

# Entwicklung von immunochemischen und PCR-Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia* Arten in Saatgut

T. KELLERER, M. SEDLMEIER, F. RABENSTEIN und B. KILLERMANN

## Abstract

Molekulare und immunologische Methoden für den sicheren und zuverlässigen Nachweis sowie die Unterscheidung von Brandpilzen wurden entwickelt. Mit den bisher erreichten Ergebnissen können die drei *Tilletia* Arten Steinbrand (*T. caries*), Zwergsteinbrand (*T. controversa*) und Indischer Steinbrand (*T. indica*) nicht nur nachgewiesen, sondern auch innerhalb von 3h mittels PCR sicher voneinander unterschieden werden. Die entwickelten spezifischen Primerpaare für die drei *Tilletia* Arten weisen keine Wechselwirkung mit den anderen *Tilletia* Arten sowie mit samenbürtigen Pilzen wie *Fusarium* oder der Wirtspflanze selbst auf. Beim immunochemischen Nachweis mittels Western Blot und polyklonalen Antisera gegen *T. caries* bzw. *T. controversa* werden innerhalb von 5h ebenfalls sehr gute Ergebnisse erzielt. Im Western Blot konnte jeweils eine spezifische Reaktion in Form einer einzelnen Bande beobachtet werden, unter Verwendung eines polyklonalen Antikörperserums gegen Gesamtproteinextrakt aus *T. caries* bzw. *T. controversa* Sporen. Zusätzlich traten keine wesentlichen Wechselwirkungen in Kreuzreaktionstests im Bereich der spezifischen Bande auf. Methoden für den spezifischen Nachweis von *T. indica* mittels polyklonaler Antisera durch Western Blot und zum Nachweis aller 3 *Tilletia* Arten mittels monoklonaler Antikörper im ELISA sind derzeit in der Entwicklung. Parallel dazu werden die PCR Primer zur Unterscheidung der drei *Tilletia* Arten optimiert und validiert.

## Key words

Samenbürtige Pilze, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa*, *Tilletia indica*, Western Blot, PCR, polyklonale Antikörper, Brandpilze

## Einleitung

Weizen ist eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel. Die Produktion wird oft durch Pilzkrankheiten wie z.B. Roste und Brände beeinträchtigt. Ertragseinbußen sowie eine deutlich schlechtere Produktqualität bis hin zur Nichtverwendbarkeit, insbesondere im Öko-Landbau sind die Folge. Unter den Brandkrankheiten sind der Weizensteinbrand und der Zwergsteinbrand die gefährlichsten. Der Quarantäneschädling Indischer Steinbrand ist in Europa bisher noch nicht aufgetreten, stellt aber eine latente Bedrohung dar.

Für die Anwendung von Quarantänebestimmungen sind hocheffiziente Nachweismethoden eine Grundvoraussetzung, um schnelle und sichere Entscheidungen über Ex- und Import treffen zu können.

In diesem Forschungsprojekt wurden zwei Methoden entwickelt, die wichtigsten und gefährlichsten *Tilletia* Arten - Steinbrand (*T. caries*), Zwergsteinbrand (*T. controversa*) und den Quarantäneschädling Indischer Steinbrand (*T. indica*) - nicht nur nachzuweisen, sondern auch sicher und zuverlässig voneinander zu unterscheiden.

Für die Detektion einzigartiger Sequenzen im Genom bzw. Proteom dieser Pathogene wurden spezifische Primer für die PCR bzw. entsprechende polyklonale Antikörper für Western Blot Methoden entwickelt. Hierfür wurde das HSP60 Gen verwendet, welches diese einzigartigen Bereiche bietet. Das HSP60 Gen codiert für ein Hitzeschock Protein (Chaperon) zudem kommt es ubiquitär in allen hier verwendeten Pilzen vor. Zusätzlich bietet dieses Gen eine ausreichend hohe Variabilität, um die einzelnen *Tilletia* Arten voneinander zu unterscheiden.

## Material und Methoden

### Herkünfte von *Tilletia*-infizierten Ähren, Körner, reines Sporenmateriale oder Brandbutten:

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising (*T. controversa*)
- Federal Biological Research Centre, Darmstadt (*T. caries*)
- Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen (*T. caries*)
- Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft (*T. caries*)
- Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau, Sachsen-Anhalt (*T. caries*)
- Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft; Pflanzenschutzdienst Hessen (*T. caries*)
- GEVES, Station Nationale d'Essais des Semences (SNES). Cedex, Frankreich (*T. caries*)
- USDA-ARS, National Small Grains Germplasm Research Facility. Aberdeen, USA (*T. caries*, *T. controversa*)
- Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (*T. caries*, *T. controversa*)
- Department of Plant Breeding, Genetics & Biotechnology; Punjab Agricultural University Punjab, Indien (*T. indica*)

Die Sporen wurden mit mehreren Sieben bei reduzierenden Durchmessern gereinigt (Großansatz) oder aus Brandbutten per Hand isoliert (Kleinansatz).

Die Isolation der DNA, die PCR Bedingungen, die Protein Extraktion, die Herstellung der Antikörper und die Western Blot Bedingungen erfolgte wie in VDLUFA Schriftenreihe Bd. 62/2007, 575-579 beschrieben.

**Autoren:** Dipl.-Biol. Thomas KELLERER, Monika SEDLMEIER und Dr. Berta KILLERMANN, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Vöttinger Straße 38, D-85354 FREISING; Dr. Frank RABENSTEIN, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Neuer Weg 22, D-06484 QUEDLINBURG

## Ergebnisse und Diskussion

### PCR Methode

Als erster Schritt wurde die *Tilletia caries* HSP60-Sequenz bestimmt, welche als einzige der *Tilletia* Arten nicht in der ncbi Sequenzdatenbank (www.ncbi.nih.gov) veröffentlicht ist. Unter der Annahme, dass durch die große Homologie zwischen den beiden Sequenzen von *T. caries* und *T. controversa* eine PCR möglich sein könnte, wurde durch Verwendung von *Tilletia controversa* Primern und *T. caries* DNA unter wenig

stringenten Bedingungen eine PCR durchgeführt und das Produkt anschließend sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit den Datenbanksequenzen von *T. controversa* und *T. indica* verglichen und entsprechende Unterschiede herausgearbeitet. Auf diesem Weg wurden 3 Primerpaare für die Differenzierung der drei *Tilletia* Arten hergestellt, wobei in einer PCR Fragmente mit einer Länge von 155 (*T. indica*), 157 (*T. caries*) und 162 bp (*T. controversa*) entstehen. Die Unterscheidung bezieht sich auf das Vorhandensein einer spezifischen Bande

auf einem 1,5%igen Agarosegel entsprechender Länge bei richtiger Primer/Template Kombination (vgl. *Abbildung 1*, Pfeile). Eine falsche Primer/Template Kombination resultiert in keiner Bande bei ~ 160 bp oder unspezifischen PCR Produkten (vgl. *Abbildung 2 a-c*). Alle drei Primerpaare wurden erfolgreich getestet und können zur Unterscheidung der drei *Tilletia* Arten herangezogen werden.

Zur Validierung dieses neu entwickelten Testsystems wurden verschiedene *T. caries* Sporenerkennungen (deutsche

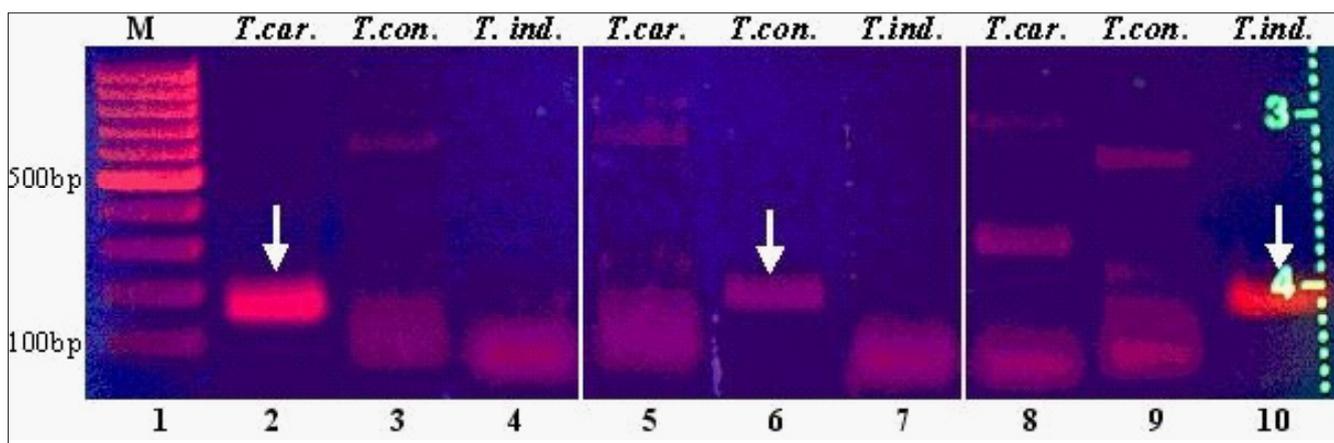


Abbildung 1: 1,5%iges Agarosegel mit PCR Ergebnissen der unterschiedlichen spezifischen Primerkombinationen. Spur 1: 100 bp Marker; Spuren 2-4: *T. caries*; Spuren 5-7: *T. controversa*; Spuren 8-10: *T. indica*.



Abbildung 2: 1,5%iges Agarosegel mit den PCR Kontrollreaktionen bei anderen samenbürtigen Krankheitserregern mit Primern für a) *T. caries*; b) *T. controversa*; c) *T. indica*. Jeweils Spur 1: 100 bp Marker, Spuren 2-9: *Fusarium poae* (2), *Fusarium graminearum* (3), *Fusarium culmorum* (4), *Microdochium nivale* (5), *Aspergillus fumigatus* (6), *Penicillium gladicola* (7), *Alternaria alternata* (8), *Cladosporium ER 21* (9).

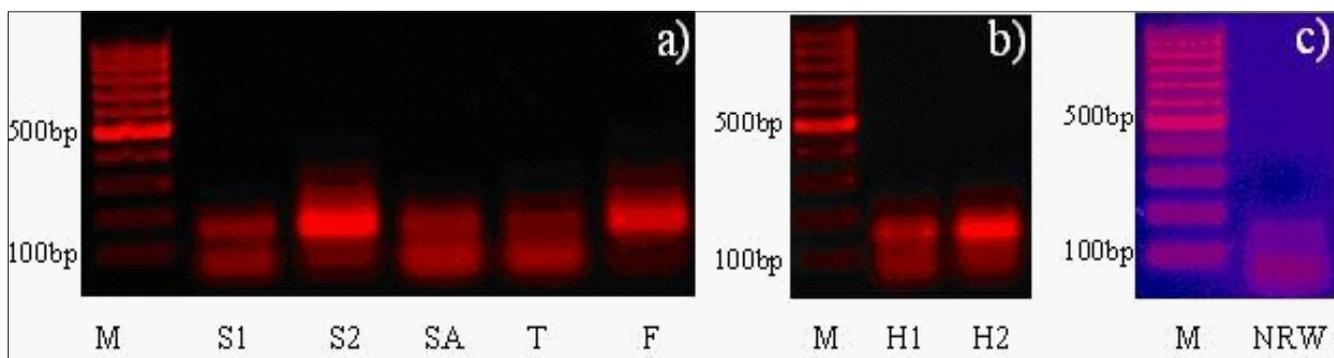


Abbildung 3 a-c: 1,5%iges Agarosegel mit *T. caries* Nachweis für Sporen aus deutschen Bundesländern und Frankreich. S1 = Sachsen (Löbau), S2 = Sachsen (Dresden), SA = Sachsen-Anhalt, T = Thüringen, F = Frankreich, H1 = Hessen Ernte '05, H2 = Hessen Ernte '07, NRW = Nordrhein-Westfalen, M = 100 bp Marker.

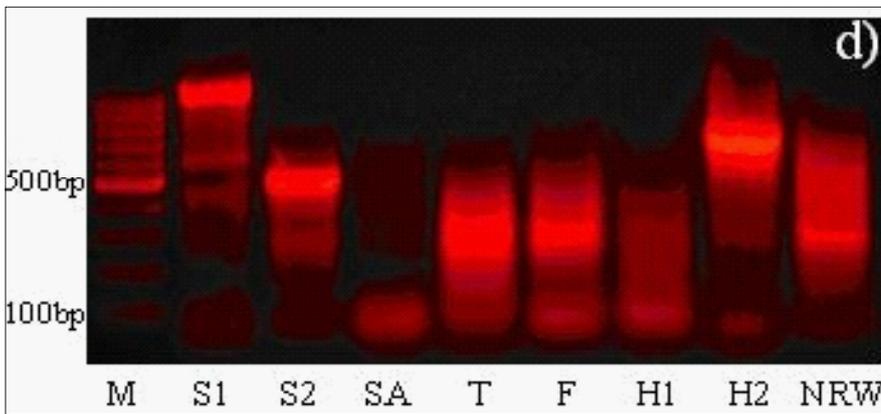
Bundesländer, Frankreich, Nordamerika und China) untersucht. Bei den Sporenproben aus den Bundesländern Sachsen, Sachsen-Anhalt, Hessen, Nordrhein-Westfalen, Thüringen sowie aus Frankreich erwies sich das Testsystem als sehr sicher und es konnten alle Proben zweifelsfrei als *T. caries* identifiziert werden (vgl. *Abbildung 3 a-c*). Weitere Herkünfte aus Deutschland werden derzeit getestet. Als Kontrolle diente das *T. controversa* Primerpaar, bei dem die charakteristische Bande bei ~160bp nicht erscheint (vgl. *Abbildung 4*). Die nordamerikanischen und chinesischen Herkünfte konnten bis jetzt noch nicht alle zweifelsfrei als *T. caries* bzw. *T. controversa* identifiziert werden, was in *Abbildung 5* dargestellt ist. Es konnten 20 *T. caries* Herkünfte richtig identifiziert werden (vgl. *Abbildung 5 a-c*). Unter-

schiedliche *T. controversa* Herkünfte ergaben wie erwartet negative Signale für das *T. caries* Primerpaar bei ~160 bp. Allerdings bildet die Herkunft A6 eine Ausnahme, die ein falsch positives PCR Produkt hervorgebracht hat (vgl. *Abbildung 5 c/d*; A6). Falsch positive Signale sind des öfteren aufgetreten und machen eine weitere Optimierung der Primer und/oder des Protokolls notwendig. Um eine quantitative Aussage bezüglich der Sporenbelastung treffen zu können wurde eine Nachweisgrenze für diese Primerpaare bestimmt. Eingesetzt wurde eine Verdünnungsreihe von 50-1.000 Sporen, wobei die DNA Extraktion mittels einer langsamen Methode (Qiagen DNA Extraction Kit) mit hoher DNA Ausbeute (*Abbildung 6*, Spuren 1-4) und einer schnellen Methode (Mikrowelle, Tris/EDTA Puffer) mit geringer DNA Aus-

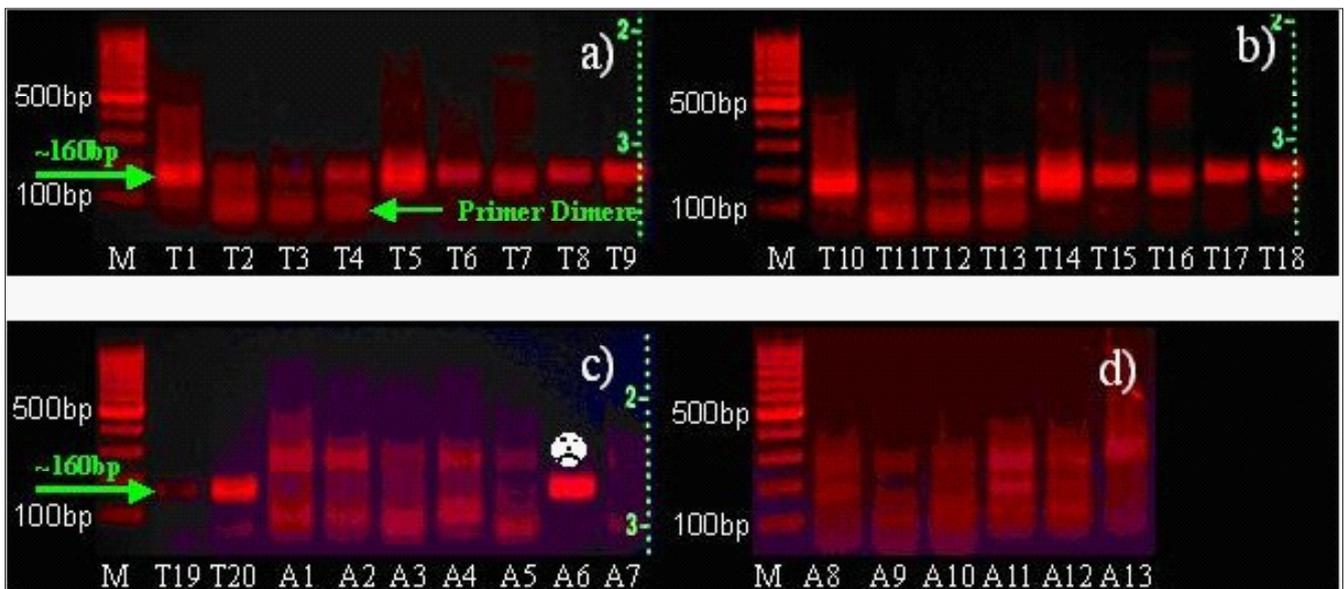
beute erfolgte (*Abbildung 6*, Spuren 5-9). Bei der DNA Extraktion mittels Qiagen Kit liegt die Nachweisgrenze unter 50 Sporen (Spur 1, *Abbildung 6*), für die schnelle Extraktionsmethode bei unter 500 Sporen (Spur 8, *Abbildung 6*). Wird diese Sporenzahl auf die zu untersuchenden 300 Körner (ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 53) bezogen, so liegt die Nachweisgrenze bei unter 1 Spore pro Korn (Qiagen) und unter 2 Sporen (schnelle Methode) und damit deutlich unterhalb der vereinbarten maximalen Sporenbelastung von 20 Sporen pro Korn, die für den Anbau von Saatgut im Ökologischen Landbau gilt.

**Western Blot Methode**

Polyklonale Antikörper wurden unter Verwendung von *T. caries*- und *T. controversa*-Sporensuspension als Antigen hergestellt. Die gereinigten Antikörper konnten für Western Blot Analysen in einer Verdünnung von 1:5.000 verwendet werden. Der Nachweis erfolgte über einen an alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper aus Ziege ( $\alpha$ -Rabbit IgG AP-conjugate) in einer 1:2.000 Verdünnung. Der *T. caries* Antikörper zeigt im Western Blot eine einzelne spezifische Bande bei ca. 43 kDa (vgl. *Abbildung 7 c*). Im Vergleich dazu zeigt der *T. controversa* Antikörper eine Vielzahl an Banden in einem „Zebrastrifenmuster“ (vgl. *Abbildung 7a*), was für die Detektion von Glycopeptiden spricht (WOODWARD et al. 1985).



*Abbildung 4*: 1,5%iges Agarosegel mit PCR Ergebnissen der *T. controversa* Primer als Negativkontrollen für die *T. caries* Herkünfte aus *Abbildung 3*. M = 100 bp Marker.



*Abbildung 5*: PCR Ergebnisse mit dem spezifischen *T. caries* Primerpaar von verschiedenen internationalen *Tilletia* Herkünften (China, Nordamerika). a-c: 20 *T. caries* Herkünften und c/d: *T. controversa* Herkünften. M = 100 bp Marker.

Hierfür wurde die Membran nach dem Blotten für 1h in Natriumperjodat Puffer inkubiert. Als Ergebnis resultiert eine

einzelne spezifische Bande bei ca. 70 kDa (Abbildung 7b, Pfeil). Auf den *T. caries* Antikörper hat diese Behandlung

keinen Einfluss (vgl. *Abbildung 7 c+d*). Ebenso wie für die PCR Methode wurde auch hier eine Nachweisgrenze für spätere quantitative Aussagen definiert. Eingesetzt wurde eine Verdünnungsreihe von 100 mg bis 1 ng (vgl. *Abbildung 8*). Der Antikörper erkennt im Western Blot noch Sporenmengen von 1 µg, was ca. 500 Sporen entspricht. Wird diese Menge wiederum auf 300 Körner bezogen, ergibt sich ein minimal nachweisbarer Befall von unter 2 Sporen pro Korn.

Mit den entwickelten Techniken stehen derzeit für den qualitativen Nachweis und die Unterscheidung der *Tilletia* Arten sichere, zuverlässige und schnelle Methoden zur Verfügung.

Hinsichtlich quantitativer Aussagen sind zwingend weitere Forschungsarbeiten notwendig. Denn erst mit der Aussage über die Befallshöhe - sprich die Anzahl Sporen pro Korn - kann eine Entscheidung darüber getroffen werden, ob die entsprechenden Saatgutpartien insbesondere im Ökologischen Landbau noch anbauwürdig sind.

## Literatur

FERREIRA, A. and N. GLASS, 1996: PCR from fungal spores after microwave treatment. <http://www.fgsc.net/fgn43/ferreir.html>

ISTA Handbook of Seed Health Testing (Working sheet No 53).

KELLERER, T., M. SEDLMEIER, F. RABENSTEIN und B. KILLERMANN, B. 2007: Entwicklung von immunochemischen und PCR Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia* Arten in Ökosaatgut. VDLUFA Schriftenreihe, Bd. 62/2007, 575-579.

National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)

WOODWARD, M.P., W.W. YOUNG Jr. and R.A. BLOODGOOD, 1985: Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *J Immunol Methods*, Vol. 78, 143-153.

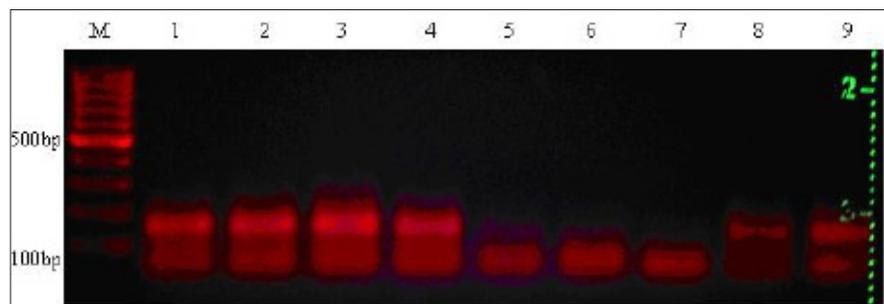


Abbildung 6: 1,5%iges Agarosegel mit den Nachweisgrenzen zweier DNA Extraktionsmethoden. Spuren 1+5: 50 Sporen; 2+6: 100 Sporen; 3+7: 200 Sporen; 4+8: 500 Sporen; 9: 1.000 Sporen. M = 100 bp Marker.

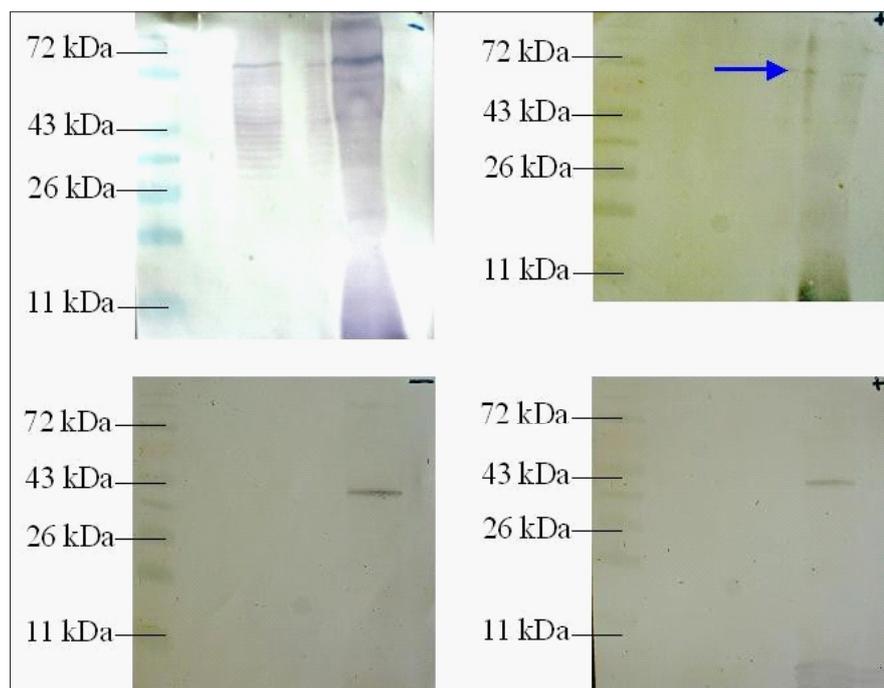


Abbildung 7 a+b: Western Blot nach SDS-PAGE des Gesamtproteinextrakts aus *T. controversa* mit einer spezifischen Bande bei ca. 70 kDa (Pfeil) vor und nach Natriumperjodat Behandlung. c+d: Western Blot nach SDS-PAGE des Gesamtproteinextrakts aus *T. caries* mit einer spezifischen Bande bei ca. 43 kDa. Eine Natriumperjodat Behandlung hatte hier keinen Einfluss.

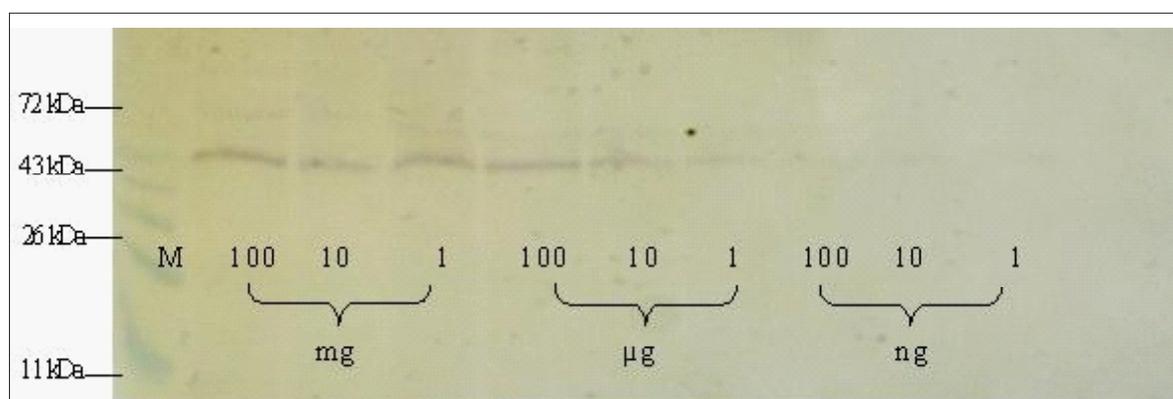


Abbildung 8: Nachweisgrenze des polyklonalen *T. caries* Antikörper bezogen auf eine Verdünnungsreihe von 100 mg bis 1 ng Sporen. M = Marker.