

Neueste Entwicklungen in der Resistenzbestimmung von Getreide und Mais: Nachweis der DNA als Schlüssel zur präzisen Messung von *Fusarium*-Befall

Latest developments for the determination of cereal and maize resistance to fungal infection: Quantification of DNA as the key for precise measurement of *Fusarium* infection

Kurt Brunner^{1*}, Viktoria Preiser¹, Andreas Farnleitner² und Robert L. Mach²

Abstract

The fungal plant pathogen *Fusarium* infects worldwide cereals and maize and causes severe damages. Infected grain is of reduced kernel weight and frequently contains toxic compounds produced by the fungus. Resistance breeding is considered as the most promising approach to fight this pathogen. However, the determination of resistance of new lines to *Fusarium* might not always be simple, often disease symptoms are not obvious. The quantification of *Fusarium* DNA by real-time PCR allows a precise determination of the grade of infection. This method measures the fungal biomass based on the specific fingerprint of only toxin producing *Fusarium* species whereas atoxigenic strains do not influence the measurement. Due to a co-determination of plant DNA the results can be given as simple infection-percent. The quantification of infection by PCR is an inexpensive and highly sensitive method to monitor *Fusarium* infection scenarios.

Keywords

Fusarium, mycotoxin, quantitative PCR, real-time PCR, tritiale, *Triticum*, *Zea mays*

Einleitung

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 des Ernteguts drastisch. Die Infektionen durch *Fusarium* werden durch feuchte Witterung, reduzierte Bodenbearbeitung und durch ungünstige Fruchtfolgen noch verstärkt. Obwohl die Resistenzzüchtung von Weizen und Mais im Laufe des letzten Jahrzehntes bedeutende Fort-

schritte gemacht hat, sind hochresistente Sorten immer noch kaum am Markt erhältlich. Die Bewertung der *Fusarium* Resistenz von neuen Züchtungen 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 wird meist durch visuelle Bonitur nachgewiesen und oft wird zusätzlich der Mycotoxingehalt im geernteten Korn analysiert. Die visuelle Bestimmung des Infektionsgrades gestaltet sich oft schwierig, da Symptome nicht immer deutlich sichtbar sind und eine umfassende Analyse des Mycotoxingehalt im Korn ist mit hohen Kosten verbunden.

Einen neuen Weg zur Bestimmung des Befallsgrades in einer Pflanze oder in geerntetem Korn beschreitet die quantitative PCR (auch real-time PCR) von *Fusarium* (REISCHER et al. 2004, WAALWIJK et al. 2004, YLI-MATTILA et al. 2008, BRUNNER et al. 2009). Mit dieser Methode können toxinbildende *Fusarium*-Stämme eindeutig anhand ihres genetischen Fingerabdrucks nachgewiesen und auch quantitativ erfasst werden. Diese Art der Bestimmung ist einerseits sehr selektiv, d.h. sie wird durch die Anwesenheit anderer Pilze nicht beeinflusst und andererseits zeigt die quantitative PCR eine überaus hohe Sensitivität. Selbst kleinste Pilzmengen können so zuverlässig gemessen werden. 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 mit hoher Genauigkeit erlaubt und diese Methode wurde bereits für Weizen, Durum, Triticale und Mais in zahlreichen praxisnahen Tests eingesetzt und die Resultate anhand visueller Bonitur und Toxinmessungen evaluiert.

¹ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften am IFA-Tulln, Analytikzentrum, Konrad-Lorenz Straße 20, A-3430 TULLN

² Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Gumpendorfer Straße 1a, A-1060 WIEN

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

Material und Methoden

Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Pilzmenge in einer Probe - meist geerntetes Korn, seltener grüne Pflanzenteile - muss die gesamte DNA möglichst vollständig und rein isoliert werden. Der Vergleich verschiedener DNA Extraktionsmethoden zeigte, dass ein validiertes Protokoll der Europäischen Referenzlaboratorien optimale Resultate liefert (EUROPEAN COMMISSION 2007). Diese Methode isoliert einerseits sehr große Mengen an DNA, sodass für alle Messungen verdünnt werden musste, und erreicht andererseits einen so hohen Reinheitsgrad, sodass keine weitere Aufreinigung nötig ist.

Referenzsystem zur Erhöhung der Analysegenauigkeit

In frühen Publikationen zur quantitativen PCR von *Fusarium* wurde die DNA Menge bestimmt und auf die eingesetzte Probenmenge bezogen. Diese Auswertemethode führt aber dazu, dass Ergebnisse verschiedener Studien kaum miteinander vergleichbar sind, da das Resultat wesentlich von der Effizienz der eingesetzten DNA Extraktionsmethode abhängt. Um diese Effekte zu kompensieren wurde an der TU Wien ein Referenzsystem entwickelt. Zusätzlich zur *Fusarium*-DNA wird auch die Menge der extrahierten Pflanzen-DNA mitgemessen. Durch den Bezug der Pilz-DNA auf die gesamte isolierte DNA kann somit ein zuverlässiger Wert für die Infektion in Prozent angegeben werden. Ein Prozent Infektion bedeutet dabei, dass ein Prozent der gesamten DNA in einer Probe von *Fusarium* stammt. Die Berechnung des Infektionsgrades in Prozent erfolgt durch die Doppelbestimmung von Pilz-DNA und Pflanzen-DNA entsprechend

$$\text{Infektion in \%} = \frac{\text{Fusarium DNA}}{\text{gesamte extrahierte DNA}} \times 100$$

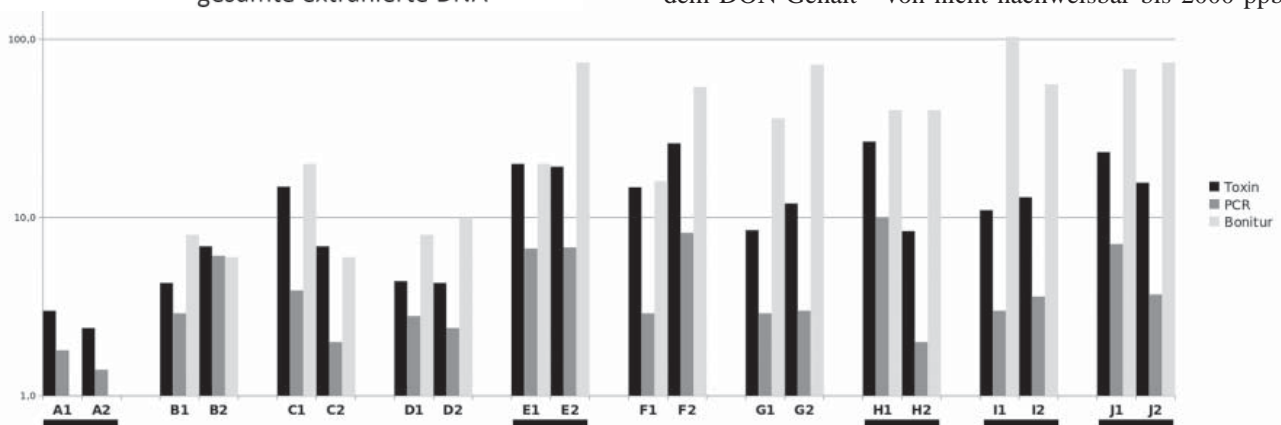


Abbildung 1: Mykotoxingehalt (ppm), Infektionsprozent für die PCR bzw. visuelle Bonitur (area under disease progress curve) von 10 Weizenlinien (A-J) nach Inokulation mit *F. graminearum*. Nachgestellte Zahlen 1 und 2 repräsentieren zwei Feldwiederholungen; schwarz unterstrichene Proben zeigen starke Abweichungen der visuellen Bonitur vom Trend der PCR Ergebnisse und der Toxinmessung

Figure 1: Mycotoxin content (ppm), infection level (%) determined by PCR, and scores for repeated visual evaluation of symptoms (AUDPC, area under disease progress curve) of 10 wheat genotypes (A-J) after inoculation with *F. graminearum*. Appended 1 and 2 represent two field trial replications; black underlined samples showed significant differences between visual symptom evaluation and results from PCR and toxin measurements

wobei die gesamte extrahierte DNA die Summe aus *Fusarium* DNA und Weizen bzw. Mais DNA ist.

Ergebnisse

Anwendungen in der Praxis

Die PCR Methode zur Messung der *Fusarium*-Infektion von Erntegut hat ein breites Einsatzspektrum. An der TU Wien wurde diese Technologie bereits zur Bestimmung der Effizienz von Fungiziden angewendet, zur Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Fruchtfolgen auf den *Fusarium*-Befall und zur Evaluierung unterschiedlicher Bodenbearbeitungsmethoden. Das zentrale Einsatzgebiet dieser Technologie liegt jedoch in der Resistenzbestimmung von neuen Getreide- und Maisszüchtungen. Durch die Quantifizierung der Pilz-DNA ist es erstmals möglich, die Menge an *Fusarium* zu erfassen, die sich während der Infektion bildet und zum Abbau des Pflanzenmaterials führt sowie zur Produktion von Mykotoxinen. In zwei Versuchen über jeweils zwei Jahre wurden die Zusammenhänge zwischen visueller Bonitur, Mykotoxingehalt und PCR Resultat bei Weizen sowie der Zusammenhang zwischen Toxinmenge und PCR Ergebnis bei Mais untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine grundsätzlich gute Korrelation zwischen den Mykotoxinen und der PCR-bestimmten Pilzmenge gibt, jedoch einzelne Proben oft stark abweichen können. Bei sehr resistenten Weizenlinien war die visuelle Bonitur besonders fehleranfällig und wich von den beiden anderen Methoden teils wesentlich ab (Abbildung 1). Für alle der hier untersuchten Proben korreliert die PCR bestimmte Infektion mit der Toxinmessung für die Feldwiederholungen nahezu perfekt, die visuelle Bonitur zeigt jedoch für die Hälfte der Proben deutlich andere Resultate.

Eine weitere Studie an Mais zeigte wiederum die erwartete gute Korrelation zwischen Toxinwerten und der Infektion (Abbildung 2). Die einzelnen Proben sind nach ansteigendem DON-Gehalt - von nicht nachweisbar bis 2000 ppb

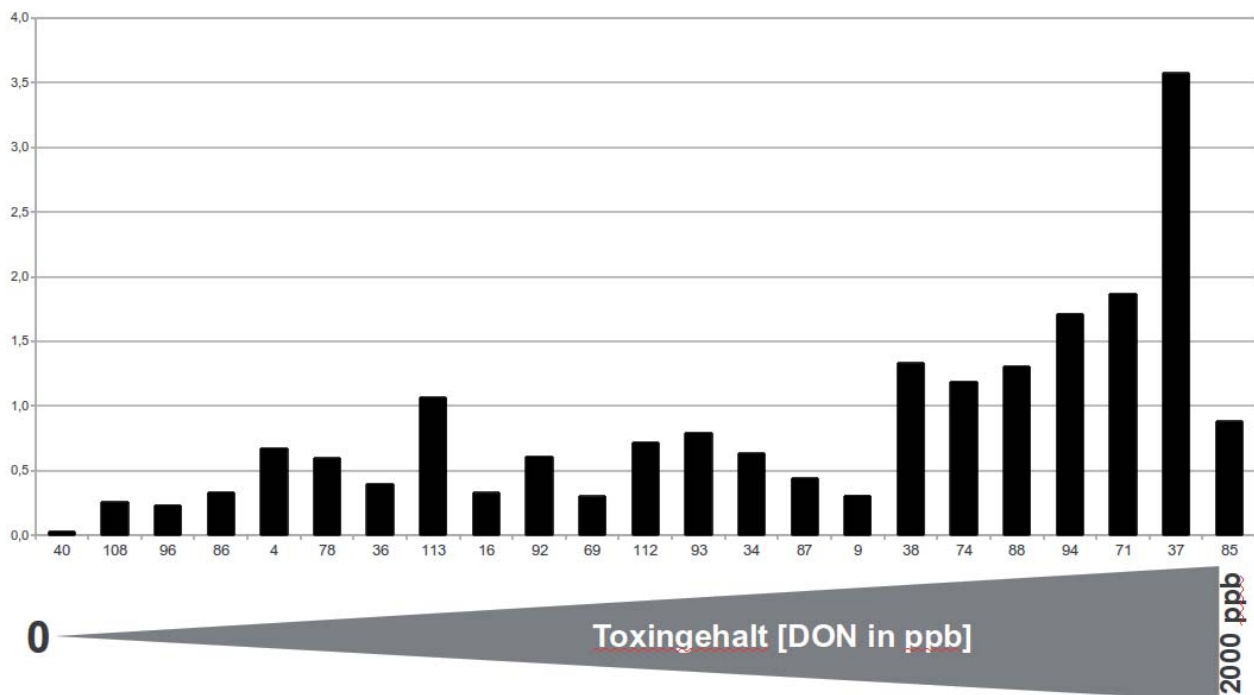


Abbildung 2: Infektionsprozent für die PCR von Maisproben (angeordnet nach steigendem DON-Gehalt). Einige Proben (113, 37) zeigen wesentlich mehr *Fusarium* Biomasse als aufgrund des Toxingehaltes zu erwarten wäre, andere wiederum sind weniger stark infiziert, bilden aber unverhältnismäßig große Mengen an Toxin (9, 85)

Figure 2: Infection level (%) determined by PCR of maize samples (arranged by ascending mycotoxin (DON) content). Some samples, e.g. 113 and 37, show significant more *Fusarium* biomass than expected due to their mycotoxin content, whereas other samples are less infected but exhibited relatively high mycotoxin contents, e.g. 9 and 85

- angeordnet. Da es sich bei diesen Proben um natürlich infizierten Mais handelt, kann der Unterschied zwischen der festgestellten Infektion und dem Toxinwert deutlicher ausfallen als in den oben präsentierten Weizenproben mit künstlicher Inokulation. Besonders toxische *Fusarium*-Isolate können zu sehr hohem Toxingehalt bei nur mäßiger Infektion führen.

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Infektion mittels quantitativer PCR ist die genaueste Methode zur Messung des *Fusarium*-Infektionsgrades. Etablierte Methoden wie die visuelle Bonitur oder die Bestimmung der Mykotoxine stellen nur indirekte Verfahren dar, um die Resistenz einer neuen Züchtung zu evaluieren. Zu oft weicht das beobachtete Schadbild oder auch die gemessenen Toxine von der tatsächlichen Menge an Pilz in einer Probe ab.

Die Technische Universität Wien hat im Laufe der letzten Jahre zahlreiche Testsysteme für *Fusarium* entwickelt, die sowohl speziesspezifisch (nur *F. graminearum*) oder toxinspezifisch (Trichothecebildner oder Fumonisinbildner) die Pilze in unterschiedlichen Proben wie Weizen, Durum, Triticale oder Mais nachweisen können. Weitere Details zu den bestehenden Messmethoden und Anwendungsgebieten sind online abrufbar (<http://www.biotrac.at>).

Literatur

- BRUNNER K, KOVALSKY-PARIS MP, PAOLINO G, BÜRSTMAYR H, LEMMENS M, BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, KRŠKA R, MACH RL, 2009: A reference-gene-based quantitative PCR method as a tool to determine *Fusarium* resistance in wheat. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1385-1394.
- EUROPEAN COMMISSION, 2007: Maize seeds sampling and DNA extraction. Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds. EC Directorate-General Joint Research Centre, Community Reference Laboratory for GM Food and Feed, Ispra, Italy. [Available online: http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MIR604_DNAExtr.pdf; accessed 13 Jan 2011]
- REISCHER GH, LEMMENS M, FARNLEITNER AH, ADLERA, MACH RL, 2004: Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe. *J. Microbiol. Meth.* 59, 141-146.
- WAALWIJK C, VAN DER HEIDE R, DE VRIES I, VAN DER LEE T, SCHOEN C, CORAINVILLE GC, HÄUSLER-HAHN I, KASTLEIN P, KÖHL J, LONNET P, DEMARQUET T, KEMA GHJ, 2004: Quantitative detection of *Fusarium* in wheat using TaqMan. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 481-494.
- YLI-MATTILA T, PAAVANEN-HUHTALA S, JESTOI M, PARIKKA P, HIETANIEMI V, GAGKAEVA T, SARLIN T, HAIKARA A, LAAKSONEN S, RIZZO A, 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, 243-260.