



## Ступінь генетичної диференціації локальних популяцій *Schizophyllum commune* (Agaricales, Basidiomycota) південної частини Києва

Сергій М. БОЙКО

ДУ "Інститут еволюційної екології НАН України"  
вул. Академіка Лебедева 37, Київ 03143, Україна  
[bsmbio@gmail.com](mailto:bsmbio@gmail.com)

Boiko S.M. 2019. Degree of genetic differentiation of the local populations of *Schizophyllum commune* (Agaricales, Basidiomycota) in the southern part of Kyiv. *Ukrainian Botanical Journal*, 76(5): 451–457.

Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine  
37 Lebedeva Str., Kyiv 03143, Ukraine

**Abstract.** Establishing genetic diversity of fungi is a fundamental issue related to the development of their conservation strategies. The data on genetic differentiation of the local populations of *Schizophyllum commune* in the southern part of Kyiv using polymorphic intracellular enzyme systems are provided. In total, fifteen allozymes were identified in three experimental populations of the fungus for four enzyme systems. It was demonstrated that heterozygote deficiency exists for most of the studied loci at the population level ( $F_{is} = 0.390$ ). The results show a high flow of genes between experimental populations ( $N_m = 7.12$ ) and a significant contribution of the *Amy2* locus to this index. A relationship between the genetic component and geographic coordinates of the samples was not established. Low level of genetic differentiation provides evidence in favor of fungal dispersal mostly by the spore mass. Thus the studied local populations belong to a single natural population.

**Keywords:** genetic diversity, loci, *Schizophyllum commune*, spatial structure

Submitted 12 June 2019. Published 31 October 2019

Бойко С.М. 2019. Ступінь генетичної диференціації локальних популяцій *Schizophyllum commune* (Agaricales, Basidiomycota) південної частини Києва. *Український ботанічний журнал*, 76(5): 451–457.

**Реферат.** Встановлення генетичного різноманіття грибів є фундаментальним завданням в розробці стратегій їхнього збереження. В статті наведено дані щодо генетичної диференціації локальних популяцій *Schizophyllum commune* південної частини м. Київ з використанням поліморфних внутрішньоклітинних ферментних систем. Загалом у трьох популяціях гриба для чотирьох ферментних систем було встановлено 15 аллозимних варіантів. Для більшості досліджених локусів спостерігається дефіцит гетерозигот на рівні локальної популяції ( $F_{is} = 0,390$ ). Отримані результати свідчать про високий потік генів між дослідженими популяціями ( $N_m = 7,12$ ) і значний внесок в цей показник локусу *Amy2*. Встановлено відсутність взаємозв'язку між генетичною компонентою та географічними координатами дослідних зразків. Низький рівень генетичної диференціації свідчить на користь основного способу розповсюдження гриба за допомогою спорових мас. Отже, досліджені локальні популяції є частинами єдиної природної популяції.

**Ключові слова:** генетичне різноманіття, локуси, просторова структура, *Schizophyllum commune*

### Вступ

Розуміння закономірностей формування генетичного різноманіття грибів та еволюційних процесів, що відбуваються, є фундаментальними завданнями, які пов'язані з розробкою стратегій їхнього збереження (Urbanelli et al., 2003). Використання молекулярних маркерів для досліджу-

ваних грибів дозволяє встановити географічну обмеженість потоку генів та причини, що її викликають (Hibbett et al., 1995; Kauserud, Schumacher, 2003). Маркерами можуть слугувати ділянки ДНК (продукти ПЛР) або білки організмів, протоколи виявлення яких вирізняються доступністю та повторюваністю (Xu, 2006; Mishra et al., 2010). На структуру популяцій впливають

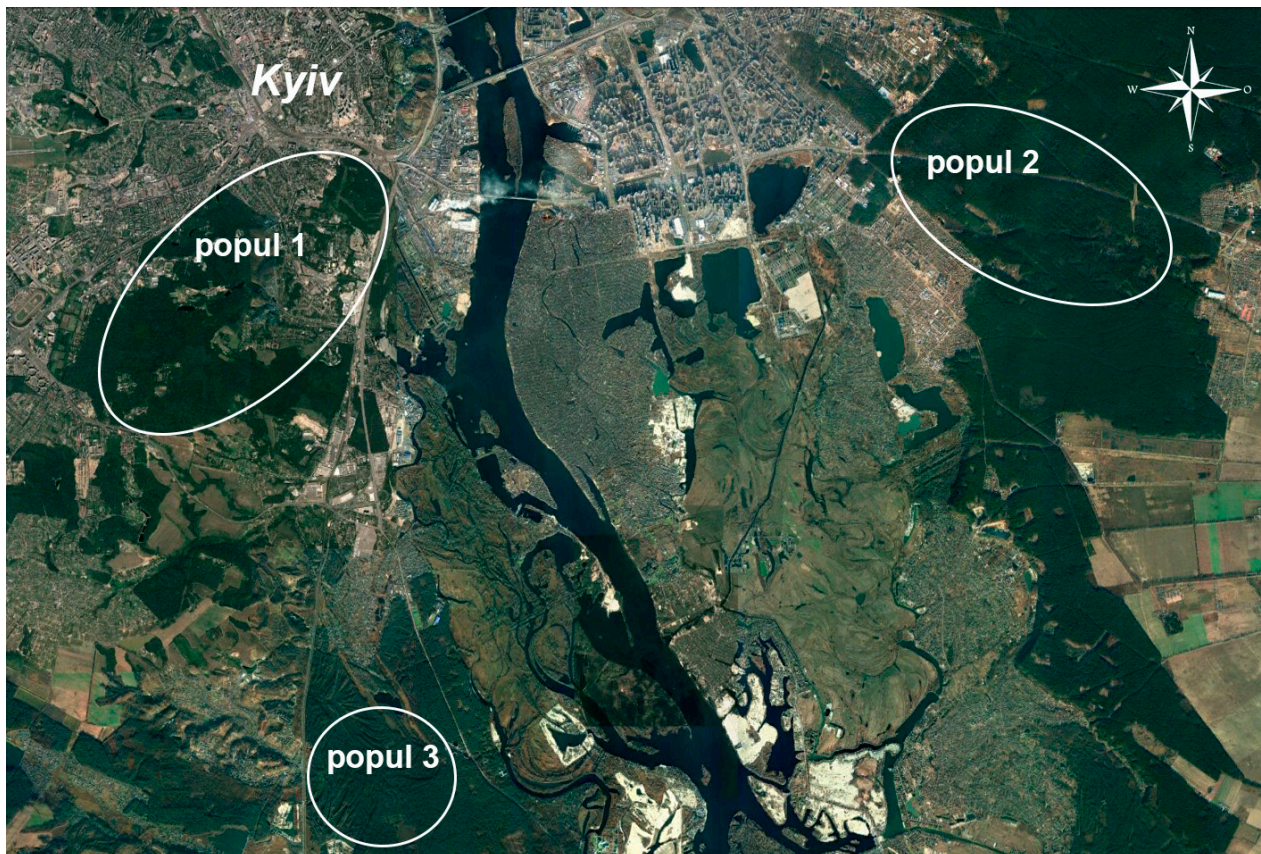


Рис. 1. Досліджені локальні популяції *Schizophyllum commune* (popul 1 – національний природний парк "Голосіївський", регіональний ландшафтний парк "Лиса гора"; popul 2 – Дарницьке лісопаркове господарство; popul 3 – Ботанічний заказник "Лісники")

Fig. 1. Experimental local populations of *Schizophyllum commune* (popul 1 – Holosiiv National Nature Park, Lysa Hora Regional Landscape Park; popul 2 – Darnytsia forest-park; popul 3 – Lisnyky Botanical Reserve)

багато факторів, у т. ч. й властива грибам система вегетативної та статевий сумісності.

Гриб-космополіт *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. є ксилотрофом, що в більшості випадків поселяється на відмерлій чи послабленій живій деревині (Rarey, 1988). Його генетична варіабельність дозволяє виділяти субструктури у великих популяціях (James et al., 1999). Використання *S. commune* як модельного об'єкта (Ohm et al., 2010) при дослідженнях на рівні локальних популяцій надасть змогу знайти рідкі (цінні) генотипи та встановити чинники, які сприяють ізоляційному процесу з можливою подальшою інтерполяцією результатів на інші види. Дуже часто зміни, що відбуваються на локальному рівні, можуть пояснити загальні популяційні процеси. Тому метою роботи було дослідити генетичні особливості локальних популяцій *S. commune* південної

частини Києва з використанням поліморфних внутрішньоклітинних ферментних систем.

### Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були дикаріотичні культури *S. commune*, отримані з 46 зразків базидіокарпів грибів з трьох локальних популяцій на території національного природного парку "Голосіївський" (НПП), регіонального ландшафтного парку (РЛП) "Лиса гора" (popul 1) (25 культур), Дарницького лісопаркового господарства (popul 2) (15 культур) та Ботанічного Заказника (БЗ) "Лісники" (popul 3) (6 культур) (рис. 1). Виділення чистих дикаріотичних культур здійснювали у асептичних умовах за методиками, наведеними нами раніше (Voiko, 2018).

Отриману культуру вирощували поверхнево на рідкому глюкозо-пептоному живильному

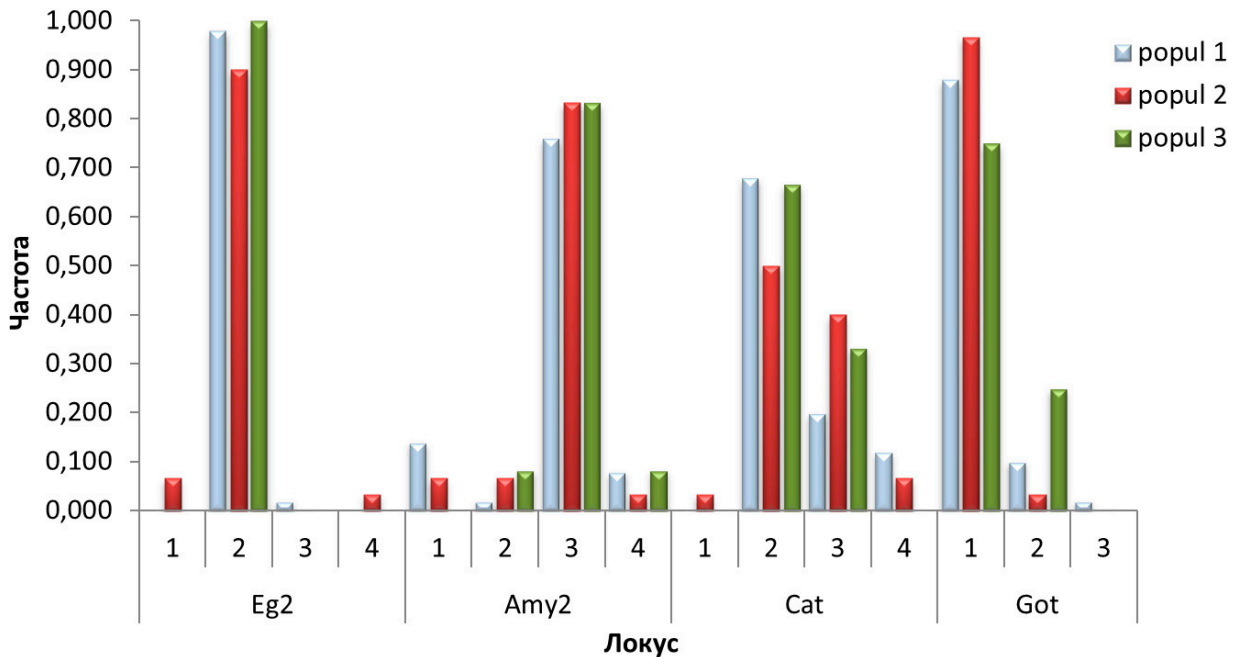


Рис. 2. Частота алелів *Schizophyllum commune* у локальних популяціях південної частини Києва

(алелі локусу Eg2: 1 –  $Eg2^{102}$ , 2 –  $Eg2^{100}$ , 3 –  $Eg2^{96}$ , 4 –  $Eg2^{93}$ ; алелі локусу Amy2: 1 –  $Amy2^{110}$ , 2 –  $Amy2^{107}$ , 3 –  $Amy2^{100}$ , 4 –  $Amy2^{95}$ ; алелі локусу Cat: 1 –  $Cat^{107}$ , 2 –  $Cat^{100}$ , 3 –  $Cat^{97}$ , 4 –  $Cat^{86}$ ; алелі локусу Got: 1 –  $Got^{100}$ , 2 –  $Got^{84}$ , 3 –  $Got^{null}$ )

Fig. 2. Alleles frequency of *Schizophyllum commune* in local populations in the southern part of Kyiv (alleles of the locus Eg2: 1 –  $Eg2^{102}$ , 2 –  $Eg2^{100}$ , 3 –  $Eg2^{96}$ , 4 –  $Eg2^{93}$ ; alleles of the locus Amy2: 1 –  $Amy2^{110}$ , 2 –  $Amy2^{107}$ , 3 –  $Amy2^{100}$ , 4 –  $Amy2^{95}$ ; alleles of the locus Cat: 1 –  $Cat^{107}$ , 2 –  $Cat^{100}$ , 3 –  $Cat^{97}$ , 4 –  $Cat^{86}$ ; alleles of the locus Got: 1 –  $Got^{100}$ , 2 –  $Got^{84}$ , 3 –  $Got^{null}$ )

середовищі,  $g \times l^{-1}$ : глюкоза – 10,0; пептон – 3,04;  $K_2HPO_4$  – 0,4;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001;  $CaCl_2$  – 0,05, яке розливали по 25 мл у колби Ерленмейера ємністю 100 мл. Культивували в живильному середовищі pH 5 за температури 28 °C упродовж 10–12 діб.

Для гістохімічних досліджень міцелій грибів попередньо тричі промивали дистильованою водою та висушували за допомогою вакуумної фільтрації, потім гомогенізували в *трис*-цитратній буферній системі та фільтрували. Концентрацію білка виміряли спектрофотометричним методом на приладі ULAB S131UV (Layne, 1957). Електрофоретичне розділення внутрішньо-клітинних білків здійснювали в 7,5- та 11,25%-му поліакриламідному гелі з використанням *трис*-гліцинової буферної системи (pH 8,3). В якості генетичних маркерів для гриба *S. commune* використовували наступні поліморфні ферментні системи (Voiko, 2015a, 2018): каталазу (CAT) (КФ 1.11.1.6), глутаматоксалоацетаттрансaminaзу (GOT) (КФ 2.6.1.1),  $\alpha$ -амілазу (AMY) (КФ 3.2.1.1), енд-

1,3(4)- $\beta$ -глюканазу (EG) (КФ 3.2.1.6) (Manchenko, 2003). Гель-документування здійснювали з використанням системи AlphaImager 2200 (Alpha Innotech), обробку електрофореграм – за допомогою програмного пакету "TotalLab TL 120".

Генетичне різноманіття популяцій характеризували за такими показниками, як: частота алелів, середнє число алелів на локус ( $A$ ), ефективне число алелів ( $A_e$ ), індекс різноманіття за Шеноном ( $H$ ), наявна та очікувана гетерозиготність ( $H_o$  та  $H_e$ ), індекс фіксації Райта, F-статистика (Nei, 1978). Проводили просторовий генетичний аналіз даних – тест Мантеля, за яким можна перевірити статистичну залежність між географічними та генетичними дистанціями (Mantel, 1967) та аналіз головних координат (PCoA), що дозволяє знаходити та будувати основні шаблони в багатоваріантному наборі даних (декілька локусів і кілька зразків) (Zuur et al., 2007). Розрахунки здійснювали за допомогою програм POPGENE32 (Yeh et al., 2000), GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006).

Таблиця 1. Генетична варіація досліджених локальних популяцій *Schizophyllum commune* та їхня відповідність рівнянню Харді-Вайнберга

Table 1. Genetic variation of the experimental populations of *Schizophyllum commune* and their correspondence to the Hardy-Weinberg equation

Популяція	Локус	Df	c	Значення	A	A <sub>E</sub>	I	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
popul 1	<i>Eg2</i>	1	0,010	ns	3,00	1,48	0,53	0,22	0,29
	<i>Amy2</i>	6	1,692	ns					
	<i>Cat</i>	3	22,371	***					
	<i>Got</i>	3	9,298	*					
popul 2	<i>Eg2</i>	3	15,021	**	3,25	1,53	0,54	0,17	0,29
	<i>Amy2</i>	6	0,600	ns					
	<i>Cat</i>	6	15,600	*					
	<i>Got</i>	1	0,018	ns					
popul 3	<i>Eg2</i>	мономорфний			2,00	1,45	0,44	0,13	0,30
	<i>Amy2</i>	3	0,240	ns					
	<i>Cat</i>	1	6,000	*					
	<i>Got</i>	1	1,852	ns					

Df – ступінь свободи; A – середнє число алелів на локус; A<sub>E</sub> – середнє ефективне число алелів; I – індекс різноманіття за Шеноном; наявна (H<sub>o</sub>) та очікувана (H<sub>e</sub>) гетерозиготність; ns = не суттєве. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Таблиця 2. Індекс Фіксації Райта за алелями у локальних популяціях *Schizophyllum commune*

Table 2. Wright's fixation index for alleles in local populations of *Schizophyllum commune*

Популяція	Локус			
	<i>Eg2</i>	<i>Amy2</i>	<i>Cat</i>	<i>Got</i>
popul 1	-0,0204	0,0909	0,4205	0,0706
popul 2	0,6386	-0,1278	0,6578	-0,0345
popul 3	–	-0,1429	1,0000	0,5556
Загалом	0,4831	0,0193	0,5887	0,2232

Таблиця 3. Структура локальних популяцій *Schizophyllum commune* за F-статистикою

Table 3. Structure of local populations of *Schizophyllum commune* by F-statistics

Локус	F <sub>is</sub>	F <sub>it</sub>	F <sub>st</sub>	N <sub>m</sub>
<i>Eg2</i>	0,523	0,542	0,039	6,127
<i>Amy2</i>	-0,044	-0,026	0,017	14,365
<i>Cat</i>	0,683	0,693	0,031	7,742
<i>Got</i>	0,338	0,384	0,069	3,362
Середнє	0,390	0,411	0,034	7,120

## Результати та обговорення

Загалом у трьох досліджених локальних популяціях гриба *S. commune* південної частини Києва для чотирьох ферментних систем було встановлено 15 алозимних варіантів. Домінуючі алелі в різних популяціях співпадали, проте їхні частоти коливалися (рис. 2).

Так, для локусу *Eg2* частота алеля *Eg2*<sup>100</sup> має найвищий показник, що коливається в межах 0,9–1,0. Для алеля *Got*<sup>100</sup> він становив 0,75–0,97. Такі високі показники за наявності загальної поліморфності локусу, на нашу думку, можуть свідчити про присутність чинників, що впливають на розповсюдження генотипу. Частково це підтверджується порушеннями рівняння Харді-Вайнберга для деяких алелів (табл. 1).

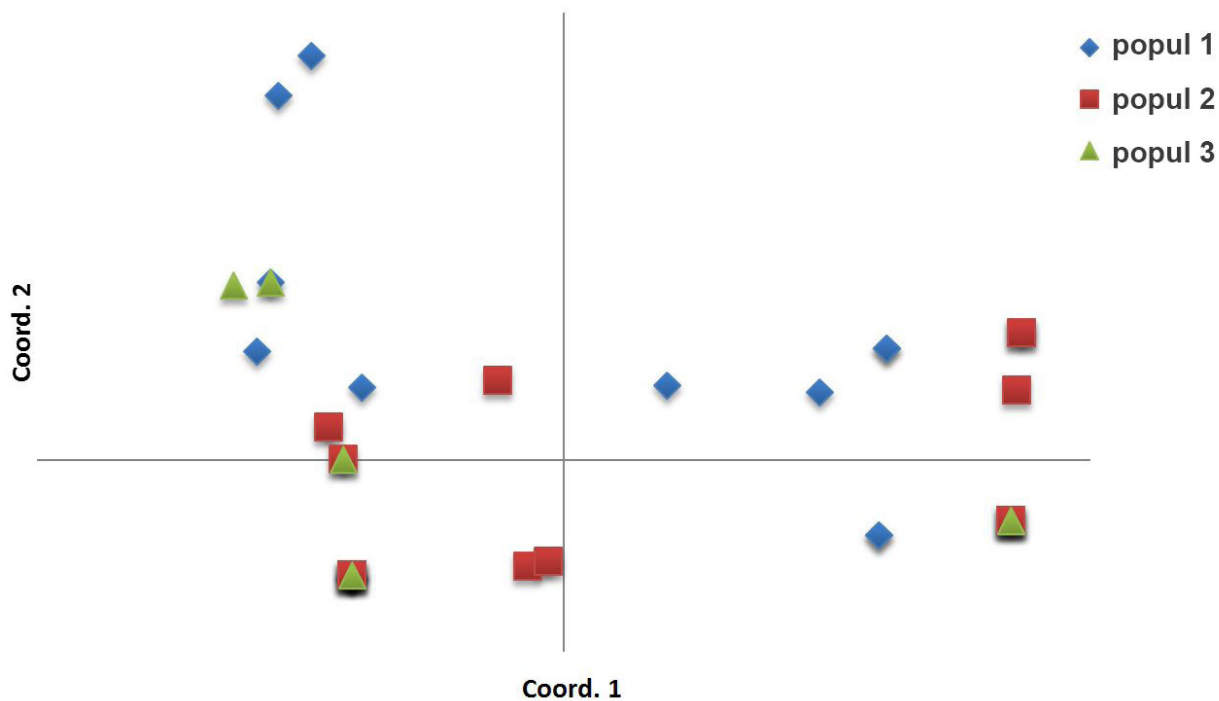


Рис. 3. Положення зразків *Schizophyllum commune* у просторі перших двох головних координат  
 Fig. 3. Location of the *Schizophyllum commune* samples within the space of the first two principal coordinates

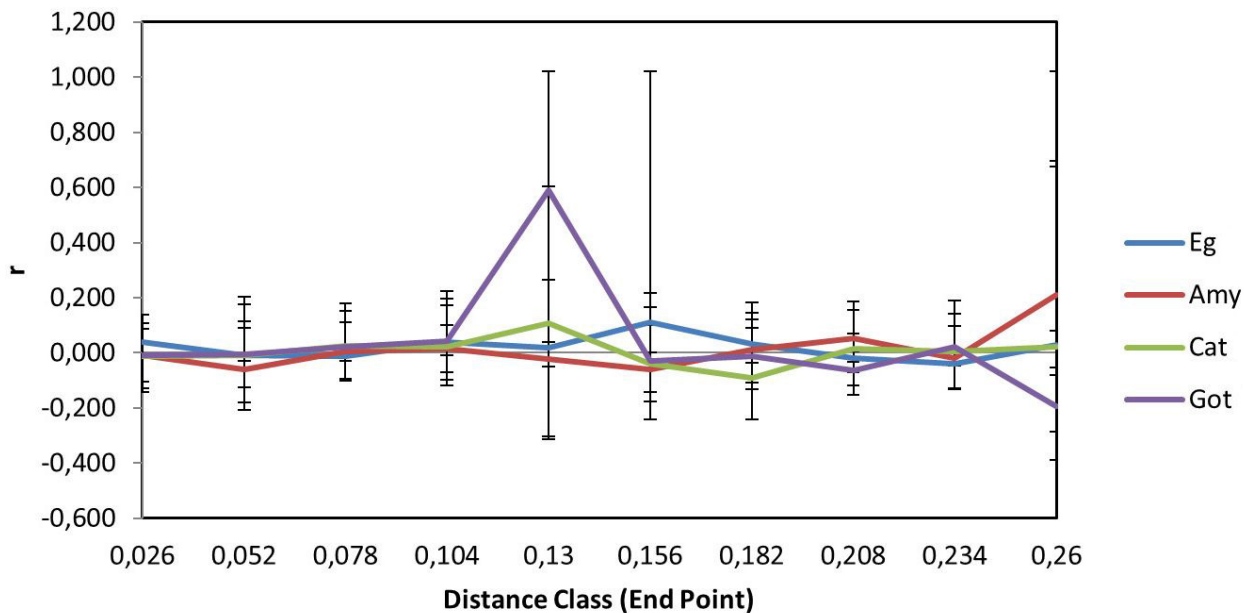


Рис. 4. Корелограми локусів *Schizophyllum commune*  
 Fig. 4. Correlograms of *Schizophyllum commune* loci

За середнім числом алелів на локус та індексом різноманіття  $ropul\ 3$  значно поступається іншим, однак внесок середнього числа алелів у алельне різноманіття (1,45) знаходиться на рівні з  $ropul\ 1$  (1,48). Загальним для всіх досліджених популяцій був значний дефіцит гетерозигот, особливо для  $ropul\ 3$ . Найбільший дефіцит гетерозигот у всіх локальних популяціях спостерігається за локусом *Cat*, у  $ropul\ 2$  за локусом *Eg2* та *Got* у  $ropul\ 3$  (табл. 2).

Найбільш збалансованим є локус *Amy2*. Подібні показники генетичної варіації характерні для популяції грибів урочища Феофанія (Boiko, 2018), але в ній, на відміну, спостерігається надлишок гетерозигот за локусами *Amy2* та *Got*. Визначення генетичної віддаленості між дослідними популяціями проводили за допомогою F статистики (табл. 3).

Встановлено, що для більшості досліджених локусів *S. commune* спостерігається дефіцит гетерозигот на рівні локальної популяції ( $F_{is} = 0.390$ ). У сукупній вибірці популяцій окремих базидіокарп виявляє 41,1% дефіциту гетерозигот виду в цілому. В дослідних популяціях ступінь диференціації генів за частотами алелей є низьким, і це вказує на те, що 96,6% усього генетичного різноманіття знаходиться всередині кожної популяції. Отримані дані свідчать про достатньо високий потік генів у досліджених популяціях ( $N_m = 7,12$ ) і значний внесок у цей показник локусу *Amy2*. Низьке генетичне різноманіття та високий потік генів спостерігається в популяціях, які підтримуються за рахунок розповсюдження спор (Dam, 2013).

Застосування кластерного аналізу (UPGMA алгоритм) дозволило виявити відособленість  $ropul\ 2$  від інших. Кластеризація може бути пов'язана з фактором дистанції між локальними популяціями. З метою виявлення просторової структурованості популяцій *S. commune* застосовували різні методи. Так, тест Мантеля показав, що виконується нульова гіпотеза ( $R^2 = 0,0012$ ), тобто відсутній взаємозв'язок між генетичною компонентою та географічними координатами дослідних зразків. При застосуванні методу головних координат було виявлено взаємозв'язок зразків за генетичним матеріалом у просторі, встановлена подібність дослідних популяцій та найбільший внесок  $ropul\ 1$  у різноманіття за другою головною координатою (рис. 3).

Враховуючи незначну відстань між локаціями, було задіяно просторово-структурний аналіз, який дозволяє виявити кореляцію розповсюдження генотипів у просторі (рис. 4).

Після аналізу отриманих даних можна стверджувати, що жодної структурованості генотипів *S. commune* між дослідженими локальними популяціями не спостерігається.

Порівнюючи дані з раніше отриманими (Boiko, 2015b), ми виявили загальні тенденції: високий потік генів, що зменшується зі збільшенням відстані між локальними популяціями, та низький рівень генетичної диференціації, які свідчать на користь основного способу розповсюдження гриба за допомогою спорових мас.

## Висновки

Для чотирьох ферментних систем трьох локальних популяцій *S. commune* південної частини Києва було встановлено 15 алотипів. Всі досліджені популяції мали значний дефіцит гетерозигот та низький ступінь диференціації генів, що є наслідком високого значення потоку генів ( $N_m = 7,12$ ). Це свідчить про основний спосіб підтримання популяцій за рахунок розповсюдження спор. Виявлена кластеризація вірогідніше за все пов'язана з фактором дистанції між популяціями. Встановлено відсутність взаємозв'язку між генетичною компонентою та географічними координатами зразків, а просторово-структурний аналіз не виявив жодної структурованості генотипів *S. commune*. Отже, отримані нами результати підтверджують те, що досліджені локальні популяції є частинами єдиної природної популяції.

## СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Boiko S.M. 2015a. Allozyme polymorphism in mono- and dikaryotic cultures of fungus *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*). *Cytology and Genetics*, 49(1): 27–31. <https://doi.org/10.3103/S009545271501003X>
- Boiko S.M. 2015b. *Ukrainian Botanical Journal*, 72(3): 252–256. [Бойко С.М. 2015. Генетична різноманітність популяцій *Schizophyllum commune* (*Basidiomycetes*) на півночі Донецької області. *Український ботанічний журнал*, 72(3): 252–256]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj72.03.252>
- Boiko S.M. 2018. *Ukrainian Botanical Journal*, 75(2): 191–196. [Бойко С.М. 2018. Стан популяції *Schizophyllum commune* (*Agaricales*, *Basidiomycota*) на території урочища Феофанія. *Український ботанічний*

- журнал, 75(2): 191–196]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj75.02.191>
- Dam N. 2013. Spores do travel. *Mycologia*, 105: 1618–1622. <https://doi.org/10.3852/13-035>
- Hibbett D.S., Fukumasa-Nakai Y., Tsuneda A., Donoghue M.J. 1995. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87: 618–638. <https://doi.org/10.2307/3760806>
- James T.Y., Porter D., Hamrick J.L., Vilgalys R. 1999. Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom *Schizophyllum commune*. *Evolution*, 53(6): 1665–1677. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04552.x>
- Kauserud H., Schumacher T. 2003. Regional and local population structure of the pioneer wood-decay fungus *Trichaptum abietinum*. *Mycologia*, 95(3): 416–425.
- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 3: 447–455.
- Manchenko G.P. 2003. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton, FL: CRC Press, 553 pp.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209–220.
- Mishra A.K., Sharma K., Misra R.S. 2010. Isozyme and PCR-based genotyping of epidemic *Phytophthora colocaliae* associated with taro leaf blight. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(14): 1367–1380. <https://doi.org/10.1080/03235400802476450>
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Ohm R.A., de Jong J.F., Lugones L.G., Aerts A., Kothe E., Stajich J.E., de Vries R.P., Record E., Levasseur A., Baker S.E., Bartholomew K.A., Coutinho P.M., Erdmann S., Fowler T.J., Gathman A.C., Lombard V., Henrissat B., Knabe N., Kües U., Lilly W.W., Lindquist E., Lucas S., Magnuson J.K., Piumi F., Raudaskoski M., Salamov A., Schmutz J., Schwarze F.W., van Kuyk P.A., Horton J.S., Grigoriev I.V., Wösten H.A. 2010. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, 28(9): 957–963. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1643>
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAIEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Raper C.A. 1988. *Schizophyllum commune*, a model for genetic studies of the Basidiomycotina. In: *Genetics of Plant Pathogenic Fungi*. Ed. G.S. Sidhu. London: Acad. Press, pp. 511–522. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-033706-4.50038-4>
- Urbanelli S., Della Rosa V., Fanelli C., Fabbri A.A., Reverberi M. 2003. Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quèl and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Quèl. *Heredity*. 90(3): 253–259. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800239>
- Xu J. 2006. Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Current issues in molecular biology*, 8(2): 75–89.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyun J.M. 2000. *POPGENE 32, Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, Version 1.32*. Edmonton, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Available at: <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>
- Zuur A.F., Ieno E.N., Smith G.M. 2007. *Analysing Ecological Data*. New York: Springer, 672 pp. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-45972-1>

Рекомендує до друку М.М. Сухомлин