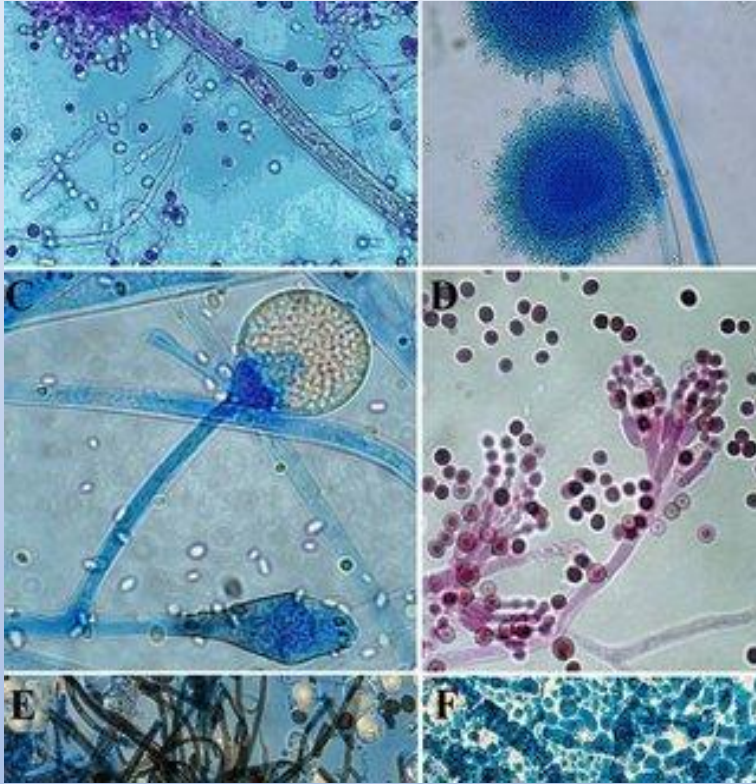


BARKODING DNA FUNGI



Microfungi



Macrofungi

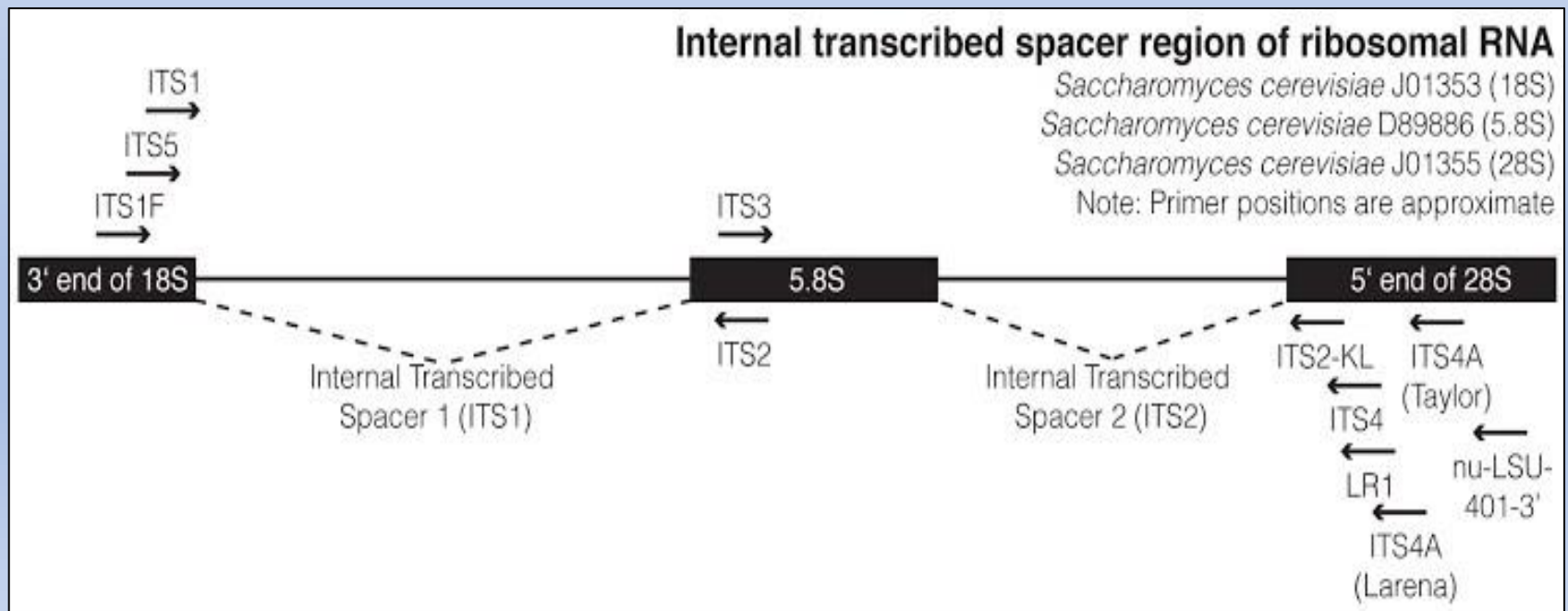
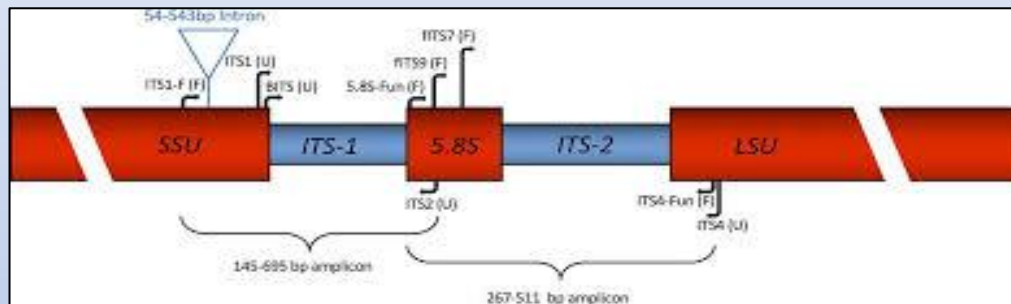
- Jamur/Fungi → eukariota heterotrofik, sebagian besar berdinding sel tebal yang terbuat dari kitin dan selulosa.
- Fungi/Jamur dapat berada baik di alam maupun lingkungan manusia dan punya keragaman: morfologi, ekologi, dan siklus hidup/Reproduksi
- ❑ Secara morfologi → terdiri dari: khamir bersel tunggal mikroskopis, kapang berfilamen jamur multiseluler makroskopis
- ❑ Secara ekologis → di berbagai tempat, dasar lautan - stratosfer, khatulistiwa - wilayah Arktik / Antartika, dari sungai - danau - gurun.
- ❑ Reproduksi → aseksual dan seksual, struktur konidiofor dan tubuh buah, sering menghasilkan spora, dapat bertahan dari tekanan lingkungan yang ekstrim dan dapat tersebar sampai jauh

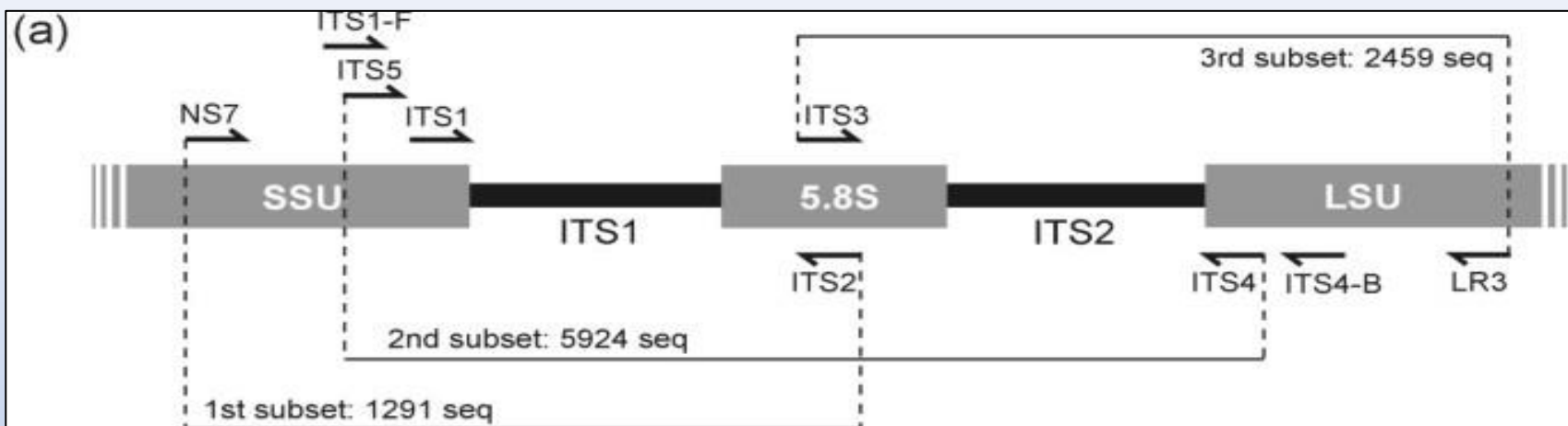
- peran penting → dalam siklus nutrisi, Kesehatan hewan dan tanaman ,kesejahteraan manusia terkait dengan ketahanan pangan dan penyakit menular, perlindungan lingkungan serta fungsi ekosistem secara luas.
- Kriteria berbeda dipakai oleh ahli taksonomi berbeda untuk mendeskripsi spesies → sulit dan bermasalah untuk membandingkan taksonomi antar kelompok jamur yang berbeda
- Akibatnya, sangat sulit untuk mengembangkan sistem identifikasi spesies yang efisien → untuk semua fungi.

- Sistem identifikasi spesies → signifikan meningkatkan kemampuan untuk mengobati penyakit infeksi jamur dan untuk memantau pola distribusi dan migrasi jamur secara spasial dan temporal
- Identifikasi spesies jamur yang cepat dan tepat → penting untuk konservasi, pemanfaatan keanekaragaman hayati yang berkelanjutan, pemantauan ekologi, pencegahan dan pengendalian jamur patogen, kontrol/ karantina spesies eksotik, dan kesehatan manusia.
- DNA barcoding → identifikasi spesimen jamur secara cepat, menemukan hipotesis spesies baru, dan memandu studi keanekaragaman hayati dan ekologi.
- Sekuen barcode → mengidentifikasi spesies **yang tidak bisa dengan identifikasi konvensional** dan membantu studi keanekaragaman hayati

- DNA barcoding → cara tepat identifikasi specimen → mengidentifikasi dan mendeskripsi semua fungi dan mengatasi masalah penggunaan kriteria tradisional yang berbeda untuk deskripsi kelompok jamur yang berbeda.
- International Fungal Barcoding Consortium (2012) rekomendasi → internal transcribed spacer (ITS) gen RNA ribosom inti digunakan sebagai barcode fungi universal/ utama.
- Pada fungi, seluruh wilayah ITS memiliki panjang sekitar 600 bp dan berisi dua variabel spacer, ITS1 dan ITS2, yang dipisahkan oleh gen 5.8S rRNA yang sangat terkonservasi.
- Wilayah ITS diapit oleh gen 18S rRNA di ujung 5 spacer ITS1 dan oleh gen 28S rRNA di 3 ujung spacer ITS2.

- Gen 18S, 5.8S, dan 28S rRNA yang sangat terkonservasi memungkinkan desain "primer universal" untuk memperkuat ITS1, ITS2, atau seluruh wilayah ITS pada mayoritas fungi.





(b)

Primer	Author	Primer sequence	Position
<i>Forward primers</i>			
NS7	[19]	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	1403-1426
ITS1-F	[18]	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	1723-1744
ITS5	[19]	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	1737-1758
ITS1	[19]	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	1761-1779
ITS3	[19]	GCATCGATGAAGAACGCAGC	2024-2045
<i>Reverse primers</i>			
ITS2	[19]	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	2024-2043
ITS4	[19]	TCCTCCGCTTATTGATATGC	2390-2409
ITS4-B	[18]	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	2526-2548
LR3	[13]	CCGTGTTTCAAGACGGG	3029-3045

- banyak primer fungi, seperti *COI*, *LSU*, *LSU*, *RPB1*, *RPB2* termasuk primer universal → ITS
- (ITS1 dan ITS4) masih banyak digunakan sampai sekarang.
- dataset komprehensif pertama dari domain variabel D1/D2 dari subunit besar inti (nLSU atau 28S) DNA ribosom → untuk sekitar 500 spesies ragi Ascomycetes.
- subunit kecil nuklir (nSSU atau 18S) DNA ribosom → untuk anggota terpilih dari klas Saccharomyces
- sebagian besar spesies yeast Basidiomycetes juga dapat dibedakan menggunakan urutan domain D1/D2 dari nLSU rRNA.
- secara umum, wilayah ITS lebih baik membedakan spesies yang berkerabat dekat dibandingkan domain D1/D2

- Pada 26 Juli 2016, Sistem BOLD berisi lebih dari 5 juta sekuen barkode DNA yang mewakili lebih dari 256.000 spesies yang dideskripsikan secara formal serta sejumlah besar hipotesis spesies baru (yaitu, BIN) (<http://www.boldsystems.org>)
- Saat ini, Sistem BOLD berisi 116.356 urutan barkode ITS fungi, yang mewakili 20.617 spesies yang dideskripsikan secara formal dan 11.507 hipotesis spesies yang diduga. Namun, proporsi yang signifikan dari sekuen barkode DNA Fungi diambil dari GenBank (<http://www.boldsystems.org>)

jurnal1: Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections

- Infeksi jamur invasif, seperti aspergillosis, kandidiasis, dan kriptokokosis, meningkat secara signifikan di antara orang-orang immunocompromised
- Untuk mengatasi infeksi ini langkah pertama dan paling menentukan adalah identifikasi yang akurat dari jamur patogen tersebut.
- Barcoding DNA jamur → barcode, wilayah internal transcribed spacer (ITS). Namun, ini hanya untuk 75% jamur diidentifikasi dengan benar
- **1 α (TEF1 α)** baru-baru ini sebagai barcode sekunder daerah untuk menutup kesenjangan/gap Kedua lokus bersama-sama membentuk barcoding DNA jamur dual skema
- Basis Data Barcoding ISHAM telah diperluas → mencakup urutan untuk kedua region barcode untuk memungkinkan implementasi praktis dari dual skema barcode dalam praktek klinis
- Penelitian ini → barcode sekunder untuk identifikasi taksa jamur yang penting secara klinis, yang telah terbukti menyebabkan penyakit invasif yang parah.
- Analisis barcode region dilakukan dengan menggunakan analisis gap barcode berdasarkan jarak genetik yang dihasilkan dengan model 2-parameter Kimura.
- Barcode sekunder / **1 α (TEF1 α)** → peningkatan dalam identifikasi untuk semua taksa yang tidak dapat diidentifikasi dengan **barcode primer/ITS**
- Barcode sekunder + barcode primer → memastikan identifikasi yang akurat untuk semua taksa yang dianalisis.
- barcode DNA sebagai hal penting, efisien, dan andal untuk perangkat diagnostik infeksi jamur invasif.

Jurnal 2: Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi)

- Jamur → salah satu organisme yang paling melimpah dan beragam di Bumi.
- jumlah besar, keanekaragaman spesies, hubungan, habitat, dan strategi kehidupan mikroorganisme ini masih belum dipahami dan teridentifikasi dengan cara konvensional
- barcode DNA → metode baru untuk identifikasi spesies yang cepat dan andal
- Region **nrITS** sebagai barcode universal Jamur, dan sub-region **ITS1** dan **ITS2** sebagai marker metabarcoding
- Dalam penelitian ini → analisis skala besar dari sekuens Basidiomycota dari GenBank.
- Dua pendekatan berbeda (PCI dan barcode gap) digunakan untuk mendeterminasi performansi region dan sub-region ITS secara lengkap
- Untuk sebagian besar genera Basidiomycota, tiga marker genomik → dapat identifikasi suatu genus, hasil yang sama diamati ketika kinerjanya tidak mencukupi
- berdasarkan analisis barcode gap, → ada marker genom yang mengidentifikasi lebih baik dari marker genom lain .
- Tetapi ada indikasi marker genom tidak bisa untuk identifikasi beberapa genus. baik ITS maupun sub-region ITS1 dan ITS2 tidak bisa mengidentifikasi 11 dari 113 genus Basidiomycota
- Hubungan filogenetik yang kompleks dan keberadaan spesies yang samar di beberapa genera adalah mungkin karena batasan ini.

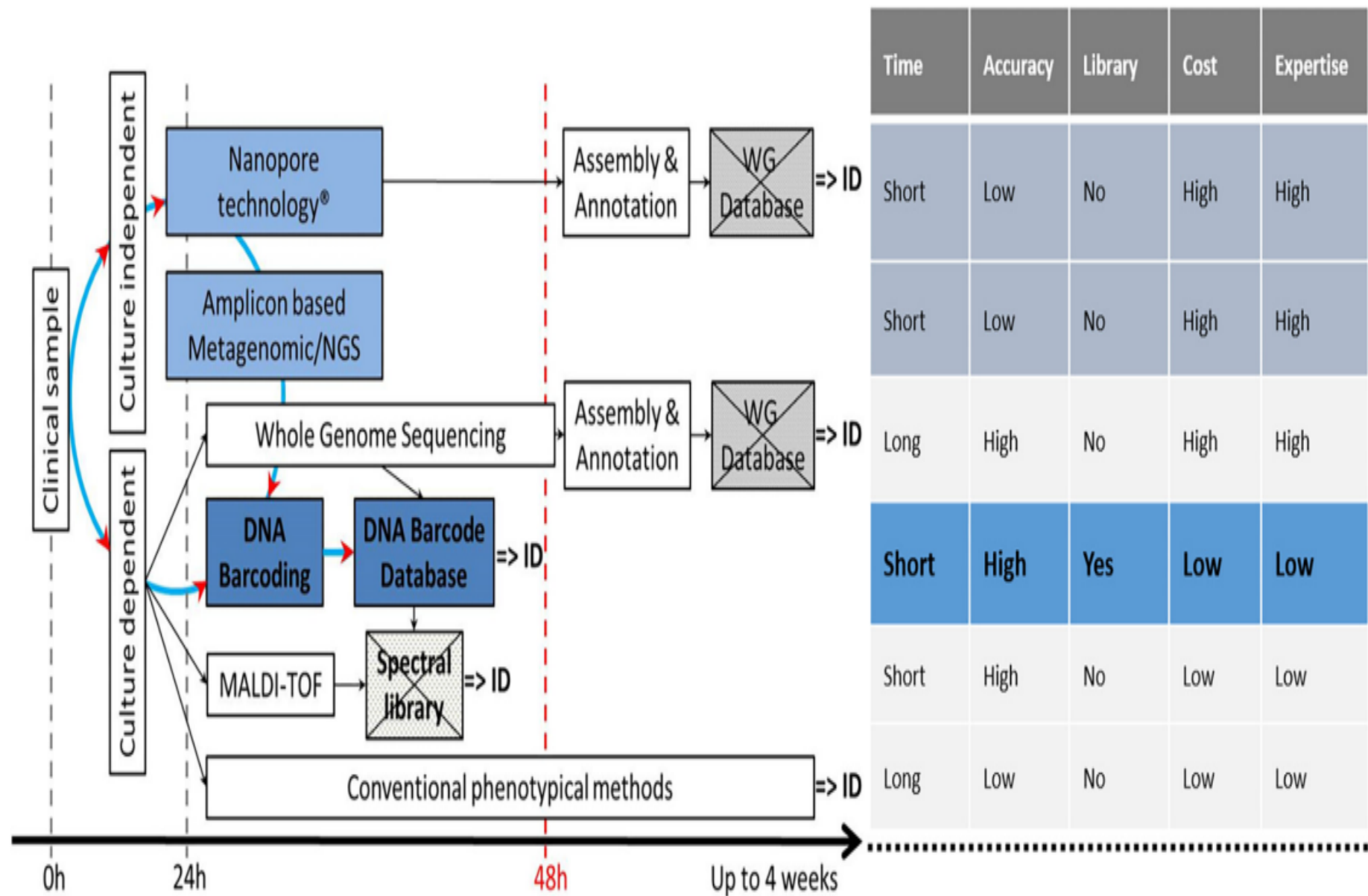


FIGURE 1 | Current and potentially available techniques for fungal ID, showing the central role of the reference DNA barcode database and the pros and cons of all techniques. Crossed boxes indicate missing databases. DNA barcoded reference strains are fundamental to build up a spectral library.

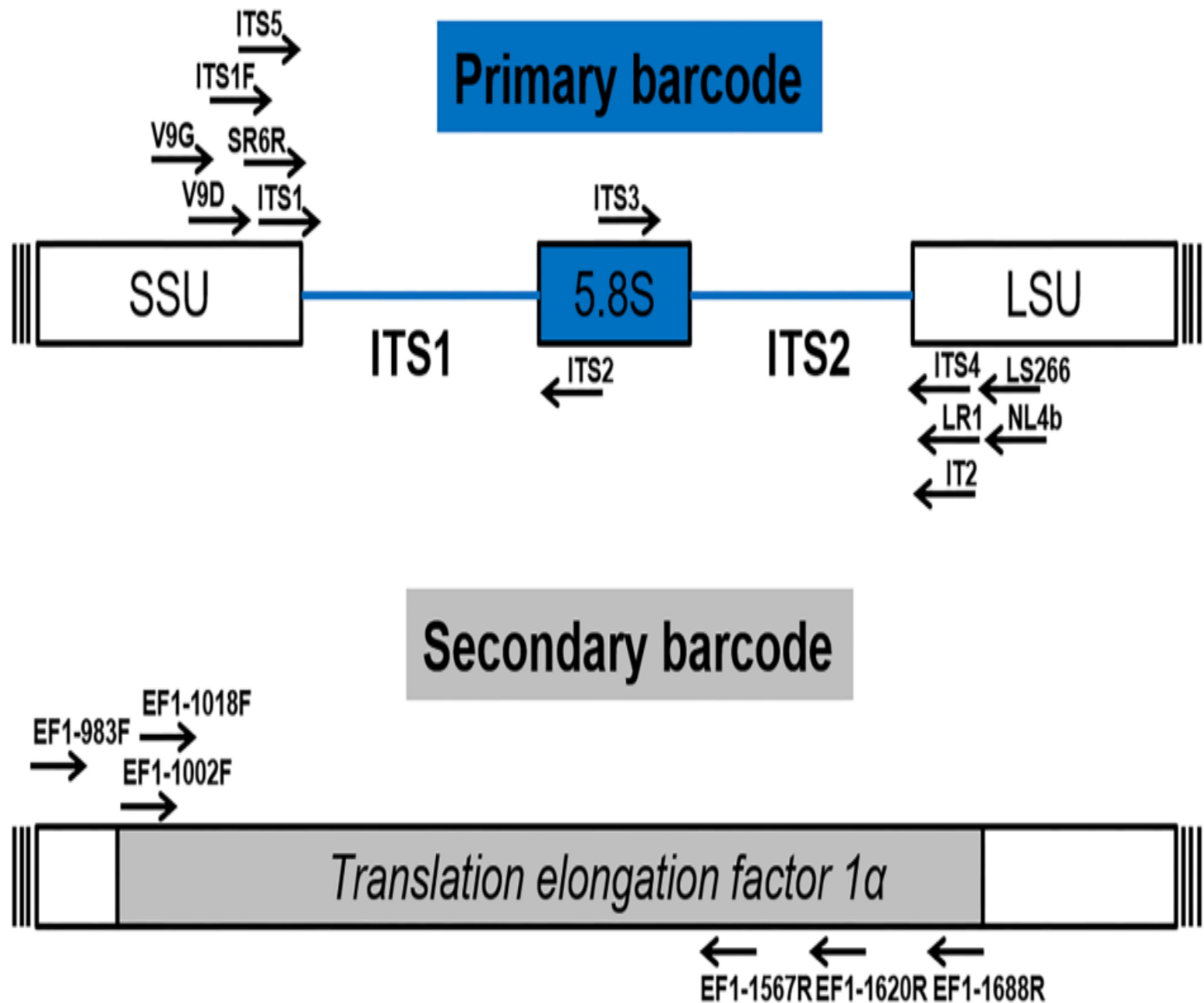


FIGURE 2 | Schematic structure of the primary (ITS) and secondary (*TEF1α*) fungal DNA barcode regions indicating universal primers for their amplification.

TABLE 1 | Universal and fungal specific primers for the dual DNA barcoding scheme.

Barcode	Primer name	Sequence	References
Primary barcode	ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	White et al., 1990
	ITS2	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'	White et al., 1990
	ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'	White et al., 1990
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White et al., 1990
	ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	White et al., 1990
	ITS1F	5' CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA 3'	Gardes and Bruns, 1993
	IT2	5' CCTCCGCTTATTGATATGCTTAGG 3'	Beguín et al., 2012
	SR6R	5' AAGTATAAGTCGTAACAAGG 3'	Vilgalys and Hester, 1990
	LR1	5' GGTTGGTTTCTTTCCT 3'	Vilgalys and Hester, 1990
	V9D	5' TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999
	V9G	5' TACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999
	LS266	5' GCATTCCCAAACAACCTCGACTC 3'	Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999
	NL4b	5' GGATTCTCACCTCTATGAC 3'	O'Donnell, 1993
Secondary barcode	EF1-1002F	5' TTCATCAAGAACATGAT 3'	Stielow et al., 2015
	EF1-1018F	5' GAYTTCATCAAGAACATGAT 3'	Stielow et al., 2015
	EF1-1620R	5' GACGTTGAADCCRACRTTGTC 3'	Stielow et al., 2015
	EF1-1688R	5' GCTATCATCACAATGGACGTTCTTGGAG 3'	Stielow et al., 2015
	EF1-983F	5' GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT 3'	Rehner and Buckley, 2005
	EF1-1587R	5' ACUCTGCCCATACCACTATCTT 3'	Rehner and Buckley, 2005

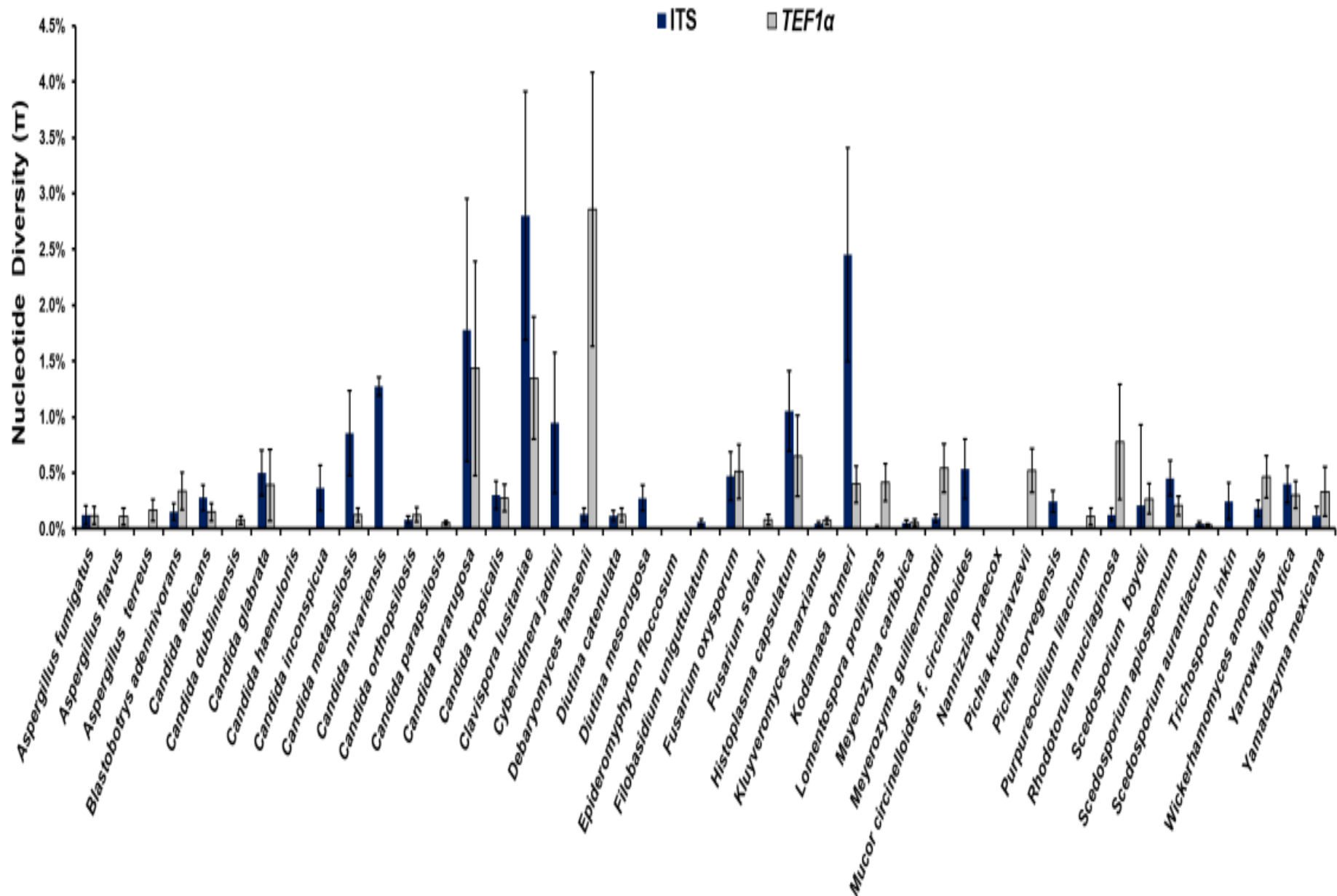


FIGURE 3 | Intraspecies variation for species, which are represented by more than three strains, in the internal transcribed spacer (ITS) (blue bars) primary fungal DNA barcode compared with the *translation elongation factor 1α* (*TEF1α*) (gray bars) secondary fungal DNA barcode.

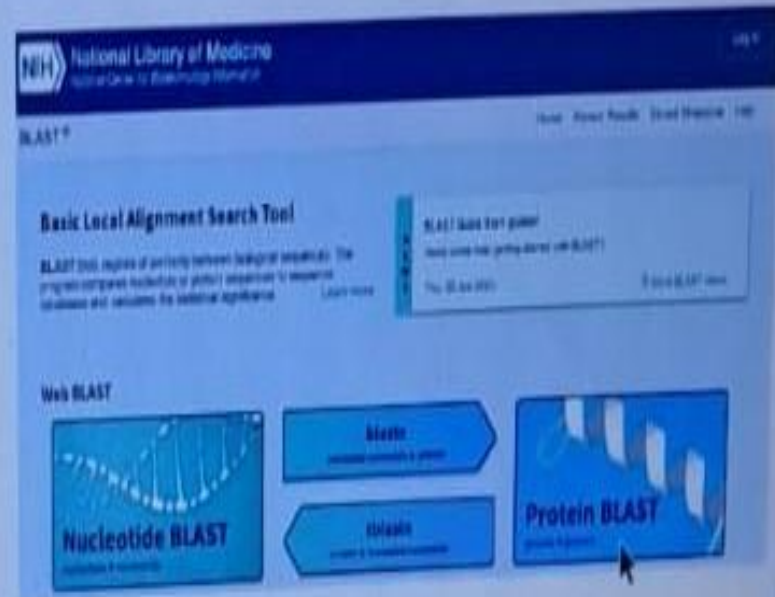
List of Curated Databases for Fungal Species Identification

(from <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>)

name of the database	URL	region utilized
Barcode of Life Database, BOLD	http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine	ITS
CBS-KNAW	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioLoMICSSequences.aspx	ITS
FUSARIUM-ID	http://isolate.fusariumdb.org	ITS, <i>tef1</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2</i> , <i>tub2</i>
Fungal Barcoding	http://www.fungalbarcoding.org	ITS
Fungal MLST database Q-Bank	http://www.q-bank.eu/Fungi/	partial actin, <i>tub2</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2</i> , <i>tef1</i> among others
ISHAM, The International Society for Human and Animal Mycology	http://its.mycologylab.org	ITS
Naïve Bayesian Classifier	http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp	28S, ITS
RefSeq Target Loci (RTL)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/	ITS, 18S, 28S
International Subcommision on Hypocrea and Trichoderma (ISHT) TrichoKey and TrichoBLAST (Trichoderma)	http://www.isth.info/tools/blast/	ITS and <i>tef1</i> , <i>RPB2</i>
UNITE, User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database	https://unite.ut.ee/	ITS

Problem with GenBank

- Blast search identification against GenBank should be made with caution as many fungal ITS sequences were submitted with insufficient taxonomic identification or incorrectly annotated and may lead to the wrong conclusion especially for fungal diversity studies.
- About half of all published studies of human mtDNA sequences contained mistakes (Bandelt et al. 2002).
- 20% of the 51,000 ITS entries in INSDC (including GenBank) at that time were incorrectly identified to the species level, and ~50% of the entries lacked descriptive and up-to-date annotations and/or taxonomy (Nilsson et al. 2006).



Limitation of the ITS as Universal DNA Barcoding Fungi

- The ITS region does not work well in some fungal genera, such as *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Trichoderma*.
- The need of use the secondary barcodes to obtain a more precise identification at the species level for these important genera.
- *Aspergillus* and *Penicillium*, two of the most prolific genera of fungi for secondary metabolites and which include numerous medicinally and industrially important species. *Trichoderma* spp. have huge implications in human health, the environment, agriculture, and industry as well as important fungi for natural products research.
- Barcoding of *Penicillium* spp., *tub2*/*BenA* is recommended as a secondary barcoding marker.
- For *Aspergillus*, **CaM** is recommended as a secondary barcoding marker, while *tub2*/*BenA* and *RPB2* genes are also highly preferred.
- For *Trichoderma* spp., the *tef-1* region has been widely used in the taxonomy and systematics of this genus.

Fungal DNA barcoding¹

Jianping Xu

Abstract: Fungi are ubiquitous in both natural and human-made environments. They play important roles in the health of plants, animals, and humans, and in broad ecosystem functions. Thus, having an efficient species-level identification system could significantly enhance our ability to treat fungal diseases and to monitor the spatial and temporal patterns of fungal distributions and migrations. DNA barcoding is a potent approach for rapid identification of fungal specimens, generating novel species hypothesis, and guiding biodiversity and ecological studies. In this mini-review, I briefly summarize (i) the history of DNA sequence-based fungal identification; (ii) the emergence of the ITS region as the consensus primary fungal barcode; (iii) the use of the ITS barcodes to address a variety of issues on fungal diversity from local to global scales, including generating a large number of species hypothesis; and (iv) the problems with the ITS barcode region and the approaches to overcome these problems. Similar to DNA barcoding research on plants and animals, significant progress has been achieved over the last few years in terms of both the questions being addressed and the foundations being laid for future research endeavors. However, significant challenges remain. I suggest three broad areas of research to enhance the usefulness of fungal DNA barcoding to meet the current and future challenges: (i) develop a common set of primers and technologies that allow the amplification and sequencing of all fungi at both the primary and secondary barcode loci; (ii) compile a centralized reference database that includes all recognized fungal species as well as species hypothesis, and allows regular updates from the research community; and (iii) establish a consensus set of new species recognition criteria based on barcode DNA sequences that can be applied across the fungal kingdom.

Key words: ITS, secondary barcode, herbarium, metabarcoding, operational taxonomic unit.

Résumé : Les champignons sont présents partout, tant dans les environnements naturels qu'anthropisés. Ils jouent des rôles importants dans la santé des plantes, des animaux et des humains de même que dans les écosystèmes. Ainsi, la disponibilité d'un système efficace d'identification des espèces pourrait grandement augmenter la capacité de traiter les maladies fongiques et de surveiller les variations spatiales et temporelles dans la distribution et la migration des champignons. Le codage à barres de l'ADN est une approche potentiellement puissante pour l'identification rapide de spécimens fongiques, permettant d'identifier de nouvelles espèces et guidant les études sur la biodiversité et les écosystèmes. Dans cette mini-synthèse, l'auteur résume brièvement (i) l'histoire de l'identification des champignons sur la base de séquences d'ADN; (ii) l'émergence de la région ITS en tant que code à barre fongique primaire consensuel; (iii) l'emploi des codes à barres ITS pour étudier nombre de questions sur la diversité des champignons de l'échelle locale à globale, incluant la description de nombreuses espèces nouvelles potentielles; et (iv) les problèmes que présente la région ITS et les approches pour les surmonter. Tout comme les recherches sur les codes à barres chez les plantes et les animaux, des avancées importantes ont été faites au cours des dernières années tant en matière des questions qui sont explorées que pour ce qui est de poser les assises pour de futurs travaux de recherche. Malgré tout, des défis importants demeurent. L'auteur suggère trois grands domaines de recherche pour accroître l'utilité du codage à barres de l'ADN chez les champignons pour rencontrer les défis actuels et futurs : (i) développer un jeu commun d'amorces et de technologies permettant l'amplification et le séquençage, chez tous les champignons, des codes à barres primaires et secondaires, (ii) compiler une base de données de référence centralisée qui inclurait toutes les espèces fongiques reconnues ainsi que celles nouvellement proposées, et qui permettrait des mises à jour régulières par les membres de la communauté scientifique, et (iii) établir un consensus quant à des critères pour la reconnaissance de nouvelles espèces sur la base de données de séquences de codes à barres de l'ADN, lesquelles s'appliqueraient à l'ensemble du règne des champignons. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : ITS, code à barre secondaire, herbier, métacodage à barres, unité taxonomique opérationnelle.

Received 26 February 2016. Accepted 9 August 2016.

Corresponding Editor: Sarah Adamowicz.

J. Xu, Department of Biology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada; Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming, Yunnan, PR China; Institute of Tropical Diseases, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, PR China.

Email for correspondence: jpxu@mcmaster.ca.

This paper is part of a special issue entitled Barcodes to Biomes.



Editorial: DNA Barcodes: Controversies, Mechanisms, and Future Applications

Rodney L. Honeycutt*

Natural Sciences Division, Pepperdine University, Malibu, CA, United States

Keywords: DNA barcodes, metabarcoding, taxonomy, biosecurity and regulation, microbial diversity, selection, mtDNA

Editorial on the Research Topic

DNA Barcodes: Controversies, Mechanisms, and Future Applications

Biodiversity provides ecosystem services and direct and indirect benefits to society. Unfortunately, human activities are now accelerating the extinction rate of biodiversity at an alarming rate, and in many cases, species will disappear before their discovery. Except for vertebrates and plants, knowledge about the number of species for many groups of organisms and the biogeographic regions harboring high levels of biodiversity is lacking (Honeycutt et al., 2010). Traditional taxonomy alone cannot achieve an all-species inventory, but the integration of conventional taxonomy, DNA-based technology, and bioinformatics increases the feasibility of filling in the knowledge gaps.

In 2003, Hebert et al. (2003a,b) proposed using an ~650 bp sequence from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) as a valuable barcode for identifying species in the kingdom Animalia. Given the rate of change and selection patterns, mitochondrial genes like COI demonstrate patterns of change conducive to their use as DNA barcodes (Shtolz and Mishmar). BOLD (Barcode of Life Data System) is a web-based reference system of COI sequences developed to allow species-level identification (Ratnasingham and Hebert, 2007). BOLD is now international and is cataloging sequences of species at a rapid rate.

What are some trends in the use of DNA barcodes? DeSalle and Goldstein present a summary of DNA barcoding papers published over the last 15 years. Throughout this period, the primary

OPEN ACCESS

Edited and reviewed by:

Mark A. Elgar,
The University of Melbourne, Australia

*Correspondence:

Rodney L. Honeycutt
rodney.honeycutt@pepperdine.edu