



## Molekularbiologische Diagnose holzerstörender Pilze (Basidiomyceten) in Praxisproben

Kordula Jacobs (Jacobs@ihd-dresden.de)  
Institut für Holztechnologie Dresden gemeinnützige GmbH  
Zellescher Weg 24 D-01217 Dresden

### Einleitung

Holzerstörende Pilze verursachen an Holzbauwerken, -konstruktionen und -bauteilen gravierende Schäden. Ein unmittelbares Unfallrisiko für den Menschen ergibt sich dabei, wenn tragende oder aussteifende Bauteile befallen werden. Die Erkennung und Beseitigung von Pilzschäden erfordern nach DIN 68800 Teil 4 eine eindeutige Feststellung der Art der Schadorganismen.

Die klassische Pilzbestimmung basiert auf der Begutachtung arttypisch ausgeprägter morphologischer Erkennungsmerkmale und erfordert eine hohe Kompetenz, Praxiserfahrung und Sorgfalt des Sachverständigen. Sie ist äußerst schwierig bzw. sogar unmöglich, wenn typische Erkennungsmerkmale nicht ausgebildet sind oder ein Mischbefall bzw. eine Verunreinigung der Befallsstellen auftritt. Eine Alternative bieten molekulare Diagnostikmethoden, die eine objektive, standardisierbare Analyse geringster Probenmengen ermöglichen. Fehlende Erfahrungen mit Proben aus der Praxis und fehlende Aussagen zu Bestimmungssicherheit und Anwendungsgrenzen dieser Methoden verhinderten jedoch bisher eine umfassende kommerzielle Anwendung.

### Ziel

Ziel des Projektes war die Weiterentwicklung bestehender molekularbiologischer Diagnostikmethoden für holzerstörende Pilze und die Untersuchung der Praxistauglichkeit dieser Methoden. Die Entwicklungsarbeit konzentrierte sich dabei auf den spezifischen Nachweis von *Serpula lacrymans* mittels SSPP (*Species specific priming PCR*) und FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) sowie die Identifizierung der wichtigsten holzerstörenden Pilze durch RFLP- (*Restriction fragment length polymorphism*) Analyse des ITS (*Internal transcribed spacer*) -Bereiches der rDNA (*ribosomale DNA*) bzw. Sequenzierung des ITS-Bereiches mit anschließendem Referenzdatenvergleich unter Nutzung der NCBI (*National Center of Biotechnology*)-Genbank. Mit der Bereitstellung eines umfassenden praxistauglichen Diagnostik-Tools sollten die Voraussetzungen für eine breite routinemäßige Anwendung der Holzpilzdiagnostik geschaffen werden.

### Ergebnisse

#### DNA-Extraktion

Für die Analyse von pilzgeschädigtem Holz wurden verschiedene Methoden der Probenvorbereitung getestet. Das beste Vermahlungsergebnis und Handling wurde mit der Schwingmühle der Firma Retsch, bei Verwendung von 50 ml-Edelstahl-Mahlbechern und Stahlkugeln von 5 mm Durchmesser, erzielt. Für spröde Hölzer sowie harte trockene Pilzmaterialien war auch die Schwingmühle der Firma Pequlab sehr gut geeignet. Hingegen waren das Vermahlen mittels Handmörser mit und ohne Stickstoff sowie mit Mikropistill unbefriedigend.

Zur Bereitstellung einer geeigneten und robusten DNA-Extraktionsmethode wurden eine Labormethode auf Basis der CTAB (*Cetyltrimethylammoniumbromid*)-Extraktion sowie sechs kommerzielle DNA-Extraktions-Kits getestet. Die Qualität und Quantität der DNA-Präparate wurde durch Gelelektrophorese und spektrophotometrische Messung der DNA-Konzentration im Biophotometer bestimmt. Die Amplifizierbarkeit wurde durch eine Standard-PCR mit den universellen Primern ITS1-F/ITS4-B (Gardes und Bruns 1993) getestet. Für schwierige Praxisproben, z.B. pilzgeschädigtes Holz ohne sichtbare Myzelien, waren Extraktionskits auf Basis von Silicasäulen geeignet. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit dem NucleoSpin Plant II Kit (MACHERY-NAGEL) sowie dem peqGOLD Fungal DNA Mini Kit (peqlab) erzielt.

Die Gewinnung analysierbarer DNA bleibt auch nach Optimierung von Probenaufarbeitung und DNA-Isolierung ein kritischer Punkt der Pilzdiagnostik. Beim Absterben des Pilzes bzw. von Teilen seiner Myzelien können eine Fragmentierung bzw. ein vollständiger Abbau der DNA-Strukturen auftreten, wodurch eine Diagnostik unmöglich wird.

#### rDNA-ITS-Sequenzierung

Für die universelle Amplifizierung des ITS-Bereiches von Basidiomyceten wurden zunächst der für höhere Pilze spezifische Primer ITS1-F sowie der für Basidiomyceten spezifische Primer ITS4-B eingesetzt. Es zeigte sich bei der experimentellen Arbeit, dass mit dem ITS4-B Primer unter optimierten (stringenten) PCR-Bedingungen keine Schimmelpilz-DNA vermehrt wird, andererseits jedoch auch einige Basidiomyceten schlecht oder gar nicht amplifiziert werden. Im Ergebnis von Sequenzierungen wurde gezeigt, dass einige der wichtigsten Hausfäulepilze im Sequenzbereich des ITS4-B-Primers unterschiedliche SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) aufweisen. Daraufhin wurde der Primer durch Einführung von alternativen Nucleotiden an zwei Stellen modifiziert (ITS4-Bm), wodurch die Amplifikationseffizienz bei kritischen Pilzarten, z.B. *Lentinus lepideus*, verbessert wurde. Kreuzreaktionen mit menschlicher, tierischer und pflanzlicher DNA wurden durch bioinformatische (BLAST-Analyse) und experimentelle Testung repräsentativer Arten ausgeschlossen.

#### Generierung valider ITS-Sequenzen

Bei der Nutzung von Referenzdaten aus frei zugänglichen Datenbanken (z.B. NCBI) ist zu berücksichtigen, dass ein beträchtlicher Teil der abgelegten Sequenzen nicht zuverlässig ist (z.B. Nilsson et al. 2006). Für die Generierung valider ITS-Sequenzen wurden Laborstämme, Isolate und Praxispräparate gesammelt und zunächst mit konventionellen Methoden zweifelsfrei identifiziert. Aus allen Materialien wurde die DNA mit dem NucleoSpin Plant II Kit (MACHEREY-NAGEL) präpariert, der ITS-Bereich mit den Primern ITS1-F und ITS4-B amplifiziert und sequenziert. Eine bioinformatische Bearbeitung der Sequenzen mit dem Software-Tool ARB-SILVA zeigte, dass der ITS-Bereich ein hinreichend großes Diskriminierungspotenzial für die 30 wichtigsten Hausfäulepilze aufweist. Es war damit nicht erforderlich, weitere potenzielle DNA-Zielregionen für die Pilzdiagnostik zu berücksichtigen.

#### Spezifischer Nachweis von *Serpula lacrymans*

Der Nachweis bzw. Ausschluss von *Serpula lacrymans* ist eine der wichtigsten Fragerstellungen im Rahmen von Holzschutzuntersuchungen. Für die Entwicklung eines leistungsfähigen Assays wurden verschiedene, auf die ITS-Region bzw. die 18s-Region der rDNA gerichtete spezifische Primer für *S. lacrymans* generiert bzw. aus der Literatur entnommen, mittels BLAST-NCBI-Recherche auf Spezifität getestet und anschließend experimentell in Bezug auf Spezifität und Sensitivität geprüft und verglichen. Mit den favorisierten Primern wurde zudem der Einfluss von Kontaminationen mit Fremd-DNA auf die Diagnostik untersucht. Die besten Befunde wurden mit dem Primer SL<sub>incorrect</sub> (Schmidt 2000) erzielt, obwohl dieser nicht 100 % homolog zur *S. lacrymans* –Sequenz ist. Durch zusätzliche Etablierung eines Nested-PCR-Verfahrens konnte die Sensitivität der Diagnostik noch verbessert werden.

#### FISH-Nachweis *Serpula lacrymans*

Für den Nachweis bzw. Ausschluss von *Serpula lacrymans* sollte ein Schnelltest auf Basis der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Technologie entwickelt werden. Dabei erfolgt eine Hybridisierung markierter spezifischer DNA-Sonden (fluoreszenzmarkiert) mit der RNA oder der Kern-DNA direkt in der Zelle. Die Fluoreszenzsignale spezifisch gebundener Sonden (positiver Befund) werden anschließend mikroskopisch detektiert.

Zur Generierung spezifischer, auf die Kern-DNA gerichteter FISH-Sonden wurden verschiedene *S. lacrymans*-Primer sowie der Primer ITS4-B als Pan-Basidiomyceten-Sonde mit dem Farbstoff Cy3 (Anregungswellenlänge 510 nm bis 550 nm – grünes Licht) markiert und deren Funktionsfähigkeit in der PCR nachgewiesen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden Behandlungen mit Paraformaldehyd, Ethanol und Methanol durchgeführt und durch Anfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und anschließende mikroskopische Untersuchung bewertet. Im Ergebnis wurde die Methanolfixierung favorisiert. Untersuchungen zur Autofluoreszenz bei der für den verwendeten Farbstoff Cy3 einzusetzenden Grünanregung (550 nm) zeigten keine deutlich sichtbare Eigenfluoreszenz des Pilzmaterials. Die Hybridisierungstemperatur betrug 47°C, die Hybridisierungsdauer wurde im Bereich von 1,5 h bis 6 h variiert. Die Untersuchungen erfolgten ohne Formamid-

Zusatz. Im Ergebnis zahlreicher Versuche mit den Sonden (Cy3-SLincorrect und Cy3-SL-2) sowie fixierten Mycelien von *Serpula lacrymans* (Stamm BAM 315) und *Serpula himantioides* (Stamm TI 55-77) konnten bei keinem der Ansätze spezifische Sondensignale detektiert werden. Auch Versuche mit der PAN-Basidiomycetensonde Cy3-ITS4-B zeigten keine positiven Befunde. Für die negativen Ergebnisse kommen verschiedene Ursachen in Betracht:

- Da zahlreiche Optimierungsversuche scheiterten, sind die für Hefen und Ascomyceten bereits erfolgreich eingesetzten Hybridisierungsprotokolle möglicherweise grundsätzlich nicht für Basidiomyceten anwendbar.
- Die etwa 20 bp großen farbstoffmarkierten Oligonucleotide (Sonden) können möglicherweise nicht in die Zellwand eindringen. Orientierend wurde deshalb eine enzymatische Zellwandlyse durch Behandlung mit Chitinase getestet, was aber keine Verbesserung brachte.
- Die Zugänglichkeit der Kern-DNA für die Sonden könnte durch Proteine behindert sein, die den Kern bzw. die darin enthaltenen Chromosomen umhüllen. In diesem Fall müssten RNA gerichtete Sonden eingesetzt werden, da die RNA in der gesamten Zelle vorhanden ist. RNA-gerichtete Sonden können nicht aus der ITS-Region generiert werden, da diese nicht in RNA umgeschrieben wird.

### RFLP-Diagnostik

Ein Teilziel des Projektes beinhaltete die Etablierung eines Diagnostiktools für die RFLP-Analyse von Hausfäulepilzen. Aus den ITS-Sequenzen der relevanten Pilzarten wurden zunächst geeignete Restriktionsstellen mit dem Programm CloneManager abgeleitet, die für die Erzielung eindeutig detektierbarer spezifischer Fragmentmuster geeignet erschienen. Unter Nutzung der generierten ITS1-F/ITS4-B-Sequenzen erfolgte die theoretische bioinformatische Ableitung der Fragmentmuster, welche anschließend experimentell verifiziert wurden. Dazu wurden entsprechende Untersuchungen an mindestens 3 Stämmen einer Pilzart in Form von Einzelverdaus durchgeführt. Auf diesem Wege wurden die RFLP-Muster (RFLP-Bibliothek) für die 30 wichtigsten holzerstörenden Pilze generiert. Damit ist eine im Vergleich zur Sequenzierung deutlich schnellere Identifizierung von Hausfäulepilzen möglich. Ein Befund liegt bereits ca. 3 Stunden nach Extraktion der DNA vor.

### Feldtest

Die im Projekt entwickelten Methoden zur DNA-Extraktion und Diagnostik wurden für die Molekularbiologische Diagnostik (MBD) pilzgeschädigter Hölzer von 50 Schadensfällen aus der Praxis im Rahmen eines Feldtests eingesetzt. Das Probenmaterial bestand aus Fruchtkörperfragmenten, Strängen, Oberflächenmyzelien oder geschädigtem Holz ohne sichtbare Pilzstrukturen. Alle Proben wurden, soweit möglich, mit konventionellen Methoden (makroskopische und mikroskopische Untersuchung der morphologischen Merkmale) analysiert. Die molekularbiologische Diagnostik umfasste einen PCR-Test auf *Serpula lacrymans* sowie eine Identifizierung der Pilzart mittels rDNA-ITS-Sequenzierung und anschließendem Datenabgleich mit eigenen Daten bzw. mit Daten der NCBI-Genbank.

Es traten bei keiner Probe widersprüchliche Befunde der eingesetzten Methoden auf. Bei Einsatz der für die Routinediagnostik optimierten Methoden zur DNA-Isolierung, Amplifizierung und Sequenzierung konnte an 32 von 50 Proben die Pilzart problemlos mit einem Analysedurchgang diagnostiziert werden. Bei weiteren 10 Proben war eine eindeutige Pilzidentifizierung nach zum Teil aufwändigen zusätzlichen Analyseschritten (u.a. weitere PCRs) möglich. An 8 Proben konnte keine Pilzbestimmung durchgeführt werden, weil keine analysierbare DNA gewonnen wurde (3), nicht auswertbare Mischsequenzen auftraten (3) oder die entsprechenden Referenzdaten nicht verfügbar waren (2). Die Anzahl der mittels MBD eindeutig identifizierten Pilzarten (42 von 50) war deutlich höher als bei der konventionellen Diagnostik (21 von 50). Dabei ist zu berücksichtigen, dass vorrangig Schadensfälle ausgewählt wurden, bei denen eine herkömmliche Pilzbestimmung problematisch war. Die ermittelte Erfolgsquote der konventionellen Diagnostik gilt also nicht für die gesamte Breite der im Kontext von Holzschutzuntersuchungen durchgeführten Pilzbestimmungen.

### **Schlussfolgerungen**

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht. Es wurde im Ergebnis ein Diagnostikpool für die molekularbiologische Identifizierung von Hausfäulepilzen entwickelt, der verschiedene Methoden umfasst und in einem Feldversuch umfassend getestet wurde. Dabei wurden die Leistungsfähigkeit und Robustheit der Diagnostik unter praktischen Bedingungen belegt und eine im Vergleich zu herkömmlichen Methoden höhere Erfolgsquote nachgewiesen.

## Danksagung

Die Untersuchungen wurden vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF), die Deutsche Gesellschaft für Holzforschung e.V. (DGfH) und den Internationalen Verein für Technische Holzfragen (iVTH) gefördert, Förderkennzeichen: AZ-AiF: 15348 BR. Der vollständige Bericht kann bestellt werden bei: Internationaler Verein für Technische Holzfragen e. V., Bienroder Weg 54 E, 38108 Braunschweig.

## Literatur

- DIN 68 800 Teil 4 (1992): Holzschutz - Bekämpfungsmaßnahmen gegen holzerstörende Pilze und Insekten. Beuth-Verlag
- Gardes M, Bruns TD (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118
- Schmidt O, Moreth U (2000): Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans* *Mycological Research* 104 (1) 69-72
- Nilsson H, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson H, Kõljalg U (2006): Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. [www.plosone.org](http://www.plosone.org)