

УДК 577.15

## ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, У ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

© 2013 г. Е. А. Шевченко, Е. А. Бессолицына, И. В. Дармов

Вятский государственный университет, Киров, 610000

e-mail: bess2000@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2012 г.

Изучено более 20 видов трутовых грибов, выделенных в лесах Кировской области и не относящихся к классическим продуцентам лигнолитических ферментов, на наличие генов лигнинпероксидазы, лакказы и марганецпероксидазы. Выявлено 15 изолятов 11 видов базидиомицетов, имеющих гены всех трех лигнолитических ферментов. Впервые гены указанных ферментов обнаружены у *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, *P. cinnabarinus*.

DOI: 10.7868/S055510991303015X

Структурный каркас почти всех наземных растений состоит из полимеров: лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Объединяясь в разных пропорциях, они образуют лигноцеллюлозный комплекс. Лигнин (в составе данного комплекса) является природным трехмерным гетерополимером на основе фенилпропановых единиц. Лигнин чрезвычайно медленно разлагается в естественных условиях и среди других биополимеров наиболее устойчив к микробной деградации. Дереворазрушающие грибы являются единственными организмами, способными разрушать лигноцеллюлозу за счет использования набора внеклеточных лигнолитических ферментов.

Как известно, наиболее активными биодеструкторами лигнина древесины являются базидиомицеты – возбудители белой гнили. В состав лигнолитического комплекса базидиомицетов входят ферменты лигнинпероксидаза, марганецпероксидаза и лакказа.

Лигнинпероксидаза представляет собой гемсодержащий гликопротеин с молекулярной массой 39–45 кДа. Это ключевой фермент, способный частично деполимеризовать нативный и синтетический лигнин, а также расщеплять некоторые модельные соединения [1].

Другой представитель этого комплекса – марганецзависимая пероксидаза – может катализировать окисление нефенольных подструктур лигнина в присутствии пероксида водорода, ионов марганца(II) и лактата. Марганецпероксидаза имеет молекулярную массу 46 кДа и содержится в своей структуре гем (простетическая группа) [2].

В лигнолитический комплекс входит и лакказа – медьсодержащий гликопротеин, катализирующий реакции окисления различных произ-

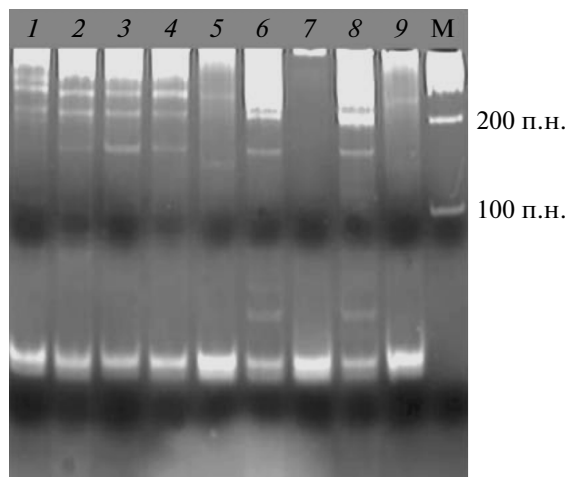
водных фенола (*o*-, *p*-дифенолов, аминифенолов, производных пара-гидроксикоричной кислоты и др.) кислородом воздуха. Молекулярная масса лакказы из различных источников варьирует в пределах 14–390 кДа. Некоторые грибы способны продуцировать одновременно несколько изоформ лакказы с различными молекулярными массами.

Очищенная лакказа слабо действует на лигнин, поэтому было высказано предположение, что основная функция фермента заключается в окислении не самих лигнинов, а низкомолекулярных продуктов их деполимеризации. С этим процессом связана и детоксицирующая функция лакказы: окисление токсичных низкомолекулярных фенольных компонентов с последующей полимеризацией приводит к образованию полимеров, для которых клеточная стенка непроницаема. Лакказа считается эффективной “ловушкой” кислородных радикалов и, таким образом, может предохранять клеточные белки от взаимодействия с гидроксилрадикалом [3].

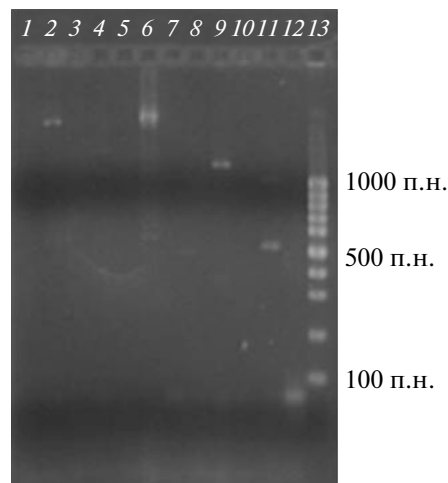
Комплекс лигнолитических ферментов имеет первостепенное значение в биодеградации лигнина, что открывает перспективы их использования для биоотбеливания тканей и бумаги; для очистки окружающей среды от ксенобиотиков, в том числе ароматических соединений; в качестве маркеров в иммуноферментном анализе [4].

Несмотря на активное изучение ферментов лигнолитического комплекса базидиомицетов и кодирующих их синтез генов, спектр исследуемых грибов ограничен отдельными представителями родов *Trametes*, *Phanerochaete*.

Цель работы – выявить гены, кодирующие лигнолитические ферменты у изолятов базидиомицетов, выделенных в лесах Кировской области.



**Рис. 1.** Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена лигнинпероксидазы в 6%-ном нативном полиакриламидном геле. Праймеры LgpF/LgpR. 1 – *D. quercina* (6); 2 – *F. pinicola* (7); 3 – *F. pinicola* (8); 4 – *F. pinicola* (9); 5 – *F. pinicola* (11); 6 – *G. lipsiense* (15); 7 – *B. fumosa* (8k); 8 – положительный контроль *T. versicolor* (Tv); 9 – отрицательный контроль (вода); М – маркер “СибЭнзим”.



**Рис. 2.** Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена лакказы в 1.5%-ном агарозном геле. Праймеры LccF и LccR. 1 – *D. quercina* (6); 2 – *F. pinicola* (7); 3 – *F. pinicola* (8); 4 – *F. pinicola* (9); 5 – *F. pinicola* (11); 6 – *F. pinicola* (23); 7 – *F. fomentarius* (35); 8 – *A. mellea* (10); 9 – *P. ostreatus* (1B); 10 – *F. fomentarius* (17); 11 – положительный контроль *T. versicolor* (Tv); 12 – отрицательный контроль (вода); 13 – маркер “СибЭнзим”.

## МЕТОДИКА

Плодовые тела были собраны в 2008–2010 гг. в лесной зоне Кировской области в период их массового появления, в сухую погоду. Для выделения культуры выбирали молодые, неповрежденные плодовые тела. Определение вида грибов проводили на основании изучения культуральных, макро- и микроморфологических признаков. При этом учитывали форму и цвет плодового тела, форму и цвет гименофора, цвет и структуру тканей плодового тела [5]. Структуру мицелия исследовали с помощью светового микроскопа (“Primo Star, Zeiss”, Германия).

Получение культуры базидиомицетов из плодовых тел осуществляли методом, описанным в работе Билай В.И. [6]. Плодовое тело очищали, быстро обеззараживали дистиллированной водой, затем стерильной водой. Предварительно обработанное плодовое тело разламывали, и кусочки «ткани» из середины стерильным скальпелем переносили в чашку Петри на смоченную стерильной водой фильтровальную бумагу. Чашки Петри для предохранения от высыхания заклеивали и помещали в термостат при температуре  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Когда инокулом покроется растущим мицелием, его переносили на сусло-агар с антибиотиками (500 мг пенициллина и 150 мг амфотерицина В на 250 мл среды).

Мицелий снимали шпателем с поверхности плотной питательной среды с площади  $1\text{ см}^2$ . К массе мицелия добавляли 1 мл буфера NET 100 (50 mM трис-HCl; 10 mM ЭДТА; 100 mM NaCl;

pH 8.0) и стерильный кварцевый песок (1/2 от объема мицелия), растирали в ступке стерильным пестиком. Затем отбирали 500 мкл полученного лизата в микропробирку типа эппендорф объемом 1.5 мл, добавляли раствор Na-ДДС до конечной концентрации 1%, инкубировали 40 мин при  $55^\circ\text{C}$ . Добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ (1 : 1), перемешивали и центрифугировали (5 мин, 10000 g). После этого отбирали водную фазу и повторяли с ней предыдущую процедуру. Затем к водной фазе, образовавшейся после второй экстракции смесью фенол-хлороформ, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали (5 мин, 10000 g), отбирали водную фазу. К водной фазе, полученной после обработки хлороформом, добавляли 1/10 объема 5 M раствора ацетата натрия (pH 5.2) и 2 объема охлажденного до  $-20^\circ\text{C}$  этанола, перемешивали и центрифугировали (15 мин, 10000 g). Полученный осадок промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в деионизированной воде.

Для амплификации искомым участкам ДНК было подобрано несколько пар праймеров; использовали полные последовательности генов и мРНК лигнинпероксидазы, марганецпероксидазы и лакказы из базы данных NCBI. Выбор праймеров осуществляли с использованием резидентных программ AliBee – Multiple alignment Release 3.0. и BLAST с сайта <http://www.genebee.msu.ru>. Последовательности используемых праймеров, температура отжига и размер ожидаемых ПЦР-продуктов представлены в табл. 1. Праймеры были синтезированы АО “Синтол” (г. Москва, Россия).

**Таблица 1.** Характеристика выбранных праймеров для определения генов лигнолитических ферментов

| Наименование праймера      | Структура праймера (5' – 3')                 | Расчетная температура отжига, °С | Ожидаемый размер амплификата, п.н. | № последовательностей в GenBank*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Лакказы</b>             |                                              |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LccF                       | GAC-AAC-(AT)TG-ACG-AAC-CA(CT)-ACC-ATG        | 52                               | 350                                | DQ431715.1, EU492907.1, AF414808.1, AY839940.1, AY839941.1, DQ234060.1, AY081188.1                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| LccR                       | CCC-CT(GC)-A(AG)A-CCA-TCA-CAG-TAC-TG         |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Лакказы</b>             |                                              |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| lLccF                      | TTC-CAG-(AC)TC-AA(CT)-GTC-(AG)T(CT)-GAC      | 67                               | 130                                | AY616035.1, AF053472.2, AJ542532.1, BK004111.1, BK004112.1, BK004113.1, BK004114.1, BK004116.1, BK004118.1, BK004119.1, BK004122.1, BK004125.1, DQ431715.1, EU282002.1, AY485826.1, AF185275.2, FJ231092.1, AY686700.1, AB089612.1, AJ005017.2, AJ344434.2, FJ473384.2, AF170093.1, EU492907.1, AF414808.1, AY839940.1, AY839941.1, DQ234060.1, AY081188.1        |
| lLccR                      | T(AC)G-G(AG)C-ACT-GGT-T(AG)A-(CT)GA-A(GC)G-C |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Марганецпероксидаза</b> |                                              |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| MnpF                       | CTC-A(CT)C-TTC-CAC-GAC-GC(GC)-ATC-GGC        | 68                               | 450                                | Z30668, AJ745879, AJ745080, AY677131, AY677130, AY677129, AY677128, D86493, AF008585, AF102515, PCU10306, PHAMNP2A, PHAMNP1A, PHAMP1A, PHAMNP1, PHAMNP, E39216, E39215, E39214, E39213, E39212, E39211, AB078606, AB078604, AB078605, E39210                                                                                                                      |
| MnpR                       | CTC-GA(CT)-GAA-GAA-CTG-(GC)G(CT)-GTC-G       |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Лигнинпероксидаза</b>   |                                              |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LgpF                       | GAC-GG(CT)-CT(CT)-GT(CT)-CC(GTC)-GAG-CC      | 67                               | 207                                | Z30667, Z30666, Z31011, AB158478, PHALIPERE, EU289404, AB455007, AB455006, PHALIP2X, PHALIGPER, EU649680, Z31011, X75655, X54257, X15599, X55343, AM397952, X51590, E07702, E05520, E05519, E05517, E03952, AY743218, AY749105, AB237774, AB191466, AB158478, X14446, TMTVLG2A, PHALPO, TMTLIGPERO, PHALIP6, PHALIGPERM, PHALIGPERG, AF140063, AF140062, PHALNPOX |
| LgpR                       | C(AT)G-NG(ATC)-CTC-GA(CT)-GAA-GAA-CTG        |                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

\* Последовательности МРНК и генов, использованные при подборе праймеров, взяты из базы данных [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Таблица 2.** Результаты видовой идентификации изолятов базидиомицетов

| Видовое название               | Номера изолята              |
|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>Antrodiella</i>             | 67                          |
| <i>Armillaria mellea</i>       | 10                          |
| <i>Bjerkandera fumosa</i>      | 8k, 66                      |
| <i>Datronia mollis</i>         | 64                          |
| <i>Daedaleopsis confragosa</i> | 706                         |
| <i>Daedaleopsis quercina</i>   | 6                           |
| <i>Fomes fomentarius</i>       | 17, 35, 55                  |
| <i>Fomes pinicola</i>          | 37                          |
| <i>Fomitopsis penicola</i>     | 3k, 23, 7, 8, 9, 11, 16, 60 |
| <i>Ganoderma applanatum</i>    | 22                          |
| <i>Ganoderma lucidum</i>       | 2k                          |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i>    | 56, 59                      |
| <i>Huipholoma fasciculare</i>  | 68, 69                      |
| <i>Lenzites betulina</i>       | 708                         |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>     | 1В                          |
| <i>Piptoporus betulinus</i>    | 39                          |
| <i>Phellinus hartigii</i>      | 13k                         |
| <i>Phellinus igniarius</i>     | 1k                          |
| <i>Phellinus pomaceus</i>      | 5k                          |
| <i>Phellinus pini</i>          | 57, 58, 61, 62              |
| <i>Polyporus betulinus</i>     | 36                          |
| <i>Pseudotrampetes gibbosa</i> | 4k                          |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> | 704                         |
| <i>Trametes</i>                | 72, 73                      |
| <i>Trametes gibbosa</i>        | 42, 700                     |
| <i>Trametes hirsuta</i>        | 65, 70, 71                  |
| <i>He определен</i>            | 706', 503, 31k, 26, 29      |

Состав реакционной смеси: 0.5 мкл пробы (50 нг ДНК), 1 мкл 10X буферного раствора для ПЦР без ионов магния (“Сибэнзим”, Россия), 0.5 мкл смеси дидезоксинуклеозидтрифосфатов, прямого и обратного праймеров по 1 мкл каждого. Таq-полимеразы (“Сибэнзим”, Россия), вода до конечного объема 10 мкл; концентрация хлорида магния — 2.0 мМ для пар праймеров LccF/LccR, MnpF/MnpR и 3.0 мМ — для пар праймеров 1LccF/1LccR, LgpF/LgpR.

Амплификацию проводили с использованием программируемого термостата “Терцик” (“ДНК-технология”, г. Москва). Условия ПЦР: 1 цикл 95°C — 3 мин; 35 циклов 94°C по 30 с, температура отжига, подобранная для каждой из указанных пар праймеров — 30 с и 72°C — 1.5 мин; 1 цикл 68°C — 5 мин.

Продукты амплификации последовательностей генов лакказы (праймеры LccF/LccR), лигнинпе-

роксидазы и марганецпероксидазы разделяли с помощью гель-электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, фрагментов генов лакказы (праймеры 1LccF/1LccR) разделяли в 6%-ном нативном полиакриламидном геле, гели окрашивали этидиумом бромидом [7]. Размер амплификатов определяли с использованием стандартного набора маркеров “Сибэнзим” (Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Всего было выделено и получены мицелиальные культуры 50 природных изолятов базидиомицетов, преимущественно трутовиков. Из 50 изолятов видовой принадлежности была определена у 42, 3 изолята были идентифицированы до рода. Результаты видовой идентификации представлены в табл. 2.

Пять изолятов идентифицировать не удалось. Среди изолятов встречались как представители классических продуцентов лигнолитических ферментов — виды рода *Trametes* (изоляты 42, 65, 70, 71, 72, 73, 700), так и менее изученный в этом отношении вид *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная, изолят 10). Также были получены мицелиальные культуры представителей малоизученных родов *Pycnoporus*, *Daedaleopsis*, *Lenzites*. Такие виды, как *Trametes gibbosa*, *Fomitopsis penicola*; *Fomes fomentarius*; *Phellinus pini* и др., были представлены несколькими изолятами (от 2 до 8).

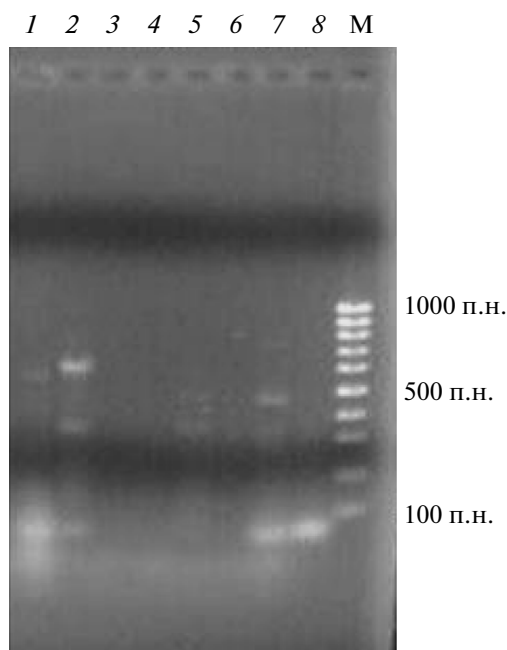
Культуры грибов использовали для выделения ДНК и последующей идентификации генов ферментов лигнолитического комплекса. Для выявления генов марганецпероксидазы и лигнинпероксидазы мы использовали по одной паре праймеров; для обнаружения гена(ов) лакказы выбрали две пары праймеров — первая (LccF/LccR) — по референс-последовательности наиболее изученного объекта (*Trametes versicolor*), вторая (1LccF/1LccR) — по последовательностям двух видов грибов рода *Trametes* (*T. hirsuta*). Первая пара соответствовала более специфическому участку гена по сравнению с участком, который был использован для выбора второй пары. В качестве положительного контроля использовали ДНК классического продуцента лигнинпероксидазы — *Trametes (Coriolus) versicolor*, штамм Tv из коллекции культур кафедры микробиологии ВятГУ. Результаты детекции продуктов амплификации приведены в табл. 3. В качестве примера на рис. 1–3 представлены электрофореграммы амплификатов ДНК некоторых изолятов.

С помощью пары праймеров LccF/LccR продукты амплификации были выявлены у *A. mellea* (10), *F. penicola* (7), *G. trabeum* (56), *L. betulina* (708), *P. betulinus* (39), *T. gibbosa* (700, 42) и у неидентифицированного изолята (31k). Размеры амплификатов ни в одном случае не совпадали с

**Таблица 3.** Продукты амплификации последовательностей генов лигнолитических ферментов природных изолятов базидиомицетов

| Видовое название                      | Изолят | Размер амплификата (п.н.), полученного с использованием праймеров... |               |                    |           |
|---------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|-----------|
|                                       |        | LccF–LccR                                                            | lLccF–lLccR   | LgpF–LgpR          | MnpF–MnpR |
| <i>Trametes versicolor</i> (контроль) | Tv     | 350                                                                  | 130           | 200, 300           | 500, 750  |
| <i>Armillaria mellea</i>              | 10     | 1000                                                                 | 130, 210, 400 | 200                | 700       |
| <i>Bjerkandera fumosa</i>             | 8k     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Datronia mollis</i>                | 64     | –                                                                    | 100, 220      | 130, 190           | –         |
| <i>Daedaleopsis confragosa</i>        | 706    | –                                                                    | 130           | 200, 250           | –         |
| <i>Daedaleopsis quercina</i>          | 6      | –                                                                    | 130           | 200, 300           | –         |
| <i>Fomes fomentarius</i>              | 17     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
|                                       | 35     | –                                                                    | 210           | 200, 300           | 400       |
|                                       | 55     | –                                                                    | –             | >300               | –         |
| <i>Fomes pinicola</i>                 | 37     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Fomitopsis penicola</i>            | 3k     | –                                                                    | 130           | 200, 300           | –         |
|                                       | 7      | 1000                                                                 | 140, 210, 300 | 180, 200, 300      | 600, 850  |
|                                       | 8      | –                                                                    | 130, 140, 210 | 180, 200, 300      | 850       |
|                                       | 9      | –                                                                    | 130, 140, 210 | 180, 200, 300      | 600, 850  |
|                                       | 11     | –                                                                    | –             | 150, 300           | –         |
|                                       | 16     | –                                                                    | –             | 100, 200, 300      | 600       |
|                                       | 23     | 1000                                                                 | –             | –                  | 850       |
|                                       | 60     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Ganoderma applanatum</i>           | 22     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Ganoderma lucidum</i>              | 2k     | –                                                                    | 130, 150      | –                  | –         |
| <i>Gloeophyllum trabeum</i>           | 56     | 300, 1000                                                            | 300, 320      | 150                | 300, 500  |
|                                       | 59     | –                                                                    | –             | 300                | 700       |
| <i>Hypholoma fasciculare</i>          | 69     | –                                                                    | 160, 210, 400 | 200, 300           | 200, 250  |
| <i>Lenzites betulina</i>              | 708    | 1000                                                                 | –             | 200, 250, 300      | 200       |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>            | 1B     | –                                                                    | 210, 250, 300 | 180, 300           | 800, 900  |
| <i>Piptoporus betulinus</i>           | 39     | 200                                                                  | 130           | 200                | 200, 500  |
| <i>Phellinus hartigii</i>             | 13k    | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Phellinus igniarius</i>            | 1k     | –                                                                    | 130, 150      | 200, 250           | –         |
| <i>Phellinus pomaceus</i>             | 5k     | –                                                                    | –             | 200, 300           | 900       |
| <i>Phellinus pini</i>                 | 57     | –                                                                    | 400           | 300                | 220, 280  |
|                                       | 61     | –                                                                    | 400           | 300                | –         |
| <i>Polyporus betulinus</i>            | 36     | –                                                                    | –             | –                  | –         |
| <i>Pseudotrhametes gibbosa</i>        | 4k     | –                                                                    | 130           | 200                | –         |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>        | 704    | –                                                                    | 200           | 200                | 400, 750  |
| <i>Trametes gibbosa</i>               | 42     | 200                                                                  | 180           | 200                | 500       |
|                                       | 700    | 650                                                                  | –             | 150, 200, 180, 300 | 600       |
| <i>He определен</i>                   | 26     | –                                                                    | 130, 200      | 200, 250           | –         |
|                                       | 29     | 200                                                                  | –             | 200, 250           | –         |
|                                       | 31k    | –                                                                    | –             | –                  | –         |
|                                       | 706'   | –                                                                    | 130, 300      | 200, 250           | –         |
|                                       | 503    | –                                                                    | 130           | 200                | 350, 500  |

Примечание: Знак “–” – амплификат не обнаружен.



**Рис. 3.** Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена марганецпероксидазы в 1.5%-ном агарозном геле. Праймеры MnpF / MnpR. 1 – *T. gibbosa* (700); 2 – *P. cinnobarinus* (704); 3 – *D. confragosa* (706); 4 – 706'; 5 – 503; 6 – *P. igniarius* (1k); 7 – *T. gibbosa* (№ 42); 8 – положительный контроль *T. versicolor* (Tv); М – маркер “СибЭнзим”.

ожидаемым, даже у представителей близкого вида *T. gibbosa*, что подтверждает высокую специфичность пары праймеров LccF/LccR для вида *T. versicolor*.

С использованием менее специфичной пары праймеров 1LccF/1LccR последовательности гена лакказы были выявлены у 23 изолятов, относящихся к 16 идентифицированным и 3 неидентифицированным видам. Размер полученного ПЦР-продукта соответствовал ожидаемому у *A. mellea* (10), *D. confragosa* (706), *D. quercina* (6), *F. penicola* (3к, 8, 9), *G. lucidum* (2к), *P. igniarius* (1к), *P. gibbosa* (4к) и у двух неидентифицированных изолятов (26, 706'). Амплификаты у остальных изолятов различались по размерам, что свидетельствует о высокой вариативности последовательностей генов лакказы у разных видов базидиомицетов. Более чем у половины изолятов, проявивших положительную реакцию с праймерами 1LccF/1LccR, обнаружено по два и более амплификата разных размеров. Это может быть связано с наличием у одного изолята нескольких изоформ фермента. Так, было показано наличие двух изоформ лакказы у одного гриба – продуцента [8].

Ген марганецпероксидазы был выявлен у 18 идентифицированных и 1 неидентифицированного изолята, относящихся к 13 видам. Размер

ПЦР-продукта был близок к ожидаемому у *G. trabeum* (56), *P. betulinus* (39), *T. gibbosa* (42) и неидентифицированного изолята (503). Как и при детекции гена лакказы с помощью праймеров 1LccF/1LccR обнаружена вариативность ампликонов у большинства изолятов и наличие у некоторых из них двух продуктов реакции с праймерами MnpF/MnpR. Гены марганецпероксидазы образуют суперсемейство последовательностей, кодирующих изоформы этого фермента; также некоторые грибы могут продуцировать несколько изоформ одновременно [9].

Последовательности гена лингнинпероксидазы были выявлены у 30 изолятов, относящихся к 17 идентифицированным и 4 неидентифицированным видам. Ампликоны, соответствующие ожидаемому по длине (200 и 300 п.н.), были выявлены почти у всех из них, за исключением трех (*D. mollis* (64), *F. fomentarius* (55) и *G. trabeum* (56)). У ряда изолятов обнаружены продукты ПЦР, отличные по длине как друг от друга, так от ампликонов ожидаемого размера. Так же, как и другие ферменты лигнолитического комплекса, лингнинпероксидазы имеют несколько изоформ. Различия ампликонов по размерам и обнаружение дополнительных полос могут быть связаны с этим.

Последовательности генов всех трех ферментов одновременно были выявлены у 15 изолятов: *A. mellea* (10), *F. fomentarius* (35), *F. penicola* (7, 8, 9), *G. trabeum* (56), *H. fasciculare* (69), *L. betulinus* (708), *P. ostreatus* (1В), *P. betulinus* (39), *P. pini* (57), *P. cinnobarinus* (704), *T. gibbosa* (700, 42) и неидентифицированного изолята (503).

Не у всех изолятов, отнесенных к одному виду, показана идентичность спектров продуктов амплификации генов лигнолитических ферментов. Такие результаты могут быть связаны с тем, что один гриб может синтезировать несколько изоформ ферментов, следовательно, возможны различия и между изолятами. Ферменты лигнолитического комплекса различаются и по катализируемым реакциям, и по субстратам, следовательно, могут окислять различные мономеры и фрагменты молекулы лигнина или промежуточные продукты на разных этапах его деградации [1]. Эта особенность лигнолитического комплекса позволяет объяснить тот факт, что, помимо видов, имеющих гены всех трех лигнолитических ферментов, существуют еще и виды, имеющие по два или по одному из этих генов; возможно, данные грибы либо одновременно обитают на одном субстрате, либо сменяют друг друга по мере разрушения древесины.

В результате проделанной работы выявлены 15 изолятов грибов 11 видов, имеющих гены всех трех ферментов лигнолитического комплекса, в том числе: *A. mellea* (10), *F. pinicola* (35), *F. penicola* (7, 8, 9), *G. trabeum* (56), *H. fasciculare* (69), *L. betu-*

*lina* (708), *P. ostreatus* (1B), *P. betulinus* (39), *P. pini* (57), *P. cinnabarinus* (704), *Tr. gibbosa* (700, 42), неидентифицированный изолят (503). У большинства указанных видов активность лигнолитических ферментов ранее не изучалась. Впервые гены лигнолитических ферментов обнаружены у *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, *P. cinnabarinus*. Отобранные изоляты перспективны для дальнейшего изучения как возможные продуценты ферментов лигнолитического комплекса, сравнительного исследования указанных ферментов, их субстратной специфичности, физико-химических характеристик и роли в биодеструкции лигнина древесины.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. СПб.: Наука, 1995. 600 с.
2. Nariishi H., Valli K., Gold M.H. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 33. P. 23688–23695.
3. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Атыкян Н.А., Самуилов В.Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 555–560.
4. Патент РФ. 1994. № 2014610.
5. Бондарцева М.А. Определитель грибов России. Порядок афиллофоровые. СПб: Наука, 1998. 391 с.
6. Билай В.И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1977. 442 с.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
8. Болобова А.В. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Ферменты, модели, процессы. М.: Наука, 2002. 343 с.
9. Johanson T. // J. Bacteriology. 1991. № 13.

## Identification of Genes Encoding Ligninolytic Enzymes in Naturally Occurring Basidiomycete Isolates

E. A. Shevchenko, E. A. Bessolitsyna, and I. V. Darmov

Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

e-mail: bess2000@mail.ru

Received February 28, 2012

**Abstract**—The presence of genes encoding lignin peroxidase, laccase, and manganese peroxidase was assessed in more than 20 types of polypore fungi collected in the woods of Kirov oblast; the fungi studied had not been previously characterized with regard to ligninolytic enzyme production. Fifteen isolates of eleven basidiomycete species were shown to contain genes coding for all three ligninolytic enzymes. Genes coding for these enzymes were detected in *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, and *P. cinnabarinus* for the first time.