

Экспериментальная эволюция базидиомицета *Schizophyllum commune*: мутагенез и естественный отбор

Безменова А.В.¹, Звягина Е.А.², Неретина Т.В.^{1,3}, Базыкин Г.А.^{1,4},
Кондрашов А.С.⁵

¹ НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ, ² Юганский заповедник,
³ Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, ⁴ ИППИ РАН,
⁵ University of Michigan

e-mail: bsshka@yandex.ru

Аннотация

Базидиомицет *Schizophyllum commune* – уникальный модельный организм, который характеризуется наивысшей генетической изменчивостью среди изученных организмов, которая может достигать 20% в популяции. Помимо этого, *S. commune* обладает сравнительно высокой скоростью мутагенеза – порядка $2 \cdot 10^{-8}$ замен на нуклеотид на поколение. Мы разработали методику изучения параметров накопления *de novo* мутаций в геноме *S. commune* в процессе линейного роста мицелия, их влияния на приспособленность гриба, а также изучения спектра коэффициентов отбора против *de novo* мутаций.

Ключевые слова: Скорость спонтанного мутагенеза; *Schizophyllum commune*; эффективная численность популяции

Мутационный процесс является одним из ключевых аспектов эволюции, поэтому изучение его параметров является одной из важнейших задач эволюционной биологии. Скорость мутагенеза может быть оценена с помощью не прямых подходов, основанных на внутривидовых и межвидовых различиях, однако эти методы могут быть неточными в силу зависимости от параметров и моделей. За последнее десятилетие, благодаря развитию технологий секвенирования нового поколения, стало возможным исследовать скорость мутагенеза напрямую, секвенируя полные геномы

особей в течении многих поколений. Этот метод был применен к ряду модельных организмов, таких как *Saccharomyces cerevisiae* (Lynch et al., 2008)(Keightley et al., 2014), *Chlamydomonas reinhardtii* (Sung et al., 2012), *Caenorhabditis elegans* (Denver et al., 2004)(Denver et al., 2009), *Drosophila melanogaster* (Haag-Liautard et al., 2007)(Keightley et al., 2009)(Schridder et al., 2013) и *Arabidopsis thaliana* (Ossowski et al., 2010). Однако высшие грибы с этой точки зрения до сих пор не изучались.

Schizophyllum commune – ксилотрофный базидиомицет, широко распространенный в умеренных широтах. В жизненном цикле *S. commune* есть свободноживущая гаплоидная стадия; возможно культивирование изолированных гаплоидных моноспоровых культур, выращенных из одной споры, которые в дальнейшем будут размножаться только вегетативным путем. Мицелий гаплокарриона *S. commune* состоит из одноядерных клеток, длина клеток варьирует от 30 до 200 мкм, в среднем 80 мкм (FEEDERICK MONROE, 1922). Гифы *S. commune* растут апикально со средней скоростью порядка 5 мм в сутки. Таким образом, за 100 дней мицелий преодолевает расстояние в 500 мм, пройдя через примерно 6000 клеточных делений. Геном *S. commune* составляет порядка 38.5 мб (Ohm et al., 2010), точность репликативных полимераз составляет примерно 10^{-10} , таким образом, через 100 дней можно ожидать появления 25 *de novo* мутаций на геном, а через год – порядка 90 мутаций на геном.

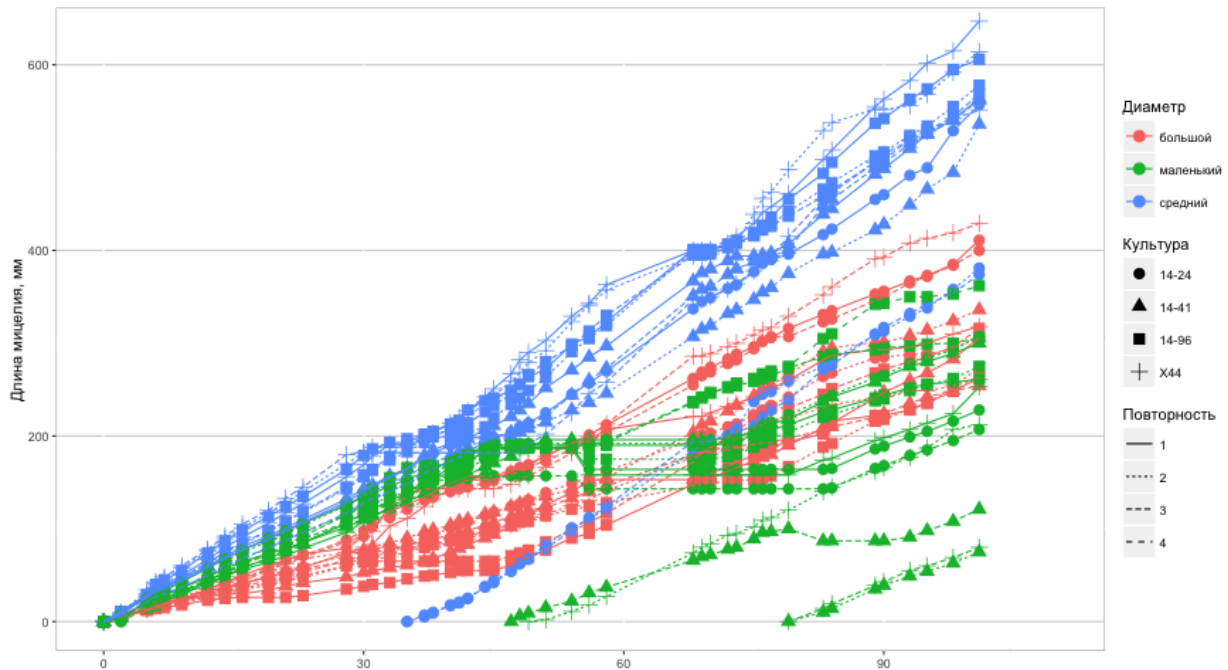


Рис. 1. Графики роста культур.

Помимо этого, есть возможность влиять на эффективность естественного отбора в популяции ветвящихся гиф мицелия *S. commune*. Культуры можно растить на твердой среде в трубочках разного диаметра, регулируя, таким образом, среднее число гиф, прорастающих одновременно через срез трубочки. В достаточно толстой трубочке естественный отбор будет эффективным, в то время как в очень тонких трубочках число гиф будет мало, и отбор будет неэффективным. В этом случае можно ожидать накопление вредных мутаций в мицелии в процессе роста и, возможно, замедление скорости роста, в то время как в толстых трубочках скорость роста будет оставаться постоянной и будут накапливаться только нейтральные мутации. Таким образом, варьируя толщину трубочек, можно регулировать эффективную численность гиф и эффективность отбора и их влияние на накопление различных типов мутаций и приспособленность (скорость роста).

Мы разработали методику культивирования *S. commune* на твердой среде в трубочках трех разных диаметров – 0.8-0.9 мм, 5 мм и 15 мм при комнатной температуре на свету. В тонких трубочках число гиф в срезе трубочки имеет порядок 10^1 . Мы начали выращивать четыре моноспоровых культуры *S. commune* (три из американской популяции и одна из русской) в трех (для одной культуры – в четырех) повторностях в трубочках каждого из трех диаметров. Длины трубочек составляют порядка 20 см, поэтому примерно каждый месяц необходимо пересаживать культуру в новую

трубочку. При каждой пересадке часть мицелия отсаживается и замораживается при -20°C .

На рис. 1 показаны графики роста культур. В начале быстрее всего росли культуры в средних трубочках (~ 6 мм/сут), медленнее всего росли культуры в толстых трубочках (~ 2 мм/сут), в тонких трубочках культуры росли со скоростью ~ 4 мм/сут. В дальнейшем в толстых трубочках рост ускорился до ~ 3 мм/сут. Замедления скорости роста, заметные на графике, в основном связаны с несовершенством экспериментальной системы. В частности, посадка мицелия в тонкие трубочки не всегда происходит успешно. Никакого систематического замедления скорости роста мицелиев пока не наблюдается.

Мы планируем продолжать культивировать *S. commune*, секвенировать мицелии культур в разных точках роста и исследовать параметры мутационного процесса, такие как скорость появления *de novo* мутаций, их спектр и распределение вдоль генома, а так же влияние эффективной численности гиф мицелия.

Список литературы

- Denver, D.R., Morris, K., Kewalramani, A., Harris, K.E., Chow, A., Estes, S., Lynch, M., and Thomas, W.K. (2004). Abundance, distribution, and mutation rates of homopolymeric nucleotide runs in the genome of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Evol.* 58, 584–595.
- Denver, D.R., Dolan, P.C., Wilhelm, L.J., Sung, W., Lucas-Lledó, J.I., Howe, D.K., Lewis, S.C., Okamoto, K., Thomas, W.K., Lynch, M., et al. (2009). A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16310–16314.

FEEDERICK MONROE, E. (1922). THE MORPHOLOGY, DEVELOPMENT, AND ECONOMIC ASPECTS OF SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FRIES. Univ. Calif. Publ. Bot. 7, 447–498.

Haag-Liautard, C., Dorris, M., Maside, X., Macaskill, S., Halligan, D.L., Houle, D., Charlesworth, B., and Keightley, P.D. (2007). Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila*. *Nature* 445, 82–85.

Keightley, P.D., Trivedi, U., Thomson, M., Oliver, F., Kumar, S., and Blaxter, M.L. (2009). Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines. *Genome Res.* 19, 1195–1201.

Keightley, P.D., Ness, R.W., Halligan, D.L., and Haddrill, P.R. (2014). Estimation of the spontaneous mutation rate per nucleotide site in a *Drosophila melanogaster* full-sib family. *Genetics* 196, 313–320.

Lynch, M., Sung, W., Morris, K., Coffey, N., Landry, C.R., Dopman, E.B., Dickinson, W.J., Okamoto, K., Kulkarni, S., Hartl, D.L., et al. (2008). A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9272–9277.

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., et al. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nat. Biotechnol.* 28, 957–963.

Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledó, J.I., Warthmann, N., Clark, R.M., Shaw, R.G., Weigel, D., and Lynch, M. (2010). The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 327, 92–94.

Schrider, D.R., Houle, D., Lynch, M., and Hahn, M.W. (2013). Rates and genomic consequences of spontaneous mutational events in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 194, 937–954.

Sung, W., Ackerman, M.S., Miller, S.F., Doak, T.G., and Lynch, M. (2012). Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 18488–18492.