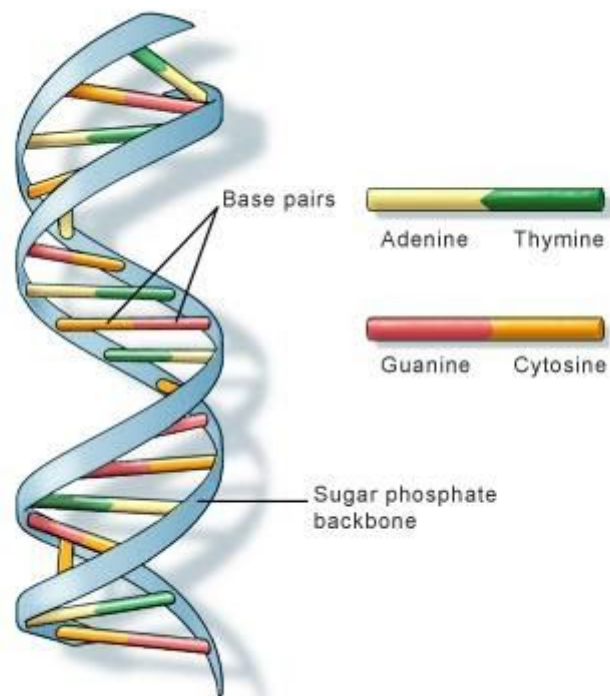


DNA - nyckel till svamparnas liv



U.S. National Library of Medicine

Rolf Libelius
Svampkonsulentutbildningen 2020
Åsa Folkhögskola

Innehållsförteckning:	sida
Titelsida	1
Innehållsförteckning	2
Sammanfattning	3
Inledning	4
Material och metod	5
Resultat och diskussion	5
DNA struktur och funktion	5-7
PCR	6
DNA i svamp	7
Provtagning	7
Extraktion och rening av DNA	8
PCR av svamp DNA	8
DNA-sekvensering	9
Databaser	9
Svårigheter och felkällor vid DNA streckkodning	9
DNA och framtiden	9-10
Hur DNA data kan påverka vår framtida klassificering av svamparter	10
Bioinformatik	10
Referenslista	10-11

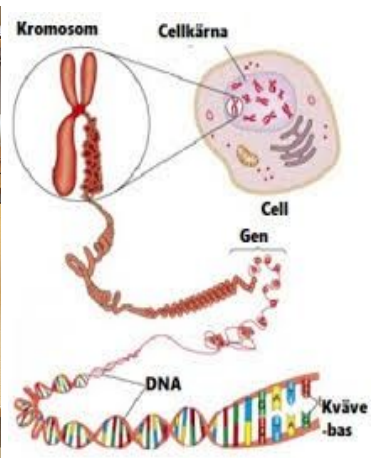
Sammanfattning:

Alla organismer med cellkärna (eukaryoter) har sin arvs massa DNA (deoxyribonucleic acid) sinnrikt packad i cellkärnans kromosomer. DNA är en mycket lång spiralformad dubbelsträngad molekyl uppbyggd av fyra olika nukleotider (Adenin, Tymin, Guanin, Cytosin). I DNA finns all information om individen lagrad genom den turordning (sekvens) som nukleotiderna har. DNA kan kopieras (transkription) till ett mRNA (messenger RNA) som sedan utgör mall för vilken aminosyra som byggs in i ett protein (translation). Mängden individspecifik information som finns lagrad i DNA är svindlande stor och innehåller också delar som definierar individens position (art) i det taxonomiska släktträdet.

En förutsättning för att vi idag ska kunna använda DNA-analys för artbestämning är de kraftfulla vetenskapliga framsteg som gjorts de senaste 50 åren inom DNA-forskningen. Vi har lärt oss hur DNA är uppbyggt, hur det fungerar och hur vi kan manipulera DNA för att bl.a. effektivt analysera dess sekvens av nukleotider. En viktig metod är PCR (**p**olymerase **c**hain **r**eaction) med vilken vi kan mångfaldiga en definierad bit av DNA som sedan kan sekvenseras.

För svamp är den mest bevarade (konserverade) och artspecifika delen av DNA en del av s.k. ribosomalt DNA med namnet ITS (**I**nternal **T**ranscribed **S**pacer). 2012 antogs ITS internationellt såsom artmarkör för svamp. Sedan dess har litteraturen stadigt ökat med arbeten där man gjort artbestämningar av enskilda svampar men också flerarts analyser av svampar i jord och vedprover.

Ett flertal internationella databaser har etablerats. Den databas som av nordiska mykologer används mest är UNITE. I databasen UNITE kan man via en s.k. "species hypothesis" och dataplattformen PlutoF lagra och analysera svampens DNA-sekvens. I framtiden kommer förmodligen ett ökat internationellt samarbete mellan olika databaser bli nödvändigt för att hantera de enorma datamängder som alstras av alla DNA-sekvenser, särskilt när svampars hela genom kommer att analyseras. Dessutom kan en framtida sammankoppling mellan DNA-databasen (UNITE) och andra artdatabaser (Dyntaxa) vara av värde. En sådan indirekt koppling finns redan idag genom GBIF (**G**lobal **B**iodiversity **I**nformation **F**acility) även om denna idag är något komplicerad att använda.



MAKRO

MIKRO

MOLEKYLÄR

Inledning:

Artbestämning av svampar har alltsedan Elias Fries tid gjorts utifrån alla möjliga makroskopiska karaktärer vilket fortfarande är "golden standard". I vissa fall kan man få ytterligare nödvändig information från mikroskopisk undersökning. Svampens alldeles specifika art och släktskap med andra svampar finner man emellertid i dess DNA (arvsmassan). Den explosiva utveckling som har skett på DNA forskningens område de senaste 50 åren har gjort att vi sedan början av 1990-talet systematiskt har påbörjat insamling av DNA från olika svampar. Vi har idag möjlighet att snabbt, enkelt och billigt analysera DNA. Man har också i allt ökande omfattning fortsatt lagra sekvenser av svamp DNA i databaser.

I det här projektarbetet skall jag försöka att enkelt beskriva uppbyggnaden av DNA, dess funktion och hur man från en svamp kan ta prov för DNA-sekvensering. När det gäller en mer detaljerad tolkningen av resultaten ber jag att få hänvisa till den information som tillhandahålls i litteraturen och av databasen UNITE.

Material och metod:

Litteraturstudier (Universitetsbiblioteket i Umeå) och sökningar på nätet (Google).
Personliga kontakter med svensk molekylärbiolog (Professor Sven Tågerud, Kalmar) och svenska mykologer (Michael Krikorev, Lill Eilertsen och Elisabet Ottosson).

Resultat och diskussion:

DNA är en mycket lång (2 m) dubbelspiral uppbyggd av socker och viktiga kvävehaltiga baser (nukleotider). DNA ligger sinnrikt packat kring histoner (protein) i cellkärnans kromosomer.

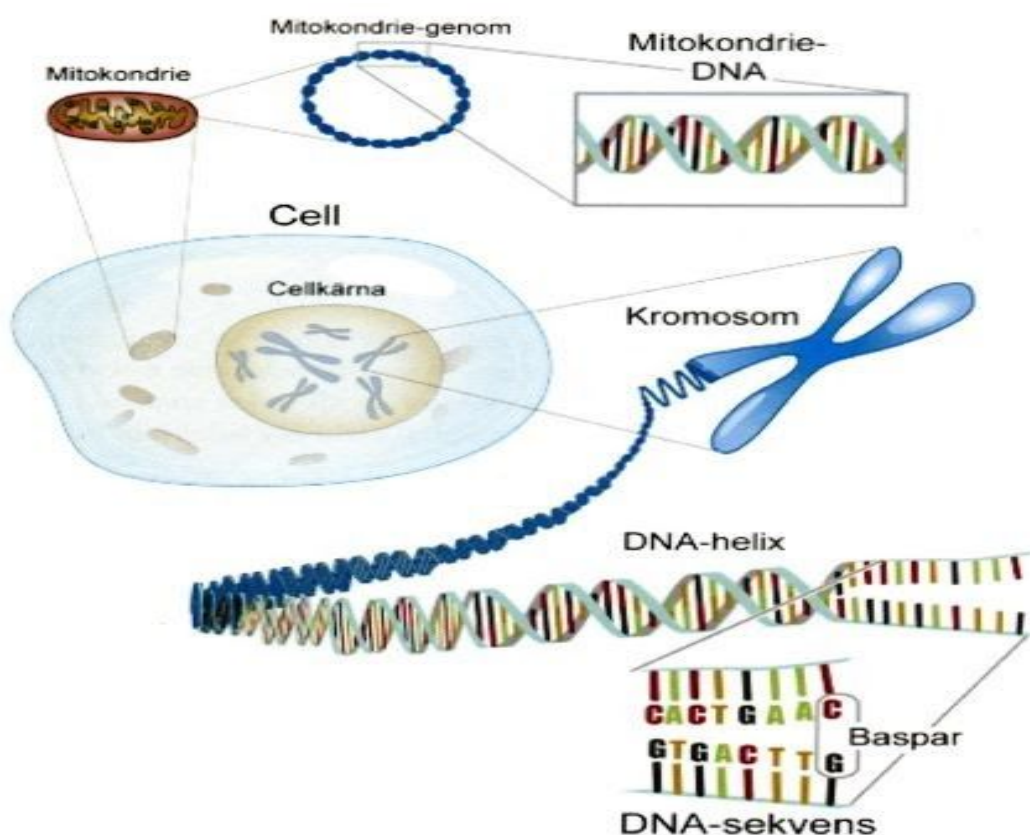


Fig 1 visar en översikt av DNA paketerat i kärnans kromosomer. Illustration: Erik Ersmark, Naturhistoriska riksmuseet.

Den information som finns lagrad i DNA står att finna i den ordning (sekvens) som nukleotiderna har. Om ena strängen har en nukleotid med basen A (adenin) så kopplar den alltid till andra strängens T (tymin) och G (guanin) kopplar till C (cytosin) och bildar då ett baspar. Strängarna sägs vara komplementära, dvs passar mot varandra. Man kan likna dubbelspiralen vid ett blytlås. Metoderna att analysera DNA grundar sig på flera vetenskapliga genombrott (10, 14, 15, 21). Man kan effektivt isolera DNA från en vävnadsbit genom att först spräcka cellerna och sedan fälla ut (precipitera) och ta bort proteiner, lipider och andra föroreningar. Därefter kan man klippa DNA till mindre

bitar, vilket kan göras med olika s.k. restriktionsenzymer som känner igen vissa specifika nukleotidsekvenser (14). När man har renat DNA kan man "låsa upp" blixtlåset vid hög temperatur (denaturera DNA) och erhålla enkelsträngat DNA. Den del av DNA som vi är intresserade av kan därefter mångfaldigas med s.k. polymerase chain reaction (PCR) (10).

Vid PCR använder man oligonukleotider (primers) vilka är ca 15-20 nukleotider i längd. De är komplementära och specifika till en startpunkt och en stoppunkt på det DNA-fragment som ska mångfaldigas. I närvaro av alla nödvändiga nukleotider kommer polymerasenzymet att från primerna bygga upp DNA-fragmentet och på så sätt efter upprepade cykler ge oss många kopior av den önskade DNA-biten. Bildandet av nya DNA-kopior sker exponentiellt (dubblas för varje steg) vilket innebär att stora mängder DNA kan bildas redan efter 20-30 cykler. Principen för PCR visas i figur 2.

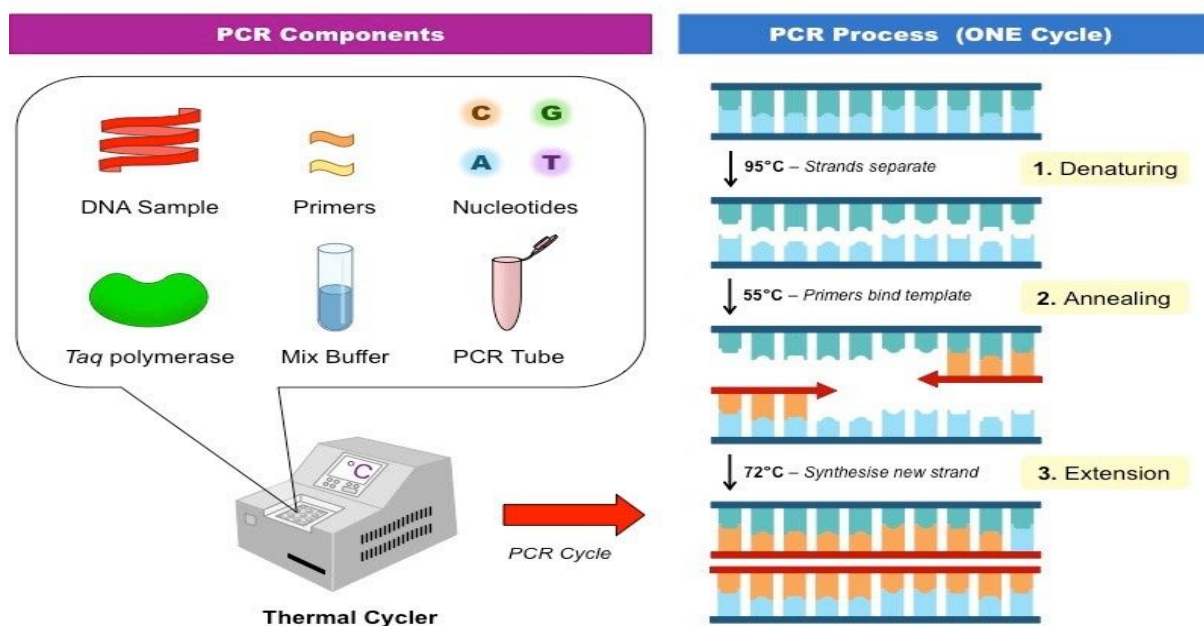


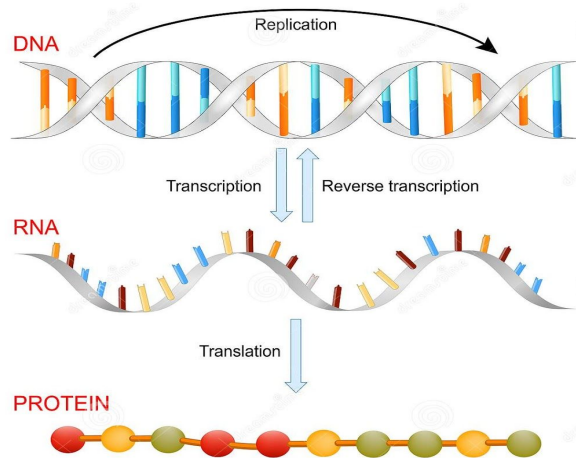
Fig. 2 visar stegen i PCR. Bildkälla: Simply Science and BioNinja.

Man kan sedan analysera DNA-sekvensen med hjälp av radioaktiva eller fluorescerande stop-nukleotider och resultatet kan fås med hjälp av en gelelektrofores (15) eller andra nyare separationsmetoder (17). Metoderna att sekvensera DNA har med tiden förbättrats och blivit snabba och kommersiellt gångbara (17). År 2000 kostade det ungefär 100.000 kronor att göra en sekvensering och idag är motsvarande kostnad nere i ca 500 kr.

DNA har två viktiga funktioner: **1.** DNA-strängarna kan delas och nya kopior av DNA bildas vid celledelning och befruktning och på så sätt föra det genetiska arvet vidare. Vi kallar detta Replikation. **2.** DNA kopieras till mRNA (messengerRNA) som sedan fungerar som mall för att bilda proteiner. På så sätt bildas alla proteiner (många tusen) som finns i organismen. Mängden proteinsyntessteg är mycket stor eftersom alla proteiner och enzymer i organismen bildas på detta sätt. DNA som kopieras till mRNA

kallas **transkription** och produktionen av protein från mRNA kallas **translation**. (se Fig. 3)

Transcription and Translation



dreamstime.com

ID 158279149 © Designua

Fig. 3 visar hur DNA kodar för mRNA (transkription) som sedan kodar för ett protein (translation).

DNA i svamp:

Två anledningar/tillämpningar att sekvensera svamp-DNA kan vara:

- 1) Att artbestämma en svamp (2, 6, 11) eller att bestämma alla och hur många svampar som finns i jord och/eller ved (7, 22), i luft och vatten samt i svamp relaterade livsmedelsprodukter (13).
- 2) Att undersöka svampens evolutionära släktskap i det taxonomiska systemet (fylogeni) (1, 4, 9, 11).

Analysen av svamp-DNA är en relativt ung vetenskapsgren. Redan 1993 beskrevs den del av DNA (ITS) som skulle kunna användas som markör för svampar (5). Många arbeten publicerades om ITS innan man 2012 enades internationellt om att använda ITS som streckods-markör (barcode) för svamp (16). Därefter har många arbeten publicerats om metoder att rena och analysera svamp DNA från jord och vedprover (7, 12, 22) samt att validera olika primers för ITS-PCR (12, 20) och sekvensera DNA för att artbestämma svamp (2, 4, 20).

Provtagning: Varje forskare har sina etablerade rutiner för hur prover från barr, sporer, luft, ved, jord och svampvävnad behandlas. Generellt kan man säga att mycket små mängder av svampens fruktkropp behövs (20-50 milligram). Det är viktigt att undvika kontamination av främmande DNA. Därför kan man med fördel ta prov från svampens "inre" och undvika ex. perifer hatthud. Ett bra sätt är att dela svampen med en ren och skarp kniv. Sedan skär man två parallella snitt med skalpell eller rakblad (ca 1 cm isär) i den tjocka exponerade delen av svamphatten. Därefter tar man och drar av 2-3 mm

strips med en ren pincett. Preparaten kan sedan med fördel läggas i plaströr med lock (Eppendorfrör) där de kommande stegen av extraktion och rening av DNA kan ske. Material som varit fryst och torkat kan också användas. (9, 20).

Extraktion och rening av DNA: Många mykologer använder sig av kommersiellt tillgängliga kits som kan innehålla lösningar och filter för att extrahera och rena DNA från svamp (OMEGA BIO-TEK, E:Z:N:A: Fungal DNA kit) och jordprover (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil). Vissa större lab använder dock egna buffertlösningar och kemikalier för att rena och extrahera DNA enligt protokoll som finns väl dokumenterade i litteraturen (9, 19, 23). De principiella stegen i att erhålla renat DNA inkluderar förutom mikrocentrifugeringar följande:

1. Sönderdela vävnaden så att cellerna spricker (mekaniskt och/eller kemiskt).
2. Fälla ut och avlägsna proteiner (fenolextraktion)
3. Anrikning av DNA (borttagande av lipider och RNA) vilket kan ske bl.a. med "silica matrix" (19). Det är viktigt att erhålla ett så "rent" DNA som möjligt eftersom det är en förutsättning för tillförlitliga PCR resultat.

Olika DNA sekvenser för olika artgrupper



Fig. 4 Olika områden i DNA används för artbestämning i olika artgrupper.
Bildkälla: Anders Dahlberg Sveriges Lantbruksuniversitet, Tyringe 17 November 2019.

PCR av DNA: Det är idag inte rutin att analysera svampens hela DNA. Man använder istället en specifik del av ribosomalt DNA som kallad ITS (Internal Transcribed Spacer). Den information man får av ITS-sekvensen är artspezifisk och ger också viss information rörande fylogeni. Ibland kan andra delar av ribosomalt DNA, LSU (Large Sub Unit) och SSU (Small Sub Unit), användas för bättre fylogenetisk information (20). För andra artgrupper än svamp finns andra lämpligare DNA sekvenser för artbestämning (Fig. 4).

För att göra PCR av ITS använder man primers (exempelvis gITS7 och ITS 4) (pers. com. Eilertsen, L. 2020) som är "flexibla" och kan identifiera ITS i flertalet svampar. Att använda ITS som "målmarkör" är också fördelaktigt därför att ITS finns i flera kopior i ribosomalt DNA. Notera att slutresultatet av PCR-körningen är ett kraftigt mångfaldigt ITS-segment som sedan kan sekvenseras. Det är viktigt att alla prover är adekvat märkta tillsammans med en god makroskopisk beskrivning (när det är tillämpligt) av svampen så att svampens makroskopiska karaktärer sedan kan kopplas till den DNA-sekvens som erhålls.

DNA-sekvensering: DNA som mångfaldigats vid PCR kan analyseras (sekvenseras) med gängse metoder på eget lab. Mykologer kan också skicka sina prov till externa laboratorier med speciell apparatur för sekvensering. Skälet till detta är att modern utrustning är mycket dyr men med högre kapacitet (17), och äldre (1980-tal) elektrofores metoder (15) är arbetskrävande och tekniskt svårare att använda. Ett svenskt lab. som utför sekvenseringar är NGI (National Genomics Infrastructure) Stockholm -SciLifeLab. Svaret kommer inom några få dagar och sekvensen erhålles som en textfil. Denna kan sedan läggas in i en central databas (UNITE) som innehåller sekvenser från många svamparter. (1, 6, 11).

Databaser: Den mest använda databasen för svamp i Norden heter UNITE (<http://unite.ut.ee/>). Om man där under analys klistrar in sin ITS-sekvens kan man via en s.k. "species hypothesis" och dataplattformen PlutoF (<https://plutof.ut.ee/>) analysera om någon identisk eller liknande sekvens finns i databasen (11). Andra databaser än UNITE finns internationellt ex. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>). Allmänt kan man säga att Unite är mer svampinriktad och med tillförlitligare information (11, 20). UNITE har blivit den mest använda databasen i Norden med mer än 60.000 arter sekvenserade (11). På databasens hemsida finns erbjudande för amatör-mykologer att få hjälp med att skicka in prover från ovanliga artfynd för sekvensering av ITS och början av LSU regionen (<https://unite.ut.ee/index.php>).

Svårigheter och felkällor vid DNA-streckkodning: Sedan 2003 har man introducerat ett streckkod system (barcode) för att presentera DNA sekvenser med en streckkod (2, 8, 20). Den största är BOL (Barcode of life). Andra liknande initiativ till databaser finns i de skandinaviska länderna, i Sverige SWEBOL, i Norge NorBOL och i Finland FINBOL. Fördelarna med streckkoder kan vara att resultaten är standardiserade till ITS (för svamp) och mer lättlästa också för en lekman. Allteftersom tekniken att analysera DNA utvecklas mot sekvensering av hela genomet (se www.nanoporetech.com) kanske streckkodning kommer att vara överspelat? Alltsedan 2012 (14) då ITS antogs internationellt som streckkod markör för svamp har ett antal arbeten publicerats som pekat på vissa svårigheter i metoder och tolkning när det särskilt gäller analys av bl.a. jordprover (20). Vid sådana studier kan det vara viktigt att noggrant välja primer-par för att maximera utbytet av detekterbara svamparter och att minimera andra felkällor (7, 20). I litteraturen finns många publikationer som beskriver ITS-sekvenser där man ej känner till vilken svampart (taxa) det rör sig om (11). Vissa forskare anser att enbart en enstaka DNA-sekvens inte kan utgöra grund för artbestämning av en svamp (18).

DNA och framtiden: Med alltmer avancerade analysmetoder av DNA (17) (www.nanoporetech.com) och kraftfullare datorer kanske man kommer att kunna utföra analys av arters hela genom (metagenomics) och mer effektiva och säkrare flerartsanalyser (metabarcoding). Redan idag finns utrustning som relativt snabbt kan sekvensera stora delar av genomet (www.nanoporetech.com). Då gäller det verkligen att vi använder datorprogram och algoritmer på ett kritiskt och ansvarsfullt sätt så att vi undviker olika felkällor vid tolkning av DNA-data. Flaskhalsen kommer då inte att

vara själva DNA-sekvenseringen utan ligga i hur vi analyserar data. Eftersom vi bara befinner oss i början av utvecklingen av "svamp-DNA-Genomics" är det inte förvånande att många olika databasprojekt (9) har utvecklats internationellt. Men för att kunna hantera kommande enorma datamängder behövs nog mer av internationellt samarbete. Vidare vore det värdefullt med en integrering av olika DNA-databaser med andra art-databaser såsom SLU Artdatabanken och Dyntaxa. Någon sådan direkt koppling finns inte idag men det finns planer på att medverka till att etablera en sådan (pers. com. Krikorev, M. 2020). Indirekt finns dock en koppling via GBIF (Global Biodiversity Information Facility. Vad är GBIF? "It is an international network and research infrastructure funded by the world's governments and aimed at providing anyone, anywhere, open access to data about all types of life on Earth". GBIF (<https://www.gbif.org>) är kopplat till många databaser inkl. SLU Artdatabanken, Dyntaxa och UNITE m.fl. På så sätt kan DNA sekvenser genom plattformen PlutoF i UNITE kopplas till Dyntaxas systematik och Artdatabanken (pers. com. Ottosson, E. 2020). Idag är detta något komplicerat men blir kanske i framtiden mer användarvänligt.

Hur DNA data kan påverka vår framtida klassificering av svamparter: Alla vetenskapliga svampnamn består inte för evigt vilket beskrivs av Elisabeth Bååth i Sporaden 4/2016. Detta beror på att ny DNA-information kan leda till att nya släkter skapas eller att en art flyttas till ett annat släkte. Som exempel beskrivs ändringar för ädelsoppar (*Boletus*) (3). Vi kan nog i framtiden förvänta oss fler sådana exempel. En användbar källa till aktuell klassificering av svampnamn är den taxonomiska databasen Dyntaxa som drivs av SLU ArtDatabanken.

Bioinformatik: Att tolka stora mängder DNA-data kallas Bioinformatik. Detta är ett område för sig som använder datorbaserade program för att behandla biologiska data (sekvenser) och stora datamängder med statistiska och matematiska metoder. Utbildning i Bioinformatik finns vid flertalet svenska Universitet och kommer sannolikt att behövas i den framtida tolkningen av DNA-data i svamp.

Referenslista:

Artiklar:

1. Abarenkov, K. m.fl. (2010) The UNITE database for molecular identification of fungi-recent updates and future perspectives. *New Phytologist* 186: 281-285.
2. Badotti, F. m.fl. (2017) Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology* 17:42.
3. Bååth, E. (2016) Soppar byter släktnamn. *Sporaden 4/2016*. Medlemstidning för Svampkonsulenternas Riksförbund.
4. Das, S. och Deb, B. (2015) DNA barcoding of fungi using Ribosomal ITS Marker for genetic diversity analysis: A Review. *Int. J. Pure App. Biosci.* 3(3): 160-167.

5. Gardes, M och Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 (2): 113-118.
6. Køljalg, U. m.fl. (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063-1068.
7. Lindahl, B.D. m.fl. (2013) Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers-a user's guide. *New Phytologist* 199: 288-299.
8. Lyrholm, T. DNA-baserade metoder för taxonomisk bestämning ("DNA barcoding"): Potentiella tillämpningar för effektivare miljöövervakning. PM från Naturhistoriska Riksmuseet 2009:2.
9. Gosavi Mahavir C. (2016) Applications of DNA barcoding in molecular systematics of fungi. A review. *Int. J. of Life Sciences, Special Issue, A7*: 111-115.
10. Mullis, K.F. m.fl. (1986) "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51: 263-273.
11. Nilsson, R.H. m.fl. (2019) The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* 47: D259-D264.
12. Op de Beeck, M. m.fl. (2014) Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS ONE* 9 (6): e97629.
13. Raja, H.H. m.fl. (2017) DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification? *Food Chemistry* 214: 383-392.
14. Roberts, J.R. (2005) How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(17): 5905-5908.
15. Sanger, F. m. fl. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (12): 5463-5467.
16. Schoch, C.L. m.fl. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 6241-6246.
17. Slatko, B.E. m.fl. (2018) Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 122 (1): e59.
18. Thines, M. m.fl. (2018) Ten reasons why a sequence-based nomenclature is not useful for fungi anytime soon. *IMA FUNGUS* 9(1): 177-183.
19. Urbaniak, J. m.f. (2019) Isolation of nucleic acids using silicon dioxide powder as a tool for environmental monitoring. *Environ. Monit. Assess* 191: 732.
20. Xu, J. (2016) Review. Fungal DNA barcoding. *Genome* 59: 913-932.
21. Watson, J.D och Crick, F.H.C. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.

Internet:

22. Identifierar svampar med DNA-teknik-Göteborgs universitet.
<http://science.gu.se/aktuellt/nyheter/Nyheter+Detalj/identifierar-svampar-med-dna-teknik.cid1186956>.

23. Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things. Cold Spring Harbor Laboratory, DNA Learning Center.
<http://www.dnabarcoding101.org/introduction.html>