

С.М. БОЙКО

Інститут еволюційної екології НАН України
вул. Акад. Лебедєва, 37, м. Київ, 03143, Україна
bsm73@ukr.net

ГЕНЕТИЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ ПОПУЛЯЦІЙ *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* (*BASIDIOMYCETES*) НА ПІВНОЧІ ДОНЕЦЬКОЇ ОБЛАСТІ

Бойко С.М. Генетична різноманітність популяцій *Schizophyllum commune* (*Basidiomycetes*) на півночі Донецької області. — Укр. ботан. журн. — 2015. — 72(3): 252–256.

З'ясовано, що природні популяції *Schizophyllum commune* Fr., які зростають на півночі Донецької обл., мають високий поліморфізм (75 %) і в середньому три алелі на локус. Надлишок гетерозигот свідчить про суттєве значення статевого процесу в обміні генетичною інформацією, а інтенсивний потік генів уможливує концентрацію 96 % усієї генетичної різноманітності виду в кожній із досліджуваних популяцій. Кластерний аналіз допоміг встановити відособленість популяції в районі с. Дронівка через механічне перешкоджання розповсюдженню генетичного матеріалу. Низький рівень індексу фіксації (Fst) дозволяє припустити, що ми маємо справу з єдиною популяцією *Sch. commune*.

Ключові слова: *Schizophyllum commune*, популяція, ферментна система, алелі

Вступ

Мікобіота є суттєвою частиною біоценозів як за своєю біомасою, так і за функціональним навантаженням. Щороку з'являються відомості про нові види та їхні місцезнаходження (Khouksvort, 1992; Kaounas et al., 2011; Dudka et al., 2013; Hernández-Restrepo et al., 2014; Prydiuk, 2014; Lombard et al., 2015). Водночас дослідження грибів на рівні популяцій нині залишаються нечисленими. Це пояснюється особливостями будови та фізіології грибів, а також працездатністю самого процесу їхнього вивчення. У природі іноді досить важко відокремити грибні індивідууми один від одного. Деякі особливості грибів, зокрема статева та вегетативна сумісність, інбридинг, багатостатевість, дають підстави говорити про відмінність таких вибірок від «класичних» моделей популяційної генетики. Для їх дослідження часто застосовують молекулярні методи, які уможливають вивчення множинних молекулярних форм ферментних систем (Linde et al., 1990; Shnyreva et al., 2004; Voiko, 2011). Наявність гаплоїдної та диплоїдної фаз у життєвому циклі грибів дає змогу вивчати динаміку алелів у природних популяціях. Володіючи знаннями з якісного складу певних ендоферментних систем грибів, які реалізуються кодомінантно, можна дослідити зміни, що відбуваються в межах виду, та визначити територіальні межі популяції.

Мета даної роботи — здійснити порівняльний аналіз природних популяцій *Schizophyllum commune* Fr., які зростають на півночі Донецької області.

Об'єкти та методи досліджень

Ми вивчали дикаріотичні культури *Sch. commune*, виділені з плодових тіл грибів, виявлених на деревних породах на півночі Донецької обл. Умовно зразки поділили на три популяції, які зростали біля м. Святогірська (вісім базидіокарпів), с. Щурове (сім базидіокарпів) і с. Дронівка (шість базидіокарпів) (рис. 1). Відстань між зразками в кожній популяції була 50–70 м.

Виділення чистої культури здійснювали за загальновідомими методами з використанням пероксиду водню (Bilal, 1982). Одержану чисту культуру вирощували поверхнево на рідкому глюкозо-пептонному живильному середовищі (глюкоза — 10,0 г/л; пептон — 3,0 г/л; K_2HPO_4 — 0,4 г/л; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,5 г/л; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ — 0,001 г/л; $CaCl_2$ — 0,05 г/л), яке розливали по 50 мл у колби Ерленмейера ємністю 250 мл. Початковий рівень рН живильного середовища становив 5,0 одиниць. Культивування відбувалося за температури 28°C протягом 15–18 діб (Voiko, 2011).

Монокаріотичні культури отримували методом спорових відбитків. Чистоту та належність їх до моноспорових культур контролювали за допомогою мікроскопії. Загальна кількість дикаріотичних



Рис. 1. Місця збирання базидіокарпів *Schizophyllum commune* на півночі Донецької області
 Fig. 1. Collection sites of the basidiocarps of *Schizophyllum commune* in the north of Donetsk Region

культур — 21, а монокаріотичних, отриманих із базидіокарпів, більше 180.

Міцелій грибів тричі промивали дистильованою водою та висушували згідно з методикою вакуумної фільтрації, потім гомогенізували в трис-цитратній буферній системі та фільтрували. Кількість білка, що вносили в лунку, коливалась у межах 40—60 мкг. Електрофоретичний поділ внутрішньоклітинних білків виконували у 7,5 %- та 11,25 %-вому поліакриламідному гелі з використанням трис-гліцинової буферної системи (рН 8,3). Гістохімічно виявляли зони активності для таких ферментів: α -амілаза (AMY) (КФ 3.2.1.1), супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаміназа (GOT) (КФ 2.6.1.1), кисла фосфатаза (ACP) (КФ 3.1.3.2) (Korochkin et al., 1977; Manchenko, 2003).

Генетичний контроль за електрофоретичними варіантами ферментів установлений у наших попередніх дослідках (Voiko, 2011, 2015).

Генетичне різноманіття популяцій характеризували за такими показниками, як поліморфність локусів (P), середнє число алелів на локус (A), ефективне число алелів (A_E), індекс різноманіття за Шеноном (I), гетерозиготність, що спостерігається та очікується (H_o і H_e), потік генів (N_m), генетична відстань Нея (D) (Nei, 1978). Генетичну ди-

ференціацію природних популяцій оцінювали за допомогою F-статистики Райта (Nei, 1977). Популяційно-генетичні показники розраховували за допомогою програми POPGENE32 (Yeh et al., 1999).

Результати дослідження та їх обговорення

Щоб повністю уявити процеси, які відбуваються на рівні популяції, потрібно виявити ознаки, котрі з'являються та накопичуються в особин виду, зрозуміти процес їхньої рекомбінації та можливий потік генів до інших груп. Ми обрали внутрішньоклітинні ферментні системи як ознаку, що безпосередньо відображає наявну генетичну інформацію, котра реалізується незалежно від зовнішніх факторів.

У ході електрофоретичного аналізу внутрішньоклітинних ферментних систем культур *Sch. commune* зазначених популяцій виявлено 12 алейних варіантів, що перебувають під контролем чотирьох ген-ферментних локусів (табл. 1).

Частка поліморфних локусів становила 75 %. В усіх вибірках локус *Sod* був мономорфним. Частоти алелів поліморфних локусів для всіх популяцій наведені в табл. 2. Якщо розглядати кожну популяцію окремо, то різниця була виявлена лише для популяції 2 (с. Щурове), де максимальна частота (0,4583) відзначена для алеля 2 локусу *Got*. Що ж стосується всіх популяцій загалом, то максималь-

Таблиця 1. Ферменти, локуси й алелі з їх електрофоретичними швидкостями *Schizophyllum commune*

Назва	Абревіатура	Локуси	Алелі (номер — відносна рухливість)	Rf
α-амілаза	AMY	Amy-2	1—95	0,39
			2—100	0,41
			3—106	0,43
			4—110	0,45
Глутамат-оксалоацетат-трансаміназа	GOT	Got	1—82	0,27 0,33
			2—91	0,30
			3—100	0,30 0,33
			4—109	0,30 0,36
Кисла фосфатаза	ACP	Acp	1—94	0,36
			2—100	0,39 0,42
			3—108	0,42
Супероксид-дисмутаза	SOD	Sod	100	0,15 0,18 0,22 0,25 0,28

на частота спостерігається для алеля 3 локусу *Got* (0,4286). Також можна відзначити суттєве накопичення у всіх популяціях алеля *Acp*¹⁰⁰ (0,8333).

Середнє число алелів на локус (A) для популяцій *Sch. commune* становить 3,0, а ефективне число — 1,65 (табл. 3). Загальне генетичне різноманіття (I) для всіх популяцій за ізоферментними локусами було вищим (0,5719), ніж для кожної окремої ви-

Таблиця 2. Частота алелів ізоферментних локусів *Sch. commune*

Алель	Локуси			
	<i>Amy2</i>	<i>Got</i>	<i>Acp</i>	<i>Sod</i>
1	0,0714	0,1429	0,1429	1,0000
2	0,8095	0,4048	0,8333	—
3	0,0952	0,4286	0,0238	—
4	0,0238	0,0238	—	—

бірки (наприклад, для популяцій поблизу с. Дробівка — 0,5141; с. Щурове — 0,5284).

Цікаві значення показала F-статистика. Середнє значення F_{is} на рівні — 0,3384 свідчить про надлишок гетерозигот у кожній популяції. Це підтверджує також і переважаючий рівень гетерозигот, що спостерігаються (H_o), над рівнем їхнього очікування (H_e). Індекс фіксації (F_{st}), який оцінює ступінь генетичної диференціації між вибірками, був доволі низький і свідчив про те, що приблизно 96 % усього генетичного різноманіття можна знайти всередині кожної популяції. Усе це вказує на суттєвий внесок статевого процесу в розвиток кожної популяції. Крім того, високе значення потоку генів (5,9389) між популяціями свідчить про значну інтенсивність обміну генетичним матеріалом. У міжпопуляційну складову мінливості найбільшим є внесок локусу *Acp* ($F_{st}=0,087$).

Кластерний аналіз (UPGMA-алгоритм) на основі генетичної відстані за Неєм допоміг встановити деяку відособленість популяції з с. Дронівка (рис. 2). Досліджувані популяції зростають поблизу русла р. Сіверський Донець і розміщені за течією в такій послідовності: м. Святогірськ, с. Щурове, с. Дронівка (рис. 1). За таких умов течія відіграє суттєву роль у розповсюдженні генетичного матеріалу, що відбувається або через спорову масу, або

Таблиця 3. Генетичне різноманіття та F-статистика за Райтом природних популяцій *Sch. commune* на півночі Донецької області

Локус	A	A_E	I	H_o	H_e	F-статистика за Райтом			
						F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
<i>Amy2</i>	4,0	1,4924	0,6725	0,3333	0,3380	-0,1391	-0,1117	0,0241	10,1256
<i>Got</i>	4,0	2,7138	1,0962	0,9048	0,6469	-0,4917	-0,4500	0,0279	8,7071
<i>Acp</i>	3,0	1,3978	0,5189	0,3333	0,2915	-0,2230	-0,1166	0,0870	2,6237
<i>Sod</i>	1,0	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	—	—	0,0000	—
Середнє значення	3,0	1,6510	0,5719	0,3929	0,3191	-0,3384	-0,2843	0,0404	5,9389

П р и м і т к а: A — середнє число алелів на локус; A_E — ефективне число алелів на локус; I — індекс генетичного різноманіття за Шеноном; H_o — гетерозиготність, що спостерігається; H_e — гетерозиготність, яка очікується; F_{is} — відхилення від частоти трапляння генотипів за випадкового схрещування відповідно до рівняння Харді—Вайнберга; F_{it} — зниження рівня гетерозиготності за умови невідповідних схрещувань у межах популяції; F_{st} — міра генетичної диференціації між субпопуляціями; N_m — потік генів.

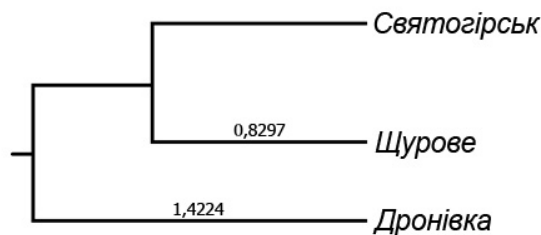


Рис. 2. UPGMA-дендрограма генетичної схожості популяцій *Schizophyllum commune*, що зростають на півночі Донецької обл.

Fig. 2. Fig. 2. UPGMA-dendrogram of genetic similarity of the populations of *Schizophyllum commune* in the north of Donetsk Region

частинами талому. Відокремлення популяції з (с. Дронівка) можна пояснити наявністю дамби, розташованої поблизу смт Райгородок, що є перешкодою для вільного пересування генетичного матеріалу. Проте, як зазначалося вище, потік генів між популяціями доволі високий (N_m) і не дає змоги суттєво накопичувати в будь-якій із них «особливі» ознаки.

Висновки

Дослідження показали, що природні популяції *Sch. commune* з півночі Донецької обл. мають високий поліморфізм (75 %) та в середньому три алелі на локус. Отримані результати дуже близькі до одержаних раніше нами та іншими авторами (James et al., 1999; Voiko, 2015). Надлишок гетерозигот свідчить про суттєву роль статевого процесу в обміні генетичною інформацією, а інтенсивний потік генів дає змогу концентрувати 96 % усієї генетичної різноманітності виду в кожній із досліджених популяцій. Кластерний аналіз допоміг виявити відособленість популяції з (с. Дронівка) від інших через механічну перешкоду розповсюдженню генетичного матеріалу. Низький рівень індексу фіксації (F_{st}) дозволяє припустити, що ми маємо справу з єдиною популяцією *Sch. commune*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bilal V.I., 1982. — Kiev: Nauk. dumka. — 550 p. [Булай В.И. Методы экспериментальной микологии. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.].
- Voiko S.M., 2011. — Ukr. botan. zhurn. — 68(4). — P. 598—603 [Бойко С.М. Зміна ізоферментного складу культури гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) залежно від віку міцелію // Укр. ботан. журн. — 2011. — 68(4). — С. 598—603].

Boiko S.M. Allozyme polymorphism in mono- and dikaryotic cultures of fungus *Schizophyllum commune* Fr. / (*Basidiomycetes*) // Cytology and Genetics. — 2015. — 49(1). — P. 27—31.

Dudka I.O., Haiyova V.P., Korytnianska V.H., 2013. — Ukr. botan. zhurn. — 70(6). — P. 776—780 [Дудка І.О., Гайова В.П., Коритнянська В.Г. Перша в Україні знахідка *Peronospora verbenae* на *Verbena officinalis* // Укр. ботан. журн. — 2013. — 70(6). — С. 776—780].

Hernández-Restrepo M., Gené J., Castañeda-Ruiz R. F., Kirk P. M.; Guarro J. A new species of *Corynesporopsis* from Spain // Mycotaxon. — 2014. — 127. — P. 155—160.

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.

Kaounas V., Assyov B., Alvarado P. New data on hypogeous fungi from Greece with special reference to *Wakefieldia macrospora* (*Hymenogastraceae*, *Agaricales*) and *Geopora clausa* (*Pyronemataceae*, *Pezizales*) // Mycologia Balcanica. — 2011. — 8. — P. 105—113.

Khouksvort D.L., 1992. — Mikol. i fitopatol. — 26(2). — P. 152—166 [Хоуксворт Д.Л. Общее количество грибов, их значение в функционировании экосистем, сохранение и значение для человека // Микол. и фитопатол. — 1992. — 26(2). — С. 152—166].

Korochkin L.I., Serov O.L., Pudovkin A.I., Aronshtam A.A., Borkin L.Ia., Maletckii S.I., Poliakova E.V., Manchenko G.P., 1977. — M.: Nauka. — 275 p. [Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.].

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.

Lombard L., Chen S.F., Mou X., Zhou X.D., Crous P.W., Wingfield M.J. New species, hyper-diversity and potential importance of *Calonectria* spp. from *Eucalyptus* in South China // Studies in Mycology. — 2015. — 80. — P. 151—188.

Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. — CRC Press, 2003. — 553 p.

Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations // Ann. Hum. Genet. — 1977. — 41. — P. 225—233.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. — 1978. — 89. — P. 583—590.

Prydiuk M.P., 2014. — Ukr. botan. zhurn. — 71(1). — P. 71—78 [Прудюк М.П. Нові та рідкісні для України види родини *Coprinaceae*. 1. Роди *Lacrymaria* та *Panaeolus* // Укр. ботан. журн. — 2014. — 71(1). — С. 71—78].

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 // Russian J. of Genetics. — 2004. — 40(8). — P. 871—881.

Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE Version 1.32. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Univ. Alberta. Center Intern. Forestry Res., 1999.

Рекомендує до друку
І.О. Дудка

Надійшла 02.03.2015 р.

Бойко С.М. Генетическое разнообразие популяций *Schizophyllum commune* (Basidiomycetes) на севере Донецкой области. — Укр. ботан. журн. — 2015. — 72(3): 252—256.

Институт эволюционной экологии НАН Украины,
г. Киев

Установлено, что естественные популяции *Schizophyllum commune* Fr., произрастающие на севере Донецкой обл., имеют высокий полиморфизм (75 %) и в среднем три аллеля на локус. Излишек гетерозигот свидетельствует о существенной роли полового процесса в обмене генетической информацией, а интенсивный поток генов позволяет концентрировать 96 % всего генетического разнообразия вида в каждой из исследуемых популяций. Кластерный анализ помог установить обособленность популяции в районе с. Дроновка из-за механической помехи распространению генетического материала. Низкий уровень индекса фиксации (F_{st}) позволяет предположить, что мы имеем дело с единой популяцией *Schizophyllum commune*.

Ключевые слова: *Schizophyllum commune*, популяция, ферментная система, аллели.

Boiko S.M. Genetic diversity of populations of *Schizophyllum commune* (Basidiomycetes) in the north of Donetsk Region. — Ukr. Bot. J. — 2015. — 72(30): 252—256.

Institute for Evolutionary Ecology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

Natural populations of *Schizophyllum commune* Fr. in the north of Donetsk Region demonstrate high polymorphism (75 %). An average of three alleles per locus was established. The excess of heterozygotes suggests an important role of the sexual process in the exchange of genetic information, and the intensity of gene flow allows to concentrate 96 % of the genetic diversity of the species in each of the studied population. Cluster analysis revealed isolation of populations within the area near Dronovka village, due to mechanical interference of the spread of genetic material. Low levels of fixation index (F_{st}) suggests that we are dealing with a single population of *Schizophyllum commune*.

Key words: *Schizophyllum commune*, population, ферментная система, alleles.

—НОВІ ВИДАННЯ

Актуальні проблеми ботаніки та екології: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених. — Умань: Видавець «Сочінський», 2014. — 180 с.

У збірнику вміщено матеріали, представлені на Міжнародній конференції молодих учених. Праці авторів охоплюють низку питань: зокрема, теоретичні та практичні аспекти мікології, бріології, ліхенології, альгології, систематики та флористики судинних рослин, екології та фітоценології, експериментальної ботаніки, а також дендрології, інтродукції рослин і ландшафтної архітектури.

Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження Глобальної стратегії збереження рослин. Збірник: Матеріали III Міжнародної наукової конференції (4—7 червня 2014 р., м. Львів). — Львів, 2014. — 251 с.

Видання розраховане на ботаніків, мікологів, екологів, викладачів, аспірантів, студентів природничих спеціальностей, працівників у сфері охорони природи.