

Entwicklung einer neuartigen, kostengünstigen LCD-Array-Technologie für die Diagnostik von praxisrelevanten Hausfäulepilzen

Development of a Novel, Reasonably Priced LCD-Array Technology for Diagnosing Practically Relevant Dry Rot Fungi

Projektleiter
Project Leader:
Natalie Rangno

Projektbearbeiter
In-charge:
Natalie Rangno,
Stefanie Kath

Förderinstitution
Funding Institution:
BMW/ZIM

Partner
Partner:
Chipron GmbH, Berlin

AUSGANGSSITUATION UND ZIELSTELLUNG

Die als Hausfäulepilze bezeichneten Braun-, Weiß- und Moderfäulepilze bauen Holz ab, zerstören Holzkonstruktionen und Bauteile und führen zu erheblichen Wertminderungen der betroffenen Immobilien. Die Erkennung und Beseitigung von Pilzschäden an verbautem Holz erfordern eine eindeutige Artidentifizierung der Pilze. Allerdings waren für diese Gruppe der Schaderreger bisher keine wirtschaftlich einsetzbaren, ausreichend spezifischen und sensitiven diagnostischen Methoden und kommerziellen Produkte auf dem inländischen und internationalen Markt verfügbar (Jacobs et al. 2015).

In einem gemeinsamen Vorgängerprojekt (2007 bis 2010) mit einem sächsischen Biotechnologieunternehmen waren bereits DNA-Microarrays zur Pilzdiagnostik entwickelt worden, die jedoch auf der Fluoreszenz-Technologie basierten und wegen ihrer zu hohen Kosten nicht wirtschaftlich einsetzbar waren (Rangno und Jacobs 2014).

Ziel des gemeinsamen Projektes des Mykolabors Dresden im IHD und der Chipron GmbH war die Entwicklung einer neuartigen, sicheren und preiswerten LCD-Array (Low Cost Density) Technologie für die Diagnostik der ca. 50 bedeutsamsten Hausfäulepilze.

MATERIAL UND METHODEN

Für die Erarbeitung von genetischen Datensätzen zur Generierung von Sonden für 40 Spezies und 10 Gattungen sowie für die experimentelle Validierung der zu entwickelnden

INITIAL SITUATION AND OBJECTIVE

Building rot fungi, such as brown rot, white rot and soft rot, decompose timber, destroy wooden structures and structural parts and lead to considerable reductions in value of properties affected. The identification and removal of fungal damage in wood used in construction require the unambiguous identification of fungal species. However, no economically applicable, sufficiently specific and sensitive diagnostic methods or commercial products were available previously for these groups of harmful organisms, neither in the domestic market nor internationally (Jacobs et al. 2015).

In a joint precursor project (2007 to 2010) with a Saxon biotechnology company, DNA microarrays for fungal diagnostics had already been developed. But they were based on the fluorescence technology and, due to their high costs, economically not applicable (Rangno and Jacobs 2014).

The objective of the joint project carried out by Mykolabor Dresden and Chipron GmbH aimed at developing a novel, reliable and reasonable LCD-array (Low Cost Density) technology for diagnosing the approx. 50 most important wood-decay fungi.

MATERIAL AND METHODS

For elaborating sets of genetic data for generating probes for forty species and ten classes and also for the experimental validation of the diagnostics to be developed, 370 samples of various referential material (fungal strains, real-life samples and extraneous organisms)

Diagnostik wurden innerhalb des Projektes 370 Proben verschiedener Referenzmaterialien (Pilzstämmen, Praxisproben und Fremdorganismen) untersucht. Hierfür wurden diese zuvor makroskopisch, mikroskopisch sowie molekularbiologisch bestimmt. Die molekular diagnostischen Methoden umfassten DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung, Generierung von 170 validen ITS-Daten für das Sonden-Design sowie die Herstellung von 13 Kontrollplasmiden für die Entwicklung der LCD-Array Kits.

Für die Entwicklung eines optimierten Verfahrens zur automatisierten DNA-Extraktion aus Holz- und Baustoffproben wurde das automatische Extraktionssystem InnuPure® C16 der Firma Analytik Jena als technologische Plattform gewählt und verschiedene Protokolle getestet und optimiert (Rangno et al. 2014). Durch eine umfangreiche Validierung an 50 Referenzproben (Pilzstämmen und Fremdorganismen) wurde die Reproduzierbarkeit der entwickelnden LCD-Array-Technologie nachgewiesen. Abschließend wurden 50 Praxisproben, denen zusätzlich Lambda-Kontroll-DNA beigelegt wurde, unter Anwendung der entwickelten Protokolle zur automatisierten DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation mit den LCD-Array-Labormustern analysiert. Zum Vergleich wurden die Praxisproben zudem mit konventionellen Methoden und mittels direkter ITS-Sequenzierung auf vorhandene holzerstörende Pilzarten untersucht.

ERGEBNISSE

Im Ergebnis des Projekts wurden zwei DNA-Makroarrays zur Diagnostik der wichtigsten

were investigated as part of the project. For that purpose, they were initially determined macroscopically, microscopically and biomolecularly. The molecular diagnostic methods comprised DNA extraction, PCR, sequencing, the generation of 170 valid ITS data for the probe design and also the preparation of 13 control plasmids for developing the LCD-array kit.

For the development of an optimised procedure for automated DNA extraction from samples of timber building material, the automatic extraction system InnuPure® C16, made by Analytik Jena, was chosen to be the technological platform and several protocols were tested and optimised (Rangno et al. 2014). The reproducibility of the developed LCD-array technology was proven by an extensive validation of 50 referential samples (fungal strains and extraneous organisms). Finally, 50 samples from real life, to which lambda-control DNA was added, were analysed with the help of the LCD-array laboratory samples applying the developed protocols on automatic DNA extraction and PCR amplification. For comparison, the real-life samples were additionally investigated by conventional methods and by means of direct ITS sequencing for existing wood-decaying fungal species.

RESULTS

As a result of the project, two DNA macroarrays were developed for diagnosing the most important dry rot (wood-destructive basidiomycetes and soft rot fungi) on the basis of the LCD-array technology.

Hausfäulepilze (holzerstörende Basidiomycete und Moderfäulepilze) auf Basis der LCD-Array-Technologie entwickelt. Zudem wurde ein IHD-Protokoll auf Basis des innuPREP Plant DNA Kits-IPC16 für das automatische DNA-Extraktionssystem InnuPure® C16 für Praxisproben aus den Bereichen Bau- und Holzschutz entwickelt. Die Analyse von 100 Referenzproben und die erfolgreiche Validierung an 50 Praxisproben zeigen, dass die beiden entwickelten Verfahren die Diagnostik für relevante Hausfäulepilze erheblich vereinfachen. Gegenüber den unsicheren konventionellen und zeitaufwändigen molekularbiologischen Methoden stellt die LCD-Array Technologie in Verbindung mit automatischem DNA-Extraktionsverfahren eine leicht handhabbare, routinefähige Diagnostik zur parallelen Differenzierung von Pilzarten bei geringem Zeitaufwand dar. In Anbetracht der Ergebnisse der Validierung ist es im Projekt gelungen, mit den LCD-Array Kits WDF-1 und WDF Plus 1.0 zwei neue, sich ergänzende, marktfähige Produkte zur Diagnostik der 44 wichtigsten Hausfäulepilze zu entwickeln. Beispielhaft sind hier Ergebnisse der Analyse der acht Pilzarten mit dem LCD-Array WDF-1 in Abb. 1 dargestellt.

FAZIT

Im Rahmen des gemeinsamen Projektes wurde eine neuartige, kostengünstige LCD-Array-Technologie für die Diagnostik von praxisrelevanten Hausfäulepilzen entwickelt. Die darauf basierenden Produkte LCD-Array Kit WDF-1 und WDF Plus 1.0 ermöglichen eine sichere Bestimmung von ca. 50 der wichtigsten holzerstörenden Basidiomyceten und Moderfäulepilzen. Die neuen LCD-Arrays erfordern einen deutlich geringeren Aufwand an Geräten, Material und Probenaufbereitung, und die erforderliche Ausstattung ist be-

In addition, an IHD protocol was developed on the basis of the innuPREP Plant DNA Kit IPC16 for the automatic DNA extraction system InnuPure® C16 for real-life samples from the fields of building and wood preservation. The analysis of 100 referential samples and the successful validation in fifty real-life samples show that the two developed methods considerably simplify the diagnostics of relevant dry rot. By contrast to unreliable, conventional and time-consuming biomolecular methods, the LCD-array technology – in conjunction with automatic DNA extraction methods – represents an easily and routinely manageable way of diagnosing fungal species by parallel differentiation, at low time expense. In view of the findings of the validation, the project team succeeded in developing two new, mutually complementary and marketable products for diagnosing 44 of the most important forms of building rot fungi, in the form of LCD-array kits WDF-1 and WDF Plus 1.0. As an example, the results of the analysis of the eight fungal species by way of LCD array WDF-1 are shown here in Fig. 1.

CONCLUSION

Within the scope of the joint project, a novel, reasonably priced LCD-array technology was developed for diagnosing practically relevant forms of building rot fungi. The products LCD-array kit WDF-1 and WDF Plus 1.0, which are based on that, allow reliable determination of approx. fifty of the most important wood-decaying basidiomycetes and wood-decay fungi. The new LCD arrays require clearly less effort in terms of devices, material and sample preparation, and the required equipment already exists in many biomolecular laboratories. Introduction of the new LCD-array kits into the market is scheduled by project partner Chipron GmbH for the 2nd quarter of 2016.

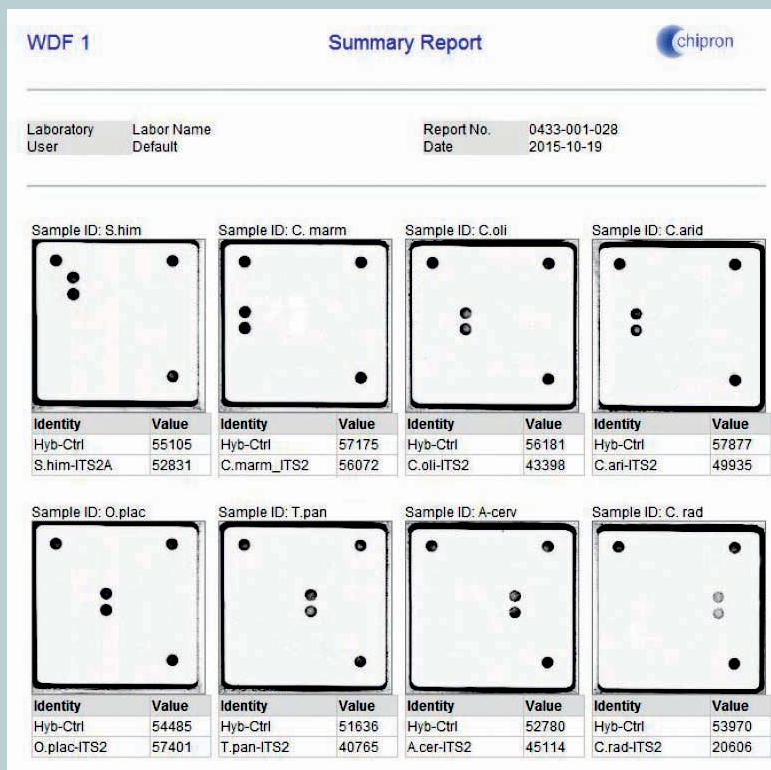


Abb.1: Ergebnisse der Analyse der acht Pilzproben mit dem LCD-Array: WDF-1
 Probe 1: *Serpula himantioides*
 Probe 2: *Coniophora marmorata*
 Probe 3: *Coniophora olivacea*
 Probe 4: *Coniophora arida*
 Probe 5: *Oligoporus placenta*
 Probe 6: *Zapinella panuoides*
 Probe 7: *Asterostroma cervicolor*
 Probe 8: *Coprinus radians*

Fig.1: Findings from analysing the eight fungal samples with the help of LCD array: WDF-1
 Sample 1: *Serpula himantioides*
 Sample 2: *Coniophora marmorata*
 Sample 3: *Coniophora olivacea*
 Sample 4: *Coniophora arida*
 Sample 5: *Oligoporus placenta*
 Sample 6: *Zapinella panuoides*
 Sample 7: *Asterostroma cervicolor*
 Sample 8: *Coprinus radians*

reits in vielen molekularbiologischen Labors vorhanden. Die Markteinführung der neuen LCD-Array Kits ist vom Projektpartner Chipron GmbH im 2. Quartal 2016 geplant. Das Mykolabor Dresden wird die Markteinführung als Referenzlabor begleiten und die LCD-Arrays für Forschung und Dienstleistung einsetzen.

Mykolabor Dresden, as the referential laboratory, will accompany the market launch and apply the LCD arrays in their research and services.