



MARCIN PIETRAS

Owocnik złotoborowika
wysmukłego

TAJEMNICE GRZYBÓW

Opisanie reakcji łańcuchowej polimerazy w bardzo krótkim czasie zrewolucjonizowało naukę. Jak wykorzystujemy to przełomowe odkrycie w badaniach taksonomii, systematyki i ekologii grzybów?

Marcin Pietras

Institutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk
w Kórniku

Przełomowe odkrycia w bardzo krótkim czasie potrafiły zmienić naukę, w tym szczególnie biologię. Za pierwszy wielki przełom, do którego doszło w biologii, można uznać wprowadzenie przez Karola Linneusza (1707–1778) systemu klasyfikacji organizmów opierającego się na podobieństwie ich cech. System ten, podobnie jak dwuczłonowe nazewnictwo organizmów, jest stosowany do dziś i stał się na długie lata podwaliną rozwoju wszystkich nauk biologicznych. Był odpowiedzią na bezustanną potrzebę szeregowania i układania wszystkiego, co człowiek wokół siebie widział i co mógł znaleźć. O doniosłości i wadze zmian wprowadzonych przez Linneusza świadczy ogromna liczba organizmów przez niego opisanych i sklasyfikowanych. Obecnie przy nazwach ponad 12 tys. gatunków roślin i zwierząt możemy znaleźć literę „L”, informującą, że autorem opisu takiego organizmu jest właśnie Linneusz. Co więcej, przez ponad 250 lat nikt nie widział potrzeby wprowadzania zmian opisów dla tychże gatunków. System klasyfikacji wprowadzony przez Linneusza był prosty i przejrzysty, posiadał jednak jedną wadę... był całkowicie sztuczny. Opierał się tylko na podobieństwie organizmów, a całkowicie pomijał ich pochodzenie i pokrewieństwo. To oczywiście żaden zarzut, podstawy teorii ewolucji Darwina zostały przedstawione prawie 100 lat po śmierci Linneusza, ale współcześni badacze widzieli niedoskonałość i potrzebę modyfikacji starego systemu klasyfikacji. Było potrzebne narzędzie, które pozwoliłoby zajrzeć głębiej niż w łatwo widoczne cechy czy obraz spod mikroskopu. Potrzebne było spojrzenie w DNA!

Łańcuch DNA

Już samo odkrycie struktury kwasu deoksyrybonukleinowego (znanego dziś bardziej jako wspomniane DNA) zostało nagrodzone Nagrodą Nobla przyznaną w 1962 roku Francisowi Crickowi, Jamesowi Watsonowi i Maurice'owi Wilkinsowi. Dowiedzieliśmy się wtedy, że życie każdego organizmu – więcej: cały znany nam żywy świat – jest zakodowane w mikroskopijnej cząsteczce będącej kłębkim dwóch splecionych i połączonych z sobą nici nukleotydów. Od momentu odkrycia uczeni wiedzieli, że wiedza na temat struktury i sekwencji nukleotydów budujących DNA jest kluczowa dla zrozumienia świata żywych organizmów. Można przypuszczać, że właśnie wtedy powstała biologia molekularna. Kolejne odkrycia poja-

wiały się w lawinowym tempie. Opisanie mechanizmu replikacji DNA i odkrycie polimerazy, enzymu odpowiadającego za tę replikację, a potem sekwencjonowanie DNA (szczytanie kolejności nukleotydów w DNA), czy odkrycie bakterii *Thermus aquaticus*, która wytwarzała termostabilną polimerazę wykorzystywaną do dziś pod nazwą Taq, to tylko najważniejsze osiągnięcia wczesnej biologii molekularnej. Na kolejny wielki przełom musieliśmy czekać do 1993 roku. Wtedy to amerykański biochemik Kary B. Mullis opisał reakcję łańcuchową polimerazy (zwaną reakcją PCR od angielskiej nazwy *polymerase chain reaction*), która po dziś dzień jest podstawową i fundamentalną techniką wykorzystywaną w biologii molekularnej. Za swoje odkrycie Mullis został uhonorowany Nagrodą Nobla.

Celem reakcji łańcuchowej polimerazy jest namnożenie interesującego nas fragmentu DNA. Fenomen tej reakcji tkwi w jej prostocie. Tak naprawdę jest to proces połączonych z sobą cykli zmian temperatury odbywający się w sprzyjających warunkach w obecności kilku „składników”. Każdy cykl rozpoczyna się od tzw. denaturacji, czyli oddzielenia dwóch nici DNA od siebie odbywającego się w wysokiej temperaturze, na ogół 90–95 st. C. W kolejnym etapie do rozerwanych nici przyłączają się tzw. startery, którymi są sztucznie syntetyzowane fragmenty nici nukleotydowych o sekwencji odpowiadającej początkowi i końcowi powielanego fragmentu DNA. W czasie przyłączenia starterów temperatura spada do 50–60 st. C w zależności od wykorzystywanych starterów (każdy opracowany starter ma określoną temperaturę, w której jego przyłączanie odbywa się najefektywniej). W kolejnym etapie tzw. elongacji dzięki obecności polimerazy Taq dochodzi do wydłużania komplementarnej nici wzdłuż wzoru. Uczestniczą tu cztery różne nukleotydy dodane do mieszaniny reakcyjnej, które łączą się z sobą według wzoru: adenina z tyminą, cytozyna z guaniną. W wyniku elongacji obok oryginalnej nici kwasu nukleinowego powstaje druga zsyntetyzowana



dr hab. Marcin Pietras

Jest profesorem Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku, gdzie kieruje Zakładem Biogeografii i Systematyki. Jego zainteresowania badawcze skupiają się wokół zagadnień związanych z ochroną przyrody oraz badaniami różnorodności grzybów.
mpietras@man.poznan.pl



Mykoryzy grzyba
Cenococcum geophilum

sztucznie. Liczba powtarzających się cykli wynosi zazwyczaj do 35–40, dzięki czemu w każdym kolejnym cyklu powstaje podwojona ilość interesującego nas fragmentu DNA. W taki sposób z jednej podwójnej nici DNA możemy otrzymać miliony identycznych kopii, co otwiera nowe możliwości badawcze i analityczne. Obecnie techniki biologii molekularnej bazujące na PCR są wykorzystywane w wielu dziedzinach nauki, m.in. w taksonomii, systematyce, ekologii, a także w kryminalistyce, medycynie czy diagnostyce klinicznej. Za najlepszy przykład może tu służyć wykorzystanie tych metod w trakcie pandemii COVID-19, kiedy to wykorzystywano metodę PCR jako bazową do przeprowadzenia testów na obecność koronawirusa.

Mykologia molekularna

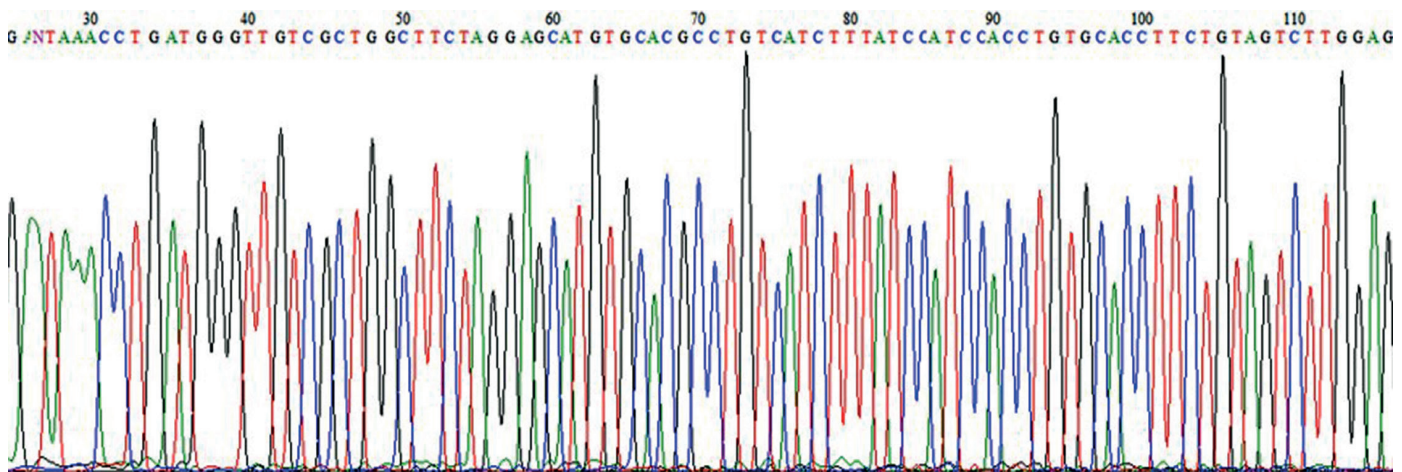
Obserwowany od blisko 30 lat rozkwit technik biologii molekularnej niewątpliwie przyczynił się do rozwoju nauk biologicznych. O tym, jak odkrycie DNA, a następnie opracowanie reakcji łańcuchowej polimerazy pchnęło do przodu naukę, opowiem na przykładzie królestwa grzybów, jednej z najbardziej tajemniczych, niezbadanych i różnorodnych grup organizmów występujących na kuli ziemskiej. Gwałtowny rozkwit metod związany z udoskonalaniem narzędzi molekularnych w mykologii jest wykorzystywany do badań taksonomicznych, ekologicznych czy populacyjnych. Rozkwit ten jest związany przede wszystkim z zaadaptowaniem reakcji PCR do badań mykologicznych oraz dostępnością narzędzi służących do analizowania sekwencji nukleotydowych. Ogromne znaczenie miało uznanie fragmentu ITS (*internal transcribed spacer*) rybosomowego DNA jako „barcodu” wykorzystywanego do identyfikacji molekularnej grzybów. Fragment ten można uznać za swoisty kod kreskowy, dzięki któremu możliwe jest rozpoznanie gatunku grzyba. Szczytanie takiego unikatowego kodu jest możliwe zarówno z owocników grzybów, jak i z tworzonych przez nie mykoryz czy obecnej w glebie grzybni. Wa-

runkiem tutaj jest posiadanie odpowiedniej liczby kopii fragmentu ITS, które powstają w czasie PCR, a następnie ich sekwencjonowanie i przedstawienie w formie ciągu liter odpowiadających oznaczeniu nukleotydów. Zintegrowana metoda wykorzystująca PCR i sekwencjonowanie otrzymanych produktów zrewolucjonizowały klasyczną mykologię, wyrzuciły znaną systematykę królestwa grzybów i pozwoliły opisać tysiące nowych gatunków. Za najlepszy przykład może posłużyć tutaj grupa grzybów klasyfikowana do niedawna do rzędu *Aphyllorphorales*, określanego jako grzyby bezblaszkowe. Grupa ta w wyniku licznych rewizji opartych na metodach molekularnych rozpadła się na 14 współcześnie uznawanych rzędów! Obecnie do ekologicznej grupy grzybów aphyloforoidalnych wlicza się ponad 500 taksonów występujących na całym świecie i reprezentujących wszystkie grupy funkcjonalne grzybów. Inny przykład to podzielenie dobrze nam znanego rodzaju *Boletus*, czyli borowik. W wyniku przeprowadzonych w ostatnich latach badań większość znanych nam gatunków borowików stała się złotoborowikami, krasnoborowikami, masłoborowikami, sinoborowikami czy krwistoborowikami. Podobnie został przekwalifikowany najpopularniejszy grzyb zbierany w polskich lasach, czyli podgrzybek brunatny (wcześniej rodzaj *Xerocomus*) przechrzczony obecnie na podgrzyba brunatnego (rodzaj *Imleria*).

Ukryte bogactwo

Metody bazujące na PCR obok klasycznej taksonomii znalazły również znacznie szersze zastosowanie w badaniach grzybów. Przed erą badań molekularnych obserwacje mykologiczne opierały się głównie na metodach klasycznych polegających na obserwacji owocników, które pojawiają się nieregularnie. Metoda ta wymagała wielu lat cierpliwych i żmudnych badań prowadzonych w terenie, uzależnionych w dużej mierze od warunków pogodowych. Wprowadzenie badań

Chromatogram fragmentu sekwencji ITS rDNA grzyba





MARCIN PIETRAS

Kutnerka brązoworóżowa – grzyb afyloforoidalny klasyfikowany obecnie do rzędu *Thelephorales*

molekularnych opartych na analizie fragmentu ITS ujawniło ogromne bogactwo świata grzybów obserwowanych na korzeniach drzew w formie mykoryz bądź jako grzybnia w glebie. Badania przeprowadzone w Estonii ujawniły obecność 122 gatunków grzybów symbiotycznych zidentyfikowanych w formie mykoryz na korzeniach jednego drzewa topoli osiki. Jeden z gatunków – *Cenococcum geophilum* – został zidentyfikowany w ponad 20 różnych genotypach (odmianach). W badaniach ekologicznych grzybów metody molekularne stały się podstawą, dzięki której było możliwe ujawnienie ogromnego bogactwa mykobioty, w szczególności gatunków, których cały rozwój odbywa się w glebie bez pojawiających się owocników. Badania prowadzone od blisko 20 lat w Instytucie Dendrologii PAN pozwoliły na odkrycie kilkudziesięciu gatunków grzybów występujących w Polsce, mimo że żaden z nich nie pojawił się w formie dojrzałego owocnika. Jedynym dowodem na obecność tych rzadkich organizmów były tworzone przez nie mykoryzy.

Kolejnym etapem w badaniach mykologicznych było wprowadzenie metody masowego sekwencjonowania. W przeciwieństwie do metody opisanej powyżej, gdzie po jednej reakcji PCR otrzymujemy identyfikację jednego gatunku grzyba, masowe sekwencjonowanie pozwala w jednej próbce namnożyć miliony sekwencji należących do tysięcy gatunków grzybów. Badania 365 prób gleby (każda o masie 2 gramów) zebranych na całym świecie pozwoliły na zidentyfikowanie 100 tys. taksonów grzybów! Większość ze znale-

zionych grzybów nie miała odpowiedników sekwencji w bazach danych zawierających znane gatunki tych organizmów. Co więcej, odkryto nowe linie filogenetyczne grzybów.

Najbardziej wyrafinowane metody wykorzystywane we współczesnej mykologii pozwalają zajrzeć jeszcze głębiej. Dzięki badaniom genomicznym możliwe jest opisanie całych genomów grzybów, a więc przedstawianie w formie sekwencji całej informacji genetycznej charakterystycznej dla danego gatunku grzyba. Całościowe opracowanie genomów zostało opublikowane dla kilku gatunków grzybów, m.in. lalkówki dwubarwnej czy komercyjnie wykorzystywanych trufli. Podejście genomiczne pozwala na badania funkcjonalnej ekologii grzybów, które mają odpowiedzieć na pytanie, jaką rolę odgrywają poszczególne gatunki grzybów w ekosystemach. Do tego wykorzystuje się bardzo zaawansowane metody „omiczne”, takie jak metabolomika (badanie powstających metabolitów), transkryptomika (badanie ekspresji genów), proteomika (analiza syntetyzowanych białek), które jeszcze mocniej wnikają w pojedynczą grzybową strzępkę i próbują odpowiedzieć na pytanie, co dzieje się w niej na poziomie fizjologicznym, molekularnym i biochemicznym.

Metody molekularne zrewolucjonizowały mykologię, otworzyły wiele możliwości do odkrywania tajemnic królestwa grzybów. Należy jednak pamiętać o kilku przełomach, do których doszło w biologii ogólnej, a które zaadaptowane na potrzeby mykologii zmieniły i dalej zmieniają nasze spojrzenie na grzyby. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Mullis K.B., *The unusual origins of the Polymerase Chain Reaction*, „Scientific American”, 1990.

Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S. et al., *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*, „The Proceedings of the National Academy of Sciences”, 2012.

Tedersoo L., Bahram M., Põlme S. et al., *Global diversity and geography of soil fungi*, „Science”, 2014.

Watson J.D., Crick F.H.C., *A structure for deoxyribose nucleic acid*, „Nature”, 1953.