

Molekularbiologische Felddiagnostik pilzlicher Schaderreger an Holz auf Basis isothermaler PCR-Verfahren mit homogener Farbdetektion

Molecular-biological field diagnostics of fungal pathogens on wood based on isothermal PCR methods using homogeneous colour detection

Projektleiterin
Project leaders:
Kordula Jacobs

Fördermittelgeber
Co-funded by:
BMWK (INNO-KOM)

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Ein schneller und sicherer Nachweis holzerstörender Pilze ist Voraussetzung für die fachgerechte Sanierung von Pilzschäden an Gebäuden und Holzkonstruktionen und für eine Minimierung wirtschaftlicher Verluste. Etablierte molekularbiologische Nachweis-systeme für holzerstörende Pilze basieren auf konventionellen PCR-Methoden, Barcode-Sequenzierungen oder DNA-Arrays und werden durch Fachlaboratorien routinemäßig durchgeführt. Für eine schnelle, robuste und valide Vor-Ort-Analyse stehen jedoch bisher keine geeigneten Methoden zur Verfügung. Einen erfolgversprechenden Ansatz bietet hier eine spezielle Verfahrensvariante der isothermalen PCR, die Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Auf diesem Verfahren aufgebaute Analysen können bei konstanter Temperatur durchgeführt werden und weisen sehr hohe Spezifitäten und Sensitivitäten bei geringen Fehlerraten auf. Sie funktionieren zudem auch mit DNA minderer Qualität, was die Anforderungen an die Probenaufarbeitung, DNA-Isolierung und -Reinigung stark reduziert.

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur Vor-Ort-Analyse von holzerstörenden Pilzen, insbesondere Hausfäulepilzen, auf Basis einer isothermalen LAMP-PCR in Kombination mit einem visuellen Farbttest. Der Fokus der Arbeiten lag auf dem spezifischen Nachweis des Echten

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

Quick and reliable detection of wood-destroying fungi is a prerequisite for professional remediation of fungal damage to buildings and wooden structures and for minimising economic losses. Established molecular biological systems proving wood-destroying fungi are based on conventional PCR methods, barcode sequencing or DNA arrays and are routinely performed by specialised laboratories. However, suitable methods for swift, robust and valid on-site analysis are not yet available. A promising approach is offered by a special variant of isothermal PCR – Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Analyses based on this method can be performed at constant temperature and show very high specificities and sensitivities with low error rates. They also work with lower quality DNA, which greatly reduces the requirements for sample processing, DNA isolation and DNA purification.

The goal of the project was to develop a method for the on-site analysis of wood-destroying fungi, in particular house rot fungi, based on isothermal LAMP PCR in combination with a visual colour test. The focus of the work was on the specific detection of true dry rot (*Serpula lacrymans*, SL) as well as wild dry rot (*S. himantioides*, SH). The project work included the development of a robust method for sample processing and release of analysable DNA, the design of specific LAMP primer sets, the implemen-

Hausschwamms (*Serpula lacrymans*, SL) sowie des Wilden Hausschwamms (*S. himantoides*, SH). Die Projektbearbeitung umfasste die Entwicklung einer robusten Methode für die Probenaufarbeitung und Freisetzung analysierbarer DNA, das Design spezifischer LAMP-Primer-Sets, die Implementierung eines geeigneten Farbtests für die Endpunkt-detektion des LAMP-Signals und den Aufbau spezifischer LAMP-Assays sowie deren Validierung und Prüfung der Praxistauglichkeit (Feldtest).

VORGEHENSWEISE

Zunächst wurde eine einfach handhabbare und kostengünstige Probenaufarbeitungs-prozedur mit organischen Reagenzien etabliert, die auch vor Ort anwendbar ist. Dazu erfolgte der Aufschluss von Referenzmaterial (Frischmyzel und pilzdurchwachsenes Kiefernholz) mit verschiedenen Puffer- und Lysereagenzien sowie potenziell geeigneten kommerziellen Kitsystemen. Alle Methoden wurden anschließend hinsichtlich DNA-Ausbeute, Handhabung, Vor-Ort-Tauglichkeit, Zeit-, Geräte- und Materialaufwand vergleichend bewertet. Die beste Performance erzielte das QuickPick™ SML gDNA purification Kit (Bio-Nobile) bzw. das DNAzol-Reagent (Invitrogen) mit eigenem adaptiertem Protokoll. Das Verfahren mit DNAzol wurde aufgrund einfacherer Handhabbarkeit und niedrigerer Kosten favorisiert.

tation of a suitable colour test for endpoint detection of the LAMP signal and the construction of specific LAMP assays as well as their validation and testing for practical suitability (field test).

APPROACH

First, an easy-to-handle and cost-effective sample processing procedure was established with organic reagents that can also be used on site. For that purpose, reference material (fresh mycelium and fungus-infested pine wood) was pulped with various buffer and lysis reagents as well as potentially suitable commercial kit systems. All methods were then comparatively assessed in terms of DNA yield, handling, on-site suitability, time, equipment and material requirements. Regarding performance, the QuickPick™ SML gDNA purification kit (Bio-Nobile) with the DNAzol reagent (Invitrogen) and its own adapted protocol scored best. The DNAzol method was given preference due to easier handling and lower costs.

For LAMP detection, three LAMP primer sets each for SL and SH were designed using the freeware PrimerExplorer V5 from (<https://primerexplorer.jp/e>) and the NEB® LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com>), with two each directed at the rDNA-ITS region and one at the partial *tef1α* gene. Fig. 1 shows an example of the position of the primers in the rDNA-ITS region for the spe-

Für die LAMP-Detektion wurden jeweils drei LAMP-Primer-Sets für SL und SH unter Verwendung der Freeware PrimerExplorer V5 von (<https://primerexplorer.jp/e>) sowie dem NEB® LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com>) konzipiert, davon je zwei auf die rDNA-ITS-Region und eines auf das partielle *tef1α*-Gen gerichtet. Abb. 1 zeigt beispielhaft die Position der Primer in der rDNA-ITS-Region für den spezifischen Nachweis von *Serpula lacrymans* mit dem Primerset LAMP-SL1.

ERGEBNISSE

Unter Berücksichtigung von Spezifität und Sensitivität wurde je ein Primerset für SL und SH favorisiert und für den Assay-Aufbau weiter optimiert. Beispielhaft zeigt Abb. 2 die Befunde eines Spezifitätstests mit dem LAMP-Primerset SL1. Dabei konnten vier verschiedene Laborstämme von *S. lacrymans* innerhalb von 15 min erfolgreich detektiert werden, gleichzeitig traten keine falsch positiven Nachweise mit anderen typischen Hausfäulepilzen auf.

Für die visuelle Signaldetektion wurden verschiedene DNA-interkalierenden Farbstoffe und indirekte Indikatoren getestet, darunter fluoreszierende DNA-bindende bzw. interkalierende Farbstoffe zur direkten Anfärbung von DNA-Doppelsträngen (SYBR Green I, EvaGreen, Berberine) sowie die indirekten kolorimetrischen Indikatoren zum Pyrophosphat-Nachweis Calcein (Fluoreszenz sichtbar im Blaulicht) sowie Hydroxynaphtolblau (HNB, Farbumschlag violett/blau). Im Ergebnis waren alle Farbstoffe prinzipiell für eine visuelle Unterscheidung von positiver/negativer LAMP-Reaktion geeignet. Favorisiert

cific detection of *Serpula lacrymans* with the primer set LAMP-SL1.

RESULTS

Considering specificity and sensitivity, one primer set each for SL and SH was favoured and further optimised for the assay setup. As an example, Fig. 2 shows the results of a specificity test with the LAMP primer set SL1. Four different laboratory strains of *S. lacrymans* were successfully detected within 15 min, and at the same time there were no false positive detections with other typical house rot fungi.

For visual signal detection, various DNA-intercalating dyes and indirect indicators were tested, including fluorescent DNA-binding or intercalating dyes for direct staining of DNA double strands (SYBR Green I, EvaGreen, Berberine) as well as the indirect colorimetric indicators for pyrophosphate detection calcein (fluorescing in blue light) and hydroxynaphtol blue (HNB, colour change violet/blue). As a result, all dyes were generally suitable for visual differentiation of positive/negative LAMP reactions. The favourite indirect indicator was hydroxynaphtol blue (HNB), which is inexpensive and can be detected without fluorescence excitation. This proved to be robust and sufficiently sensitive for application to practical samples during the subsequent basic validation. In addition, fluorescence measurement with SYBR®Green was established, which is suitable for rapid diagnostics of several samples in the laboratory. In a final field test with 25 fungus-infested woods from practice, the two favoured and previously validated assays SL1 and SH5 showed good specificity and sensitivity. Both



Abb. 1: Schadpilze an Holz bzw. pilzgeschädigten Holzproben im Rahmen von Holzschutzuntersuchungen des IHD: Fruchtkörper (A) und Strangmyzel (B) sowie geschädigtes Holz (C) von *Serpula lacrymans*; Fruchtkörper (D) und Strangmyzel von *S. himantoides* (E, F) sowie verschiedene Oberflächenmyzelien von *Gloeophyllum trabeum* (G), *Coniophora puteana* (H), *Antrodia vaillantii* (I) und *Rhodonio placenta* (K).

Fig. 1: Harmful fungi on wood or on wood samples damaged by fungi within the scope of wood preservation investigations at the IHD: Fungal fruiting bodies (A) and strand mycelium (B) as well as wood (C) infested by *Serpula lacrymans*; fungal fruiting bodies (D) and strand mycelium of *S. himantoides* (E, F) as well as surface mycelia of *Gloeophyllum trabeum* (G), *Coniophora puteana* (H), *Antrodia vaillantii* (I) and *Rhodonio placenta* (K).

wurde der kostengünstige und ohne Fluoreszenzanregung detektierbare indirekte Indikator Hydroxynaphtholblau (HNB). Dieser erwies sich im Rahmen der anschließenden Basisvalidierung als robust und hinreichend sensitiv für die Applikation an Praxisproben. Daneben wurde die Fluoreszenzmessung mit SYBR®Green etabliert, die sich für eine schnelle Diagnostik mehrerer Proben im Labor eignet.

In einem abschließenden Feldtest mit 25 pilzgeschädigten Hölzern aus der Praxis zeigten die zwei favorisierten und im Vorfeld validierten Assays SL1 und SH5 eine gute Spezifität und Sensitivität. Beide liefern eine technische Basis für die Entwicklung von Diagnostikprodukten für die Vor-Ort-Analyse holzerstörender Pilze. Die zunächst für zwei Modellpilze entwickelte LAMP-Diagnostik kann mit überschaubarem Entwicklungsaufwand auch für die Diagnostik weiterer pilzlicher Schaderreger im Holz- und Materialschutz, in der Holz- und Forstwirtschaft oder in anderen Bereichen adaptiert werden.

provide a technical basis for the development of diagnostic products for the on-site analysis of wood-destroying fungi. The LAMP diagnostics initially developed for two model fungi can also be adapted with manageable development effort for the diagnostics of other fungal pathogens in wood and material protection, in the wood-working industry and forestry or other areas.