

Quantitativer PCR-Assay zum Nachweis des Echten Hausschwamms mit implementiertem molekularem Vitalitätstest

Projektleiter: Dipl.-Ing. Kordula Jacobs
 Bearbeiter: Dipl.-Ing. Sc. Natalie Rangno
 Förderinstitution: BMWi/EuroNorm/INNO-KOM
 Kooperationspartner: Institut für Polymorphismus und Mutationsanalytik,
 Saarbrücken
 Institut für Bioinformatik der Universität Saarbrücken

Ausgangssituation und Zielstellung

Der gefährlichste und gleichzeitig mit Abstand häufigste pilzliche Holzzerstörer in Gebäuden Mitteleuropas ist der Echte Hausschwamm *Serpula lacrymans* (Wulfen:Fr.) Schroeter apud Cohn (Abbildung 1).



Abb. 1: Befall einer Balkon-Unterkonstruktion durch Echten Hausschwamm

Aufgrund des hohen Zerstörungspotenzials sind für diesen Pilz spezielle Sanierungsmaßnahmen vorgeschrieben, die in der Regel mit deutlich höheren Kosten im Vergleich zur Regelsanierung bei anderen Pilzen verbunden sind (Grosser et al. 2003). Zwangsläufig ist deshalb der Nachweis bzw. Ausschluss eines Befalls durch *S.lacrymans* eine der wichtigsten Aufgaben von Holzschutzsachverständigen und -gutachtern im Rahmen der Gebäudesanierung und Immobilienbewertung.

Die Pilzbestimmung im Rahmen einer Schadensbegutachtung beinhaltet zunächst die von einem Fachmann durchzuführende visuelle Untersuchung vor Ort. Führt diese nicht zu einem aussagekräftigen Befund, sind normgemäß Laboruntersuchungen durchzuführen (DIN 68800-4:2012). Diese können makroskopische und mikroskopische Analysen, Kul-

tivierungsversuche oder molekularbiologische Nachweise, insbesondere DNA-Analysen, umfassen (Grosser et al. 2013).

Die Mehrzahl der molekularbiologischen Nachweissysteme für holzerstörende Pilze basieren auf der spezifischen Amplifikation von rDNA-ITS-Sequenzen mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese (z.B. Jacobs et al. 2010, Schmidt und Moreth 2006, Schmidt und Moreth 1999). Zunehmend werden auch Real-Time-PCR-Verfahren eingesetzt (Jacobs et al. 2013). Im IHD wird zudem seit 2010 die DNA-Chiptechnologie unter Verwendung artspezifischer rDNA-ITS-Sonden genutzt (Rangno et al. 2010, Jacobs et al. 2010).

Die Kompetenz und Erfahrung der Anbieter PCR-basierter Diagnostik im Bereich Holz- und Bautenschutz ist sehr unterschiedlich bzw. zum Teil nicht vorhanden. Die genutzten „Hausverfahren“ (Inhouse-Methoden) variieren sehr stark und es existiert kein universeller Standard. Daraus resultiert die Notwendigkeit einer Evaluierung und Standardisierung verfügbarer Methoden. Daneben bieten die rasanten Fortschritte in der Molekularbiologie zahlreiche Ansätze für die Weiterentwicklung und Verbesserung DNA-basierter Diagnostikmethoden, z.B. für einen Lebend-/Tod-Nachweis der relevanten Schadorganismen.

Aufgrund der Nachteile und des Verbesserungspotenzials der bestehenden Diagnostik wurde ein zweijähriges, vom Bundesministerium für Wirtschaft (BMWi) gefördertes F&E-Vorhaben initiiert.

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines quantitativen PCR-Assays zum Nachweis des Echten Hausschwamms sowie seines engsten Verwandten, des Wilden Hausschwamms (*S.himantioides*) auf Basis neuer molekularer Marker und die Implementierung eines Lebend-/Tod-Nachweises. Gleichzeitig wurde

eine im Vergleich zur konventionellen PCR höhere Sensitivität und Spezifität des Nachweises angestrebt.

Ergebnisse

Zunächst wurden verschiedene genomische DNA-Bereiche im Hinblick auf ihre Eignung als Differenzierungsmarker sowie die Quantifizierung der Zielorganismen untersucht und bewertet.

Im Ergebnis wurde gezeigt, dass sich sowohl ein aus Whole-Genome-Sequenzen identifizierter repetitiver Marker (ein 360-fach auftretendes Repeat-Motiv) als auch aus eigenen Sequenzen abgeleitete mitochondriale Marker prinzipiell für eine Differenzierung und Quantifizierung des Echten Hausschwamms eignen. Beide Ansätze sind für eine kommerzielle Nutzung interessant, erfordern jedoch eine umfassendere Sequenzdatengrundlage für die Entwicklung und Validierung von Nachweis-Assays.

Als Favorit für das Assay-Design erwiesen sich deshalb die gleichfalls im Projekt entwickelten Kern-DNA-Marker auf Grundlage des Betatubulin-Gens sowie modifizierte Marker aus der rDNA-ITS-Region. Insbesondere die Kombination beider Systeme zeigte ein hohes Differenzierungspotenzial, nicht nur für den Echten Hausschwamm, sondern auch für andere Hausfäulepilze. Auf deren Basis wurde ein sondenbasierter Multiplex-qPCR-Assay entwickelt und im Feldversuch validiert.

Der Assay wurde durch Implementierung einer Extraktions- und Amplifikationskontrolle sowie eines universellen Pilznachweises (PAN-Pilzsonde) ergänzt. Als Quantifizierungsstandard bewährte sich neben dem klassischen Einsatz genomischer DNA in Verdünnungsstufungen die Verwendung künstlicher einzelsträngiger Template-Oligonukleotid-Konstrukte. Für die molekularbiologische Vitalitätsbestimmung bzw. den Lebend-/Tod-Nachweis wurden zwei aus dem Betatubulin-Gen abgeleitete Splice-PCR-Primerkombinationen erfolgreich an lebendem und totem Material getestet. Der konkrete Applikationsbereich und die Rahmenbedingungen für eine entsprechende Diagnostik sind noch zu untersuchen, aber die prinzipiell nachgewiesene Funktionalität ist vielversprechend für eine kommerzielle Nutzung.

Im Rahmen der Validierung wurde für den Multiplex-Sondenassay eine Nachweisgrenze von 100 fg genomischer DNA bzw. 1,5 Sporen im Extraktionsansatz (entspricht 15 Sporen/ml) bei 95%iger Sicherheit nachgewiesen. Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit von Diagnostikbefunden auf drei verschiedenen qPCR-Geräten (StepOne von Applied Biosystems, Q-Tower von Analytik Jena sowie Piko-Real von Thermofisher) demonstriert. Die Sicherheit, Spezifität und Sensitivität des Assays wurde abschließend in einem

Feldversuch an zwanzig pilzgeschädigten Hölzern aus der Praxis bestätigt.

Fazit

Die Projektergebnisse können direkt für die Entwicklung bzw. Weiterentwicklung von Diagnostik-Produkten zum Labornachweis von Pilzen eingesetzt werden, insbesondere ein Real-Time-PCR-Kit für den Echten und den Wilden Hausschwamm sowie ein DNA-Extraktions-Kit für höhere Pilze und pilzgeschädigtes Holz. Zudem sind die gefundenen Lösungen bzgl. Markerdesign und Assay-Aufbau auf andere Schadorganismen oder Krankheitserreger übertragbar.

Literatur

- DIN 68800-4 (2012). Holzschutz – Bekämpfungs- und Sanierungsmaßnahmen gegen Holz zerstörende Pilze und Insekten. Beuth-Verlag
- Grosser, D., Flohr, E., Eichhorn, M. (2003). Echter Hausschwamm – Erkennung, Lebensbedingungen, vorbeugende Maßnahmen, bekämpfende chemische Maßnahmen, Leistungsverzeichnis. WTA-Merkblatt E1-2-03. Wissenschaftlich-Technische Arbeitsgemeinschaft für Bauwerkserhaltung und Denkmalpflege e. V., Referat Holzschutz
- Grosser, D., Hertel, H., Radovic, B., Willeitner, H. (2013). Holzschutz – Praxiskommentar zu DIN 68800 Teile 1 bis 4. (DIN, iVTH, R. Marutzky, Eds.) Beuth-Verlag
- Jacobs, K., Gäbisch, M., Rangno, N. (2013). Pilznachweis in verbautelem Holz mittels Real-Time-PCR; Neues Diagnostiktool für den Nachweis des Echten Hausschwamms, Holztechnologie 54(3) 38–43
- Jacobs, K. (2010). Molekularbiologische Diagnose holzzerstörender Pilze (Basidiomyceten) in Praxisproben. F&E-Bericht Reg.-Nr. 15348 BR, vgl. Pkt. 7
- Jacobs, K., Rangno, N., Scheiding, W., Müller, D., Hiller, C., Brabetz, W., Weiß, B. (2010). Detection of wood destroying fungi using DNA microarray technology. International research group of wood preservation, Annual Meeting 2010, Biarritz
- Rangno, N., Müller, D., Jacobs, K., Hiller, C., Brabetz, W., Weiß, B. (2010). Buildings rot fungus diagnosis based on PCR and DNA microarray detection. Mycoses, 53(5) 375–462
- Schmidt, O., Moreth, U. (1999). rDNA-ITS sequence of *Serpula lacrymans* and other important indoor rot fungi and taxon-specific priming PCR for their detection. International research group on wood preservation, IRG/WP 99-10298
- Schmidt, O., Moreth, U. (2006). Molekulare Untersuchungen an Hausfäulepilzen. Zeitschrift für Mykologie, 72(2)