

# Eine neue Methode zur DNA-Qualitätskontrolle erleichtert die Forschung zur Apfeltriebsucht

A new method for DNA quality control facilitates apple proliferation disease research

Un nuovo metodo per il controllo di qualità del DNA facilita la ricerca sugli scopazzi del melo

Vicky Oberkofler<sup>1</sup>, Katrin Janik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Versuchszentrum Laimburg

## CITE ARTICLE AS

Oberkofler Vicky, Janik Katrin (2020). A new method for DNA quality control facilitates apple proliferation disease research. Laimburg Journal 02/2020

## CORRESPONDING AUTHOR

Katrin Janik  
Laimburg 6, Pfatten, I-39040 Auer (BZ),  
Italien  
katrin.janik@laimburg.it  
+390471969518

## KEYWORDS

qPCR, DNA quality control, endogenous control, multiplex qPCR, phytoplasma, apple proliferation disease

## EINLEITUNG

Die Arbeitsgruppen für "Funktionelle Genomik" und "Virologie und Diagnostik" des Versuchszentrums Laimburg haben eine neue Methode für die DNA-Qualitätskontrolle der auf PCR (Polymerase-Kettenreaktion) basierenden Detektion von Phytoplasmen, den Erregern der Apfeltriebsucht, etabliert.

Die neue Vorgehensweise vereinfacht den Nachweis von Phytoplasmen und kommt darüber hinaus auch für andere Forschungszwecke in Frage. Sie wurde außerdem vom Versuchszentrum Laimburg erfolgreich patentiert.

## PHYTOPLASMEN ALS KRANKHEITSERREGER

Phytoplasmen sind eine Gruppe von krankheitserregenden Bakterien, die eine Vielzahl von Nutzpflanzenarten befallen [1] [2]. In befallenen Apfelbäumen z. B. löst eine bestimmte Phytoplasmenart die sogenannte Apfeltriebsucht, auch bekannt als Besenwuchs, aus. Die Anzahl der Insektenarten, die den verschiedenen Phytoplasmen als Zwischenwirte dienen und sie beim Blattsaugen von Pflanze zu Pflanze übertragen, ist ebenfalls hoch [1].

Eine zuverlässige Detektion von Phytoplasmen in befallenen Pflanzen und in den Wirtsinsekten ist für die Forschung unabdingbar. Eines der Anliegen der Projekte in der Arbeitsgruppe "Funktionelle Genomik" ist es, herauszufinden, ob noch andere Insektenarten außer den bisher bekannten das oben genannte Apfeltriebsucht-Phytoplasma übertragen können.

## NACHWEIS VON PHYTOPLASMEN MITTELS QUANTITATIVER PCR

Der Nachweis von Phytoplasmen in Blatt- und Insektenproben erfolgt mittels quantitativer PCR (qPCR). Anhand dieser enzymatischen Reaktion wird überprüft, ob die Proben Phytoplasmen-spezifische DNA enthalten. Zu diesem Zweck müssen zuerst Blattproben von potenziell befallenen Bäumen genommen oder potenzielle Wirtsinsekten gefangen werden (Abb. 1, Abb. 2). Die daraus extrahierte Gesamt-DNA enthält zum allergrößten Teil DNA der Pflanze bzw. des Insekts. Diese Wirts-DNA wird als eukaryotische DNA bezeichnet. Eukaryoten sind Lebewesen, die sich aufgrund ihres zellulären Aufbaus und ihrer Biologie stark von Bakterien unterscheiden. Falls vorhanden, macht die bakterielle Phytoplasmen-DNA nur einen sehr kleinen Teil der gesamten DNA aus.

In der qPCR-Reaktion wird ein kurzer, spezifischer Phytoplasmen-DNA-Abschnitt gezielt vervielfältigt (Abb. 3). Mittels Fluoreszenzfarbstoffen, die durch die Vervielfältigung der DNA zu leuchten beginnen, kommt es zur Bildung eines Fluoreszenzsignals in der Probe. Nach einigen Amplifikationszyklen ist in positiven Proben genügend Phytoplasmen-DNA vorhanden, um vom PCR-Gerät als ansteigendes Fluoreszenzsignal registriert werden zu können.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch das Enzym DNA-Polymerase. Welchen DNA-Abschnitt die DNA-Polymerase vervielfältigt, wird durch das in der qPCR-Reaktion verwendete Primerpaar bestimmt. Beim Primerpaar handelt es sich um zwei sehr kurze DNA-Sequenzen, die vom Forscher so gewählt wurden, dass sie in einem bestimmten Abstand spezifisch an die zu vervielfältigende DNA binden. Die DNA-Polymerase erkennt die Primer und amplifiziert den dazwischenliegenden DNA-Abschnitt. Für den Nachweis von Phyto-

plasmen werden häufig Primer verwendet, die an das Phytoplasmen-spezifische 16S rDNA Gen binden [3] [4].

Die Fluoreszenzquelle ist die sogenannte Sonde, eine dritte sehr kurze DNA-Sequenz, die an einem Ende an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern an die Phytoplasmen-spezifische DNA bindet. Am anderen Ende der Sonde ist ein Molekül, der sogenannte Quencher, das die Fluoreszenz unterdrückt. Wird die Sonde während der Amplifikation durch die DNA-Polymerase zerstört, wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt und die Fluoreszenz aktiviert. Das bedeutet, je mehr Fluoreszenzsignal desto mehr amplifizierte DNA.

## VERMEIDUNG VON FALSCH NEGATIVEN ERGEBNISSEN

Ein sehr wichtiger Punkt für eine zuverlässige molekulare Diagnostik ist die Verringerung der Anzahl von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen. „Falsch positiv“ sind Proben, die von nicht infizierten Blättern oder Insekten stammen, in der qPCR-Reaktion jedoch fälschlicherweise zu einem Fluoreszenzsignal führen. Das kann z.B. passieren, wenn die Proben mit DNA aus einer infizierten Probe verunreinigt wurden. „Falsch negative“ Proben stammen dementsprechend von infizierten Blättern oder Insekten, geben in der qPCR-Reaktion jedoch kein Fluoreszenzsignal ab. Die häufigsten Ursachen für falsch negative Proben sind der Verlust oder der Zerfall der DNA während der Extraktion, oder, dass die aufgereinigte DNA noch Substanzen enthält, die ihre Vervielfältigung durch die DNA-Polymerase inhibieren [5].

Um auszuschließen, falsch negative Ergebnisse zu erhalten, verwendet man in der molekularen Diagnostik sogenannte interne bzw. endogene Kontrollen in der qPCR-Reaktion [6]. Das heißt, in derselben qPCR-Reaktion werden neben dem Phytoplasmen-spezifischen Primerpaar und der Sonde ein weiteres Primerpaar und eine Sonde verwendet, mit denen gezielt ein Pflanzen- oder Insekten-Gen vervielfältigt wird. Man spricht dann von einer „Multiplex qPCR“, da in einem Reaktionsansatz gleichzeitig mehrere Nachweise stattfinden (Abb. 3).

Phytoplasmen- und Pflanzen- bzw. Insekten-Gen können voneinander differenziert werden, da die jeweiligen Sonden an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, welche das PCR-Gerät unterscheiden kann. Wenn das PCR-Gerät das Fluoreszenzsignal des Pflanzen- oder Insekten-Gens registriert, bedeutet das, dass die DNA-Aufbereitung erfolgreich war und keine Hemmstoffe im qPCR-Ansatz vorhanden sind.

## VORTEILE EINER UNIVERSELLEN INTERNEN DNA-QUALITÄTSKONTROLLE

Bei Phytoplasmenachweisen wird als interne Kontrolle in der Regel die spezifische DNA des Wirtes nachgewiesen [7] [8]. Sollen verschiedene potenzielle Überträger oder Wirtspflanzen getestet werden, müsste immer eine andere interne Kontrolle eingesetzt werden. Dies macht ein Screening vieler tausender Proben unterschiedlicher Wirtsspezies in kurzer Zeit nahezu unmöglich. Es fehlten also

ein Primerpaar und eine Sonde, die universell an dasselbe Gen in allen Pflanzen- und Insektenarten binden können, die auf Phytoplasmenbefall getestet werden sollten. Idealerweise sollte sich diese Kontrolle also für ein möglichst breites Spektrum eukaryoter Organismen eignen.

Deshalb haben die Arbeitsgruppen für "Funktionelle Genomik" und "Virologie und Diagnostik" eine solche universelle endogene Kontrolle entwickelt. Diese erleichtert und beschleunigt die Arbeit mit Proben, die aus verschiedenen Arten genommen werden, da nicht mehr für jede neu getestete Art eine eigene endogene Kontrolle etabliert werden muss. Auch das Ansetzen der Multiplex-qPCR-Reaktionen ist dadurch effizienter, da für alle Reaktionen dieselbe Kombination von Primern und Sonden verwendet werden kann.

## ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN KONTROLLE

Die entwickelte universelle interne Kontrolle für die DNA-Qualität besteht aus einem Primerpaar und einer Sonde, die an einen Abschnitt des 28S rDNA Gens binden. Die Sequenz dieses Gens ist in allen eukaryotischen Organismen sehr ähnlich, also evolutionsbiologisch „konserviert“, denn das Genprodukt ist essenziell für die Proteinsynthese dieser Organismengruppe.

Die Effizienz des neu entwickelten Primerpaares und der Sonde wurde mit jener von zwei bereits existierenden artspezifischen endogenen Kontrollen verglichen, die zum Phytoplasmenachweis im Apfelbaum (*Malus x domestica*) verwendet werden. Die neue Kombination funktioniert in qPCR-Reaktionen mindestens genauso gut wie die beiden artspezifischen Kontrollen.

Zusätzlich wurde die Effizienz der universellen internen Kontrolle erfolgreich in verschiedenen Multiplex-qPCR-Reaktionen getestet, in denen gleichzeitig Phytoplasmen-DNA und eukaryotische DNA nachgewiesen werden konnten.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die neue 28S rDNA-Kontrolle in qPCR-Reaktionen die DNA von über 40 verschiedenen eukaryotischen Arten aus dem Reich der Pilze, der Pflanzen und der Tiere (darunter DNA von über 20 verschiedenen Insektenarten sowie menschliche DNA) erkennt.

## EINSATZBEREICHE DER NEUEN METHODE

Die neu entwickelte, universell einsetzbare Methode zur DNA-Qualitätskontrolle stellt einen wichtigen Fortschritt bei der Detektion von Phytoplasmen dar. Da Primerpaar und Sonde an die DNA von vielen verschiedenen eukaryotischen Organismen binden, kann sie darüber hinaus prinzipiell für die Diagnostik anderer Krankheitserreger in Pflanzen, Tieren und Menschen und für andere Forschungszwecke verwendet werden. Die DNA-Sequenzen für Primerpaar und Sonde wurden vom Versuchszentrum Laimburg erfolgreich unter Patentschutz gestellt. Der detailliert wissenschaftlich-technische Artikel wurde in der Wissenschaftszeitung BMC Plant Methods veröffentlicht [9].

## LITERATUR

- [1] Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S. et al. (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5 (12), 1763-1788, [DOI: 10.4236/ajps.2014.512191](https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191).
- [2] Maejima K., Oshima K., Namba S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* 80, 210-221, [DOI: 10.1007/s10327-014-0512-8](https://doi.org/10.1007/s10327-014-0512-8).
- [3] Nikolić P., Mehle N., Gruden K. et al. (2010). A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes* 24 (5), 303-309, [DOI: 10.1016/j.mcp.2010.06.005](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.06.005).
- [4] Mehle N., Nikolić P., Gruden K. et al. (2013). Real-time PCR for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Methods in Molecular Biology* 938, 269-281, [DOI: 10.1007/978-1-62703-089-2\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_23).
- [5] Rezaadoost M.H., Kordrostami M., Kumleh H.H. (2016). An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech* 6:61, [DOI: 10.1007/s13205-016-0375-0](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0375-0).
- [6] Hodgetts J., Boonham N., Mumford R. et al. (2009). Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (9), 2945-2950, [DOI: 10.1128/AEM.02610-08](https://doi.org/10.1128/AEM.02610-08).
- [7] Baric S., Dalla-Via J. (2004). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* 57 (1), 135-145, [DOI: 10.1016/j.mimet.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.12.009).
- [8] Baric S., Berger J., Cainelli C. et al. (2011). Seasonal colonisation of apple trees by '*Candidatus Phytoplasma mali*' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European Journal of Plant Pathology* 129, 455-467, [DOI: 10.1007/s10658-010-9706-x](https://doi.org/10.1007/s10658-010-9706-x).
- [9] Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V. (2020). Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *BMC Plant Methods* 16:53, [DOI: 10.1186/s13007-020-00597-2](https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2).

**ANHANG: ABBILDUNGEN**

Abb. 1: „Klopprobe“ in der Apfelanlage zum Fangen von Insekten, die auf die Präsenz von Phytoplasmen untersucht werden sollen. // *Taking insect samples in apple orchards to test them for the presence of phytoplasmas.*



Abb. 2: Ein adultes Tier (links) und eine Nymphe (rechts) des Sommerapfelblattsaugers *Cacopsylla picta*, einem Überträger des Erregers der Apfeltriebsucht. // *Adult (left) and nymph (right) stadium of Cacopsylla picta, a known host of the phytoplasmas that cause apple proliferation disease.*

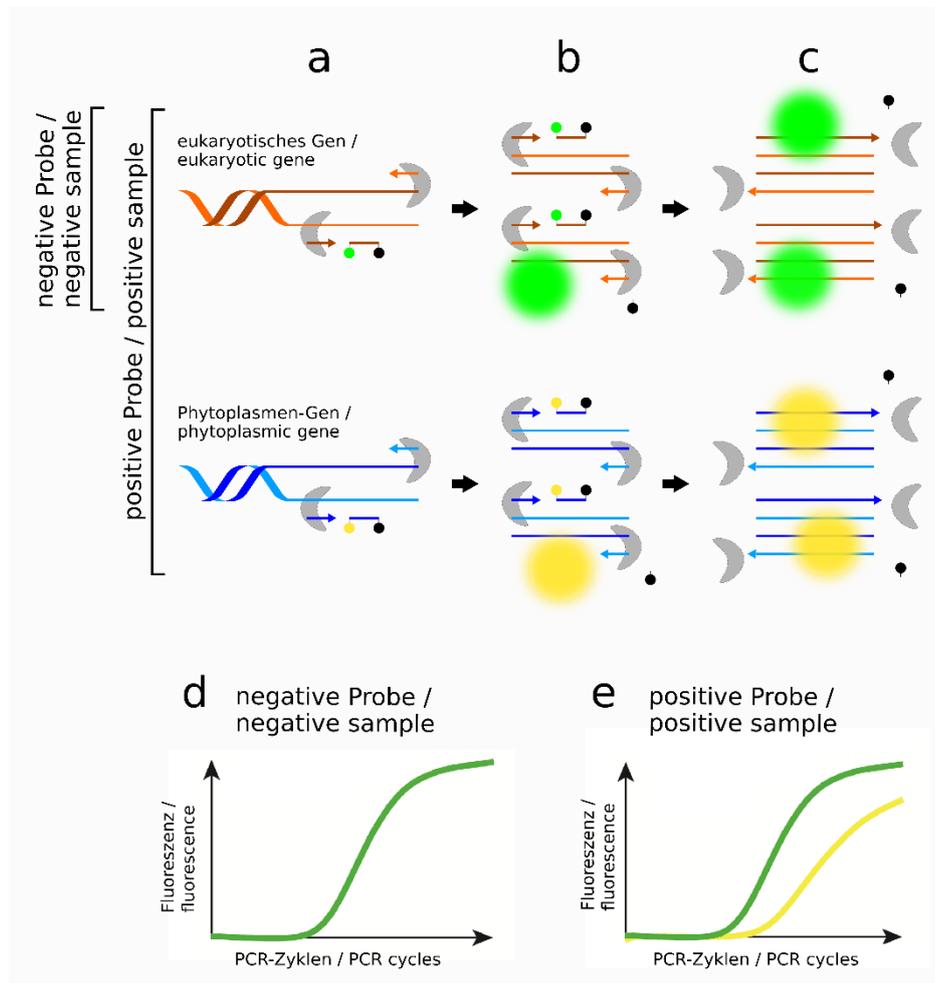


Abb. 3: Grundprinzip der Multiplex qPCR zur Detektion von Phytoplasmen in Pflanzen- oder Insektenproben. (a) Ein eukaryotisches Gen (braune Helix) und ein bakterielles Phytoplasmen-Gen (blaue Helix), wobei letzteres jedoch nur in positiven Proben vorkommt, werden von jeweils einem Primerpaar (braune bzw. blaue Pfeile) spezifisch gebunden. Zwischen den Primerpaaren bindet jeweils eine Sonde (Linie mit zwei Kreisen). Die beiden Sonden sind an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (grüner bzw. gelber Kreis) gekoppelt, die vom sogenannten Quencher (schwarzer Kreis) inaktiviert werden. Die DNA-Polymerase (grau) erkennt die Primer, bindet an die DNA und amplifiziert das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment. (b) Am Ende des PCR-Zyklus hat sich die Anzahl der in der Probe vorhandenen spezifischen DNA-Fragmente verdoppelt. Da die Sonde während der Amplifikation von der DNA-Polymerase zerstört wird, kann der Quencher das Fluoreszenzsignal (großer grüner bzw. gelber Kreis) nicht mehr unterdrücken. (c) In jedem weiteren Amplifikationsschritt wird die Anzahl der DNA-Fragmente verdoppelt und die Fluoreszenz nimmt exponentiell zu. Das PCR-Gerät registriert die Zunahme der Fluoreszenzsignale mit der Zeit und stellt diese als typische Amplifikationskurven dar. (d) In einer negativen Probe ist keine Phytoplasmen-DNA vorhanden. Deshalb wird nur das Fluoreszenzsignal des eukaryotischen Gens generiert und registriert. (e) Eine positive Probe enthält von Anfang an mehr eukaryotische DNA als Phytoplasmen-DNA. Deshalb nimmt die Fluoreszenz des eukaryotischen Signals schneller zu als die des Phytoplasmen-Signals. Beide Fluoreszenzsignale werden detektiert. // Working principle of multiplex qPCR for the detection of phytoplasmas in plant or insect samples. (a) A eukaryotic gene (brown helix) and a phytoplasma gene (blue helix), with the latter one only present in positive samples, are each specifically bound by a primer pair (brown or blue arrows). Between each primer pair a probe (line with two circles) also binds to the gene. The two probes are associated with different fluorophores (green and yellow circles) that are kept inactive by a quencher (black circles). The DNA polymerase (grey) recognizes the primers, binds to the DNA and amplifies the DNA fragment in between the two primers of each primer pair. (b) At the end of the PCR cycle the quantity of specific DNA fragments in the probe has doubled. Since the probe has been destroyed by the polymerase during DNA amplification, the quencher can no longer suppress the emission of the fluorescence signal (big green and yellow circles) of the fluorophore. (c) During each following PCR cycle the quantity of DNA fragments doubles and fluorescence increases exponentially. The PCR machine registers the increase in fluorescence over time and generates the typical amplification curves. (d) A negative sample does not contain any phytoplasmal DNA. Therefore, only the fluorescence signal of the eukaryotic gene is generated and detected. (e) A positive sample contains more eukaryotic DNA than DNA of phytoplasmal origin. Therefore, the fluorescence of the eukaryotic gene increases faster than that of the phytoplasmal one. Both fluorescence signals are detected.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International Lizenz](#).  
Quest'opera è distribuita con [Licenza Creative Commons Attribuzione - Non commerciale 4.0 Internazionale](#).  
This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#).

Für alle Abbildungen und Tabellen ohne Nennung des Urhebers gilt: © Versuchszentrum Laimburg.  
Per tutte le immagini e tabelle senza menzione dell'artefice vale: © Centro di Sperimentazione Laimburg.  
For all figures and tables without mention of the originator applies: © Laimburg Research Centre.