

Die Entwicklung einer quantitativen PCR Methode zur Beurteilung der *Fusarium*-Resistenz von Weizen

Kurt Brunner^{1*}, Maria Paula Kovalsky Paris, Guadalupe Paolino, Hermann Bürstmayr, Marc Lemmens, Franz Berthiller, Rainer Schuhmacher, Rudolf Krska und Robert L. Mache

Abstract

The breeding of *Fusarium* tolerant wheat is one of the major efforts of plant breeders nowadays. Usually artificial inoculation is chosen to infect the new breeds and visual ratings or mycotoxin analyses are applied to acquire knowledge of plant resistance. We developed a quantitative PCR Method which allows fast and reliable assessment of disease resistance. In contrast to previous PCR techniques a reference system was used to compensate for unsteadiness of DNA isolation and sample preparation procedure. The results obtained by the newly developed technique were in perfect accordance with the toxin-method but provided in several cases different results than visual ratings.

Key words: *Fusarium*, plant resistance determination, quantitative PCR

Der pflanzenpathogene Pilz *Fusarium* befällt Getreide und Mais und verursacht dadurch erhebliche Ertragseinbußen. Vermindertes Korngewicht und vor allem die Belastung des Korns mit toxischen Substanzen (Mycotoxinen) reduzieren die Qualität drastisch. Die Infektionen durch *Fusarium* werden durch feuchte Witterung, reduzierte Bodenbearbeitung und durch ungünstige Fruchtfolgen (Weizen auf Mais) begünstigt. Obwohl die Resistenzzüchtung von Weizen im Laufe des letzten Jahrzehntes bedeutende Fortschritte gemacht hat, sind hochresistente Sorten noch nicht am Markt erhältlich. Die Bewertung der *Fusarium* Resistenz von neuen Sorten erfolgt meist durch künstliche Infektion mittels Sprayinokulation oder über den natürlichen Infektionsweg unter erhöhtem Infektionsdruck durch das Ausbringen von Maisstoppeln oder befallenen Maiskörnern. Die Bestimmung des Befallsgrades erfolgt meist durch visuelle Bonitur und oft auch über die analytische Bestimmung des Mycotoxingehaltes im geernteten Korn. Beide Verfahren sind sehr zeitaufwändig und eine vollständige Analyse des Mycotoxingehaltes sehr kostenintensiv. Um Kosten für die Toxinbestimmung zu sparen wird meist nur Deoxynivalenol (DON) gemessen und als Leittoxin betrachtet. Seit einigen Jahren ist aber bekannt, dass Pflanzen die Mycotoxine als Glucoside maskieren (BERTHILLER et al. 2005) und dadurch an den etablierten Analysemethoden vorbeischießen können. Es wird vermutet, dass die Entgiftung durch Maskierung ein wesentlicher Mechanismus für erhöhte Resistenz von Pflanzen gegen *Fusarium* ist. Da aber die

Glucose im Magen-Darmtrakt von Säugetieren wieder abgespalten wird, kommt die akute Toxizität des DON wieder voll zur Geltung.

Einen neuen Ansatz zur Bestimmung des Befallsgrades in einer Pflanze oder in geerntetem Korn bietet die quantitative PCR (SCHNERR et al. 2001, REISCHER et al. 2004, WAALWIJK et al. 2004, YLI-MATTILA et al. 2008). Mit Hilfe der PCR wird die Menge an *Fusarium* DNA in einer Probe bestimmt. Diese Methode ist einerseits sehr sensitiv und Infektionen können bereits festgestellt werden bevor Symptome sichtbar sind und andererseits ist die Messung sehr selektiv. Der Befall mit anderen Pathogenen wird durch die *Fusarium*-PCR bewusst nicht erfasst. Diese Technik erlaubt einen sehr hohen Probendurchsatz und ist daher sehr kostengünstig. Damit die Aussagen über den *Fusarium*befall jedoch ausreichend zuverlässig werden, ist eine aufwändige Optimierung der gesamten Analyseprozedur unerlässlich. An der Technischen Universität Wien wurde eine Methode entwickelt, die künftig schnelle und kostengünstige PCR basierte Analytik der *Fusarium*menge in Proben erlaubt.

Übersicht: Die Stärken der quantitativen PCR

- Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) weist einen Organismus anhand seiner DNA nach
- Die PCR ist sehr sensitiv, wenige Moleküle *Fusarium* DNA reichen für einen positiven Test
- Die PCR ist sehr selektiv; es wird nur ein bestimmter Organismus nachgewiesen, selbst wenn andere, ähnliche in einer Probe zu finden sind
- Die PCR ist sehr schnell und kostengünstig

Die Probenvorbereitung

Die Isolation von DNA aus einer Probe stellt einen Schlüsselprozess für die gesamte folgende Analyse dar. Um die Ausbeute an DNA zu maximieren wurden verschiedene Zerkleinerungsverfahren (Mühle, Ultraschall und flüssiger Stickstoff), verschiedene Puffersysteme und verschiedene Reinigungsschritte auf deren Tauglichkeit getestet und mit kommerziell erhältlichen DNA-Isolationskits verglichen.

Es zeigte sich, dass eine modifizierte Methode der Europäischen Referenzlaboratorien (CRL) mit Abstand die meiste DNA aus Weizen zu isolieren vermochte. Zusätzlich zur sehr hohen Ausbeute ermöglicht diese Methode auch sehr gute Wiederholbarkeit der Aufschlüsse und sie ist sehr einfach handzuhaben.

¹ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Getreidemarkt 9, A-1060 WIEN

* Ansprechpartner: Dr. Kurt BRUNNER, brunner@mail.tuwien.ac.at

Entwicklung eines Referenzsystems

Der Vergleich von früheren Publikationen zum Thema *Fusarium* Messung mittels quantitativer PCR zeigte, dass oft kleine Unterschiede in der Probenvorbereitung zu drastischen Verfälschungen der Resultate führen. Daten aus unterschiedlichen Studien und unterschiedlichen Labors waren bisher kaum vergleichbar. Um diese Einschränkung der PCR Methode zu beseitigen wurde an der TU Wien ein Referenzsystem in Anlehnung an die etablierten PCR Nachweise für gentechnisch veränderten Mais entwickelt. Um Unregelmäßigkeiten in der Probenvorbereitung zu kompensieren, wird die *Fusarium* DNA Menge auf die gesamte extrahierte DNA bezogen und nicht wie in früheren Studien üblich, auf die eingesetzte Probenmenge.

Die Korrelation zwischen PCR Ergebnissen, Toxinmenge und visueller Bonitur

Um die Aussagekraft der PCR-Analytik für *Fusarium*befall in Weizen zu untersuchen, wurden 80 verschiedene Weizenproben mit unterschiedlichem Infektionsgrad mittels PCR vermessen. Unabhängig vom Jahr aus dem die Probe stammte und vom applizierten *Fusarium* Stamm zeigte sich eine äußerst gute Korrelation zwischen den Toxinwerten und der PCR Messung. Für die Toxinmenge wurde die Summe aus DON und DON-3-glukosid (maskiertes DON) herangezogen, da in einigen Proben mehr als 50% des DON maskiert vorlagen. Andere Toxine wie zum Beispiel Nivalenol wurden nur in vernachlässigbaren Mengen nachgewiesen.

Obwohl zu erwarten wäre, dass die Daten aus der visuellen Bonitur sehr gut mit dem PCR-bestimmten Infektionsgrad übereinstimmen sollten, wurde hier eine wesentlich schlechtere Korrelation beobachtet als zwischen Infektion und der Toxinmenge.

Die Resistenzbewertung von 20 Weizensorten

20 Weizensorten mit sehr hoher bis sehr niedriger Resistenz gegenüber *Fusarium* wurden 2005 mit *F. graminearum* und 2006 mit *F. culmorum* infiziert. Die Versuche wurden jeweils in zwei Parzellen am Feld durchgeführt. Um die drei Methoden visuelle Bonitur, Toxinmessungen und

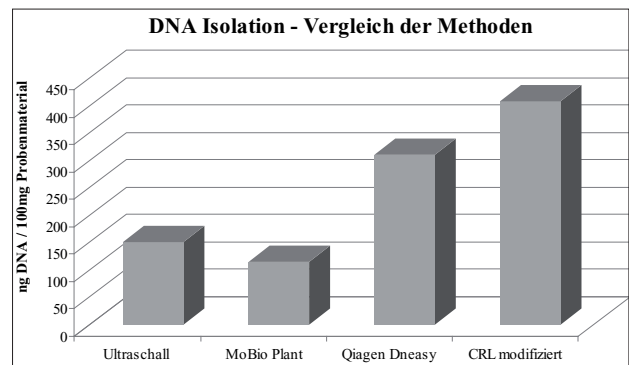


Abbildung 1: Vergleich der DNA Ausbeute einiger etablierter Isolationsmethoden

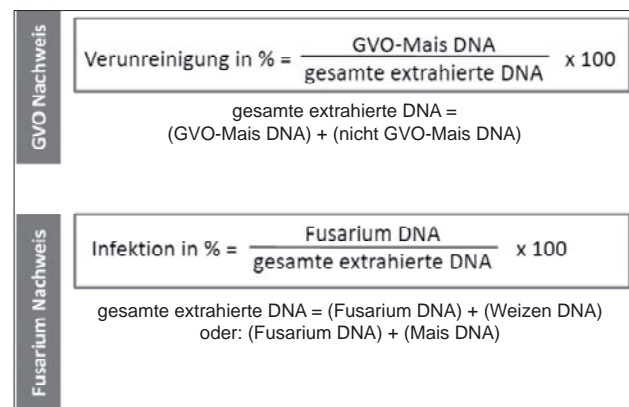


Abbildung 2: Umlegung der etablierten PCR-Methode zum Nachweis von gentechnisch verändertem Mais auf die Bestimmung der Infektion durch *Fusarium*

PCR-bestimmte Infektion vergleichen zu können wurden alle drei Methoden einander gegenübergestellt. In allen Fällen lieferten die Toxinwerte und die PCR-Methode idente Aussagen betreffend der Reihung der einzelnen Proben hinsichtlich Resistenz. Die Daten der visuelle Bonitur wichen besonders bei den resistenten Sorten oft deutlich von den beiden anderen Methoden ab.

Obwohl die Toxinanalytik und die PCR-Methode auf sehr unterschiedliche Weise die Resistenz von Weizen gegen *Fusarium* beurteilen, lieferten sie jedoch für *F. culmorum* und *F. graminearum* eine idente Reihung der Sorten hinsichtlich Resistenz. Es wäre zu erwarten, dass die visuell

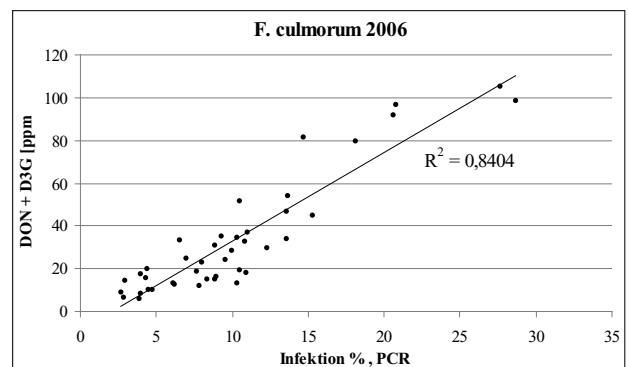
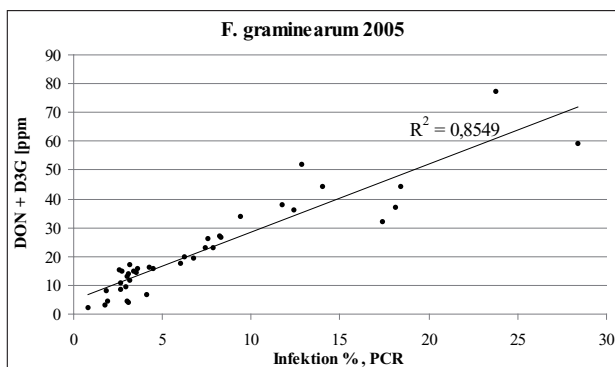


Abbildung 3: Die gebildete Toxinmenge korreliert unabhängig vom Jahr oder eingesetzten Stamm sehr gut mit der nachgewiesenen Menge an *Fusarium*

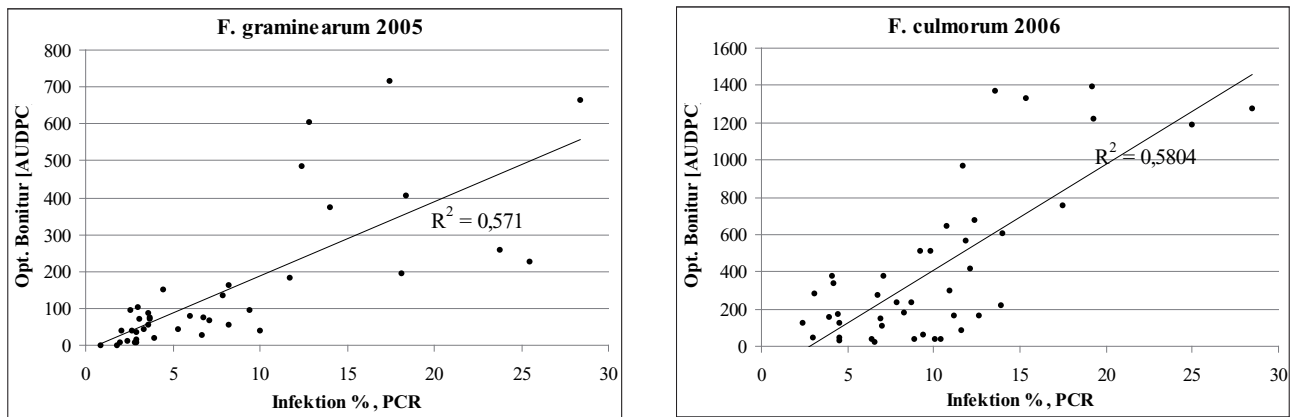


Abbildung 4: Korrelation zwischen visueller Bonitur (AUDPC - Area Under Disease Pressure Curve) und dem PCR bestimmten Infektionsgrad

beurteilten Symptome sowohl mit der Toxinmenge als auch mit der Menge des Pilzes sehr gut korrelieren sollten, dennoch lieferte diese Methode oft abweichende Ergebnisse, besonders bei eher resistenten Sorten.

Im Zuge dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung des Grades der Infektion mit *Fusarium* mittels quantitativer PCR sehr zuverlässige Ergebnisse liefert. Diese Methode erlaubt das Bearbeiten großer Probenmengen innerhalb sehr kurzer Zeit zu sehr geringen Kosten und stellt damit eine weitere Methode zur Resistenzbewertung neben den beiden etablierten dar.

Literatur

BERTHILLER, F., C. DALL'ASTA, R. SCHUHMACHER, M. LEMMENS, G. ADAM and R. KRŠKA, 2005: Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3421-3425.

REISCHER, G.H., M. LEMMENS, A.H. FARNLEITNER, A. ADLER and R.L. MACH, 2004: Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe. *J. Microbiol. Meth.* 59: 141-146.

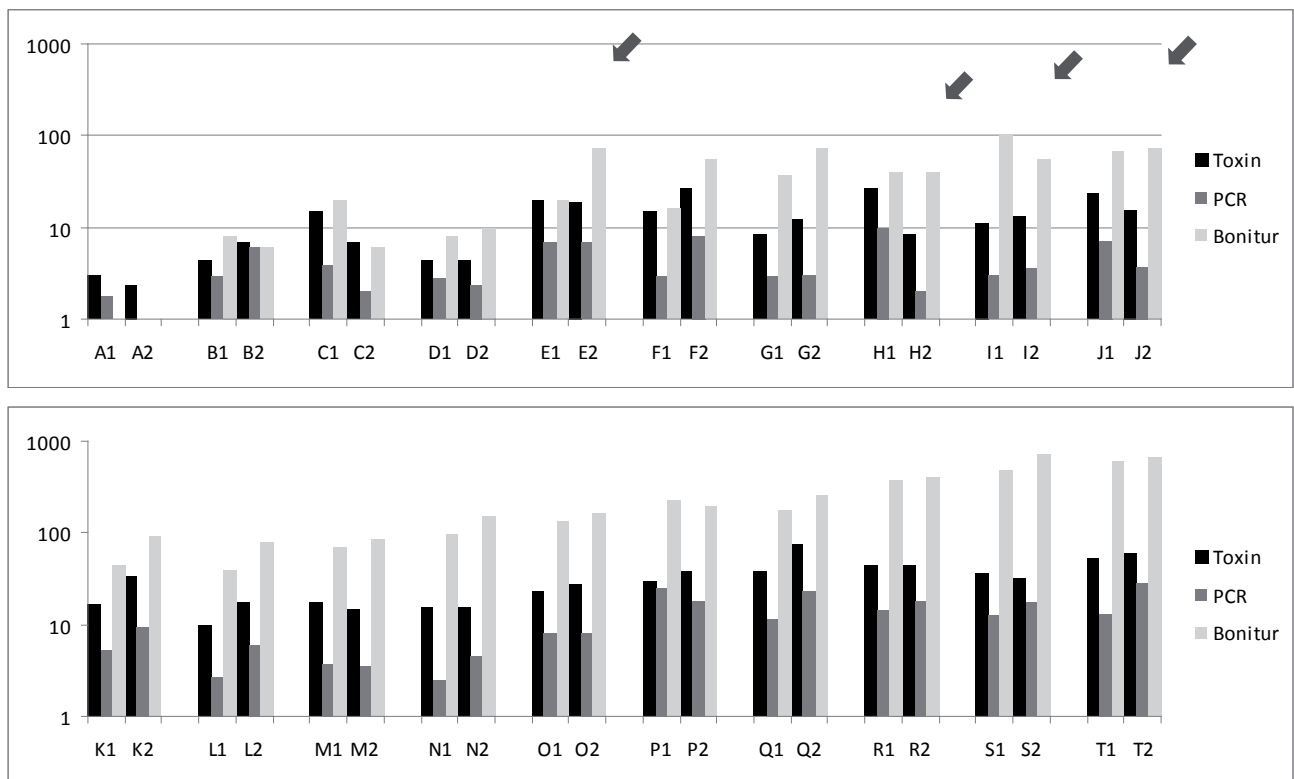


Abbildung 5: Inokulation mit *F. graminearum*. Die Buchstaben markieren die jeweiligen Sorten und ihre Feldwiederholung. A1: Parzelle 1 der Sorte A, A2: Parzelle 2 der Sorte A. Die Y-Achse gibt folgende Einheiten wieder: Toxinmenge [mg/kg], PCR-Methode [Infektions%] und visuelle Bonitur [AUDPC]. Die Pfeile markieren Feldwiederholungen mit deutlicher Abweichung der Boniturdaten von den beiden anderen Methoden.

- SCHNERR, H., L. NIESSEN and R.F. VOGEL, 2001: Real-time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* by LightCycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 53-61.
- WAALWIJK, C., R. VAN DER HEIDE, I. DE VRIES, T. VAN DER LEE, C. SCHOEN, G.C. CORAINVILLE, I. HÄUSLER-HAHN, P. KASTELEIN, J. KÖHL, P. LONNET, T. DEMARQUET and G.H.J. KEMA, 2004: Quantitative detection of *Fusarium* in wheat using TaqMan. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 481-494.
- YLI-MATTILA, T., S. PAAVANEN-HUHTALA, M. JESTOI, P. PARIKKA, V. HIETANIEMI, T. GAGKAEVA, T. SARLIN, A. HAIKARA, S. LAAKSONEN and A. RIZZO, 2008: Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 41(4): 243-260.