

## POROVNANIE ITS-PCR-RFLP A MALDI-TOF MS METÓD PRI IDENTIFIKÁCI DREVOZNEHODNOCUJÚCICH HÚB Z RODU *Ganoderma*

TERÉZIA GAŠPARCOVÁ<sup>a</sup>, JÁN GÁPER<sup>b,c</sup>,  
PETER PRISTAŠ<sup>d</sup>, SIMONA KVASNOVÁ<sup>a</sup>  
a SVETLANA GÁPEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra biológie a ekológie, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela, Tajovského 40, 974 01 Banská Bystrica, <sup>b</sup> Katedra biológie a všeobecnej ekológie, Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita, T. G. Masaryka 24, 960 63 Zvolen, Slovenská republika, <sup>c</sup> Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Česká republika, <sup>d</sup> Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárová 2, 041 54 Košice, Slovenská republika [terezia.gasparcova@umb.sk](mailto:terezia.gasparcova@umb.sk)

Došlo 4.11.16, prijaté 25.1.17.

Kľúčové slová: drevoznehodnocujúce huby, izoláty, plodnice, identifikácia, *Ganoderma*

### Úvod

Zástupcovia drevoznehodnocujúcich húb z rodu lesklôdovka (*Ganoderma*) patria k významným pôvodcom hnilôb dreva živých drevín. Rod *Ganoderma* P. Karst., 1881, je jedným z druhovo najpočetnejších rodov radu Polyporales<sup>1</sup>. Lesklôdovky sa vyznačujú charakteristickými výtrusmi typu bazídiospóra s dvojistou stenou a povrchovou ornamentikou<sup>2</sup>. Majú vajcovitý tvar, sú echinulátne a môžu mať predĺžený alebo trunkátny (skrátенý) vrchol. Aj keď slovenský názov tohto taxónu evokuje prítomnosť lesklého povrchu plodníc, rozlišujú sa 2 typy, plodnice s lesklým a plodnice s matným povrchom<sup>3</sup>. V Európe, vrátane Slovenska, rastie sedem druhov<sup>4</sup>: *Ganoderma lipsiense* (Batsch) G. F. Atk., *G. australe* (Fr.) Pat., *G. carnosum* Pat., *G. pfeifferi* Bres., *G. lucidum* (Curtis) P. Karst., *G. resinaceum* Boud. a *G. valesiacum* Boud.<sup>4,5</sup>. Klasická identifikácia druhov z rodu *Ganoderma* je založená hlavne na analýze a porovnaní anatomicko-morfologických charakteristík plodníc. Okrem klasických metód sa pri identifikácii organizmov do popredia čoraz viac dostávajú molekulové metódy. Zástupcovia rodu *Ganoderma* a ich identifikácia sú v ostatnej dobe záujmom mnohých vedeckých štúdií využívajúcich moderné molekulové prístupy<sup>6–10</sup>. Molekulové metódy sú založené najmä na analýze DNA, ako napr. polymorfizmus dĺžky res-

trikčných fragmentov amplifikovaného ITS medzerníka – ITS-PCR-RFLP analýza. V ostatných rokoch sa však na identifikáciu širokého spektra baktérií, mykobaktérií a húb, a to hlavne v klinických laboratóriách<sup>11</sup>, používa oveľa rýchlejšia MALDI-TOF hmotnostná spektrometria proteínových profilov – MALDI-TOF MS. Absencia hmotnostných spektier drevorozkladajúcich húb v identifikačnej databáze MALDI-TOF MS však zatiaľ neumožňuje ich identifikáciu touto metódou. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať rozlišovaciu schopnosť ITS-PCR-RFLP analýzy s nami vyvinutou metódou pre identifikáciu druhov rodu *Ganoderma* založenej na MALDI-TOF MS analýze.

### Experimentálna časť

#### Materiál

V predloženej štúdií sme použili tieto vzorky plodníc (charakteristika každej vzorky obsahuje druh lesklôdovky, miesto nálezu, hostiteľskú drevinu, dátum odberu vzorky, krstné meno a priezvisko zberateľa a určovateľa):

Č. 1 *Ganoderma carnosum*, Slovenská republika, Donovaly – osada Bully, neidentifikovateľná drešina, peň, 09.09.2015, leg. Terézia Gašparcová, det. Ján Gáper;

Č. 2 *Ganoderma pfeifferi*, Slovenská republika, Topoľčianky – park, *Tilia platyphyllos* Scop., 25.10.2015, leg. Michaela Kružlíková, det. Ján Gáper;

Č. 3 *Ganoderma lipsiense*, Slovenská republika, Korňa – súkromná záhrada, neidentifikovateľná drešina, peň, 18.10.2015, leg. Simona Kvasnová, det. Ján Gáper;

Č. 4 *Ganoderma lipsiense*, Česká republika, Domoradovice, neidentifikovateľná drešina, peň, 15.10.2015, leg. Markéta Kudělová, det. Ján Gáper;

Č. 5 *Ganoderma lipsiense*, Slovenská republika, Detva – Kameňolom Ježová, *Quercus robur* L., 21.10.2015, leg. Martin Šebesta, det. Ján Gáper;

Č. 6 *Ganoderma lipsiense*, Slovenská republika, Špania Dolina – chatová oblasť, neidentifikovateľná drešina, peň, 16.11.2015, leg. Terézia Gašparcová, det. Ján Gáper;

Č. 7 *Ganoderma australe*, Slovenská republika, Žiar nad Hronom – Park Š. Moyses, *Tilia platyphyllos* Scop., 09.01.2016, leg. Michaela Kružlíková, det. Ján Gáper.

#### Metodika

Druhy sme determinovali na základe makro- a mikroskopických analýz plodníc<sup>4,12</sup>. Z plodníc sme izolovali čisté kultúry, ktoré sme kultivovali na sladínovom agare (zloženie na 1 dm<sup>3</sup> destilovanej vody: sladový extrakt 30 g, peptón 3 g, agar 15 g; pH 5,6 ± 0,2 pri 25 °C; Milcom, Tábor, Česká republika) v termostate pri teplote 24 ± 1 °C. Na izoláciu genómovej DNA sme použili upravenú metódu, ktorú publikovali Goodwin a Lee<sup>13</sup>. Asi 100 mg mycélia sme suspendovali v 300 µl lyzačného roztoku a následne vystavili 6–10 mikrovlnným impulzom (600 W po dobu 2–4 sekundy). Následne sme pridali 300 µl čerstvého lyzačného roztoku a inkubovali 2 min pri teplote 98 °C. Získané DNA sme opakovane extrahovali

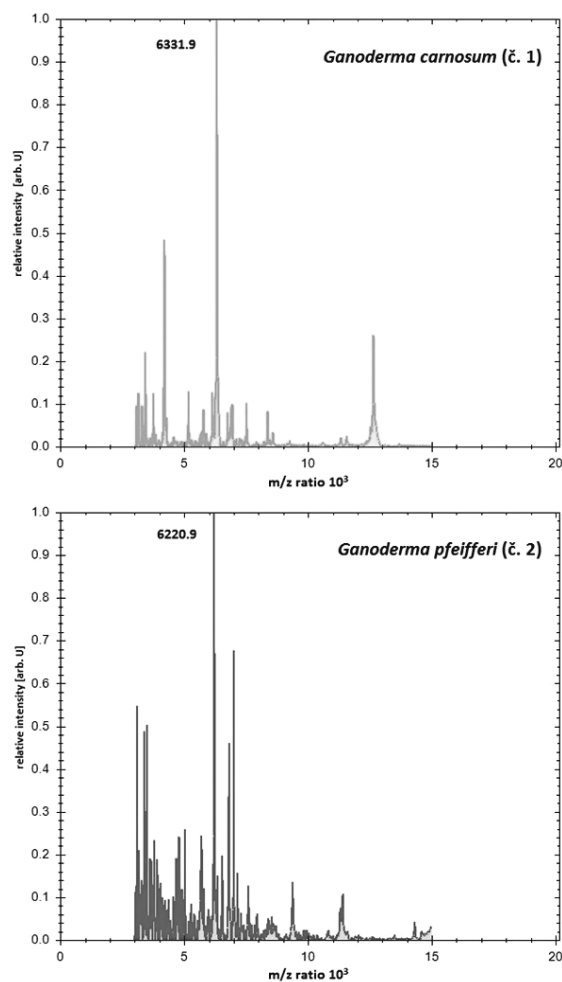
zmesou chloroform-izoamylalkohol (24:1). Čisté nukleové kyseliny sme eluovali v 50  $\mu$ l TE pufru. Získanú DNA sme podrobili elektroforetickej analýze v 1% agarózovom géli. Pri ITS-PCR-RFLP analýze sme postupovali podľa metódy Júdovej a spol.<sup>14</sup>. Na amplifikáciu ITS medzerníka sme použili špecifické priméry ITS1 a ITS4 (cit.<sup>15</sup>). PCR reakcia bola vykonaná v termocykléri MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Reakčná zmes s objemom 50  $\mu$ l obsahovala 200  $\mu$ M dNTP, 1  $\mu$ M primér ITS1, 1  $\mu$ M primér ITS4, 1,25 U Taq DNA polymeráza (Invitrogen, Paisley, UK), 5  $\mu$ l 10x PCR pufor (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng templátová DNA. Na štiepenie získaných amplifónov z ITS-PCR bola použitá restričná endonukleáza Hae-III (Fermentas GmbH, Germany). 10  $\mu$ l PCR produktu sme štiepili vybranou restričnou endonukleázou po dobu 1 hodiny podľa návodu výrobcu. Následne sme DNA fragmenty oddelili v 1,5% agarózovom géli a na porovnanie sme použili 100 bp marker molekulových veľkostí (Invitrogen, Paisley, UK). MALDI-TOF MS analýza: pre analýzu sme chemicky extrahovali bielkoviny zo vzoriek čerstvého mycélia z čistých kultúr rastúcich na sladínovom extrakte. Vzorky mycélia (50  $\mu$ g) sme suspendovali v 600  $\mu$ l destilovanej vody a inkubovali 5 min pri teplote 95 °C. Následne sme k zmesi pridali 900  $\mu$ l absolútneho etanolu, dôkladne premiešali, centrifugovali pri maximálnych otáčkach (14 000 rpm) po dobu 2 min na centrifúge Mikro 120 centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany) a supernatant odstránili. K peletu sme pridali 100  $\mu$ l 70% kyseliny mravčej, dôkladne premiešali a pridali rovnaké množstvo acetonitrilu, a opäť premiešali. Zmesnú vzorku sme centrifugovali pri maximálnych otáčkach po dobu 2 min. 1  $\mu$ l supernatantu sme naniesli na MALDI doštičku a nechali uschnúť pri laboratórnej teplote. Následne sme vzorky prekryli 1  $\mu$ l roztoku MALDI matrice (1 % roztok kyseliny alfa-kyano-4-hydroxyškoricevej v roztoku 50 % acetonitril, 47,5 % voda a 2,5 % kyselina triflóroctová) a opäť nechali uschnúť pri laboratórnej teplote. Každú vzorku sme analyzovali minimálne dva razy na prístroji Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). Zhlukovú analýzu podobnosti získaných proteínových profilov a dendrogram sme vytvorili v programe MALDI Biotyper 3.0 (Bruker).

## Výsledky a diskusia

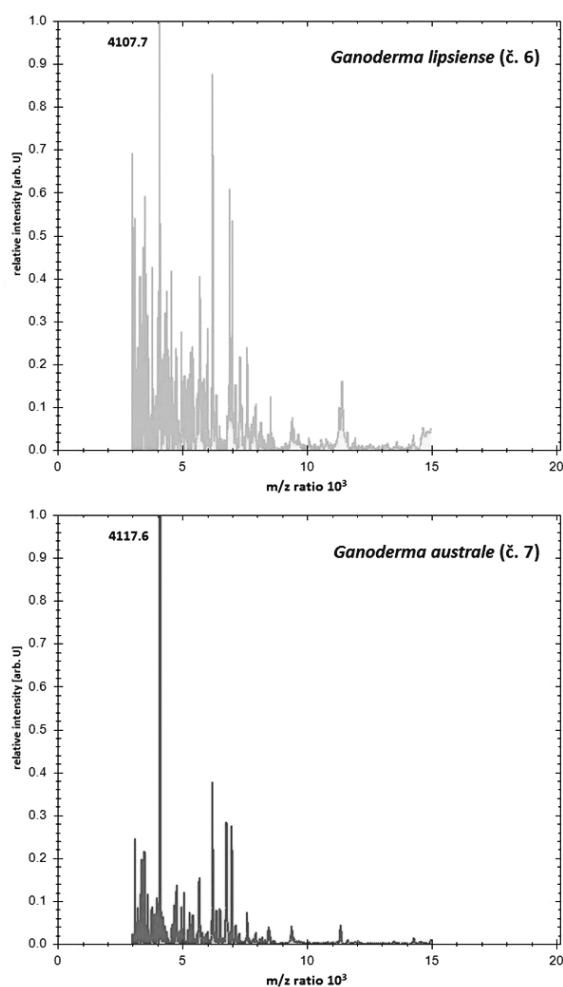
Ako vyplýva z charakteristiky biologického materiálu, anatomicko-morfologickou analýzou plodníc sme identifikovali štyri druhy lesklokôroviek – *G. carnosum*, *G. pfeifferi*, *G. lipsiense* a *G. australe*. Na základe MALDI-TOF MS analýzy sme získali dobre definované spektrá všetkých študovaných druhov s  $m/z$  hodnotami v rozmedzí 3000 až 15 000. Každý druh vykazoval špecifický dominantný band s  $m/z$  hodnotou 6331,9 pre *G. carnosum*, 6220,9 pre *G. pfeifferi*, 4107,7 pre *G. lipsiense* a 4117,6 pre *G. australe* (normalizované spektrá jednotlivých druhov sú prezentované na obr. 1 a 2). Na zhodnotenie použiteľnosti MALDI-TOF MS analýzy pre

identifikáciu a rozlíšenie húb rodu *Ganoderma* bola vykonaná zhluková analýza získaných spektier (obr. 3B). Výsledný dendrogram (obr. 3A) potvrdil, že MALDI-TOF MS analýza produkuje druhovo špecifické spektrá húb rodu *Ganoderma* a pomocou tejto analýzy môžeme vybrané druhy húb jednoznačne rozlíšiť. Kým podobnosť spektier rôznych izolátov toho istého druhu a medzi opakovanými analýzami tej istej vzorky bola veľmi vysoká (pozorovaná *distance level* menej ako 100), spektrá jednotlivých druhov sa lišili výrazne viac (pozorovaná *distance level* viac ako 450) (obr. 3A).

O použití MALDI-TOF MS analýzy pri identifikácii húb je relatívne málo literárnych odkazov. Schmidt a Kalow<sup>16</sup> prvýkrát použili túto analýzu na diferenciáciu drevorozkladajúcich húb z rodov *Serpula*, *Coniophora* a *Antrodia*. V štúdiu testovali vzorky mycélií (3 páry druhov – napr. *Serpula lacrymans* a *Serpula himantoides*), ktoré sú morfológicky veľmi podobné a len ťažko rozlíšiteľné tradičnými metódami. Na základe porovnania získa-

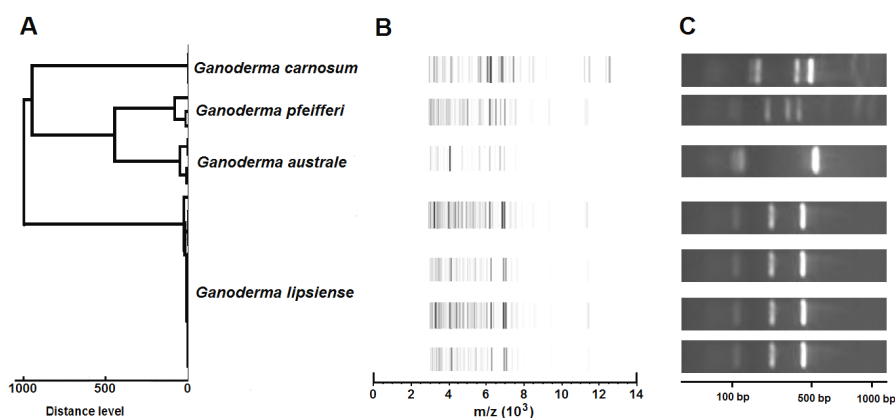


Obr. 1. Porovnanie MALDI-TOF MS normalizovaných spektier; hore *Ganoderma carnosum* (vzorka č. 1), dole *Ganoderma pfeifferi* (vzorka č. 2)



Obr. 2. Porovnanie MALDI-TOF MS normalizovaných spektrier; hore *Ganoderma lipsiense* (vzorka č. 6), dole *Ganoderma australe* (vzorka č. 7)

ných spektier zistili, že MALDI-TOF MS je vhodná na rozlíšenie testovaných vzoriek. Chalupová a spol.<sup>17</sup> sa vo svojej prehľadovej štúdií zaoberali identifikáciou húb za pomoci MALDI-TOF MS analýzy. Zástupcovia mnohých známych rodov ako *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, ale aj rôznych kvasiniek boli úspešne identifikované za pomoci MALDI-TOF MS analýzy<sup>17</sup>. Autori naznačili zaujímavý prístup identifikácie húb MALDI-TOF MS analýzou popri zaužívaných mikroskopických a molekulových metódach. Pre potvrdenie druhovej variability študovaných druhov húb sme použili ITS-PCR-RFLP analýzu, ktorou sme získali druhovo špecifické RFLP profily (obr. 3C), ktoré korelujú s výsledkami anatomicko-morfologickej charakteristiky plodníc a výsledkami MALDI-TOF MS analýzy. Štiepením PCR produktov v dráhach patriacich druhom *Ganoderma carnosum* a *Ganoderma pfeifferi* vznikli fragmenty rôznych veľkostí, čo naznačuje, že môže ísť o dva rozdielne druhy. K poštiepeniu PCR produktu v dráhe patriacej druhu *Ganoderma australe* nedošlo, čo naznačuje, že ide o geneticky rozdielne taxóny. Podobne sme pozorovali rozdielne ITS-PCR-RFLP profily u druhov *Ganoderma australe* a *Ganoderma lipsiense*. Porovnaním profilov štyroch izolátov *Ganoderma lipsiense* sme nedetegovali žiadnu vnútrodruhovú variabilitu. Na Slovensku boli pomocou molekulových analýz študované len dva druhy: *Ganoderma lipsiense* a *Ganoderma australe*, ktoré sú na základe morfologických znakov veľmi podobné. Na ich odlíšenie autori využili ITS-PCR-RFLP metódu, ktorú potvrdili mikroskopickou analýzou veľkosti bazídiospór<sup>18</sup>. Zheng a spol.<sup>19</sup> tiež využili vo svojej štúdií ITS PCR-RFLP analýzu na objasnenie genetickej diverzity komplexu *Ganoderma lucidum*. Zhuková analýza rozdelila 39 kmeňov, vrátane *Trametes versicolor* ako kontrolnej vzorky, do 7 skupín. Použitelnosť tejto metódy poukazuje na to, že štúdie na molekulovej úrovni môžu predstavovať užitočnú doplnkovú metódu k súčasnému klasifikačnému systému rodu *Ganoderma* založenom na morfologických charakteristikách<sup>19</sup>. Res-



Obr. 3. Porovnanie výsledkov MALDI-TOF MS analýzy a ITS-PCR-RFLP analýzy; A – dendrogram poukazuje na príbuznosť vzoriek študovaných húb rodu *Ganoderma* na základe porovnania hmotnostných spektier získaných analýzou MALDI-TOF MS, B – porovnanie MALDI-TOF profilov jednotlivých izolátov, C – profily štiepenia ITS sekvencií jednotlivých izolátov restriktívnou endonukleázou HaeIII

trikčnú analýzu využili vo svojej štúdií aj Júdová a spol.<sup>14</sup>, ktorí sa venovali problematike variability drevorozkladajúcej huby *Fomes fomentarius* v pohorí Vihorlatské vrchy na východnom Slovensku. ITS-PCR-RFLP analýzou zistili prítomnosť dvoch genotypov, čo bolo potvrdené aj sekvenciou analýzou. V našom prípade ITS-PCR-RFLP a MALDI-TOF MS potvrdili druhovú variabilitu izolátov rodu *Ganoderma* pozorovaných morfológicky. Vo všetkých prípadoch sme pozorovali perfektnú koreláciu medzi výsledkami ITS-PCR-RFLP analýzy, MALDI-TOF MS analýzy a anatomicko-morfológickou charakteristikou plodníc. Naše výsledky potvrdzujú, že ITS-PCR-RFLP analýza a MALDI-TOF MS analýza sú schopné rozlíšiť druhy rodu *Ganoderma* s porovnateľnou presnosťou a predstavujú tak pomerne rýchle alternatívne metódy k náročnej anatomicko-morfológickej analýze plodníc.

## Záver

V tejto štúdií bola porovnaná schopnosť novo aplikovanej metódy MALDI-TOF MS a známej metódy ITS-PCR-RFLP pre identifikáciu drevorozkladajúcich húb rodu *Ganoderma*. Anatomicko-morfológickou analýzou siedmich vzoriek plodníc sme determinovali štyri druhy. Restriktívna analýza ukázala tiež prítomnosť štyroch druhov. Rovnako MALDI-TOF MS analýzou boli získané druhovo špecifické spektrá štyroch druhov rodu *Ganoderma*. Zo získaných spektier bola urobená zhluková analýza. Výsledky ukázali, že MALDI-TOF MS analýza je schopná rozlíšiť testované druhy s porovnateľnou presnosťou ako ITS-PCR-RFLP analýza a môže byť využitá pri identifikácii druhov rodu *Ganoderma*.

*Autori ďakujú grantovým agentúram VEGA (projekt č. 1/0286/17) a KEGA (projekt č. 025UMB-4/2017) za finančnú podporu predloženej práce.*

## LITERATÚRA

- Lima Júnior N. C., Gibertoni B. T., Malosso E.: *Rev. Biol. Trop.* 62, 1197 (2014).
- Moncalvo J. M., Ryvarden L.: *A nomenclatural Study of the Ganodermataceae Donk.* Fungiflora, Oslo 1997.
- Moncalvo J.-M., v knihe: *Ganoderma Diseases of Perennial Crops* (Flood J., Bridge P.D., Holderness M., ed.), kap. 2. CABI Publishing, Wallingford 2000.
- Bernicchia A.: *Polyporaceae s.l. Fungi Europaei.* Massimo Candusso, Alassio 2005.
- Gáperová S.: *Acta Facultatis Ecologiae* 8, 93 (2001).
- Wang D.-M., Wu S.-H., Su C.-H., Peng J.-T., Shih Y.-H., Chen L.-C.: *Bot. Stud.* 50, 451 (2009).
- Nusaibah S. A., Latiffah Z., Hassaan A. R.: *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34, 83 (2011).
- Wang X.-C., Xi R.-J., Li Y., Wang D.-M., Yao Y.-J.: *PLoS One* 7, e40857 (2012).
- Cao Y., Wu S.-H., Dai Y.-C.: *Fungal Divers.* 56, 49 (2012).
- Zhou L.-W., Cao Y., Wu S.-H., Vlasák J., Li D. -W., Li M.-J., Dai Y.-C.: *Phytochemistry* 114, 7 (2015).
- Fournier P.-E., Drancourt M., Colson P., Rolain J.-M., La Scola B., Raoult D.: *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 574 (2013).
- Breitenbach J., Kränzlin F.: *Fungi of Switzerland. Non gilled fungi. Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gastromycetes.* Mykologia Verlag, Lucerne 1986.
- Goodwin D. C., Lee S. B.: *BioTechniques* 15, 438 (1993).
- Júdová J., Dubíková K., Gáperová S., Gáper J., Pristaš P.: *Fungal Biol.* 116, 155 (2012).
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., v knihe: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White, T. J., ed.), kap. 38. Academic Press, San Diego 1990.
- Schmidt O., Kalow W.: *Holzforschung* 59, 374 (2005).
- Chalupová J., Raus M., Sedlářová M., Šebela M.: *Biotechnol. Adv.* 32, 230 (2014).
- Čikoš Š., Koppel J., Kantiková M.: *Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike.* Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice 2001.
- Zheng L., Jia D., Fei X., Luo X., Yang Z.: *Microbiol. Res.* 164, 312 (2009).

**T. Gašparcová<sup>a</sup>, J. Gáper<sup>b,c</sup>, P. Pristaš<sup>d</sup>, S. Kvasnová<sup>a</sup>, and S. Gáperová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>Department of Biology and Ecology, Faculty of Natural Sciences, Matej Bel University, Banská Bystrica, Slovakia, <sup>b</sup>Department of Biology and General Ecology, Faculty of Ecology and Environmental Sciences, Technical University, Zvolen, Slovakia, <sup>c</sup>Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Ostrava, Czech Republic, <sup>d</sup>Institute of Biology and Ecology, Faculty of Natural Sciences, Pavol Josef Šafárik University, Košice, Slovakia): **Comparison of ITS-PCR-RFLP and MALDI-TOF MS Methods for the Identification of Wood-Decaying Fungi of the Genus *Ganoderma***

The traditional identification of the species of the genus *Ganoderma* (Basidiomycota phylum, Polyporales order) is based on its anatomical and morphological characteristics of basidiocarps. In recent years, molecular methods based on the analysis of the DNA are widely used. In this study, ability of newly applied method MALDI-TOF MS and known ITS-PCR-RFLP have been compared for the identification of fungi of the genus *Ganoderma*. The samples of seven members of the genus have been determined based on its anatomical and morphological traits and four species have been identified. Restriction analysis also showed the presence of four species of the genus. MALDI-TOF MS analysis yielded well defined spectra for all species tested. The cluster analysis has been carried out from the spectra obtained. The results have shown that MALDI-TOF MS is capable to distinguish among studied fungi with an accuracy comparable to ITS-PCR-RFLP and could be used for identification of fungi of the genus *Ganoderma*.