

С.М. Бойко

**ПОЛИМОРФИЗМ АЛЛОЗИМОВ *TRICHAPTUM ABIETINUM* (J. DICKS.)  
RYVARDEN (*BASIDIOMYCETES*) НА ТЕРРИТОРИИ КАРПАТСКОГО  
НАЦИОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКА***Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvardeen, аллозимы, локус, монокариотическая культура**Введение**

Популяционные исследования грибов являются непростой задачей в силу высокой изменчивости морфологических признаков, зачастую сильно зависящих от субстрата и условий произрастания, короткого срока существования плодового тела, необходимости дорогостоящих мощных оптических приборов [4, 9, 19]. Использование различных молекулярных маркеров позволяет унифицировать и значительно интенсифицировать исследовательскую работу в этом направлении, а также провести оценку состояния генетических ресурсов грибов [7, 8, 14]. Одним из таких маркеров являются моногенно наследуемые изоферменты гриба [10, 18].

*Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvardeen – космополит, относящийся к дереворазрушающим грибам, преимущественно поселяющимся на древесине хвойных пород [6, 11]. Является одним из самых распространенных грибов Европы [17]. Немногочисленные известные работы посвящены изучению структуры популяций вида с применением ДНК–маркеров (для северных регионов Восточного полушария) и сравнению участков рибосомальной ДНК у единичных представителей разных популяций [12, 13, 15]. Исследования, в которых бы изучалась структура популяций и их генетическая дифференциация *T. abietinum*, на территории Украины не проводились.

**Цель исследований**

Цель работы – изучить полиморфизм аллозимов у гриба *Trichaptum abietinum*, произрастающего на территории Карпатского национального природного парка (НПП).

**Объекты и методика исследований**

Объектом исследований были ди- и монокариотические культуры *T. abietinum*. Дикариотические культуры были получены из плодовых тел грибов, произрастающих на территории Карпатского НПП. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и выдерживали 1–2 мин [2]. Обработанный фрагмент переносили в пробирку с картофельным агаром. После появления чистого грибного мицелия его часть 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 агаризированную среду [5]. Чистоту и принадлежность к моноспоровым культурам контролировали при помощи микроскопии. Общее число монокариотических культур составило 84.

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), сорбитолдегидрогеназа (SDH) (КФ 1.1.1.14), пероксидаза (POX) (КФ 1.11.1.7), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) (КФ 2.6.1.1), эстераза (EST) (КФ 3.1.1.1), кислая фосфатаза (ACP) (КФ 3.1.3.2) [16]. Генетический контроль выявленных электрофоретических вариантов ферментов изучали методом анализа их сегрегации среди монокариотических культур, полученных с каждой дикариотической культуры. Степень соответствия наблюдаемых соотношений аллозимов ожидаемым оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  [1].

### Результаты исследований и их обсуждение

Анализ внутриклеточных ферментных систем моно- и дикариотических культур *T. abietinum* позволил выявить восемь ген-ферментных локусов (табл.). Соотношение наблюдаемого и ожидаемого распределения аллозимов у монокариотических культур соответствовало распределению 1:1 ( $P < 0,05$ ).

Таблица. Ферменты, локусы и аллели с их подвижностями *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvarden

| Ферментная система                                   | Локусы      | Аллели | Rf<br>(относительная электрофоретическая подвижность) |
|--|-------------|--------|---|
| Глутаматоксалоацетаттрансаминаза GOT<br>(КФ 2.6.1.1) | <i>Got</i>  | 100    | 0,23  |
|  |             | 122    | 0,28  |
| Алкогольдегидрогеназа<br>ADH (КФ 1.1.1.1)            | <i>Adh1</i> | 91     | 0,60  |
|  |             | 100    | 0,66  |
|  | <i>Adh2</i> | 100    | 0,31  |
|  |             |        | 0,35  |
| Сорбитолдегидрогеназа<br>SDH (КФ 1.1.1.14)           | <i>Sdh1</i> | 91     | 0,60  |
|  |             | 100    | 0,66  |
|  | <i>Sdh2</i> | 100    | 0,31  |
|  |             |        | 0,35  |
| Эстераза<br>EST (КФ 3.1.1.1)                         | <i>Est</i>  | 100    | 0,63  |
|  |             | 111    | 0,70  |
| Кислая фосфатаза<br>ACP (КФ 3.1.3.2)                 | <i>Acp</i>  | 100    | 0,19  |
|  |             |        | 0,33  |
|  |             | 137    | 0,26  |
| Пероксидаза<br>POX (КФ 1.11.1.7)                     | <i>Pox</i>  |        | 0,37  |
|  |             | 100    | 0,40  |
|  |             |        | 0,40  |
|  |             | 116    | 0,43  |

Алкогольдегидрогеназа (ADH, 1.1.1.1) и сорбитолдегидрогеназа (SDH, 1.1.1.14) на электрофореграммах имели одни и те же паттерны, что может свидетельствовать о низкой субстратной специфичности данной группы дегидрогеназ. Было установлено, что за их визуализацию отвечают по два локуса, причем локус *Adh1* (аналогично *Sdh1*) имел 2 аллеля, а локус *Adh2* (аналогично *Sdh2*) кодировал двухполосный вариант фермента (рис.1).

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT, 2.6.1.1) представлена единичным локусом, имеющим два аллеля *Got*<sup>100</sup> и *Got*<sup>122</sup>. У дикариотических культур, несущих два разных аллеля, проявляется три зоны активности фермента, что говорит о его димерной структуре (рис.2).

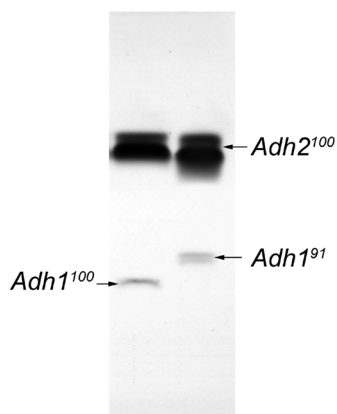


Рис. 1. Электрофореграмма аллозимов алкогольдегидрогеназы монокариотических культур *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvarden

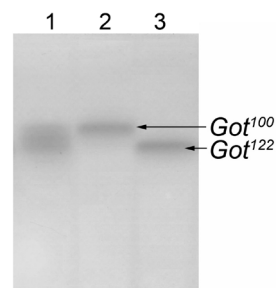


Рис. 2. Электрофореграмма аллозимов глутаматоксалоацетаттрансаминазы дикариотической (1) и монокариотических (2, 3) культур *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvarden

Кислая фосфатаза (АСР, 3.1.3.2) и пероксидаза (РОХ, 1.11.1.7) кодировались двумя аллелями каждый (*Acp*<sup>100</sup>, *Acp*<sup>137</sup> и *Pox*<sup>100</sup> и *Pox*<sup>116</sup> соответственно), которые проявлялись двухполосными вариантами (рис. 3 а, б).

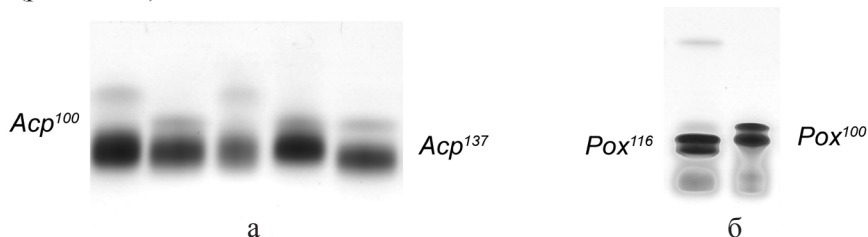


Рис. 3. Электрофореграмма аллозимов кислой фосфатазы (а) и пероксидазы (б) монокариотических культур *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvarden

Эстераза (EST, 3.1.1.1) у *T. abietinum* не показала большого разнообразия, которое наблюдается для некоторых представителей *Basidiomycetes* [3, 10]. Установлено, что фермент кодируется одним локусом, имеющим два аллеля – *Est*<sup>100</sup> и *Est*<sup>111</sup>. Как и в случае с GOT, у дикариотической культуры, несущей оба аллеля, наблюдается три паттерна, что свидетельствует о димерном строении новообразовавшейся зоны (рис.4).

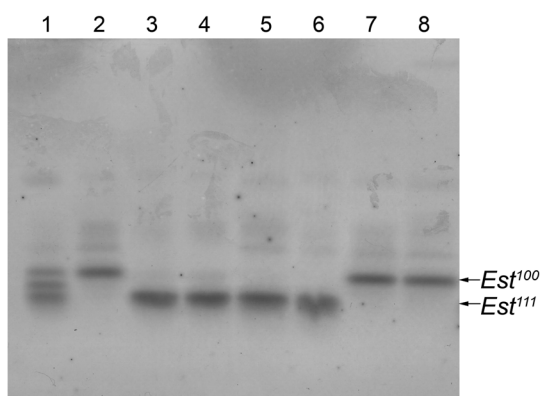


Рис. 4. Электрофореграмма аллозимов эстеразы дикариотической (1) и монокариотических (2-8) культур *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvarden

### Выводы

Проведенный аллозимный анализ шести ферментных систем гриба *T. abietinum* позволил нам установить наличие восьми ген-ферментных локусов. Локусы ферментных систем пероксидазы, алкогольдегидрогеназы, сорбитолдегидрогеназы и кислой фосфатазы визуализировались двухполосными паттернами. Полученные данные позволят в дальнейшем изучать генетическую структуру и дифференциацию природных популяций *T. abietinum* на территории Украины.

1. **Айала Ф.** Введение в популяционную генетику / Ф. Айала. – М.: Мир, 1984. – 230 с.  
**Ayala, F.**, Introduction to Population Genetics, New York: Wiley, 1984.
2. **Билай В.И.** Основы общей микологии / В.И. Билай. – К.: Вищ. шк., 1980. – 360 с.  
**Bilal, V.I.**, *Osnovy obshchei mikologii* (Fundamentals of General Mycology), Kiev: Vysshaya shkola, 1980.
3. **Бойко С.М.** Різноманітність внутрішньоклітинних ферментних систем природних штамів *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray (*Basidiomycetes*) на території Донецької області // Укр. ботан. журн. – 2012. – 69, №2. – С. 286–291.  
**Boiko, S.M.**, Diversity of the Intracellular Natural Enzyme Systems in Natural Strains of *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray (Basidiomycetes) in the Donetsk Region, *Ukr. Botan. Zhurn.* (Ukr. Bot. Journal), 2012, vol. 69, no 2, pp. 286–291.
4. **Бухало А.С.** Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / [А.С. Бухало, В.Г. Бабицкая, Н.А. Бисько и др.; Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера]. – Киев: Альтерпрес, 2011. – 212 с.  
**Bukhalo, A.S.**, Babitskaya, V.G., and Bisko, N.A., Biological Features of Medicinal Macromycetes in Culture: Collection of Scientific Works in Two Volumes, vol. 1, Vasser, S.P., Ed., Kiev: Alterpres, 2011.
5. **Дудка И.А.** Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.  
**Dudka, I.A.**, Vasser, S.P., and Ellanskaya, I.A., *Metody eksperimentalnoi mikologii* (Methods of Experimental Mycology), Kiev: Naukova Dumka, 1982.
6. **Лессо Т.** Грибы: Определитель / Т. Лессо. – М.: ООО «Издательство АСТ», 2003. – 304 с.  
**Lesso, T.**, *Griby: Opredelitel* (Fungi: A Key), Moscow: ООО “Izdatelstvo AST”, 2003.
7. **Шнырева А.В.** Геносистематика и проблема вида у грибов: подходы и решения // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, №1. – С. 209–220.  
**Shnyreva, A.V.**, Genosystematics and a Problem of the Species in Fungi: Approaches and Solutions, *Mikologiya i fitopatologiya* (Mycology and Phytopathology), 2011, vol. 45, no.1, pp. 209–220.
8. **Abesha, E.**, and Caetano-Anollers, G., Population Genetics and Spatial Structure of the Fairy Ring Fungus *Marasmius oreades* in a Norwegian Sand Dune Ecosystem, *Mycologia*, 2003, vol. 95, no. 6, pp. 1021–1031.
9. **Anusha, N.C.**, Umikalsom, M.S., Ling, T.C. and Ariff, A.B., Relationship Between Fungal Growth Morphologies and Ability to Secrete Lipase in Solid State Fermentation, *Asian Journal of Biotechnology*, 2012, vol. 4, pp. 15–29.
10. **Boiko, S.M.**, Polymorphism of Intracellular Isoenzymes of *Schizophyllum Commune* Fr. (Basidiomycetes) in the Donetsk Region, *Cytology and Genetics*, 2011, vol. 45, no. 6, pp. 343–346.
11. **Grand, L.F.**, Vernia, C.S. and Munster, M.J., Biogeography and Hosts of Poroid Wood Decay Fungi in North Carolina: Species of *Trametes* and *Trichaptum*, *Mycotaxon*, 2009. pp. 243–246.
12. **Kauserud, H.**, and Schumacher, T., Ribosomal DNA Variation, Recombination and Inheritance in the Basidiomycete *Trichaptum abietinum*: Implications for Reticulate Evolution, *Heredity*, 2003, vol. 91, pp. 163–172.
13. **Kauserud, H.**, and Schumacher, T., Regional and Local Population Structure of the Pioneer Wood-Decay Fungus *Trichaptum abietinum*, *Mycologia*, 2003, vol. 95, no. 3, pp. 416–425.
14. **Klaassen, C.H.W.**, and Osharov, N., Aspergillus Strain Typing in the Genomics Era, *Studies in Mycology*, 2007, vol. 59, pp. 47–51.
15. **Ko, K.S.**, and Jung, H.S., Three Nonorthologous ITS1 Types are Present in a Polypore Fungus *Trichaptum abietinum*, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, vol. 23, pp. 112–122.
16. **Manchenko, G.P.**, Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, CRC Press, 2003.
17. **Olofsson, D.**, Tickor i Sverige, Projektrapport, 1996.
18. **Shnyreva, A.V.**, Belokon, Yu.S., Belokon, M.M., and Altukhov, Yu.P., Interspecific Genetic Variability of the Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* as Revealed by Allozyme Gene Analysis, *Russian Journal of Genetics*, 2004, vol. 40, no. 8, pp. 871–881.
19. **Znidarsic, P.**, and Pavko, A., The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter, *Food Technol. Biotechnol.*, 2001, vol. 39, no. 3. pp. 237–252.

УДК 575.113:582.284

ПОЛІМОРФІЗМ АЛОЗИМІВ *TRICHAPTUM ABIETINUM* (J. DICKS.) RYVARDEN (*BASIDIOMYCETES*)  
НА ТЕРИТОРІЇ КАРПАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО ПРИРОДНОГО ПАРКУ

С.М. Бойко

Донецький національний університет

Популяційно-генетичні дослідження грибів є одним з основних напрямків у сучасній мікології. *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvardeen – космополіт, що відноситься до дереворуйнівних грибів, які переважно селяться на деревині хвойних порід. Дослідження зі структури популяцій *T. abietinum* на території України раніше не здійснювали. Проведений алозимний аналіз шести ферментних систем гриба *T. abietinum* дозволив установити наявність восьми ген-ферментних локусів. Локуси ферментних систем пероксидази, алкогольдегідрогенази, сорбітолдегідрогенази та кислотої фосфатази візуалізуються двосмуговими патернами. Отримані дані дозволять надалі вивчати генетичну структуру й диференціацію природних популяцій *T. abietinum* на території України.

UDC 575.113:582.284

POLYMORPHISM IN *TRICHAPTUM ABIETINUM* (J. DICKS.) RYVARDEN (*BASIDIOMYCETES*)  
ALLOZYMES IN THE CARPATHIAN NATIONAL NATURE PARK

S.M. Boiko

Donetsk National University

Population genetic research on fungi is one of the main trends in contemporary mycology. *Trichaptum abietinum* (J. Dicks.) Ryvardeen is a cosmopolite wood-decay fungus that colonizes mostly conifer wood. There have been no studies on the population structure of *T. abietinum* (J. Dicks.) Ryvardeen in Ukraine so far. Using allozyme analysis of six enzyme system of this fungus, we detected eight gene-enzyme loci. Loci of the enzyme systems of peroxidase, alcohol dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase and acid phosphatase are visualized as two-band patterns. The data obtained will facilitate further studies on genetic structure and differentiation in *Trichaptum abietinum* natural populations in Ukraine.