

## Methodenentwicklung zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp.) bei Weizen mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)

Grundler MK<sup>1</sup>, Sedlmeier M<sup>1</sup>, Killermann B<sup>1</sup> & Niessen L<sup>2</sup>

*Keywords: common bunt, dwarf bunt, Tilletia spp., detection method, qPCR.*

### Abstract

*For a precise diagnosis of the wheat bunt diseases, common bunt and dwarf bunt (*Tilletia* spp.), reliable and reproducible methods are essential. Further the accurate quantification of the spore number on infested seed is important for seed multiplication and international seed trading, as different thresholds and quarantine regulations have to be considered. At present the determination of the teliospores is carried out according to a filtration method (ISTA 1984) combined with a microscopic examination requiring considerable experience to distinguish the different *Tilletia* species. Therefore the aim of this research work is to develop an efficient molecular testing method by means of quantitative Real-time PCR (qPCR). Based on genome data species specific markers are designed and tested for their specificity on several strains from different countries. For the quantification calibration lines are established to calculate the spore number of test samples.*

### Einleitung und Zielsetzung

Im ökologischen Weizen- und Dinkelanbau können Brandkrankheiten erhebliche Probleme verursachen. Durch Befall wird die Qualität des Ernteguts vermindert, zudem können die Brandsporen über Jahre im Boden überdauern. Daher ist für die Saatgutproduktion die zuverlässige Bestimmung der samen- und bodenbürtigen Erreger des Steinbrandes (*Tilletia caries* (DC) Tul. sowie *Tilletia laevis* Kühn syn. *T. foetida* (Wallr.) Liro) und Zwergsteinbrandes (*Tilletia controversa* Kühn) von entscheidender Bedeutung. Derzeit wird die Filtrationsmethode nach ISTA Working Sheet No 53 (ISTA 1984) mit mikroskopischer Auswertung angewendet. Diese Methode ist sehr zeitintensiv und eine sichere Bestimmung der verschiedenen *Tilletia* Arten setzt eine langjährige Erfahrung voraus. Zum sicheren und schnellen Nachweis der Brandkrankheiten (*Tilletia* spp.) werden mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) effiziente Methoden entwickelt und validiert.

### Methoden

Für eine sichere qualitative Bestimmung und Unterscheidung der *Tilletia* Arten mittels qPCR werden artspezifische Marker benötigt. Diese werden anhand der vorliegenden genetischen Informationen entwickelt. Die Spezifität und Sensitivität dieser Primerpaare wird an verfügbaren Stämmen aus verschiedenen Ländern getestet. Hierfür wird die DNA der aus Butten präparierten Brandsporen mit Hilfe eines Kits isoliert und mittels Standard-PCR und Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Lange Point 6, 85354 Freising, Deutschland, monika.grundler@lfl.bayern.de, <http://www.lfl.bayern.de>

<sup>2</sup> Technische Universität München, Gregor-Mendel-Straße 4, 85354 Freising, Deutschland

nachweisbaren Fragmente und Bandenmuster werden mit der zuvor morphologisch bestimmten Art abgeglichen und hinsichtlich ihrer Spezifität eingeordnet.

In einem weiteren Schritt werden Standardgeraden aus Sporensuspensionen erstellt, welche für die absolute Quantifizierung mittels qPCR verwendet werden. Von zahlreichen Verdünnungsreihen wird die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen sowie die Sporenzahl nach der Filtrationsmethode bestimmt. Anschließend wird die DNA der Sporen isoliert und mittels qPCR analysiert. Die resultierenden ct-Werte (cycle threshold), welche den PCR-Zyklus zu Beginn der exponentiellen Phase definieren, werden mit den zugehörigen gemittelten OD-Werten und Sporenzahlen zur Kalibrierung verwendet. Anhand dieser Standards kann der Sporenbesatz der zu untersuchenden Saatgutpartien berechnet werden.

### Ergebnisse und Diskussion

Nach eingehenden Untersuchungen konnte die Spezifität publizierter Primer für einen qualitativen Nachweis der *Tilletia* Arten nicht bestätigt werden. Weiterhin lieferten umfangreiche Analysen bekannter und eigens entwickelter phylogenetischer Marker sowie Marker für die ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat) keine homogenen und reproduzierbaren Ergebnisse. Mit den bisher angewandten Methoden konnten somit keine Genregionen detektiert werden, die deutliche Unterschiede zwischen den Arten aufweisen, was auf eine nähere Verwandtschaft der Arten hinweist als bisher angenommen. Die Sequenzierung und Auswertung des gesamten Genoms soll nun Hinweise auf mögliche diagnostische Markergene (DMGs) geben, welche zur Entwicklung artspezifischer Marker verwendet werden können.

Für die Verdünnungsreihen konnte die lineare Regression der Sporenanzahl und der OD-Werte nachgewiesen werden. Die Qualität der Standardgeraden, basierend auf dem Bestimmtheitsmaß (bestes  $R^2 = 0,972$ ) und der von der Geradensteigung abgeleiteten Effizienz (für genanntes  $R^2$ : 36,35%) weist weiteren Optimierungsbedarf auf. Bei der Hochrechnung hoher Sporenmengen, die nur in Verdünnungen gezählt werden können, treten häufig größere Schwankungen auf. Diese führen dazu, dass die für die Erstellung der Kalibrierungsgerade eingesetzten Sporenzahlen nicht den tatsächlichen initialen Quantitäten entsprechen und somit verfälschte Ausgangszahlen den ct-Werten zugeordnet werden. Eine deutliche Verbesserung der Qualität der Standardgerade wird vom Einsatz gemittelter Sporenzahlen über zahlreiche Wiederholungen sowie der Verwendung artspezifischer Marker erwartet.

### Danksagung

Unser Dank gilt dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft für die Förderung des Forschungsprojektes aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft. Weiter danken wir unserem Projektpartner (Julius-Kühn-Institut) für die gemeinsame Bearbeitung des qualitativen Projektteils sowie allen Beteiligten für die Bereitstellung von Sporenmateriale.

### Literatur

ISTA, International Seed Testing Association (1984) Working Sheet No. 53, *Triticum aestivum*, *Tilletia contraversa* Kühn, *Tilletia caries* (DC) Tul., *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro. In: International Seed Testing Association (Hrsg.) ISTA Handbook on Seed Health Testing, Zurich, Switzerland: 1-4.