

С.М. БОЙКО

Донецький національний університет  
вул. Щорса, 46, м. Донецьк, 83050, Україна  
bsm73@ukr.net

## РІЗНОМАНІТНІСТЬ ВНУТРІШНЬО- КЛІТИННИХ ФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ ПРИРОДНИХ ШТАМІВ *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY (*BASIDIOMYCETES*) НА ТЕРИТОРІЇ ДОНЕЦЬКОЇ ОБЛАСТІ

*К л ю ч о в і с л о в а:* *Stereum hirsutum*, ферментна система,  
ізоферменти, електрофоретичний поділ білків

### Вступ

Актуальним питанням мікології сьогодення є дослідження генетичних особливостей представників різних груп грибів та з'ясування певних популяційних і міжпопуляційних взаємозв'язків (Linde et al., 1990; Otrosina et al., 1992; Siddiquee et al., 2007). У багатьох лабораторіях світу пріоритетно вивчають об'єкти, які мають практичне значення (May, Royle, 1982; Matsumoto et al., 1995; Штаер, 2006; Ravash et al., 2010). Гриби, що не дають комерційного зиску, а таких більшість, поступаються за темпами їхніх досліджень, хоча, враховуючи актуальність вивчення біорізноманіття, вони є не менш важливими для науковців (Rayner, 1982). Поширення, морфологічні та фізіологічні особливості сапротрофного гриба *Stereum hirsutum* (Willd.) Gray, що спричиняє білу гнилизну деревини, добре відомі (Леcco, 2003; Neilmann-Clausen, 2005; Palma, 2011). Посилена увага дослідників протягом останніх років до ядерно-генетичної системи гриба дала змогу з'ясувати деякі відмінності у взаємодії гетеро- та гомокаріонів і вивчити генетичні особливості штамів певної вибірки за допомогою RAPD маркерів (Coates, 1985; Yurchenko, 2010). Враховуючи існуючу інформацію та недоліки ПЛР методу з використанням RAPD маркерів, можна констатувати, що питання генетично-популяційного різноманіття *Stereum hirsutum* залишається відкритим. Ферментні системи є прямим відображенням поліморфізму генетичної інформації, а метод електрофоретичного поділу білків уможливило чітке та неупереджене дослідження (Остерман, 1981; Fukuda, 1991; Воіко, 2011). Наявність таких відомостей дасть змогу встановити видові особливості, що ідентифікуються за будь-яких умов, та контролювати процеси, які відбуваються на рівні популяцій. Саме тому метою нашого дослідження було визначення різноманітності ендoferментних систем гриба *Stereum hirsutum*.

### Об'єкти та методи досліджень

Об'єктом досліджень були дикаріотичні культури *S. hirsutum*, виділені з плодових тіл грибів, що зростали на деревних насадженнях на території Донецької обл. (таблиця).

© С.М. БОЙКО, 2012

## Походження зразків гриба *Stereum hirsutum* у межах Донецької обл.

№ зразка	Орієнтир розташування	Географічні координати		Субстрат
1	м. Макіївка	48°02,105'N	37°52,060'E	<i>Populus</i> sp.
2	м. Донецьк	47°59,802'N	37°48,466'E	<i>Armeniaca</i> sp.
3	м. Авдіївка	48°06,812'N	37°46,114'E	<i>Acer</i> sp.
4	м. Святогірськ	49°02,767'N	37°29,245'E	<i>Fraxinus</i> sp.
5	м. Торез	47°58,285'N	38°38,270'E	<i>Quercus</i> sp.
6	м. Торез	47°58,393'N	38°38,296'E	<i>Quercus</i> sp.

Чисту культуру гриба виділяли згідно із загальновідомими методами з використанням пероксиду водню і вирощували на картопляно-агаризованому середовищі в термостаті ТС-80М-2 за температури 26°C (Билай, 1982). Під час досліду брали рідке глюкозо-пептонне живильне середовище, яке розливали по 50 мл у колби Ерленмейера ємкістю 250 мл. Початковий рівень рН живильного середовища становив 5,0 одиниць. Культивування тривало 18 діб. Як свідчать попередні дослідження, це є оптимальним терміном для якісного електрофоретичного прояву існуючих ферментних систем за даних умов (Бойко, 2011).

Мицелій грибів промивали та висушували за допомогою вакуумної фільтрації, відтак гомогенізували у трис-гліциновій буферній системі та фільтрували. Кількість внесеного в кожну лунку білка коливалась у межах 40—60 мкг. Електрофоретичний поділ білків проводили в 11,25%-ному поліакриламідному гелі з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН — 8,3). Зони активності гістохімічно виявляли для таких ферментів: альдегід оксидаза (ALDOX) (КФ 1.2.3.1); алкогольдегідрогеназа (ADH) (КФ 1.1.1.1);  $\alpha$ -амілаза (AMY) (КФ 3.2.1.1);  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа (GPDH) (КФ 1.1.1.8); глутаматдегідрогеназа (GDH) (КФ 1.4.1.2); пероксидаза (POX) (КФ 1.11.1.7); сорбітолдегідрогеназа (SDH) (КФ 1.1.1.14); супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1); естераза (EST) (КФ 3.1.1.1) (Gabriel, 1971; Корочкин, 1977; Гааль, 1982).

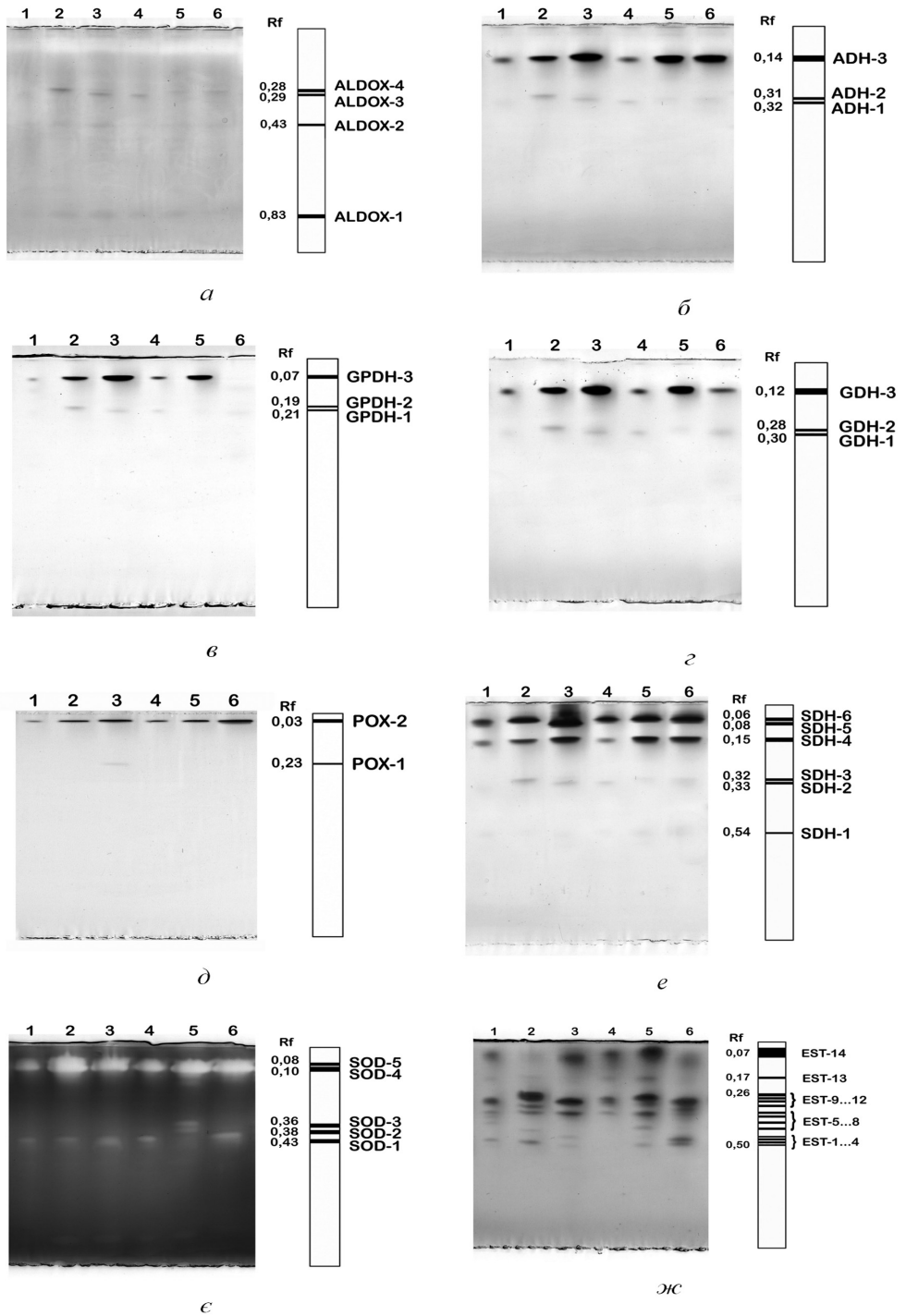
### Результати дослідження та їх обговорення

Здійснені дослідження дали змогу встановити повну відсутність ендoferменту  $\alpha$ -амілази у гриба *S. hirsutum*.

Виявлені ізоферменти внутрішньоклітинної альдегід оксидази представлені на рисунку (а). У кожній культури спостерігали три ізоформи. Загалом зафіксованих форм чотири, однак ступінь візуалізації зон активності надто низький і в деяких випадках не уможливило їх чіткого ідентифікування.

Внутрішньоклітинна алкогольдегідрогеназа в кожній культурі *S. hirsutum* виявляється двома смугами активності (рисунок, б). Швидкорухлива зона є поліморфною (ADH-1 та ADH-2), тоді як повільнорухлива – мономорфною.

Ферментні системи  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогенази та глутаматдегідрогенази, як і попередня, проявляються двома зонами, з яких рухливішою є поліморфна (рисунок, в, г). Загалом для кожної системи виявлено три ізоферменти.



Спектр внутрішньоклітинних ізоформ ферментних систем *Stereum hirsutum* (1—6 — номер зразка, див. табл.): *a* — альдегід оксидаза; *б* — алкогольдегідрогеназа; *в* —  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа; *г* — глутаматдегідрогеназа; *д* — пероксидаза; *е* — сорбітолдегідрогеназа; *ж* — естераза

Пероксидаза є сталою ознакою культур *S. hirsutum* (рисунок, *д*). Незалежно від місця зростання гриба в культурі спостерігали зони з відносно електрофоретичною рухливістю (Rf) — 0,03. Цікавою особливістю характеризується культура, отримана зі зразка № 3: тільки для неї характерна швидкорухлива, менш активна форма з Rf 0,23. Виявлені ізоферменти внутрішньоклітинної альдегід оксидази представлені на рисунку (*а*). У кожній культурі спостерігали три ізоформи. Загалом зафіксованих форм чотири, однак ступінь візуалізації зон активності надто низький і в деяких випадках не уможливило їх чіткого ідентифікування.

Сорбітолдегідрогеназа, на відміну від інших досліджених дегідрогеназ, характеризується більшою кількістю ізоферментів — шість (рисунок, *е*). Швидкорухлива зона SDH-1 за своїм проявом є дуже слабкою, і ми не можемо її рекомендувати для подальшого використання в популяційно-генетичних дослідженнях. Зони SDH-4, SDH-5, SDH-6 мають низьку рухливість і дають чітку картину. Встановлено також поліморфізм для двох ізоферментів — зон SDH-2, SDH-3 та SDH-5 і SDH-6.

Для ферментної системи супероксиддисмутази виявлено п'ять ізоферментів (рисунок, *є*). У п'яти з шести дослідних культур спостерігаються три зони активності ферменту: SOD-1, SOD-4 і SOD-5. Культура, отримана зі зразка № 5, показала чотири зони активності ферменту: SOD-2, SOD-3 і SOD-4, SOD-5. Низькорухливі зони SOD-4 та SOD-5 мали дуже високу активність і стовідсоткову присутність у дослідних культурах, що дає можливість використовувати їх у ролі білкових маркерів.

Естеразний ферментний комплекс виявився найскладнішим за кількістю та проявом зон активності (рисунок, *ж*). У дослідних культур визначено 14 ізоферментів естерази. Кожна культура показала від п'яти до восьми зон активності. Слід зазначити неможливість використання з аналітичною метою EST-14 через значну розмитість і відсутність її чітких кордонів. З усіх ферментних систем саме естераза виявилася найбільш гетерогенною. Отже, результати досліджень дають уявлення про зміну ізоферментного профілю гриба *Stereum hirsutum*, виділеного з певної території. Подібна інформація конче потрібна для подальших популяційно-генетичних досліджень гриба.

## Висновки

Таким чином, із дев'яти ферментних систем, досліджених у *Stereum hirsutum*, що зростали на території Донецької обл., встановлено вісім. Ендоферменти  $\alpha$ -амілази не виявили своєї активності. Такі ферментні зони, як ADH-3, GDH-3, POX-2, SDH-4, SOD-4 і SOD-5, показали стовідсоткову присутність в усіх ізолятах дослідженого гриба. Найбільша кількість ізоферментів (14) властива

---

Spectrum of endocellular isoforms of enzyme systems of *Stereum hirsutum* (1—6 — number of sample, see Table): *a* — aldehyde oxidase; *б* — alcohol dehydrogenase; *в* —  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase; *г* — glutamate dehydrogenase; *д* — peroxidase; *е* — sorbitol dehydrogenase; *є* — superoxide dismutase; *ж* — esterase

естеразі, що спостерігається також для інших видів грибів (Matsumoto, 1995; Hussain, 1997; Штаер, 2006). Ферментна система пероксидази налічує лише дві зони активності, з яких РОХ-2 є сталою та перспективною з погляду використання як білкового маркера *S. hirsutum*.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
2. *Бойко С.М.* Зміна ізоферментного складу культури гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) залежно від віку міцелію // Укр. ботан. журн. — 2011. — **68**, № 4. — С. 596—602.
3. *Гааль Э., Медведиш Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 446 с.
4. *Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др.* Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
5. *Лессо Т.* Грибы: Определитель. — *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
6. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с.
7. *Штаер О. В.* Сравнительный анализ природных популяций *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2006. — 25 с.
8. *Boiko S.M.* Polymorphism of intracellular isoenzymes of *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) in the Donetsk region // Cytol. and Genetics. — 2011. — **45** (6). — P. 343—346.
9. *Coates D., Rayner A. D. M.* Heterokaryon-homokaryon interactions in *Stereum hirsutum* // Trans. Brit. Mycol. Soc. — 1985. — **84**. — P. 637—645.
10. *Fukuda M., Tokimoto K.* Variation of isozyme patterns in the natural population of *Lentinus edodes* // Proc. Japan. Acad. — 1991. — **67**. — P. 43—47.
11. *Gabriel O.* Locating enzymes on gels // Methods of Enzymol. — 1971. — **2**. — P. 578—604.
12. *Heilmann-Clausen J., Boddy L.* Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species // Microbial Ecol. — 2005. — **49**. — P. 399—406.
13. *Hussain S., Barz W.* Isozyme polymorphism in *Ascochyta rabiei* isolates from Pakistan // Pak. J. Bot. — 1997. — **29**. — P. 207—216.
14. *Linde D. C., Groth J. V., Roelfs A. P.* The genetic basis of isozyme variation in the bean rust fungus (*Uromyces appendiculatus*) // J. of Heredity. — 1990. — **81**. — P. 134—138.
15. *Matsumoto Teruyuki, Mimura Kimito, Fukumasa-Nakai Yuktaka.* Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus* // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1995. — **41**. — P. 487—497.
16. *May Bernie, Royse Daniel J.* Genetic variation and joint segregation of biochemical loci in the common meadow mushroom *Agaricus campestris* // Biochemical Genetics. — 1982. — **20**. — P. 1165—1173.
17. *Otrosina William J., Chase Thomas E., Cobb Fields W.* Allozyme differentiation of intersterility groups of *Heterobasidion annosum* isolated from conifers in the Western United States // Phytopathol. — 1992. — **82**. — P. 540—545.
18. *Palma C., Contreras E., Urra J., Martinez M.* Eco-friendly technologies based on banana

- peel use for the decolourization of the dyeing process wastewater // Waste Biomass Valor. — 2011. — 2. — P. 77—86.
19. Ravash R., Shiran B., Alavi A.-A., Bayat F., Rajaei S., Zervakis G. I. Genetic variability and molecular phylogeny of *Pleurotus eryngii* species-complex isolates from Iran, and notes on the systematics of Asiatic populations // Mycol. Progress. — 2010. — 9. — P. 181—194.
20. Rayner A. D. M., Turton M. N. Mycelial interactions and population structure in the genus *Stereum*: *S. rugosum*, *S. sanguinolentum* and *S. rameale* // Trans. Brit. Mycol. Soc. — 1982. — 78. — P. 483—493.
21. Shafiquzzaman S., Faridah A., Tan S., Emila R. Level in allozyme variations of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications // Research Journ. of microbiol. — 2007. — 2 (10). — P. 717—726.
22. Yurchenko E. O., Sinyavskaya M. G. An assessment of genetic variation in *Stereum hirsutum* (*Basidiomycota*) based on RAPD markers // Baltic Forestry. — 2010. — 16 (2). — P. 172—179.

Рекомендує до друку  
І.О. Дудка

Надійшла 23.06.2011 р.

С.М. Бойко

Донецкий национальный университет

#### РАЗНООБРАЗИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY (*BASIDIOMYCETES*) НА ТЕРРИТОРИИ ДОНЕЦКОЙ ОБЛАСТИ

Исследованы девять внутриклеточных ферментных систем гриба *Stereum hirsutum*, который произрастает в Донецкой обл. Установлено полное отсутствие активности эндофермента  $\alpha$ -амилазы. Ферментные зоны ADH-3, GDH-3, POX-2, SDH-4, SOD-4 и SOD-5 показали стопроцентное присутствие во всех изученных образцах и могут служить белковыми маркерами гриба *S. hirsutum*.

*К л ю ч е в ы е с л о в а*: *Stereum hirsutum*, ферментная система, изоферменты, электрофоретическое разделение белков.

S.M. Boiko

Donetsk National University

#### DIVERSITY OF ENDOCELLULAR ENZYME SYSTEMS IN WILD STRAINS OF *STEREUM HIRSUTUM* (WILLD.) GRAY (*BASIDIOMYCETES*) IN DONETSK REGION

Nine endocellular enzyme systems of *Stereum hirsutum* strains from Donetsk Region were investigated. Total absence of endocellular  $\alpha$ -amylase activity was established. Enzyme zones ADH-3, GDH-3, POX-2, SDH-4, SOD-4, and SOD-5 showed 100 % presence in all studied samples. They can be used as protein markers for *S. hirsutum*.

*К е у w o r d s*: *Stereum hirsutum*, enzyme system, isoenzymes, electrophoretic division of proteins.