

Entwicklung eines DNA-Diagnostiktools auf Basis der NGS-Sequenzierung für die Analyse der genetischen Diversität von Pilzen an Holz

Development of a DNA-diagnosing tool based on NGS sequencing for the analysis of the genetic diversity of fungi infesting wood

Projektleiterin

Project leader:
Kordula Jacobs

Projektbearbeiter

Persons in charge:
Kordula Jacobs,
Natalie Rangno

Fördermittelgeber

Co-funded by:
BMWK (INNO-KOM)

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Aus wissenschaftlicher Sicht ist die vollständige Erfassung von Pilzgemeinschaften auf verschiedenen Materialien und in verschiedenen Habitaten eine Herausforderung. Konventionelle Methoden der Kultivierung und phänotypischen Diagnostik sind meist unzureichend, aber auch mit etablierten DNA-Analysemethoden, wie RAPD-Fingerprinting, taxonspezifischer PCR und Real-Time-PCR sowie konventioneller rDNA-ITS-Sequenzierung, werden analytische Grenzen erreicht. Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren der 2. Generation, auch unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“ (NGS) zusammengefasst, ermöglichen eine deutlich umfassendere Analyse von Mikroorganismengemeinschaften bis hin zur Erfassung bisher unbekannter Spezies.

Ein aktuell bestehendes Problem ist der Mangel an robusten experimentellen Strategien und Datenauswertungsverfahren für spezifische diagnostische Fragestellungen. Es fehlt die Basis, große NGS-Sequenzdatensätze zu sortieren und zuzuordnen. Zudem besteht die Gefahr, dass teilweise oder vollständig falsche Befunde generiert werden, wenn die Ergebnisse nicht in den notwendigen Kontext der klassischen Mykologie gestellt werden.

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines neuen DNA-Diagnostiktools auf Basis der Illumina-Hochdurchsatzsequenzierung zur

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

From a scientific perspective, the complete detection of fungal populations on various materials and diverse habitats represents a challenge. Conventional methods of cultivation and phenotypic diagnostics are generally insufficient. Established DNA-analysing methods, such as RAPD fingerprinting, taxon-specific PCR and real-time PCR as well as conventional rDNA-ITS sequencing also come to their analytical limits. High-throughput sequencing methods of the 2nd generation, also known by the handier term of “Next Generation Sequencing” (NGS), enable a clearly more comprehensive analysis of microorganism communities, even the detection of previously unknown species. A current problem is the lack of robust experimental strategies and data analysis methods for specific diagnostic questions. There is no basis for sorting and assigning large NGS sequence data sets. In addition, there is a risk that false findings – partially or completely – are generated if the results are not put in the necessary context of classical mycology. The aim of the project was to develop a new DNA diagnostic tool based on Illumina high-throughput sequencing to determine the genetic diversity of fungal communities on wood and to use this tool to analyse the biodiversity of wood-destroying and wood-discolouring fungal populations on timber in outdoor use.



Abb. 1: Für die NGS-Sequenzierung beprobte Prüfstäbe bzw. deren Bruchstücke: je fünf Stäbe von links nach rechts: Lärchenkernholz, Bambus-Scrimber (komprimierter, mit Klebharz verpresster Bambus) sowie Eichenkernholz nach acht bis zehn Jahren Exposition im Erdkontakt gemäß DIN EN 252.

Fig. 1: Stakes and stake fragments sampled for NGS sequencing: five stakes each from left to right: larch heartwood, bamboo scrimber (compressed bamboo pressed with adhesive resin) and oak heartwood after eight to ten years of in-ground exposure acc. to DIN EN 252.

Ermittlung der genetischen Diversität von Pilzgemeinschaften an Holz sowie der Einsatz dieses Tools für die Analyse der Artenvielfalt von holzerstörenden und holzverfärbenden Pilzpopulationen an im Freiland verbauten Nutzhölzern.

VORGEHENSWEISE

Die NGS-Methodenentwicklung erfolgte unter Verwendung von drei Modell-Pilzpopulationen, die im Kontext des Holzschutzes relevant sind. Diese umfassten zehn praxisrelevante holzerstörende Basidiomycota-Spezies, zehn holzerstörende Moderfäulepilze (Ascomycota) sowie zehn holzverfärbende Bläue- und Schimmelpilze (Ascomycota). Zwei Populationen enthielten mehrere Arten einer Gattung, um das Differenzierungspotenzial der NGS-Methodik bei hohen Verwandtschaftsgraden zu ermitteln. Zielregion der NGS-Sequenzierung war der in hoher Kopiezahl in allen Organismen auftretende rDNA-ITS-Marker („Internal transcribed spacer“ der ribosomalen DNA). Die NGS-Analyse wurde mit Bezug auf die

APPROACH

The NGS methods were developed using three model fungal populations that are relevant in the context of wood preservation. These comprised ten wood-destroying basidiomycete species of practical relevance, ten wood-destroying mould rot fungi (ascomycete) and ten wood-discolouring blue stain and mould fungi (ascomycete). Two populations contained several species of one genus to determine the differentiation potential of the applied NGS methodology at high degrees of kinship. The target region for NGS sequencing was the rDNA-ITS marker (“internal transcribed spacer” of ribosomal DNA), which occurs in high copy counts in all organisms. The NGS analysis was designed with reference to the rDNA-ITS2 region, as this generally has a higher species diversity in the analysed wood-destroying basidiomycete reference fungi and most ascomycete reference fungi than the ITS1 region. In collaboration with a routine sequencing laboratory, the amplification strategy and parameters for the Illumina-sequencing reactions were

rDNA-ITS2-Region konzipiert, da diese i. d. R. eine höhere Spezies-Diversität bei den analysierten holzerstörenden Basidiomycota-Referenzpilzen und der Mehrzahl der Ascomycota-Referenzpilze aufweist als die ITS1-Region.

In Zusammenarbeit mit einem Sequenzierungs-Routinelabor wurden Amplifikationsstrategie und Parameter für die Illumina-Sequenzierungsreaktionen festgelegt, die Sequenzierungsexperimente geplant und durchgeführt. Der entwickelte NGS-Workflow wurde anschließend für die Analyse von Pilzgemeinschaften an verschiedenen Hölzern (Lärchen- und Eichenkernholz, Kiefernspint- und Buchenholz) sowie Bambus-Scrimber eingesetzt, die über einen Zeitraum von zwei bis zehn Jahren auf dem Freilandprüffeld des IHD exponiert waren (Abb. 1).

ERGEBNISSE

Bei Analyse der Modell-Pilzpopulationen wurden neun von zehn Basidiomycota-Referenzpilze auch in der Mischung aller drei Modellpopulationen mit insgesamt 30 Pilzarten sicher auf Artniveau detektiert. In weniger komplexen Mischungen wurden alle zehn Arten sicher nachgewiesen. Die Wiederfindung und Differenzierung der Ascomycota-Spezies in der komplexen Mischung aller drei Populationen war mit sechs (Moderfäulepilze) bzw. fünf (Schimmelpilze) von zehn deutlich geringer. Auf Gattungsniveau wurden hingegen alle Pilze erkannt, was ein unzureichendes Auflösungsvermögen der ITS-Region für die Spezies-Differenzierung bei Ascomycota belegt.

defined and the sequencing experiments were planned and carried out. The developed NGS workflow was then used to analyse fungal communities on various woods (larch and oak heartwood, pine heartwood and beech wood) and bamboo scrimber exposed to the IHD field test site over a period of two to ten years (Fig. 1).

RESULTS

The analysis of the model fungal populations detected nine out of ten basidiomycete reference fungi also reliably at species level in the mixture of all three model populations of a total of 30 fungal species. In less complex mixtures, all ten species were reliably proven. The recovery and differentiation of the ascomycete species in the complex mixture of all three populations was significantly lower with six (mould rot fungi) and five (mould fungi) out of ten. In contrast, all fungi were recognised at genus level, which demonstrates an insufficient resolution capacity of the ITS region for species differentiation in ascomycete. The OTU signal strength in the detection of the individual reference fungi varied significantly, although all DNAs were diluted to the same final concentration before mixing. This allows to conclude that the individual fungi have a different affinity to the NGS primers or adapters and/or a different number of ITS copies in the genomic DNA. In the NGS analysis of wood and bamboo from the field test site, a total of 32 different taxa of basidiomycete, 102 ascomycete taxa and 7 mucoromycota taxa

Die OTU-Signalstärke beim Nachweis der einzelnen Referenzpilze variierte deutlich, obwohl alle DNA vor der Mischung auf die gleiche Endkonzentration verdünnt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die einzelnen Pilze eine unterschiedliche Affinität zu den NGS-Primern bzw. -Adaptoren und/oder eine unterschiedliche Anzahl von ITS-Kopien in der genomischen DNA aufweisen.

Bei der NGS-Analyse von Hölzern und Bambus vom Freilandprüffeld wurden in der Summe 32 verschiedene Taxa von Basidiomycota, 102 Ascomycota-Taxa und 7 Mucoromycota-Taxa nachgewiesen. Materialspezifische Unterschiede der Pilzflora wurden deutlich aufgezeigt. Etwa 14 % der OTUs konnten nicht eindeutig einer Gattung oder sogar Familie zugeordnet werden, da keine verfügbaren Referenzdaten in der NCBI-Genbank vorlagen oder die taxonomische Zuordnung derzeit unklar ist.

Die Bestimmungssicherheit und Leistungsfähigkeit der entwickelten NGS-Diagnostikstrategie wurde anhand der Analyse von Modell-Pilzpopulationen sowie von Pilzgemeinschaften an Versuchshölzern im Freilandprüffeld des IHD belegt und durch vergleichende Methoden abgesichert. Die entsprechende Diagnostik ist ein geeignetes Werkzeug für die wissenschaftliche Bearbeitung weiterer Fragestellungen im Kontext des Holz- und Materialschutzes, wie z. B. die Analyse von Gemeinschaften materialschädigender Pilze und Bakterien an Baustoffen, Leder, Textilien, Kunststoffen sowie Kunst- und Kulturgütern.

were detected. Material-specific differences in the fungal flora were clearly shown. About 14 % of the OTUs could not be clearly assigned to a genus or even family, as there was no available reference data in the NCBI gene bank, or the taxonomic assignment is yet unclear. The reliability and performance of the NGS diagnostic strategy developed was demonstrated by analysing model fungal populations and fungal communities on wood in the IHD's outdoor test field and verified using comparative methods. The corresponding diagnostics are a suitable tool for investigating further questions in the context of wood and material preservation, such as the analysis of communities of material-damaging fungi and bacteria on building materials, leather, textiles, plastics as well as art and cultural artefacts.