

144 - Reinigung doppelsträngiger RNA in Verbindung mit Hochdurchsatzsequenzierung als Werkzeug zum Nachweis von RNA Viren in Pflanzen

The combination of double-stranded RNA isolation and deep sequencing as an unspecific diagnostic tool to assess the presence of RNA viruses in plants

Till Lesker, Paul Rentz, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abt. Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland

Die meisten Pflanzen infizierenden Viren besitzen einzelsträngige RNA-Genome und bilden während der Replikation doppelsträngige RNA (dsRNA). Diese dsRNA kommt normalerweise nicht in Pflanzenzellen vor und kann daher als ein erstes Indiz für eine Infektion mit Viren dienen. DsRNA kann in Lösungen mit einem 16%igen Ethanolgehalt an Cellulose gebunden und so selektiv gereinigt werden. Dieses bietet eine einfache Möglichkeit für ein RNA-Viren-Screening in Pflanzen, ohne Vorkenntnisse über das Virus zu besitzen.

Es ist jedoch zeit- und arbeitsintensiv mittels RT-PCR, Klonierung und Sequenzierung die einzelnen Viren zu bestimmen. Hochdurchsatzsequenzierung kann hier helfen, diese Schwierigkeiten zu umgehen. Darüber hinaus ermöglicht das Verfahren die Erfassung auch äußerst geringer Menge vorliegender Viren selbst in Mischinfektionen. Der Anteil von Virus-RNA kann jedoch im Vergleich zu Pflanzen-RNA in der Probe sehr gering sein. Für ein effizientes Virus-Screening einer Pflanze muss daher eine Konzentration der Virus RNA erfolgen, bevor es als Ausgangsmaterial für die unspezifische Hochdurchsatzsequenzierung genutzt werden kann.

In einer Studie kombinierten wir gereinigte dsRNA Proben aus kontrolliert kultivierten Kleearten und Dill für eine Hochdurchsatzsequenzierung. Die Analyse der Daten ergab neben den bereits bekannten Viren eine Vielzahl bislang unbekannter viraler Sequenzen, die mutmaßlich von latenten und/oder kryptischen Viren stammen. Die Möglichkeiten, Effizienz aber auch die Grenzen der Hochdurchsatzsequenzierung zur Identifikation bekannter und neuer Viren werden diskutiert. Hierbei wird auch der Vergleich zu anderen Studien gezogen, welche andere Ansätze wie small interfering RNAs, Gesamt-RNA aus Pflanzen oder „Subtraktion-Libraries“ für ein Virus-Screening verwenden.

Literatur

- Adams, I. P., R. H. Glover, W. A. Monger, R. Mumford, E. Jackeviciene, M. Navalinskiene, M. Samuitiene and N. Boonham (2009). "Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology." *Mol Plant Pathol* **10**(4): 537-545.
- Coetzee, B., M. J. Freeborough, H. J. Maree, J. M. Celton, D. J. Rees and J. T. Burger (2010). "Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard." *Virology* **400**(2): 157-163.
- Donaire, L., Y. Wang, D. Gonzalez-Ibeas, K. F. Mayer, M. A. Aranda and C. Llave (2009). "Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes." *Virology* **392**(2): 203-214.
- Kreuze, J. F., A. Perez, M. Untiveros, D. Quispe, S. Fuentes, I. Barker and R. Simon (2009). "Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses." *Virology* **388**(1): 1-7.
- Roossinck, M. J., P. Saha, G. B. Wiley, J. Quan, J. D. White, H. Lai, F. Chavarría, G. Shen and B. A. Roe (2010). "Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology." *Mol Ecol* **19**: 81-88.