *Sch. commune*. Несмотря на дикариотический статус гриба, некоторые из изоферментов не продемонстрировали кодоминантного наследования. В то же время из представленных в табл. 1 данных видно, что ни у одного из идентифицированных полиморфных локусов не наблюдалось достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1.

α -Амилаза (АМУ). На гелях изоферменты АМУ представлены двумя (иногда тремя) зонами активности, которые, вероятно, кодируются двумя локусами – *Amy-1* и *Amy-2* (рис. 1). Локус *Amy-1* имел два аллеля, а локус *Amy-2* представлен четырьмя аллозимными вариантами (табл. 2).

Локус *Amy-1* зачастую не проявлялся у «родительского» дикариотического мицелия и, наоборот, мог интенсивно визуализироваться у монокариотических культур (рис. 1), поэтому в дальнейших исследованиях его использовать не рекомендуется. Локус *Amy-2* на гелевых пластинах проявлялся довольно четко и стабильно (рис. 1), что делает его перспективным для дальнейшего использования в популяционно-генетических исследованиях *Sch. commune*.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT). При гистохимическом окрашивании геля выявлено различное количество зон активности фермента. Исследуя распределение этого признака у монокариотического потомства, удалось установить присутствие четырех аллелей, кодируемых одним локусом. Аллели *Got⁸²*, *Got¹⁰⁰*, *Got¹⁰⁹* на электрофореграммах представлены двухполосными вариантами фермента, аллель *Got⁹¹* – однополосным (рис. 2). Аллель *Got¹⁰⁹* оказался достаточно редким, частота его встречаемости составила 0,08.

Глутаматдегидрогеназа (GDH). Ряд дегидрогеназ, исследуемых нами у представителей *Sch. commune* [24], объединяет высокая начальная активность у свежевнесенного в гель материала и быстрая ее потеря по истечении времени.

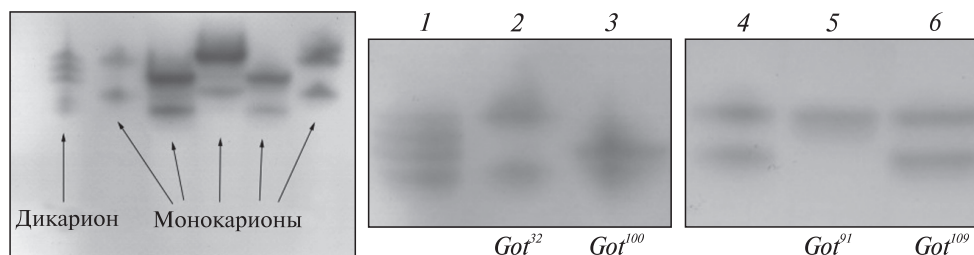


Рис. 2. Электрофореграмма аллозимов глутаматоксалоацетаттрансаминазы дикариотической (1, 4) и монокариотической (2, 3, 5, 6) культур *Schizophyllum commune* Fr.

Приведенный факт значительно затрудняет работу с этой группой ферментов, поскольку достаточно сложно подобрать количество внесимого материала без риска получения избыточной концентрации белка в полиакриламидном геле или потери определенных зон активности фермента как результат его недостатка. Проведенные исследования позволили установить наличие у всех изученных культур мультиморфного локуса *Gdh*, который визуализируется на гелевых пластинках в виде двух и более полос активности фермента (рис. 3). Хотя не исключено, что это могут быть два тесно сцепленных локуса, однако имеющих на сегодняшний день данных пока недостаточно, чтобы подтвердить или опровергнуть высказанное предположение.

Кислая фосфатаза (ACP). Зона активности этого фермента контролируется локусом *Acp*, изменчивость которого определяется тремя аллелями — *Acp*¹⁰⁰, *Acp*¹⁰⁸ и *Acp*¹¹⁸ (табл. 2, рис. 4). Исследование сегрегации признаков позволило установить их моногенное наследование, а сравнение между культурами — кодоминантную реализацию. Незначительные затруднения при интерпретации данных могут представлять близкое расположение аллельных вариантов и высокая ферментная активность кислой фосфатазы. В работе Lilly et al. [25] приводится информация, которая подтверждает полученные нами данные: при изучении изоферментов кислой фосфатазы на стадии дикариона установлен сходный профиль этого фермента.

Супероксиддисмутаза (SOD). Вне зависимости от ядерного статуса «клетки» SOD проявляется в виде пяти зон активности фермента, кодируемых, как мы предполагаем, одним локусом с единственным аллелем — *Sod*¹⁰⁰ (рис. 5).

Таблица 2. Ферменты, локусы и аллели с их подвижностями *Schizophyllum commune* Fr.

Локусы	Аллели	Rf
<i>α-Амилаза (AMY)</i>		
Amy-1	105	0,78
	100	0,74
Amy-2	110	0,45
	106	0,43
	100	0,41
	95	0,39
<i>Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT)</i>		
Got	109	0,36
		0,30
	100	0,33
		0,30
	91	0,30
	82	0,33
		0,27
<i>Глутаматдегидрогеназа (GDH)</i>		
Gdh	100	0,32
		0,28
<i>Кислая фосфатаза (ACP)</i>		
Acp	118	0,46
	108	0,42
	100	0,42
		0,39
		0,36
<i>Супероксиддисмутаза (SOD)</i>		
Sod	100	0,28
		0,25
		0,22
		0,18
		0,15
<i>Эстераза (EST)</i>		
Est	100	0,98

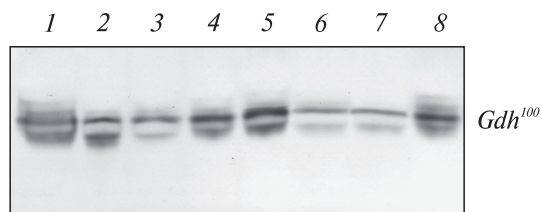


Рис. 3. Электрофореграмма аллозимов глутамат-дегидрогеназы дикариотической (1) и монокариотической (2–8) культур *Schizophyllum commune* Fr.

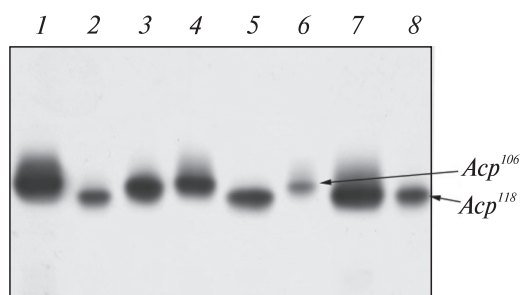


Рис. 4. Электрофореграмма аллозимов кислотной фосфатазы дикариотической (1) и монокариотической (2–8) культур *Schizophyllum commune* Fr.

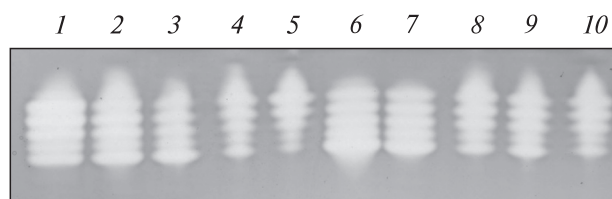


Рис. 5. Электрофореграмма аллозимов супероксид-дисмутазы *Schizophyllum commune* Fr.: 1 – исходная дикариотическая культура; 2–10 – монокариотические культуры, полученные методом споровых отпечатков от исходной дикариотической культуры

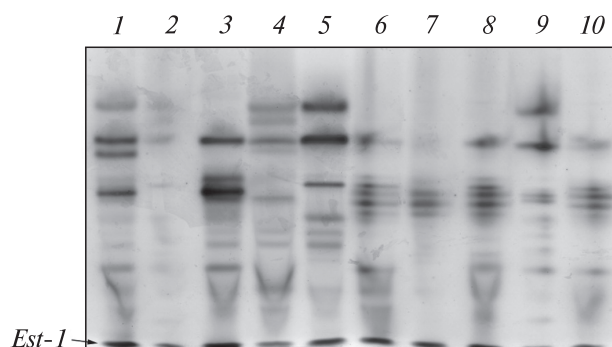


Рис. 6. Электрофореграмма изоферментов эстеразы *Schizophyllum commune* Fr.: 1 – дикариотическая культура, 2–10 – монокариотические культуры

Не исключено, что может идти речь и о пяти тесно сцепленных локусах по аналогии с ферментом GDH. Локус визуализируется на гелях, начиная с самого молодого возраста мицелия [20], присутствует у всех изученных культур и имеет своеобразный «профиль» зон активности. Все это указывает на возможность использования ферментной системы SOD как молекулярного маркера вида.

Эстераза (EST). Указанная ферментная система оказалась наиболее сложной в интерпретации. Исследование сегрегации «родительских» признаков у монокариотических культур позволило выделить высокоподвижную изоформу, кодируемую локусом *Est-1* (рис. 6). Изофермент двигался практически вровень с фронтом красителя (бромфеноловый синий) и имел молекулярную массу в районе 10 кДа. Большая часть изоферментов EST в силу разных причин (быстрая потеря активности фермента, недостаточная их концентрация, посттрансляционная модификация и др.) не показала моногенного наследования и кодоминантный характер реализации признака. Все это делает проблематичным использование изоферментов EST в дальнейших популяционно-генетических исследованиях гриба.

James et al. [8] при изучении генетической структуры *Sch. commune* с использованием 11 ферментных систем установили высокий уровень полиморфизма, составивший в среднем пять аллелей на локус. В наших исследованиях этот уровень оказался ниже – 2,7, что по-видимому, связано с меньшей выборкой и количеством использованных ферментных систем, а также полностью иным качественным составом изоферментов. В то же время полученные нами данные расширяют набор аллозимов, пригодных для популяционно-генетических исследований гриба.

Таким образом, при изучении шести ферментных систем у *Sch. commune* обнаружено 16 аллельных вариантов, находящихся, возможно, под контролем семи ген-ферментных локусов. Для популяционно-генетических исследований рекомендуется использовать локусы *Amy-2*, *Got* и *Acp*, выявившие полиморфность, а мономорфные локусы *Sod* и *Est-1*, проявляющиеся в 100 % случаев, могут служить молекулярными маркерами вида.

ALLOZYME POLYMORPHISM
IN MONO- AND DIKARYOTIC CULTURES
OF FUNGUS *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR.
(*BASIDIOMYCETES*)

S.M. Boiko

Donetsk National University
E-mail: bsm73@ukr.net

Allozyme polymorphism of a number of enzyme systems in mono- and dikaryotic cultures of the fungus *Schizophyllum commune* Fr. from basidiocarp selected in Ivano-Frankivsk, Chernihiv, Donetsk regions of Ukraine and Crimea was studied. As a result 16 alleles of 7 gene-enzyme loci were found. The loci *Amy-2*, *Got*, *Acp*, *Sod* and *Est-1* are considered perspective for use in the population genetic studies of the fungus.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pawlik A., Janusz G., Koszerny J. et al. Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism // Curr. Microbiol. – 2012. – **65**. – P. 438–445.
2. Kredics L., Láday M., Körmöczy P. et al. Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the Great Hungarian Plain // Acta Biol. Szeg. – 2012. – **56**, № 2. – P. 141–149.
3. Banik M.T., Lindner D.L., Ortiz-Santana B., Lodge D.J. A new species of *Laetiporus* (Basidiomycota, Polyporales) from the Caribbean basin // Tomo. – 2012. – **37**, № 1. – P. 15–21.
4. Uehling J.K., Henkel T.W., Aime M.C. et al. New species of *Clavulina* (Cantharellales, Basidiomycota) with resupinate and effused basidiomata from the Guiana Shield // Mycologia. – 2012. – **104**, № 2. – P. 547–556.
5. Белова Н.В., Ефремова И.Я. Препараты из высших базидиальных грибов – объект патентно-правовой охраны // Микология и фитопатология. – 1992. – **26**, № 4. – С. 321–324.
6. Guettler S., Jackson E.N., Lucchese S.A. et al. ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media // Fungal Genet. Biol. – 2003. – **39**, № 2. – P. 191–198.
7. Smith J.E., Sullivan R., Rowan N. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs : Current perspectives (Review) // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – **5**. – P. 217–234.
8. James T.Y., Porter D., Hamrick J.L., Vilgalys R. Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom *Schizophyllum commune* // Evolution. – 1999. – **53**. – P. 1665–1677.
9. 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.
10. Wösten H.A., Wessels J.G. The emergence of fruiting bodies in basidiomycetes // The Mycota. Part I. Growth, differentiation and sexuality. – Berlin : Springer, 2006. – P. 393–414.
11. Ohm R.A., Jong J.F., Lugones L.G. et al. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune* // Nature Biotechnol. – 2010. – **28**, № 9. – P. 957–963.
12. Raper C.A. *Schizophyllum commune*, a model for genetic studies of the Basidiomycotina // Genetics of Plant Pathogenic Fungi / Ed. G.S. Sidhu. – London : Acad. press, 1988. – P. 511–522.
13. Kothe E., Gola S., Wendland J. Evolution of multispecific mating-type alleles for pheromone perception in the homobasidiomycete fungi // Curr. Genet. – 2003. – **42**. – P. 268–275.
14. Douhan G.W., Vincenot L., Gryta H., Selosse M.-A. Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions // Fungal Biol. – 2001. – **115**. – P. 569–597.
15. Linde D.C., Groth J.V., Roelfs A.P. The genetic basis of isozyme variation in the bean rust fungus (*Uromyces appendiculatus*) // J. Hered. – 1990. – **81**. – P. 134–138.
16. Siddiquee S., Abdullah F., Tan Soon G., Rohaza E. Level in allozyme variations of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications // Res. J. Microbiol. – 2007. – **2**, № 10. – P. 717–726.
17. Shnyreva A.V., Belokon Yu.S., Belokon M.M., Altukhov Yu.P. Interspecific genetic variability of the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* as revealed by allozyme gene analysis // Rus. J. Genet. – 2004. – **40**, № 8. – P. 871–881.
18. Билай В.И. Основы общей микологии. – Киев : Вища шк., 1980. – 360 с.
19. Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. Методы экспериментальной микологии. – Киев : Наук. думка, 1982. – 550 с.
20. Бойко С.М. Зміна ізоферментного складу культури гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) залежно від віку міцелію // Укр. бот. журн. – 2011. – **68**, № 4. – С. 598–603.
21. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
22. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press, 2003. – 553 p.
23. Айала Ф. Введение в популяционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
24. Boiko S.M. Polymorphism of intracellular isoenzymes of *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) in the Donetsk region // Cytology and Genetics. – 2011. – **45**, № 6. – P. 343–346.
25. Lilly W.W., Charvat I. Activities and isozymes of acid phosphatase in *Schizophyllum commune*: a re-examination // Mycologia. – 1987. – **79**, № 2. – P. 314–319.

Поступила 11.04.13