

С.М. БОЙКО

Донецький національний університет
вул. Університетська, 24, м. Донецьк, 83001, Україна
bsm73@ukr.net

ЗМІНА ІЗОФЕРМЕНТНОГО СКЛАДУ КУЛЬТУРИ ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*) ЗАЛЕЖНО ВІД ВІКУ МІЦЕЛІЮ

Ключові слова: *Schizophyllum commune*, міцелій, внутрішньоклітинні ізоферменти, відносна електрофоретична рухливість, ферментна система

Вступ

Дереворуйнівний гриб *Schizophyllum commune* Fr. (*Sch. radiatum* (Sw.) Fr.) є одним із найбільш розповсюджених серед базидіальних грибів [10]. Завдяки добрій обізнаності з його властивостями людина знаходить йому практичне застосування [13, 17]. Морфологічні та фізіологічні особливості *Sch. commune* науковці різних країн дослідили досить повно [3, 9], але на сьогодні залишилося кілька питань, які потрібно вивчити. Одне з них — популяційно-генетичні дослідження об'єкта, які дозволять здійснити добір цінного генофонду [4, 11, 12, 16]. Ізоферменти як біохімічні маркери генної активності з цією метою використовуються найчастіше [6, 15]. Методом, що застосовують у таких дослідженнях, є електрофорез білків у поліакриламідному гелі [7, 8, 14]. Передумовою для проведення популяційно-генетичних досліджень є вірогідна інформація про наявність певних ферментних систем, їх якісний склад, а також вміст ізоформ у різні періоди розвитку організму.

Мета роботи — дослідити варіабельність внутрішньоклітинного ізоферментного складу *Sch. commune* залежно від віку міцелію.

Об'єкти та методи досліджень

Об'єкт вивчення — дикаріотичні культури *Sch. commune*, виділені із плодових тіл грибів, які зростали в штучних деревних насадженнях у межах м. Донецька. Чисту культуру виділяли за загальновідомими методиками з використанням пероксиду водню [1]. Одержану культуру вирощували на картопляно-агаризованому середовищі в термостаті ТС-80М-2 за температури 28 °С. Для дослідження застосовували рідке глюкозо-пептонне живильне середовище, яке розливали по 50 мл у колби Ерленмейера об'ємом 250 мл. Початковий рівень рН живильного середовища становив 5,0 одиниць. Протягом 30 діб, через кожні 3 доби, обстежували внутрішньоклітинні ізоферментні системи.

Для аналізу ферментних систем використовували міцелій, який гомогенізували в буферній системі та фільтрували [5]. Кількість внесеного матеріалу в

кожну лунку коливалася в межах 50—70 мкг білка. Електрофоретичний розподіл білків проводили в 11,25 %-му поліакриламідному гелі з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН 8,3). Гістохімічне виявлення зон активності здійснювали для наступних ферментів: альдегід оксидаза (КФ 1.2.3.1), α -амілаза (КФ 3.2.1.1), алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.1.1), α -гліцерофосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.8), глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.2), естераза (КФ 3.1.1.1), сорбітолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.14), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) [2]. Досліди проводили у трикратній повторності.

Результати дослідження та їх обговорення

Термін культивування (30 діб) був зумовлений тим, що в зазначених умовах відбувається перебіг практично всіх фаз росту [1]. Це дає змогу дослідити варіабельність внутрішньоклітинного ізоферментного складу гриба під час активних фізіологічних змін. Проведені дослідження дозволили встановити відсутність ферментної системи альдегід оксидази у *Sch. commune* протягом усього періоду культивування. Інші сім систем виявили свою наявність і різноманітність.

Ізоферменти алкогольдегідрогенази проявлялися п'ятьма зонами активності, відносна електрофоретична рухливість (ВЕР) яких коливалась у межах 0,03—0,29 (рис. 1).

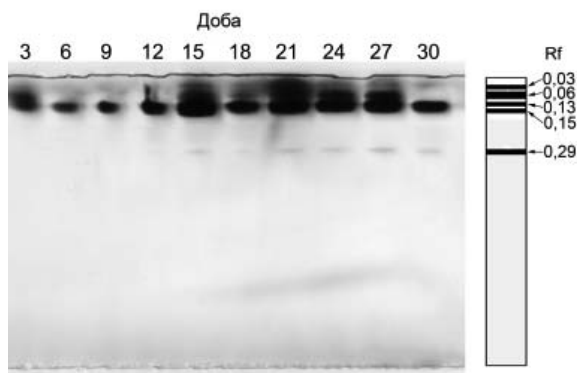


Рис. 1. Вплив віку міцелію *Schizophyllum commune* Fr. на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів алкогольдегідрогенази

Fig. 1. Influence of the age of mycelium of *Schizophyllum commune* Fr. on variability of endocellular isoenzymes alcohol dehydrogenase

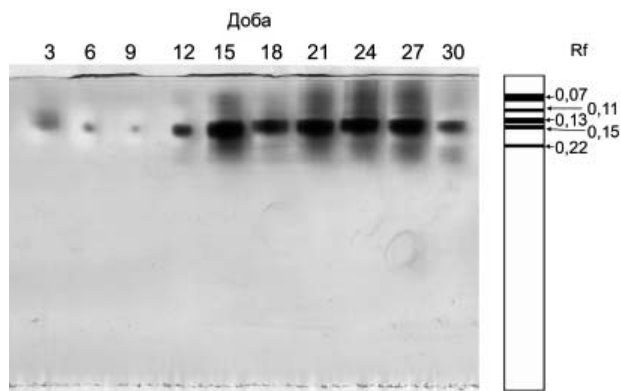


Рис. 2. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів α -гліцерофосфатдегідрогенази

Fig. 2. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes α -glycerophosphate dehydrogenase

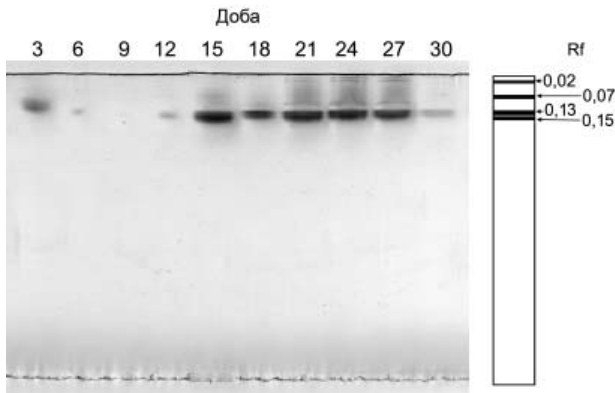


Рис. 3. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів глутаматдегідрогенази

Fig. 3. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes glutamate dehydrogenase

Рис. 4. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів сорбітолдегідрогенази

Fig. 4. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes sorbitol dehydrogenase

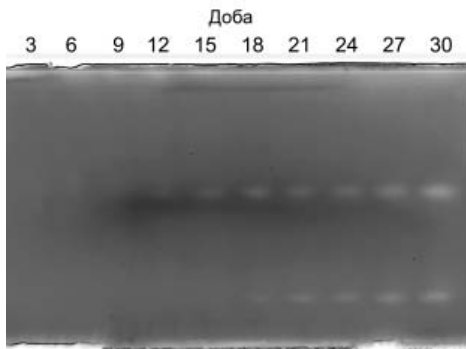
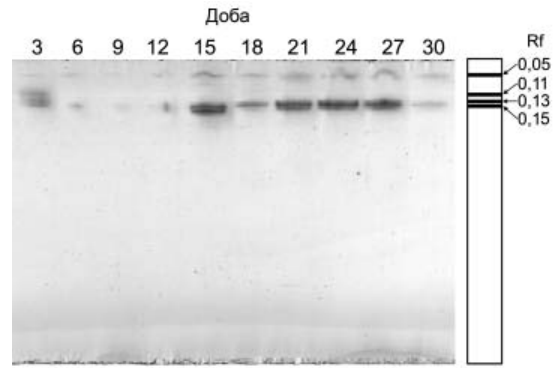


Рис. 5. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів α -амілази

Fig. 5. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes α -amylase

Протягом усього періоду зростання гриба відзначена наявність ізоферментів із ВЕР 0,13 та 0,15, які виявляли високу активність, а зі збільшенням тривалості гістохімічного прояву зливалися в одну широку зону. Від 15 до 27-ої доби фіксували усі 5 зон активності ізоферментів алкогольдегідрогенази. На 30-ту добу була відсутня зона з ВЕР 0,06. Отже, період культивування гриба від 15 до 27-ої доби можна рекомендувати для дослідження ферментної системи алкогольдегідрогенази.

Ізоферменти α -гліцерофосфатдегідрогенази в максимальній кількості виявляються 5-ма зонами, із яких зони з ВЕР 0,13 і 0,15 фіксуються чітко протягом

Рис. 6. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів супероксиддисмутази

Fig. 6. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes superoxide dismutase

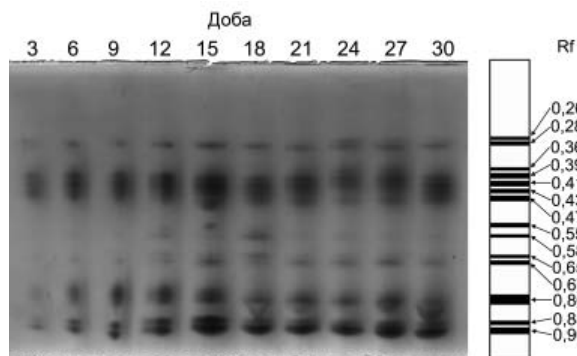
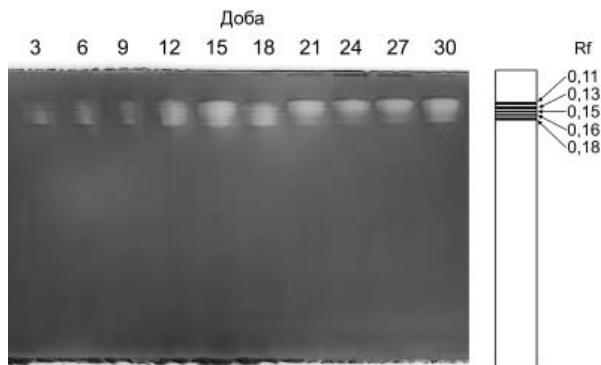


Рис. 7. Вплив віку міцелію *Sch. commune* на варіабельність внутрішньоклітинних ізоферментів естерази

Fig. 7. Influence of the age of mycelium of *Sch. commune* on variability of endocellular isoenzymes esterase

усього періоду досліджень (рис. 2). Для них характерна висока активність реакції, що через деякий час призводить до їх візуального злиття. Зони активності ферменту з ВЕР 0,07; 0,11 та 0,22 починають виявлятися з 15-ої доби, але їх активність та чіткість прояву дуже слабка, що спричиняє певні труднощі їх дослідження.

Ферментна система глутаматдегідрогенази, як і попередні, має зони активності ферменту з ВЕР 0,13 та 0,15, які виявляються протягом усього періоду культивування (рис. 3). Зону з ВЕР 0,07 фіксують лише в 15-добовому віці міцелію, а білкову зону з ВЕР 0,02 — в міцелію віком 21–27 діб. Активність їх прояву дуже низька.

Внутрішньоклітинна ферментна система сорбітолдегідрогенази *Sch. commune* представлена чотирма зонами з ВЕР 0,05; 0,11; 0,13; 0,15 (рис. 4). На рисунку добре видно чітке розділення зон із ВЕР 0,13 та 0,15, які зі збільшенням терміну гістохімічного прояву зливаються в одну широкую зону, як і в попередніх дегідрогеназ.

Зони прояву ферменту добре фіксуються, починаючи з 15-добового віку міцелію. Зона з ВЕР 0,11 диференційована слабо і спостерігається лише в міцелію, вік якого становить 3 доби.

Ізоферменти α -амілази *Sch. commune* виявляються двома зонами активності з ВЕР 0,44 та 0,82. На рис. 5 добре помітно, що відбувається поступове накопичення ізоферментів α -амілази, а починаючи з 15–18-добового віку міцелію гриба останні добре ідентифікуються.

Внутрішньоклітинна ферментна система супероксиддисмутази *Sch. commune* представлена п'ятьма зонами активності, які досить близько розташовані одна від одної (ВЕР 0,11–0,18) (рис. 6). Виявлені зони, незалежно від віку міцелію, залишаються стабільними.

З-поміж усіх досліджених ферментних систем саме естераза має найбільше ізоферментів (рис. 7). Загальна кількість зон активності ферменту — 14. Вже у 15-добового міцелію спостерігається 12 ізоферментів внутрішньоклітинної естерази. Зони активності ферменту з ВЕР 0,28; 0,39; 0,41; 0,43; 0,58; 0,67; 0,80; 0,88 та 0,90 виявляються в міцелію гриба з самого раннього віку і до кінця експерименту. Слабу активність деяких зон можна пояснити недостатньою кількістю білка, внесеного до гелю.

Висновки

Отримані результати дозволяють стверджувати, що якісний склад внутрішньоклітинних ізоферментів *Sch. commune* загалом не суттєво залежить від віку міцелію. Комплексні гістохімічні дослідження внутрішньоклітинних ізоферментів краще проводити в культури гриба віком 15—27 діб. Усі досліджені дегідрогенази показали наявність зон активності з ВЕР 0,13 та 0,15 протягом усього періоду культивування. Встановлено, що найстабільнішими внутрішньоклітинними ферментними системами за якісним складом є α -амілаза та супероксиддисмутаза. Ферментна система α -амілази виявила накопичувальний характер зі збільшенням віку міцелію, а естерази, незважаючи на найбільшу різноманітність лізоформ, — незначні якісні коливання: міцелій гриба віком 15 діб і більше показав наявність у середньому 85—95 % ізоферментів від виявленої їх кількості.

1. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
2. *Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др.* Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
3. *Ліновицька В.М., Бухало А.С.* Культуральні та морфологічні особливості лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) на агаризованих живильних середовищах // Укр. ботан. журн. — 2005. — **62**, № 1. — С. 78—86.
4. *Милютин Д. И.* Генотипический состав популяций и устойчивость к некоторым фунгицидам штаммов *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary из Республики Марий Эл и Московской области: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.24 / Москва, 2008. — 24с.
5. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. — 288 с.
6. *Панькова В.В.* Аллозимные спектры глюкозо-6-фосфат изомеразы у полидорид (*Polychaeta: Spionidae*) и возможные механизмы их формирования.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Владивосток, 2006. — 22 с.
7. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. — 272 с.
8. *Юдина Р.С., Ибрагимова С.С., Железнова Н.Б.* Изучение структуры популяций амаранта (*Amaranthus L.*) по изоферментным локусам // Вестн. ВОГиС. — 2008. — **12**, № 3. — С. 385—391.
9. *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.

10. *Cybertruffle's* robigalia. Observations of fungi and their associated organisms. <http://www.cybertruffle.org.uk> (22.11.10).
11. Fowler T.J., Mitton M.F., Rees E.I., Raper C.A. Crossing the boundary between the B-alpha and B-beta mating-type loci in *Schizophyllum commune* // Fung. Genet. Biol. — 2004. — **41**. — P. 89—101.
12. 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.
13. Lorenzen K., Anke T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products // Cur. Organ. Chemist. — 1998. — № 2. — P. 329—364.
14. Maquet A., I. Zoro Bi, M. Delvaux B. Wathelet u J.P. Baudoin. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers // Theor. Appl. Genet. — 1997. — **95**. — P. 980—991.
15. 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. Journ. Genet. — 2004. — **40**, № 8. — P. 871—881.
16. Tarkka M.T., Vasara R., Gorfer M., Raudaskoski M. Molecular characterization of actin genes from homobasidiomycetes: Two different actin genes from *Schizophyllum commune* and *Suillus bovinus* // Gene. — 2000. — **251**. — P. 27—35.
17. Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S., Solomko E.F. Medicinal mushrooms: past, present and future // Укр. ботан. журн. — 2002. — **59**, № 5. — P. 499—524.

Рекомендує до друку
А.С. Бухало

Надійшла 26.12.2010 р.

С.М. Бойко

Донецкий национальный университет

ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА КУЛЬТУРЫ ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА МИЦЕЛИЯ

Определено, что гистохимические исследования ферментных систем *Schizophyllum commune* Fr. лучше осуществлять в мицелии гриба 15—27-суточного возраста. Наиболее стабильными внутриклеточными ферментными системами является α -амилаза и супероксиддисмутаза. Ферментная система эстераза показала наибольшее разнообразие по качественному составу.

Ключевые слова: *Schizophyllum commune*, мицелий, внутриклеточные изоферменты, относительная электрофоретическая подвижность, ферментная система.

S.M. Voiko

Donetsk National University

CHANGE OF ISOENZYMIC COMPOSITION OF THE *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*) CULTURE DEPENDING ON THE AGE OF MYCELIUM

Mycelium of 15—27-day-old cultures is shown as more appropriate for histochemical research of the enzyme system of *Schizophyllum commune* Fr. The most stable endocellular enzyme systems are α -amylase and superoxide dismutase. The enzymic system of esterase demonstrated the highest diversity in its qualitative structure.

Key words: *Schizophyllum commune*, mycelium, endocellular isoenzymes, relative electrophoretic mobility, enzyme system.