

## Hübriidisatsioon ja heteroploidsus kui bioloogilise mitmekesisuse allikad hüüfe moodustavatel seentel

*Bellis Kullman*

Seentel on Maa toitumisahelates väga tähtis osa. On nii majanduslikult kasulikke liike, nagu mükoriisaseened, kui ka patogeenseid seeni, mis laastavad taimepopulatsioone. Seente evolutsiooni uurimine on olnud kuni molekulaarse fülogeneetika esilekerkimiseni ääretult raske. Viimase aastakümne jooksul on neid uusi meetodeid rakendades tehtud jahmatavaid avastusi, mille hulka kuulub ka seente liikidevahelise hübriidisatsiooni võime (Schardl & Craven, 2003).

Seeneriigis valitsevad haploidid, vahel küll dikarüootsel viisil. Kui inimesel saavad ema munarakk ja isa seemnerakk kokku, siis seeneeosed, munaraku ja seemneraku ekvivalendid, idanevad eraldi hüüfideks. Tavaliselt peetakse seeneks selle viljakeha, tegelikult on seen ise aga maa all ja ajab seal oma niidistikku laiali. Nõiaringsis kasvavad seened on tegelikult kõik üks ja sama seen, selle erinevad viljakehad. Nagu õunapuu ja õunad.

Teineteise äratundmiseks võivad kaks ühetuumsete rakkudega hüüfi kasutada feromooni. Seejärel võib toimuda midagi sellist, mida me oleme harjunud seksiks pidama. Kui hüüfide tuumadel on erinev nn paarumiskahv, siis moodustatakse nende vahele torujas kanal, mille kaudu kumbki hüüf saab teiselt tuuma, mida siis kogu hüüfi pikkuses paljundatakse. Võiks öelda, et kandseente haploidsete hüüfide anastomoseerumisel on toimunud tuumade „ristsiire“. Sissetunginud tuum migreerub kiiresti rakust raku, ise mitootiliselt jagunedes. Selle tulemusel muutub monokarüootne mütseel dikarüootseks, kaksiktuumseks. Migratsiooniteed markeerivad hüüfirakkude vahetuleks tekivad pandlad (fenotüübi muutus!?). Nüüd võib ehk hakata geeniekspressioon toimuma sarnaselt diploididele, s.t. meile, inimestele. Tähelepanuväärne erinevus võrreldes näiteks inimese genoomiga on asjaolu, et vanematelt saadud geneetilist materjali hoitakse eri tuumades. Seentele on iseloomulik suletud mitoos: tuumamembraan säilib tuuma jagunemisel, tuuma jagunemine meenutab tihti amitoosi (Kullman, 2004).

Seentele on tüüpiline kromosoomi pikkuse polümorfism (CLP) aneuploidsus, mtDNA rekombinantsus ning transposonite, viiruste ja mitmesuguste funktsioonidega plasmiidide (nt. killerplasmiidid) olemasolu rakus (Weber, 1993, Zolan, 1995, Saville et al., 1998, Beadle et al., 2003); esineb horisontaalne geeniülekanne (Kullman, 2002). See kõik annab mitmeid varuvariante mitmekesisuse suurendamiseks ka siis, kui puudub suguline paljunemine.

Seentele kõige olulisem iseärasus on hüüfi tipmine kasv, mis tagab genoomi sobilike muutuste edasikandumise, pärandumise vegetatiivse kasvu käigus. Radiaalselt levivad hüüfid võivad oma tippudes kanda erinevaid genoome (tekkinud mutatsioonide, tuumade „ristsiirde“, paraseksi jm. tulemusel) ja neid erinevates tingimustes, erinevatele kasvusubstraatidele levides läbi katsetada. (Seened on välispidise seedimisega, nagu bakteridki absorbeerivad nad toitaineid, olles neid eelnevalt ensüümidega lagundanud.)

Loeb see, mis juhtub hüüfi tipurakus. Iduplasma ja somatoplasma on siin üks ja seesama. Nad pole eristunud nagu teame selle olevat loomariigile iseloomuliku, kus munaraku tekkele järgneb kudedeks diferentseerumine. Üldjuhul seentel pole kudesid (erandiks on selts Laboulbeniales) ja „munarakk“, kui see tuumade liitumisel eoskoti või eoskanna näol tekib, taandub kohe haploidseteks eosteks – sügootne meiosis.

Mutatsioonid on toormaterjal evolutsiooniks, kuid mõningail juhtudel annab liikidevaheline hübriidisatsioon evolutsiooniks lisavõimalusi, põhjustades laiaulatuslikke muutusi genoomi struktuuris ja geenivahetust lähedaste liikide vahel.

Liikidevahelist hübriidisatsiooni tunti taimedel juba ammu. Seentel on hübriidiseerimiseks mitmeid erinevaid mehhanisme. Hübrididid võivad moodustuda kas osalise või täieliku seksuaaltsükli või paraseksuaalse protsessi käigus.

Sugulise paljunemise käigus liituvad sobivate ristumistüüpidega isas- ja emasstruktuurid kahetuumse faasi tekkeks. Kahetuumnes olekus

viibimise ajaline kestus erineb liigiti. Hübriidid võivad säilitada kaksiktuumse faasi pikkadeks aastateks. Kui aga tuumad liituvad, järgneb sellele kohe meioos – sügootne meioos, mis taastab esialgse euploidse oleku (paljude seente jaoks tähendab see haploidset olekut). Mitte-euploidsed ehk heteroploidsed hübriidid võivad tekkida ebanormaalse meioosi käigus. Kromosoomide või kromosoomifragmente kaotades peavad nad oma genoomis säilitama vähemalt need geenid, milleta elu pole võimalik, et paljuneda edaspidi kasvõi ainult vegetatiivselt.

Heteroploidsuse kohta võib kirjanduses leida vastukäivaid andmeid (Tolmsoff 1983, Beadle 2003, Bresinsky et al. 1987). Meie poolt koostatud seente genoomi suuruse andmebaas <http://www.zbi.ee/fungal-genomesize> (Kullman et al. 2005a, Tamm et al., 2005) sisaldab üle 1000 kirje. Välja on toodud kasutatud meetodid, genoomi suurus, kromosoomide arv jm. Uurides põhiliselt mittesuguliselt paljunevaid seeni ja kasutades elektroforeetilist karüotüüpiseerimist on leitud, et seeneliigi sees on genoomi suuruse ja kromosoomide arvu varieerumine pigem reegel kui erand (Beadle 2003). Vastuoksa, suguliselt paljunevaid seeni tsütofluoromeetriliselt uurides on leitud, et liigi sees on tüvede ja varieteetide tuumade DNA sisaldus stabiilne; samas on leitud suuri erinevusi liikide vahel ühe perekonna piires ja seltsi piires perekondade vahel (Bresinsky et al., 1987). Näib, et sugulise paljunemise võimeta liigi genoomi suurus on ebapüsivam kui suguliselt paljunevatel liikidel, mis viitab meioosi osale liigispetsiifilise genoomi suuruse kujunemisel.

Kummatigi esineb sugulise paljunemise kaotanud vegetatiivselt paljunevatel seentel rekombinatsioone. Nende teket võib seostada horisontaalse geeniülekanne (HGT) (Kullman, 2002a) ja paraseksuaaltsükli olemasoluga seentel (Kullman, 2004). Nii on seen *Penicillium chrysogenum* saanud oma penitsilliini tootva geeni HGT käigus bakterilt (Penalva et al., 1990.) Riikide vahel esineb geeniülekanne harva kuid ühe seeneperekonna liikide vahel võib introgressioon ja hübriidiseerumine olla üsna tavaline ning avalduda võrkja evolutsioonina.

Paraseksuaalset hübriidisatsiooni on üldiselt peetud liigisiseseks mehhanismiks, kuid rohttaimede endofüütidel ja arbuskulaarset mükoriisat moodustavatel seentel esineb ka liikidevahelist hübriidiseerumist (Schardl & Craven, 2003). Paraseksuaalne tsükkel algab vegetatiivsete rakkude liitumisega ja kahe erineva genotüübiga paljutuumsete rakkude tekkimisega. Tuumade liitudes võib kromosoomide vahel toimuda mitootiline ristsiire. Stohhastiliste protsesside käigus kaob kromosoome ja tekib palju uusi genotüüpe (Papa 1979; Caten 1981).

Seened, eriti kottseened on kohastunud kiireks evolutsiooniks tänu haploidisusele, lühikesele generatsiooniajale ja anastomooside olemasolule, mis võimaldab sugulist ja/või paraseksuaalset geenivahetust genotüüpide või isegi liikide vahel. Haploidse genoomi kiire replitseerumine tagab suure hulga mutatsioonide kiire leviku, samas paraseksuaalsus ja liikidevaheline ristumine aitavad kaasa introgressioonile ja genoomi laiaulatuslikele ümberkorraldustele. Hübriidide tunnused ei ole mitte ainult segu vanemate tunnustest. Hübriidid võivad omada täiesti uusi võimeid ja asustada uusi ökoloogilisi nišše. Järjest enam tehakse kindlaks nii sugulise kui mittesugulise päritoluga hübriide. Liikidevahelisi hübriide võib kohata enamikus seenehõimkondades (Schardl & Craven, 2003).

Rääkides liikidevahelistest hübriididest lähtume sellest, et nende vanemad on liigid, mis vastavad kindlatele kriteeriumitele (Clardige *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999, 2000; Schardl & Craven, 2003). Kohn (2006) tõdeb oma ülevaateartiklis, et seeneliigi tekkemehhanismid vajavad põhjalikumat analüüsi. Seente liigikontseptsioonile on pööratud vähe tähelepanu, kuigi seeneliike on kirjeldatud 100 000 kuni 1 500 000. Valitsevad kolm liigikontseptsiooni: morfoloogiline, bioloogiline ja fülogeneetiline, millest viimane leiab mükoloogide hulgas järjest enam poolehoidu. Fülogeneetilise liigikontseptsiooni puhul lähtutakse monofüleetiliste gruppide olemasolust, kuid kuna selline grupp võib esindada iga taksonoomilist tasandit, mitte ainult liiki, siis on vaja inkorporeerida morfoloogilise või ka bioloogilise liigi kriteeriumid fülogeneetilisse liigikontseptsiooni (Schardl & Craven, 2003).

Paljudel juhtudel langevad erinevate kriteeriumide järgi eristatud liigid ühte, kuid harvad pole juhud, kus morfoloogilise ja/või bioloogilise kontseptsiooni kriteeriumide järgi eristatud liigid moodustavad ühe fülogeneetilise liigi. Heidi Tamme (2004) uuringud näitasid, et morfoloogiliste kriteeriumite järgi eristatud liigid *Peziza varia* ja *P. violacea* kompleksides moodustavad vastavalt vaid ühe või siis kaks fülogeneetilist liiki. Konflikt fülogeneetiliste ja teiste liigikriteeriumite vahel ilmnes perekonna *Epichloë* uuringutes, kus fülogeneetiliste kriteeriumite alusel polnud võimalik eristada liike *E. typhina* ja *E. sylvatica* hoolimata sellest, et need kaks liiki pole interfertiilsed, kasvavad erinevatel peremeestaimedel ja on eristatavad morfoloogiliselt (Schardl & Craven, 2003, Box 1). Veelgi enam, selle perekonna liigid moodustavad mittesugulises staadiumis omavahel heteroploidseid hübriide (Kuldau *et al.*, 1999). Liikidevaheline hübriidatsioon on ilmselt palju tähtsam evolutsiooniline protsess paljudes seenerühmades, kui seni arvatud.

Kuigi liikidevaheline hübriidiseerumine teeb liikide piiritlemist fülogeneetilise analüüsi abil keerulisemaks, vähendades toetust ristuvate liikide klaadidele, annab just fülogeneetiline liigikontseptsioon kõige kindlama evolutsioonilise baasi seente süstemaatikale. Liikidevahelised hübriidid on identifitseeritavad teatud markerite abil. *Epichloë/Neotyphoideum* liikide puhul on kasutatud hübriidsete tüvede tuvastamiseks markerina  $\beta$ -tubuliini geeni (*tub2*) (Schardl & Craven, 2003). Kim *et al.* (2001) kasutasid geenidevahelise speisserregiooni (*intergenic spacer*, IGS) RFLP mustreid perekonna *Armillaria* liigisisese ja liikidevahelise hübriidiseerumise tuvastamiseks. Fülogeneetilistest uuringutest nähtub, et iga heteroploid omab mingit osa või kogu geneetilist materjali, mis on pärit kahelt või enamalt eellaselt (Moon *et al.* 2000, 2002; Craven *et al.* 2001a).

Seda, mis juhtub hübriidse genoomi suurusega sügootses meiosis, näitab ühe viljakeha eosproovi (sisuliselt F1) DNA-sisalduse analüüs. Meie poolt tehtud uuringud näitasid, et *Pleurotus*, *Lentinula*, *Phellinus* ja *Cystoderma* liikide eosproovides võib esineda kahesuguse genoomi suurusega aneuploidseid või heteroploidseid eospopulatsioone (Kullman, 2000, 2002b, Kullman *et al.*, 2005b, Irja Saare ja Margus Pedaste avaldamata materjalid).

Seentel on liikidevahelise hübriidi vormiks kaksiktuum (dikaarüon), kus tuumad pärinevad eri liikidesse kuulunud vanematelt (Schardl & Craven, 2003). Looduses kasvades võib kompleksi *Pleurotus ostreatus* kuuluva seene mütseel sisaldada kahe erineva teisikliigi testtüvedega sobivaid tuumi. Võib arvata, et selline seen on hübriid. Antud juhul moodustavad dikaarüoni tuumad, mis sobivad kahe bioloogilise liigikriteeriumi alusel eristatud liigi tuumadga. Nimelt selliste tuumadega monospoorsed hüüfid kultuuris kokku ei kasva, nad on interinkompatiibilsed.

Möödunud aastal Moskva Ülikoolis kaitstud doktoritöös (Шнырева, 2005) käsitleti uut genotüüpide rekombinatsiooni tüüpi looduses, kus substraadil kasvav viljakehi moodustav dikarüootne mütseel võib vahetada tuumi eostest kasvama hakanud (homokarüootsete) hüüfidega, ise sel viisil korduvalt dikarüotiseerudes. Teiste sõnadega, dikarüootne mütseel liitub monokarüootsega ja moodustub mütseel kolme geneetiliselt erineva tuumaga, millede jaotumine sellel mütseelil kasvavatesse viljakehadesse on juhuslik. Shnyreva (Шнырева, 2005) nimetab uut rekombinatsioonitüüpi kitsamas mõttes mittemeiootiliseks. Kirjeldatud asjaolu näib kokku sobivat M. Öpiku (1995) poolt saadud tulemustega, kus ta sai di-mono ristustel dikarüootse mütseeli sobivuse kolme liigi monokarüootsete testtüvedega.

Hübriidide esinemist kandseente looduslikes populatsioonides näib kinnitavat erineva genoomi suurusega eospopulatsioonide lahkumine meiosis. Looduses kasvanud seen, kelle eosproovis avaldus eoste divergents DNA ja valgu sisalduse alusel, oli oma viljakeha ja kultuuritunnuste poolest liikide *P. osteratus* ja *P. pulmonarius* vahepealsete tunnustega (A. Kollomi määrang). Seente genoomi suuruse andmebaas (Kullman, *et al.*, 2005a) näitab, et liigi *P. ostreatus* genoomi varieeruvus kirjandusandmete alusel ja meie poolt saadud genoomi suurused jäävad samadesse piiridesse. Saadud kromosoomide arvu ja genoomi suuruse erinevus avaldub kui aneuploidsus ja heteroploidsus. Austerservikul tuntakse ka konidiaalset, mittesugulist paljunemist, mis võib omakorda olla üks genoomi suuruse mitmekesisuse allikas.

Tööstuslikult kasvatatava tüve eosproovis avaldus divergents veelgi markantsemalt (Kullman, 2002b). Naaberperikondade *Pleurotus* ja *Lentinula* liikide, austerserviku ja shiitake, kunstlikul ristamisel saadud tüved (Ramirez Carillo & Leal Lara, 2002) produtseerisid kahesuguse genoomi suurusega eoseid, mis olid lähedased nende eellastüvedele genoomi suurustele (Kullman et al., 2005b). Võib arvata, et selline divergents kajastab hübriidse genoomi saatust meiosis (Kullman, 2000, 2002b).

Kottseente *Peziza varia* ja *P. violacea* kompleksi liikidel võib leida polüspoorsetest kultuuridest heteroploidseid hüüfe (avaldamata andmed), seetõttu võib kahtlustada neil paraseksuaalse tsükli olemasolu. *P. varia* ja *P. violacea* kompleksi liikidel esineb konidiaalstaadiumis anamorf *Oedocephalum* sp. (Öpik, 1998). Tuleks kontrollida, kas monosporsete tüvede ristamisel kultuuris esineb anastomoose, tuumade liitumist ja haploidiseerumist ning koniidide DNA-sisalduse heteroploidsust (NB! sugulisel paljunemisel liituvad tuumad alles viljakehas, vahetult enne eoskoti teket).

*P. varia* ja *P. violacea* kompleksid erinevad oma paljunemistüübi poolest. Esimene on homotalne, teine heterotalne (Weber, 1992). Valitseva seisukoha järgi on sugulise paljunemise puudumine taandareng (Yun et al., 1999). Võimalik, et paraseksuaalsusest tingitud heteroploidsus on üheks põhjuseks, miks paljudel kottseentel on suguline paljunemine kadunud. Pealtäha vegetatiivselt paljunevates seenehüüfides toimub geneetilise materjali rekombineerumine ja uute tüvede teke, mis ei allu populatsioonigeneetika seadustele.

Hübriidisatsioon ja heteroploidsus seentel alles ootab täpsemat uurimist ja rakendamist.

Artikli koostamisel on kasutatud andmeid, mis on saadud ETF grantide 3580 ja 4989 ning DAAD (1998. a., 2002. a.) ja DFG (2000. a.) uurimisgrantide käigus.

Beadle, J., Wright, M., McNeely, L. & Bennett, J.W. 2003. Electrophoretic karyotype analysis in fungi. *Advances in Applied Microbiology* 53: 243-270.

- Bresinsky, A., Wittmann-Meixner, B., Weber, E. & Fischer, M. 1987. Karyologische Untersuchungen an Pilzen mittels Fluoreszenzmikroskopie. *Zeitschrift für Mykologie* 53: 303-318.
- Caten, C.E. 1981. Parasexual processes in fungi. In: *The Fungal Nucleus* (eds Gull K., Oliver S.G.), pp. 191–214. Cambridge University Press, Cambridge. (not seen)
- Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. 1997. *Species: the Units of Biodiversity*, 1st edn. Chapman & Hall, London. (not seen)
- Craven, K.D., Hsiao, P.T.W., Leuchtman, A, Hignight, K. & Schardl, C.L. 2001. Multigene phylogeny of *Epichloë* species, fungal symbionts of grasses. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 88: 14–34.
- Kim, M.-S., Klopfenstein, N.B., McDonald, G.I., Arumuganathan, K. & Vidaver, A.K. 2001. Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCRbased techniques to assess intraspecific and interspecific matings of *Armillaria* species *Mycol. Res.* 105: 153-163.
- Kohn, L.M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annual Review of Phytopathology* 43: 279-308.
- Kuldau, G.A., Tsai, H-F. & Schardl, C.L. 1999. Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. *Mycologia*, 91: 776–782.
- Kullman, B. 2000. Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi. *Folia Cryptogamica Estonica* 36: 31-46.
- Kullman, B. 2002a. Horisontaalsest geenitülekandest seeneriigis. In: I. Puura & T. Teder (toim), Võrkude teooria. *Schola Biotheoretica* 28: 21-33. Tartu, Sulemees. 88 lk.
- Kullman, B. 2002b. Diversity of genome size in zygotic meiosis of *Pleurotus* studied by flow cytometry. In: IMC7 Book of Abstracts. Oslo. 1133.
- Kullman, B. 2004. Seksiv seen. *Eesti Loodus*, 11: 6-13.
- Kullman, B., Tamm, H., and Kullman, K. 2005a. Fungal Genome Size Database. <http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>
- Kullman, B., Greve, B. & E. Severin. 2005b. Diversity in the spore print of the hybrid of *Lentinula* and *Pleurotus* on the basis of nuclear DNA content. In: Proceedings of the XVI Symposium of Mycologists and Lichenologists of Baltic States. Cesis, Latvia. 119-123.
- Moon, C.D., Miles, C.O., Jarlfors, U. & Schardl, C.L. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. *Mycologia* 94: 694–711.
- Moon, C.D., Scott, B., Schardl, C.L., & Christensen, M.J. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia* 92: 1103–18.
- Penalva, M.A., Moya, A., Dopazo, J. & Ramon, D. 1990. Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 241: 164-169.
- Papa, K.E. 1979. Genetics of *Aspergillus flavus*: complementation and mapping of aflatoxin mutants. *Genetical Research* 34: 1–9.

- Ramirez Carillo, R. & Leal Lara, H. Breeding of *Pleurotus* and *Lentinula* hybrids by pairing of neohaplonts for commercial cultivation. In: IMC7 Book of Abstracts. Oslo. 264.
- Saville, B.J., Kohli, Y. & Anderson, J.B. 1998. mtDNA recombination in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 1331-1335.
- Schardl, C.L. & Craven, K.D. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12: 2861-2873.
- Zolan, M.E. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews*, 49: 686-698.
- Tamm, H. 2004. Seeneperekonna *Peziza* (Pezizales, Ascomycota) gruppide *P. varia* ja *P. violacea* ning lähedaste liikide fülogeneetiline analüüs rDNA ITS regiooni alusel. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool. Käsikiri.
- Tamm, H., Kullman, B. & Kullman, K. 2005. Fungal Genome Size Database. In: Programme and Book of Abstracts of XVI Symposium of Mycologists and Lichenologists of Baltic States. 44. Cesis, Latvia.
- Taylor, W., Jacobson, D.J. & Fisher, M.C. 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification *Annual Review of Phytopathology* 37: 197-246.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J. & Kroken, S. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21-32.
- Tolmsoff, W.J. 1983. Heteroploidy as a mechanism of variability among fungi. *Annual Review of Phytopathology* 21: 317-40.
- Weber, E. 1992. Untersuchungen zu Fortpflanzung und Ploidie verschiedener Ascomyceten. *Bibliotheca Mycologica* 140: 1-186.
- Weber, H. 1993. *Allgemeine Mykologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 541 pp.
- Õpik, M. 1995. Viljakehade morfoloogia, kultuuritunnused ning paarumistestid austerserviku (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm.) kompleksi kuuluvate liikide eristamisel. Diplomitöö. Tartu Ülikool. Käsikiri.
- Õpik, M. 1998. Puhaskultuuride tunnused liudikulaadsetel seentel (Pezizales) süstemaatikas. Magistritöö. Tartu Ülikool. Käsikiri.
- Yun, S.H., Berbee, M.L., Yoder, O.C. & Turgeon, B.G. 1999. Evolution of the fungal selffertile reproductive life style from selfsterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 5592-97.
- Шнырева, А. 2005 Популяционная биология грибов с гаплоидным и гаплодидикариотическим жизненными циклами. ДИССЕРТАЦИИ МГУ имени М.в. Ломоносова. Käsikiri.