

FLUORESCERANDE BLÅNAD

Ulrika Råberg och Jonas Hafrén

Sammanfattning

Vi har visat att blåmögelsvampen *Aureobasidium pullulans* transformerad med grönt fluorescerande protein (GFP) fungerar utmärkt som analysverktyg för att studera svamp i ved. Här visar vi tydligt att hyfer som växt in i ved fluorescerar och lätt kan detekteras med fluorescensmikroskop.

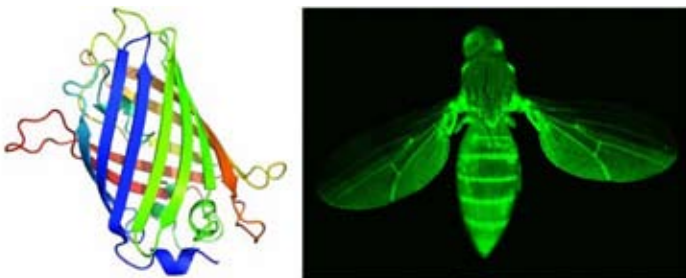
I framtiden ser vi möjligheter att fler svampar transformeras för att användas som analysverktyg för att studera svampars interaktion med varandra och med ved under olika förutsättningar för vednedbrytningen. Svampekologiska studier, av det mikroekologiska system som svampvednedbrytning utgör, kan också breddas till andra vedfiberbaserade material och svampar.

Bakgrund

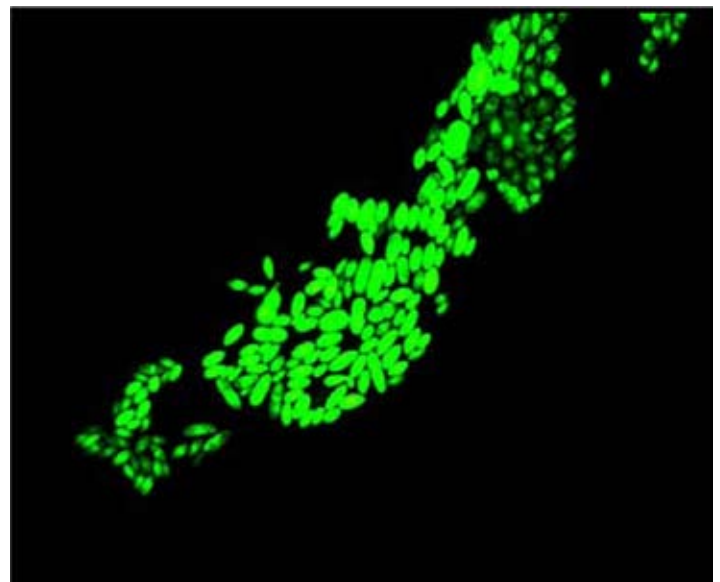
Nobelpriset i kemi gavs år 2008 till Martin Chalfie, Osamu Shimomura och Roger Y. Tsien för upptäckten av grönt fluorescerande protein (GFP) och utvecklingen av GFP som analysredskap. GFP är ett naturligt protein som fluorescerar i grönt ljus när det belyses med blått ljus och kan användas som biosensor och markör i biologiska system och kemiska reaktioner (Figur 1, Prendergast och Mann 1978, Tsien 1998). Anledning-

en till GFP:s genombrott och stora popularitet är dess breda användbarhet och relativt enkla analys med t.ex. fluorescensmikroskop. Genom att klona GFP med enskilda proteiner i celler, vävnader eller hela djur har man påvisat många olika saker, t.ex. hur hjärnceller påverkas av sjukdomar eller tillväxten av cancer. Även bakterier, insekter (Figur 1) och växters funktioner och strukturer har analyserats med hjälp GFP.

Även blåmögelsvampen *Aureobasidium pullulans* har klonats med GFP i syfte att följa kolonisering och etablering av mögel på blad i fruktträd (Figur 2, McGrath and Andrews 2007); vi har i denna studie använt samma GFP märkta klon av *Aureobasidium pullulans* från Geoffrey D. Robson för att undersöka huruvida GFP märkt blåmögel kan användas som redskap för att studera blåmögelsvampens kolonisationsförlopp och utbredning i furuved (*Pinus sylvestris*).



Figur 1. Till vänster, schematisk modell av grönt fluorescerande protein från maneten *Aequorea victoria* (DJUS online). Till höger, GFP märkt protein som inte uttrycks i främre delen av vingarna i en bananfluga, men resten av flugan fluorescerar grönt (Klebes, Freie Universität Berlin)



Figur 2. Grön fluorescens i enskilda celler av *Aureobasidium pullulans* transformerad med GFP, här har svampen ännu inte utvecklat hyfer utan är i ett jäststadium. Cellerna är avbildade med fluorescensmikroskop.

Resultat och diskussion

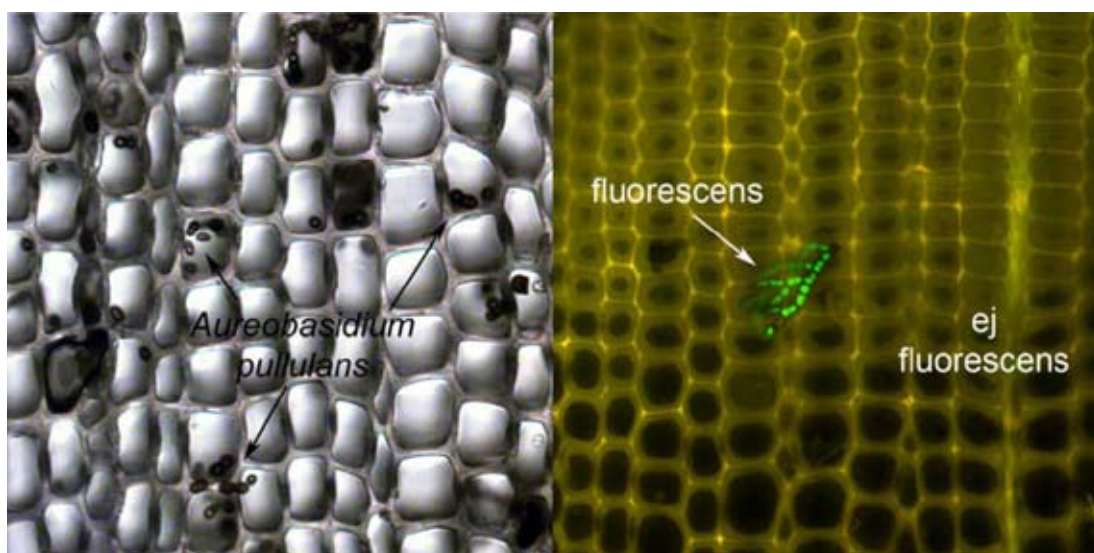
Provbitar av furu placerades på på jord inoculerad med den GFP transformerade blåmögelsvampen. Efter två veckor var proverna täckta med mögel och försöket avslutades. Mikrometer tunna snitt skars ur träbitarna med en mikrotom, vedsnitten placerades på objektglas och analyserades med ljusmikroskop och fluorescensmikroskop (med optiska filter för excitation $\lambda_{ex} = 450-490$ nm och emission $\lambda_{em} = > 515$ nm). Figur 3 visar hur blåmögelsvampen ser ut i vanligt ljusmikroskop och hur den GFP märkta svampen lyser grönt i fluorescensmikroskopet. Den svagare gulgröna färgen från veden kommer från vedligninets autofluorescens.

Vid närmare analys av den fluorescerande blåmögelsvampens utbredning kan man se att märkestrålarna kan koloniseraras av svamphyferna. Figur 4 uppvisar en rad

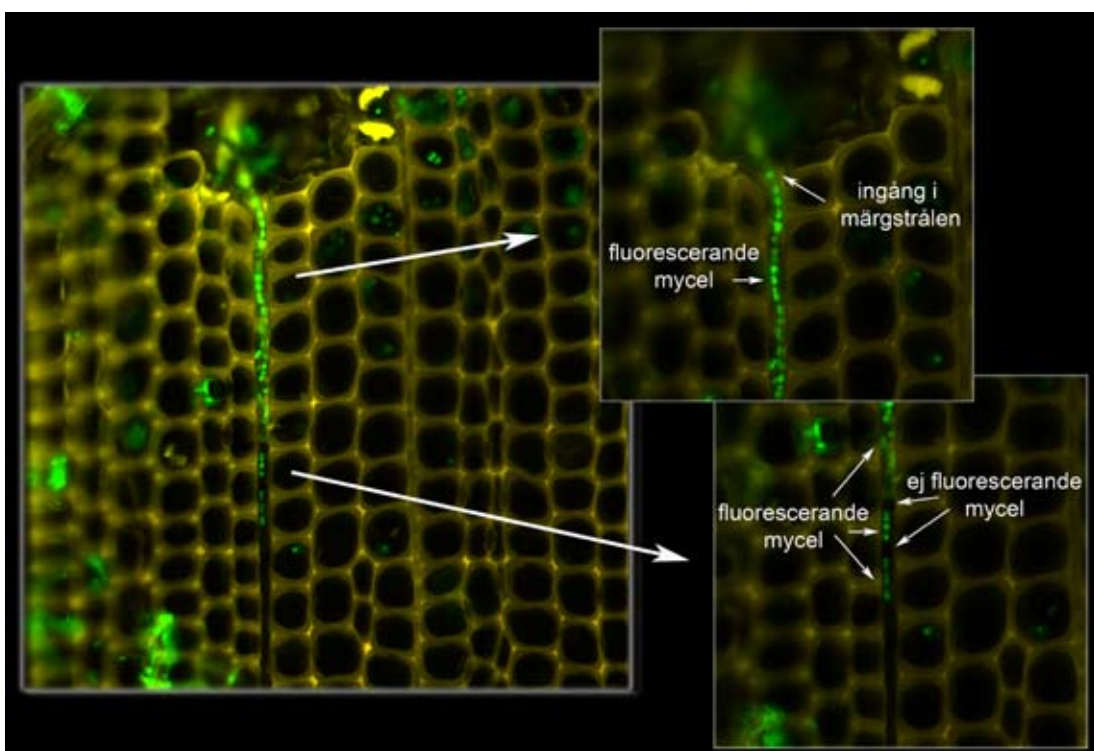
fluorescerande svampceller längs en märkestråle. Man kan också se svamptillväxt i hålligheterna mellan fiberväggarna (lumen). Värt att notera är att veden i Bild 4 kommer cirka en centimeter inifrån vedprovet, således kan den GFP märkta svampens intrång i veden lätt detekteras med fluorescensmikroskopi.

Våra mikroskopistudier av den GFP transformerade blåmögelsvampen visar att fluorescensbaserad analys-teknik också är ett lämpligt forskningsredskap för att studera *Aureobasidium pullulans* i ved. Och dessa inledande försök kommer fördjupas med svampbiologiska studier av det mikroekologiska system svamp-vednedbrytning utgör och breddas till andra vedfiberbaserade material och svampar.

Figur 3. *Aureobasidium pullulans* i ljusmikroskop, i jäststadium i bildruta till vänster. Till höger, *Aureobasidium pullulans* transformerad med GFP lyser grönt, avbildad med fluorescensmikroskop.



Figur 4. Bilden visar *Aureobasidium pullulans* intrång i en märkestråle som ett pärlband.



Referenser

DJUS online. <http://dujs.dartmouth.edu/winter-2009/nobel-prize-in-chemistry-applications-of-the-green-fluorescent-protein>

Klebes online. http://genetik.fu-berlin.de/institut/flychip_06.html

McGrath M J, Andrews J H (2007). Role of immigration in the colonization of apple leaves by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1277–1286

Prendergast F, Mann K (1978). Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* 17: 3448–53

Webb J S, Barratt S R, Sabev H, Nixon M, Eastwood I M, Greenalgh M, Handley P S, Robson G D (2001). Green fluorescent protein as a novel indicator of antimicrobial susceptibility in *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5614–5620

Tsien R (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509–44