مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کاربرد فناوری نسل جدید توالی‌یابی در ویروس‌شناسی گیاهی

فرشته اسماعیل‌زاده[1] و داود کولیوند[2]*

۱- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

koolivand@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۳۰
صفحه ۱۱۸-۹۵

چکیده

پیشرفت علم با ظهور فناوری‌هایی که راه‌های جدیدی را برای پاسخ به سوالات علمی و پیشرفت دانش فراهم می‌کنند، امکان‌پذیر است. پس از روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی، فناوری نسل جدید توالی‌یابی (NGS) یکی از روش‌هایی است که اکنون درک ویروس‌ها را به ویژه در زمینه‌های شناسایی، توالی‌یابی ژنوم و ترنسکریپتوم، تکامل، تاکسونومی و اقدامات قرنطینه‌ای تغییر می‌دهد. این روش در کنار مشکلاتی چون ذخیره‌سازی، تفسیر حجم عظیمی از داده‌های تولیدشده، با شناسایی محتوای کل ویروسی و ترنسکریپتوم نمونه گیاهی در شرایط بیمار و سالم، تشخیص و شناسایی همه ویروس‌های شناخته‌شده و ناشناخته موجود در یک گیاه را بدون نیاز به دانش قبلی از بیمارگر مورد نظر فراهم می‌کند. سرعت شناسایی ویروس‌ها، ویروئیدها و میزبان‌های جدید را افزایش داده و با تشخیص به موقع می‌تواند از ورود ویروس‌ها و ویروئیدهای خارجی به مناطق جدید جلوگیری کند. شناسایی دقیق‌تر و سریع‌تر ویروس‌های گیاهی و اثرات کامل آنها در میزبان‌های مختلف یکی از مهمترین گام‌های مدیریت بیماری‌هاست. در این مقاله، با مروری بر کاربردهای NGS در تشخیص و شناسایی ویروس‌ها، شناسایی بیماری‌ها با اتیولوژی ناشناخته، اثرات متقابل میزبان و بیمارگر و موارد دیگر را مورد بحث قرار خواهیم داد.

واژه‌های کلیدی: ترنسکریپتوم، شناسایی، قرنطینه، ویروس.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

مقدمه

ویروس‌ها و ویروئیدهای گیاهی، بیمارگرهای مهمی هستند که از طریق کاهش کیفیت و کمیت محصول باعث خسارت اقتصادی در سراسر جهان می‌شوند (Loebenstein, 2008). بنابراین تشخیص دقیق و سریع آن‌ها برای محافظت گیاهان، امری ضروری است و به همین دلیل فراهم کردن یک روش تشخیص سریع، ارزان و مطمئن در تولید گیاهان عاری از ویروس و پایش بیماری در مزرعه به‌عنوان یک پارامتر کلیدی نقش مهمی در مبارزه و کنترل بیماری ویروسی دارد (Opoku et al. 2018). روش‌های اختصاصی به‌طور معمول یک یا چند گونه ویروسی را مورد هدف قرار می‌دهند و نیاز به دانش قبلی از بیمارگرهای مورد آزمایش دارند، در حالی‌که روش‌های غیر اختصاصی به دانش خاصی از عوامل بیماری‌زا احتیاج ندارند. روش‌های تشخیص سرولوژیکی و مولکولی نمی‌توانند تصویری از همه بیمارگرهای موجود در گیاهان مورد بررسی را نشان دهند و به‌طور معمول این روش‌ها بر اساس شناسایی اهداف از پیش تعریف‌شده طراحی می‌شوند. عموماً برای تشخیص و توصیف ویروس‌ها از روش‌های استانداردی مانند ایندکس بیولوژیکی، میکروسکوپ الکترونی، آزمایشات سرولوژیکی و مولکولی استفاده می‌شود که این روش‌ها را می‌توان به روش‌های اختصاصی (آزمایشات سرولوژیکی/مولکولی) و غیر اختصاصی (گیاه محک، میکروسکوپ الکترونی) تقسیم کرد. در بین این روش‌ها، ایندکس بیولوژیکی و میکروسکوپ الکترونی می‌توانند ویروس‌های جدید را تشخیص دهند، اما آزمایشات سرولوژیکی و مولکولی بسیار اختصاصی‌اند و نمی‌توانند ویروس‌های ناشناخته را که ممکن است در اتیولوژی یک گیاه نقش داشته باشند را شناسایی کنند. ایندکس بیولوژیکی روشی دشوار، زمان‌بر و نیاز به تجهیزات گلخانه‌ای پیشرفته دارد. میکروسکوپ الکترونی نیز فقط در حد توصیف مورفولوژیکی ذرات ویروسی کارایی دارد و به دلیل گران‌بودن، کارآمد نیست (Rott et al. 2017).

الایزا، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکنیک‌های هیبریداسیون اسید نوکلئیک، تشخیص سریع و ارزان را برای ویروس‌ها و ویروئیدهای شناخته شده فراهم می‌کنند و به‌طور گسترده در کشاورزی و پزشکی استفاده می‌شوند. با این وجود، به دلیل وابستگی به آنتی‌بادی، پرایمر و پروب، زمانیکه بیماری توسط ویروس جدید یا ترکیبی از بیمارگرها ایجاد شود که از نظر توالی، شباهت اندکی یا هیچ شباهتی با مواردی که قبلاً

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

توصیف شده‌اند، نداشته باشد، این روش‌ها کارآمد نیستند (Qingfa et al. 2015). دلیل دیگر برای ناکارآمد بودن این روش‌ها، تنوع بالای بین ویروس‌های گیاهی است (Hadidi et al. 2016). برای غلبه بر مشکلات ذکرشده، تکنیک‌های جدیدی مثل توالی‌یابی نسل جدید (next generation sequencing: NGS) برای تشخیص و توصیف ویروس‌ها به کار می‌روند. NGS که توالی‌یابی با کارایی بالا (high throughput sequencing: HTS) و توالی‌یابی عمیق (deep sequencing) نیز نامیده می‌شود، روند توالی‌یابی اسید نوکلئیک را متحول کرده است، زیرا امکان توالی‌یابی میلیون‌ها نوکلئوتید در یک بازه زمانی کوتاه با خوانش‌های بسیار بالا را فراهم می‌کند (Villamor et al. 2019). از آن‌جایی‌که این روش شناسایی کل ویروس‌های آلوده‌کننده (virome) نمونه گیاهی را فراهم می‌کند، اغلب از وجود بیمارگرهای ویروسی جدید پرده بر می‌دارد. در واقع می‌توان گفت تفاوت اساسی بین NGS و تکنیک‌های دیگر، ماهیت غیرهدفمند آن است. استفاده از این روش زمان مورد نیاز را کاهش می‌دهد و شناسایی عامل اتیولوژیک بیماری را تسهیل می‌کند (He et al. 2017). پیشرفت‌های اخیر در فناوری NGS، فرصت‌های جدیدی را برای شناسایی و تشخیص بیمارگرهای ویروسی/ ویروئیدی ایجاد کرده است. به دلیل ماهیت غیر اختصاصی NGS، می‌توان از آن برای تشخیص ویروس‌های موجود در میزبان صرف نظر از بیماری‌زایی آن‌ها استفاده کرد (Kesanakurti et al. 2016).

این روش شامل استخراج دی.ان.اِ یا آر.ان.اِ یا آر.ان.اِی کوچک (small RNA) از گیاهان آلوده، تولید دی.ان.اِی مکمل (complementary DNA: cDNA) و سرانجام توالی‌یابی است که توالی‌هایی را از طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا تولید می‌کند. آنالیز داده‌های حاصل از توالی، ایجاد کانتیگ و بلاست توالی کانتیگ در پایگاه داده ویروس‌های گیاهی به شناسایی ویروس‌های بالقوه کمک می‌کند. نتایج NGS سپس می‌تواند با طراحی آغازگرهای اختصاصی ویروس (بر اساس توالی کانتیگ‌هایی که به ویروس‌ها برخورد می‌کنند) و انجام نسخه برداری معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) با استفاده از آر.ان.اِی کل از گیاه آلوده، همسانه‌سازی و توالی‌یابی محصول RT-PCR به روش توالی‌یابی سنگر تایید شود. شناسایی ویروس‌ها/ویروئیدهای جدید و میزبان‌های جدید بعد از معرفی NGS به سرعت افزایش یافته است. فناوری NGS یک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

روش عمومی (روش غیر اختصاصی) برای شناسایی ویروس فراهم می‌کند اما می‌تواند نتیجه اختصاصی استرین/ گونه را ارائه دهد. این روش اولین بار در سال ۲۰۰۹ برای تشخیص ویروس‌ها در محصولات کشاورزی مختلف به کار گرفته شد و می‌تواند جایگزین قدرتمند اکثر یا تمام روش‌های متداول باشد و تا به امروز درک عمیق‌تری از تنوع زیستی ویروسی را امکان‌پذیر کرده است. اگرچه استفاده از آن برای تشخیص معمول هنوز خیلی گران است، استفاده از NGS برای غربالگری مواد گیاهی، زمان تشخیص ویروس‌ها را کاهش می‌دهد. پیشرفت‌های اصلی ارائه شده توسط NGS در مقایسه با روش‌های توالی‌یابی نسل اول مبتنی‌بر سنگر، توانایی تولید حجم عظیمی از داده است. به‌طور کلی بیش از یک میلیارد خوانش کوتاه در هر ران و همچنین توانایی آن در ارائه اطلاعات سریع، مقرون به صرفه و دقیق از ژنوم است. با استفاده از پلت‌فرم‌های جدید NGS، به‌طور مداوم ماهیت داده‌های توالی تولیدشده و هزینه‌های مرتبط کاهش می‌یابد. فناوری NGS همراه با بیوانفورماتیک، به‌تازگی زمینه ویروس شناسی گیاهی را به ویژه در زمینه‌های توالی‌یابی ژنوم، اکولوژی، مطالعه بیماری‌ها با اتیولوژی ناشناخته، اپیدمیولوژی، ژنتیک جمعیت، ارتباط متقابل گیاه-ویروس، ترنسکریپتومیکس، تکثیر، تشخیص و شناسایی تغییر داده است. بطور کلی، کنترل موثر ویروس‌ها، شناسایی بیمارگر و تعیین مکانیسم احتمالی انتقال امری ضروری است. آگاهی کامل و دقیق از ویژگی‌های ویروس، علائم و دسترسی به تشخیص قابل اعتماد و حساس ویروس، پیش نیاز تشخیص صحیح ویروس‌ها و مدیریت موثر آن‌ها است که این امر با پیشرفت فناوری‌های جدید مانند توالی‌یابی آر.ان.اِ فراهم شده است (Adams et al. 2009; Al Rwahnih et al. 2009).

معرفی NGS

تکنیک‌های NGS به دو نوع طبقه بندی می‌شوند: توالی‌یابی با سنتز یا با اتصال. از جمله این تکنیک‌ها می‌توان توالی‌یابی با سنتز (illumina)، توالی‌یابی با اتصال (SOLID, applied biosystems)، توالی‌یابی تک مولکول (pacific biosciences)، پایروسکوئنسینگ (pyrosequencing) (Roche 454) و توالی‌یابی نیمه‌رسانای یونی (ion torrent) را نام برد. در توالی‌یابی مبتنی‌بر سنتز، رشته دی.ان.اِی مکمل توسط دی.ان.اِی پلیمراز سنتز می‌شود و سیگنال فلورسنت حاصل از ترکیب نوکلئوتید برای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

شناسایی توالی استفاده می‌شود. اصلی‌ترین پلت‌فرم‌های توالی‌یابی مبتنی‌بر سنتز، illumina، Roche 454 pyrosequencing و ion torrent هستند. پایروسکوئنسینگ بر اساس چسبندگی یک الگوی دی.ان.اِی به یک بید کوچک و تکثیر با استفاده از امولسیون PCR انجام می‌شود که هر بید به‌صورت جداگانه درون یک چاهک قرار می‌گیرد، با دی.ان.اِی پلیمراز ، لوسیفراز ، سوبستراهای لوسیفرین، ATP سولفوریلاز و آدنوزین متصل به ۵´ فسفوسولفات انکوبه می‌شود. سپس نوکلئوتید در رشته دی.ان.اِ قرار می‌گیرد که ATP مورد نیاز را برای تبدیل لوسیفرین به اکسی لوسیفرین تولید می‌کند و با تابش نور منعکس می‌شود. پس از اضافه‌شدن نوکلئوتید، تمام نوکلئوتیدها و ATP شسته می‌شوند و فرآیند چندین بار تکرار می‌شود تا زمانیکه الگوی دی.ان.اِی به طول مورد نظر برسد. در سیستم مبتنی‌بر ایلومینا، از تکثیر پل فاز جامد در جایی استفاده می‌شود که هر انتهای یک الگوی دی.ان.اِی به آداپتورها متصل می‌شود. انتهای قطعه دی.ان.اِی متصل به آداپتور، به یک بستر متصل شده است، با این وجود، انتهای دیگر به‌منظور افزایش سیگنال فلورسنت، کلاسترهایی از الگوی یکسان ایجاد می‌کند. این فرآیند در حضور ترکیبی از چهار نوکلئوتید در یک سیکل متوالی ادامه می‌یابد (هر نوکلئوتید با یک فلوروفور متفاوت برچسب‌دار می‌شود). این سیکل تکرار می‌شود تا زمانی‌که قطعه دی.ان.اِ به طول هدف خود سنتز شود. پلت‌فرم‌های توالی‌یابی به‌طور مداوم پیشرفت می‌کنند تا سریعتر، کارآمدتر و ارزان‌تر شوند تا بتوان NGS را در آزمایشگاه‌های بیشتری به کار برد و استفاده از آن‌ها را در تحقیقات بیولوژیکی و تشخیصی گسترش داد. با نگاه به آینده می‌توان پیش بینی کرد که روزی هزینه‌ها به حدی کاهش یابد که ارائه نتایج برای یک نمونه، پایین‌تر از هزینه یک تست الایزا یا PCR باشد (Bhat and Rao, 2020).

تشخیص و شناسایی ویروس‌های جدید

اولین استفاده از NGS برای شناسایی ویروس، برای ویروس‌های موجود در سیستم‌های آبی بود (Suttle, 2007). ویروس‌های گیاهی علاوه بر گیاهان در بسیاری از محیط‌ها یافت می‌شوند: آب دریا، آب شیرین، فاضلاب، حشرات و مدفوع بسیاری از حیوانات. ویروس‌ها را می‌توان هر کجا که حیات وجود دارد پیدا کرد و احتمالاً فراوان‌ترین و متنوع‌ترین موجودات زنده روی زمین هستند. در سال‌های اخیر با پیشرفت فناوری‌های NGS، مشخص شده است که

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

آلودگی‌های ویروسی بدون علائم یا پنهان در همه جا وجود دارند. این ویروس‌ها ممکن است در میزبان در غلظت پایینی وجود داشته باشند و یا به‌صورت نهفته درآیند. در نتیجه با استفاده از پروتکل‌های سنتی که برای شناسایی ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد، به راحتی قابل شناسایی نیستند. استفاده از NGS در سال‌های گذشته انقلابی در شناسایی ریزسازواره‌ها و ویروس‌ها ایجاد کرده است. NGS برای بررسی بیمارگرها در مقیاس بزرگ مناسب است، نه تنها به این دلیل که می‌تواند سرعت شناسایی طیف وسیعی از بیمارگرها را افزایش دهد، بلکه به این دلیل که می‌توان از آن برای شناسایی بیمارگرهای نوظهور که ابزاری برای تشخیص آن‌ها در دسترس نیست، استفاده کرد (Villamor et al. 2016).

NGS و تاکسونومی ویروس‌ها

در آخرین گزارش کمیته بین‌المللی رده‌بندی ویروس‌ها (international commite on taxonomy of viruses: ICTV)، در سال ۲۰۱۸ حدود ۲۲۸۵ گونه ویروس و ویروئید منتشر شده است که استفاده از NGS در ویروس شناسی گیاهی قطعاً تعداد بیمارگرهای ویروسی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد زیرا ویروس‌های جدید در گونه‌های مختلف میزبان از جمله گیاهان وحشی (خودرو) و همچنین در ناقلین مختلف شناسایی می‌شوند (Opoku et al. 2018). شناسایی ویروس‌های جدید با سازماندهی ژنومی جدید، یک چالش برای نامگذاری ویروس است. ویروس‌ها به‌طور معمول براساس علائم بیماری، مکان‌هایی که ویروس‌ها از آن‌جا پیدا شده‌اند، گونه‌های میزبان یا بافت‌ها و اجزایی که ویروس برای اولین بار از آن جدا شده‌اند، نامگذاری می‌شوند. اگرچه جدیدترین دستورالعمل ICTV برای طبقه‌بندی و نامگذاری ویروس‌ها، استفاده از نام میزبان و به دنبال آن کلمه "ویروس" است. اکثر ویروس‌های شناسایی شده توسط تجزیه و تحلیل داده‌های NGS، بدون علائم هستند یا علائم آشکاری ندارند، در نتیجه از استفاده از علائم بیماری برای نامگذاری ویروس‌های جدید جلوگیری می‌کند (Liu et al. 2015).

شناسایی ویروس در درختان اکوسیستم‌های شهری/جنگلی با استفاده از NGS

درختان (غیر مثمر) تاثیر بسیار زیادی بر سلامت جمعیت انسان داشته و محافظت از آن‌ها امری ضروری است. در سال‌های اخیر بیماری‌های ویروسی به‌عنوان یکی از عوامل موثر در زوال

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

درختان توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. در سال ۱۹۹۰، زوال درختان توس (غان) در برلین مشاهده شد که می‌تواند به دلیل عوامل غیرزنده مانند درجه حرارت بسیار بالا، خشکسالی، تضعیف درختان و ایجاد زمینه برای بیمارگرهای ویروسی باشد (Costello. 2003).

تنوع علائم در گونه‌های بتولا توس منجر به فرض آلودگی مخلوط با منشا ویروسی ناشناخته می‌شود. کاربرد گسترده فناوری HTS به‌طور قابل توجهی شناسایی و توصیف عوامل ویروسی در درختان را تسهیل کرده است. در زوال درختان توس دارای علائم birch leafroll disease، یک ویروس جدید از طریق آنالیز توالی‌یابی آر.ان.اِ شناسایی شد (Rumbou et al. 2018). این ویروس عضو جدیدی از جنس *بادناویروس* (*Badnavirus*)، خانواده کالیموویریده (Caulimoviridae) است.

با توجه به مشکلات جداسازی ویروس‌ها از گیاهان چوبی، شناسایی ویروس‌ها در اکوسیستم جنگلی در مقایسه با ویروس‌ها در گیاهان زراعی و باغی بسیار مشکل است اما درختان و درختچه‌ها نیز می‌توانند به‌عنوان منبعی برای ویروس‌های بیماری‌زا باشند. فقدان اطلاعات وعدم آگاهی در مورد شیوع ویروس در جنگل می‌تواند تشخیص بیماری و عامل بیماری را دشوار کند. مشاهده علائم شبیه ویروس در درختان جنگلی و دانش در مورد ویروس‌هایی که درختان میوه را تحت تاثیر قرار می‌دهند این فرضیه را تائید می‌کند که ویروس‌ها باید در اکوسیستم جنگلی نیز تاثیر داشته باشند. HTS ممکن است اطلاعات بیشتری از ویروس‌ها در گونه‌های جنگلی ارائه دهد و خلا اطلاعات مربوط به virome جنگل را تکمیل کند. این روش در شناخت بسیاری از ویروس‌های ناشناخته که گونه‌های مهم درختان جنگل‌های اروپا را تحت تاثیر قرار داده‌اند، نقش بسزایی داشته است. انتظار می‌رود تحقیقات فعلی و آینده، پتانسیل اثرات متقابل ویروس‌ها را با تاثیر بر عوامل غیر زنده و زنده در درختان جنگلی و شهری و همچنین نحوه انتقال ویروس روشن کند (Rumbou et al. 2020).

جستجو و شناسایی ویروس‌ها و ویروئیدهای باستانی توسط NGS

حساسیت NGS بدان معناست که گاهی اوقات ویروس‌های کمیابی شناسایی می‌شوند که هرگز با روش‌های سنتی نمی‌توان آن‌ها را تشخیص داد. این روش امکان شناسایی دو ویروس گیاهی احتمالی از مدفوع منجمد گوزن متعلق به ۷۰۰

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

سال پیش را فراهم کرده است. این ویروس‌ها با ویروس‌های شناخته شده تنها ارتباط دوری دارند، اما یکی از آن‌ها از یک کلون بازسازی شد و توانست توتون را آلوده کند (Ng et al. 2014). آنالیز NGS در مورد ویروئیدهای باستانی در نمونه‌هایی از هرباریوم، خاک، هوا یا آب ممکن است این امکان را فراهم کند که تاریخچه تکاملی ویروئیدها را طی دهه‌های گذشته، قرن‌ها یا چندین میلیون سال به دست آوریم زیرا ویروئیدها ممکن است فسیل‌های زنده از جهان باستانی آر.ان.اِی باشند (Flores et al. 2014).

(VEM) Vector enabled metagenomics

یکی از کاربردهای جالب توجه در شناسایی ویروس بر اساس NGS، vector enabled metagenomics (VEM) است که در آن حشرات برای شناسایی ویروس‌های موجود در محیط نمونه‌برداری می‌شوند (Ng et al. 2011a). این روش که ویریون‌ها مستقیماً از ناقلین حشره‌ای، خالص و توالی‌یابی می‌شوند، یک روش با کارایی بالا برای بررسی *بگوموویروس*ها (*Begomovirus*) در مناطق خاص است (Ng et al. 2011; Rosario et al. 2014; Ng et al. 2011). با به دام انداختن ویروس‌ها مستقیماً از ناقلین حشره‌ای، VEM ممکن است دانش بی‌نظیری از بیوگرافی و تنوع *بگوموویروس*ها را فراهم کند و به‌عنوان یک سیستم پایش یا نظارت مولکولی، قادر به شناسایی *بگوموویروس*های شناخته شده و نوظهور باشد. با استفاده از این روش روی سفیدبالک، یک *بگوموویروس* جدید شناسایی‌شده در سلمه‌تره با علائم ویروسی تائید شد که در اکوسیستم‌های نمونه‌برداری رشد یافته بود و این نشان‌دهنده کارایی این روش برای پایش فعال ویروس‌های گیاهی است (Ng et al. 2011). با استفاده از VEM یک *مستروویروس* (*Mastrevirus*) جدید و ژنوم‌های شبیه به آلفاستلایت (α-satellite) شناسایی شد. بنابراین می‌توان از حشرات به‌عنوان گونه‌های نگهبان برای پایش محیط‌های خاص برای حضور یا معرفی ویروس‌های جدید استفاده کرد. این روش یک استراتژی کاربردی برای مطالعه تنوع ویروس‌هایی است که انتقال آن‌ها توسط ناقلین حشره‌ای صورت می‌گیرد (Ng et al. 2011).

کاربرد NGS در مطالعه بیماری‌ها با اتیولوژی ناشناخته

استفاده از NGS در ویروس‌شناسی گیاهی نشان داد که برخی بیماری‌ها با اتیولوژی ناشناخته که روی گیاهان علفی، چمن و میزبان‌های وحشی مختلف تاثیر می‌گذارند ناشی از ویروس‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

جدید یا شناخته‌شده هستند. با استفاده از NGS ویروس‌های جدید زیر شناسایی شده‌اند:

در سیب زمینی شیرین، دو ویروس دی.ان.اِی‌دار دو رشته‌ای (*بادناویروس*) و یک ویروس دی.ان.اِی تک‌رشته‌ای (*مستروویروس*)، در فلفل و بادمجان، دو ویروس peper yellow leaf curl virus و eggplant mild leaf mottle virus، در فلفل سیاه، دو ویروس دی.ان.اِی‌دار (*کالیموویریده*) با نام‌های پیشنهادی DNA virus 1 و DNA virus 2 شناسایی شدند (Barba et al. 2014). با کاربرد NGS مشخص شد که بیماری apple green crinkle virus کمپلکسی از چندین ویروس است و حداقل شش ویروس شناخته شده، سه ویروس نهفته سیب و سه ویروس میوه سنگی با آن در ارتباط است. تا به امروز بیش از ۷۰ ویروس و ۵ ویروئید به‌عنوان آلوده‌کننده انگور شناسایی شده‌اند (Martelli. 2017).

تشخیص جداگانه و دقیق این عوامل با روش‌های سرولوژیکی یا مولکولی در هر نمونه نسبتا دشوار است. NGS امکان بازیابی همزمان صدها هزار توالی از آر.ان.اِی کل گیاهان آلوده را فراهم می‌کند که می‌تواند از تنوع یا تعدد ویروس‌ها و ویروئیدهای موجود در نمونه انگور حاصل شود. استفاده از روش‌های توالی‌یابی آر.ان.اِی کل یا آر.ان.اِی دو رشته‌ای یا small RNA، ارتباط بسیاری از ویروس‌های جدید را با انگور نشان داد. از جمله این ویروس‌ها می‌توان یک *مارافی‌ویروس* (grapevine syrah 1 virus)، grapevine virus E، grapevine leaf roll-associated virus-3، grapevine rupestris pittingassociated virus، grapevine virus A، grapevine vein clearing virus، ۲۶ *مایکوویروس* و grapevine red blotch-associated virus را نام برد. توالی‌یابی با Illumina، یک ویروس ثبت‌نشده را همراه با سایر ویروس‌های شناخته‌شده نشان داد. این ویروس سازمان ژنوم مشابه با grapevine berry inner necrosis virus (GINV) داشت. یک *تریکوویروس* که فقط از ژاپن گزارش شده بود، اما تفاوت‌های مولکولی با GINV به اندازه کافی بود که ویروس مورد نظر را به‌عنوان گونه جدید با نام موقت virus grapvine pinot gris طبقه‌بندی کند (Giampetruzzia et al. 2011).

در مرکبات یک *Geminivirus* جدید و دو ویروس آر.ان.اِی‌دار جدید شناسایی شد که به ترتیب به‌طور موقت citrus dwarf-associated virus، citrus leprosies virus و citrus vein enation virus نامگذاری شدند. در سال ۲۰۱۲،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

تلفات محصول ذرت در کنیا گزارش شد. روش‌های موجود استفاده‌شده در هر دو محل و آزمایشگاه‌های بین‌المللی قادر به تشخیص مشکل نبودند و تنها با کاربرد NGS بود که دو ویروس شناخته‌شده (ویروس موزائیک نیشکر و ویروس ماتل نکروتیک ذرت) تشخیص داده شدند (Adams et al. 2013b).

شیوع یک ویروس ناشناخته در *Gomphrena globasa* با نام gayfeather mild mottle virus و توالی کامل cassava brown streak virus در کاساوا و maize chlorotic mottle virus و sugarcane mosaic virus در ذرت از طریق NGS بدست آمد. توالی‌یابی small RNA، وقوع cereal yellow dwarf virus در گراس‌های وحشی، ویروس نواری برنج (rice stripe virus (RSV)) در برنج، gayfeather mild mottle virus در liatris spicata و cotton leafroll dwarf virus در پنبه را نشان داد. توالی‌یابی small RNA، وقوع یک *بگوموویروس* جدید (citrus chlorotic dwarf-associated virus)، یک *سیلویروس* (citrus leprosies virus cytoplasmic cilevirus) type 2 و یک *لوتئوویروس* (citrus vein enation virus) را در مرکبات نشان داد (Bhat and Rao, 2020).

در محصولات چوبی چندساله، آلودگی همزمان با چند ویروس بسیار رایج است. بنابراین، شناسایی بیماری با اتیولوژی ناشناخته از طریق حضور همزمان ویروس‌های مختلف، پیچیده است. NGS، روشی مناسب برای تشخیص و شناسایی ویروس‌ها و عوامل شبه ویروسی آلوده‌کننده درختان میوه است (Maliogka et al. 2018). تشخیص CAV (virus A cherry) با ایندکس بیولوژیکی و الایزا امکان‌پذیر نبود. با ظهور NGS، این ویروس در آلودگی‌های مخلوط همراه با ویروس‌های شناخته شده آلوده‌کننده درختان میوه، گزارش شد. با توجه به اینکه این ویروس با پیوند قابل انتقال است، بنابراین از ورود آن در نهالستان‌ها باید جلوگیری شود. LchV-1 (little cherry virus 1) معمولا به‌صورت آلودگی توام با CAV گزارش شده است. با استفاده از NGS، حضور CAV و LchV-1 که قبلا در مجارستان تشخیص داده نشده بود، تایید شد. فناوری NGS می‌تواند به ما در توصیف حضور ناشناخته و کمیاب LchV-1 در نهالستان‌های زردآلو کمک کند (Baráth et al. 2018).

ویروس‌های گیاهی آب‌برد شامل *پوتکس‌ویروس*، *توبامووویروس* و *تومبوس‌ویروس*، در سراسر جهان گزارش شده است و تعدادی از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

آن‌ها در ایالات متحده رخ می‌دهد. آلودگی‌های ویروسی در مزارع آبیاری‌شده یا محصولات هیدروپونیک تا زمانی‌که علائم مشخص نشود، تشخیص داده نمی‌شود. از deep sequencing برای تشخیص ویروس‌های گیاهی آب‌برد استفاده شده است (Adams et al. 2009).

NGS ابزار مفیدی برای تشخیص ویروس‌ها و ویروئیدها در برنامه‌های قرنطینه

فهرست‌بندی کامل، سریع و دقیق ویروس‌ها و ویروئیدها یعنی شناسایی همه ویروس‌ها و ویروئیدهای موجود در یک نمونه که برای قرنطینه، بازرسی و مدیریت بیماری حائز اهمیت است تا همین اواخر یک هدف دست نیافتنی بود (Qingfa et al. 2015).

تحولات اخیر در NGS این وضعیت را به شدت تغییر داده است زیرا اطلاعات ژنتیکی لازم برای تشخیص معمولی را فراهم می‌کند. استفاده از این تکنیک در برنامه‌های قرنطینه و گواهی سلامت می‌تواند به‌طور موثر کارایی این برنامه‌ها و همچنین کنترل بیماری‌های ویروسی و ویروئیدی را در سطح ملی و بین‌المللی بهبود بخشد و از ورود ویروس‌ها و ویروئیدهای خارجی به کشورهای جدید جلوگیری کند. کاربرد این روش برای غربالگری مواد گیاهی با ارزش بالا می‌تواند زمان تشخیص ویروس را کاهش و کارایی برنامه‌های گواهی محصول را افزایش دهد. این تکنیک می‌تواند جایگزین بسیاری از ابزارهای موجود شود که در حال حاضر در قرنطینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (MacDiarmid et al. 2013). به‌عنوان مثال، روش‌های تشخیصی که به‌طور معمول در قرنطینه مورد استفاده قرار می‌گیرند، قادر به تشخیص یک *مستروویروس* جدید به نام sugarcane white streak virus نبودند، به دلیل وجود این ویروس در آلودگی مخلوط با یک *مستروویروس* دیگر (sugarcane streak egypt virus)، ولی با استفاده از NGS توانستند این *مستروویروس* جدید را تشخیص دهند (Candresse et al. 2014).

جابه‌جایی بین‌المللی ژرم‌پلاسم در حفظ تنوع ژنتیکی نیشکر اهمیت ویژه‌ای دارد. اما این جابه‌جایی و تبادل ژرم‌پلاسم، گسترش ویروس‌های نیشکر را به ویژه ویروس‌های ناشناخته‌ای که هیچ روش تشخیصی برای آن‌ها در دسترس نیست، تسهیل می‌کند (Boukari et al. 2017). بنابراین استراتژی‌های قرنطینه‌ای با کیفیت و قابل اعتماد برای به حداقل رساندن خطر جابه‌جایی بیمارگرهای خارجی در هنگام تبادل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

ژرم‌پلاسم مورد نیاز است. به تازگی، فناوری NGS برای تشخیص ویروس‌های نیشکر استفاده شده است (Candresse et al. 2014).

از جمله ویروس‌هایی که با NGS تشخیص داده شدند sugarcane bacilliform virus، sugarcane striate virus و *آمبراویروس* (*Umbravirus*) هستند (Boukari et al. 2017). غربالگری منظم virome نیشکر با NGS، امکان نظارت بر شیوع بیماری‌های ویروسی نیشکر را فراهم و کارایی کنترل بیماری را با استفاده از ارقام مقام ارزیابی می‌کند. استفاده از NGS برای شناسایی بیمارگرهای مهم قرنطینه‌ای پیش بینی شده است و به توزیع ایمن ژرم‌پلاسم در سراسر جهان کمک می‌کند (Carvajal-Yepes et al. 2017). اجرای NGS برای تشخیص بیمارگرهای بذر برد در کلکسیون بانک ژن به خصوص برای کلکسیون‌هایی که نیاز به بازسازی در این زمینه دارند و در معرض بیمارگرهای نوظهور در فصول زراعی قرار می‌گیرند، بسیار مناسب است. NGS در سال ۲۰۱۵ مشخص کرد که عامل اصلی کوتولگی شدید و مرگ گیاهان رازک در اسلوونی، citrus bark cracking viroid (CBCVd) است. در نتیجه سازمان حفاظت از گیاهان اروپا و مدیترانه (the european and mediterranean plant protection organization: EPPO)، ویروئید را به لیست هشدارهای EPPO اضافه کرد (Jakse etal. 2015).

در نتیجه NGS باید به‌عنوان یک تاییدیه یا اقدام قرنطینه‌ای پس از ورود به‌منظور تشخیص و شناسایی CBCVd در رازک اتخاذ شود. از داده‌های تولیدشده توسط NGS می‌توان برای بهبود کارایی و قابلیت اطمینان این برنامه‌ها و همچنین در برنامه‌هایی با هدف از بین بردن ویروس و ویروئید از مواد تکثیری رویشی استفاده کرد. براین اساس، فناوری NGS ابزار مهم و قدرتمندی در کنترل بیماری‌های ویروسی و ویروئیدی خواهد بود (Rott et al. 2017).

NGS برای شناسایی ویروس‌های حشره‌ای

حشرات به‌عنوان آفات محصولات کشاورزی و ناقل بیماری‌های انسانی، حیوانی و گیاهی، اثرات منفی بسیار زیادی هم بر اقتصاد و هم بر زندگی انسان‌ها دارند. در دهه گذشته، NGS روش شناسایی ویروس را تغییر داده و به ابزاری اصلی برای شناسایی ویروس‌ها در جانوران از جمله انسان (Lipkin and Firth, 2013) و بندپایان تبدیل شده است (Junglen and Drosten, 2013). حشرات به‌طور معمول به ویروس‌های مختلفی آلوده می‌شوند از جمله ویروس‌های که باعث

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

آلودگی‌های نهفته و بدون علائم می‌شوند. روش‌های سنتی برای جداسازی ویروس به‌طور معمول فاقد حساسیت مورد نیاز برای تشخیص چنین ویروس‌هایی هستند که در غلظت پایینی وجود دارند. از این نظر، فناوری‌های NGS در روش شناسایی ویروس‌های جدید از حشرات، تغییرات اساسی ایجاد کرده‌اند. این روش علاوه بر شناسایی ویروس‌ها در حشرات، در تشخیص و اپیدمیولوژی بیماری‌های ویروسی و مطالعه برهم‌کنش ویروس-حشره تغییرات اساسی ایجاد کرده است. NGS امکان توالی‌یابی سریع، ارزان، با کارایی بالا و دقیق را برای شناسایی توالی‌های ویروسی حاصل از حشرات کامل یا بافت‌های خاص و برای ویروس‌های موجود در تیترهای کم که منجر به ایجاد علائم در میزبان نمی‌شوند را فراهم می‌کند (Bishop-Lilly et al. 2010). علاوه بر این، NGS نگاه کمی از ویروس‌های موجود در یک حشره و بینش همزمان در مورد اینکه چه تغییراتی در ترنسکریپتوم میزبان بعد از آلودگی ویروسی رخ می‌دهد را فراهم می‌کند. فناوری NGS ابزار قدرتمندی برای شناسایی توالی‌های ویروسی از حشرات و کشت سلولی حشرات است. چنین ویروس‌هایی که به تازگی شناسایی شده‌اند ممکن است پتانسیل زیادی برای استفاده به‌عنوان عوامل کنترل زیستی داشته باشند. پیشرفت‌های اخیر در شناسایی ویروس حاکی از این است که حشرات پناهگاه ویروس‌های جدید و متنوع هستند که نقش مهمی برای استفاده از کشت سلولی حشرات و کلون‌های آزمایشگاهی حشرات برای تحقیقات ویروس دارد. افزایش میزان شناسایی ویروس‌های جدید، چالش‌هایی را برای رده‌بندی و نامگذاری ویروس به همراه دارد، به ویژه زمانی‌که حشرات میزبان به درستی تایید نشده‌اند. نامگذاری نامناسب ویروس‌ها باعث سردرگمی می‌شود. انتظار می‌رود که ابزارهای بیوانفورماتیک، شناسایی دقیق‌تر و کارآمدتر توالی‌های ویروسی را فراهم کنند و مونتاژ کامل ژنوم ویروس را بهبود بخشند (Liu et al. 2015). ویروس‌های حشره‌ای جدید شناسایی شده با NGS، حضور ویروس‌ها را در جمعیت‌های مزرعه‌ای، کلونی‌های آزمایشگاهی حشرات و کشت‌های سلولی حشرات نشان می‌دهند. این ویروس‌ها ممکن است باعث آلودگی پنهان یا آشکار شوند یا توسط حشره به میزبان‌های گیاهی یا حیوانی آن‌ها منتقل شوند. تحقیقات اخیر، پیچیدگی و تنوع جمعیت‌های ویروسی در یک حشره و گروه‌های مختلف ویروسی آلوده‌کننده حشرات را نشان می‌دهد. فناوری NGS، بازآرایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

(assembly de novo) توالی‌های ویروسی را بدون رفرنس به توالی‌های ویروسی فراهم می‌کند. توالی‌یابی نسل سوم احتمالاً کارایی شناسایی ویروس‌های حشره‌ای جدید را بهبود می‌بخشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد، روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های حشره‌ای جدید و برای مونتاژ توالی ژنوم ویروسی وجود دارد. روش‌های مختلفی که برای تهیه کتابخانه (library) (دی.ان.اِی کل، آر.ان.اِی کل، small RNA یا نوکلئوتیدهای جدا شده از ویروس‌های خالص) استفاده می‌شود و کتابخانه‌های مورد استفاده ممکن است منجر به تشخیص ویروس‌های مختلف شود. بعد از تشخیص توالی‌های ویروسی با فناوری NGS، وجود توالی‌های ویروسی در نمونه باید با PCR (ویروس‌های دی.ان.اِی‌دار) و یا RT-PCR (ویروس‌های آر.ان.اِی‌دار) تایید شود. Real time PCR/RT-PCR می‌تواند برای تعیین کمی میزان ویروس موجود و تایید تعداد خوانش‌های مشاهده شده در مجموعه داده‌های (datasetهای) NGS استفاده شود. برای تایید اینکه آیا ویروس‌های شناسایی شده در حشرات میزبان تکثیر می‌شوند، RT-PCR برای تشخیص رونوشت‌های ویروسی یا RT-PCR اختصاصی رشته منفی برای ویروس‌های ssRNA می‌تواند انجام شود. از ردیابی رشته‌های منفی آر.ان.اِ به‌عنوان شاخص تکثیر برای ویروس‌هایی که آر.ان.اِی تک رشته‌ای مثبت هستند، استفاده می‌کنند. آزمایش‌های بیشتر برای تایید حضور ویروس توصیه شده است (به‌عنوان مثال، خالص‌سازی ویروس، آنالیز میکروسکوپ الکترونی، ردیابی پوشش پروتئینی ویروسی، جداسازی دی.ان.اِی یا آر.ان.اِی ژنومی یا نشان دادن افزایش تکثیر ویروس در طول زمان با استفاده از PCR/RT-PCR کمّی). در بعضی مواقع، توالی‌های ویروس‌هایی که در حشره هدف تکثیر نمی‌شوند اما در رژیم غذایی آن حشره وجود دارند یا در ژنوم میزبان گنجانیده شده‌اند، شناسایی می‌شود. از این رو، تشخیص توالی‌های ویروسی در یک حشره خاص، شاهد کافی برای تکثیر ویروس در آن میزبان نیست. در حالت ایده آل، خالص‌کردن ویروس و آلوده‌کردن افراد دیگر از همان‌گونه که فاقد ویروس هستند، امکان‌پذیر است (Liu et al. 2011).

توسعه فناوری NGS به محققان این امکان را داد تا ویروس‌های آر.ان.اِی‌دار حشره‌ای شناخته‌شده یا جدید را شناسایی کنند. حساسیت بسیار بالای NGS در تشخیص غلظت‌های بسیار کم ویروس باعث شده است که در تشخیص

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

نمونه‌های آلوده با *مایکوویروس*، ویروس‌های حشرات یا سایرین بسیار حساس باشد. شاید توالی‌یابی ژنوم بارزترین کاربرد NGS باشد. اگرچه ژنوم‌های ویروسی نسبتاً کوچک هستند ارزش تحقیقاتی بالایی دارند و زمانی‌که با بارکد و پارتیشن همراه شوند، NGS می‌تواند به روشی بسیار کارآمد برای توالی‌یابی کامل ژنوم‌های ویروسی تبدیل شود. فراهم‌کردن یک لیست کامل و جامع از همه ژنوم‌های ویروسی منتشرشده توسط NGS امکان پذیر نیست و به سرعت از دسترس خارج می‌شود (Radford et al. 2012).

NGS و بررسی ترنسکریپتوم

توالی‌یابی کامل ترنسکریپتوم که معمولا توالی‌یابی آر.ان.اِ نامیده می‌شود، با هدف بررسی و مطالعه کل محتوای آر.ان.اِی یک سلول اعم از آر.ان.اِی پیک (mRNA)، آر.ان.اِی ناقل (tRNA)و دیگر آر.ان.اِهای غیر کد کننده یا با هدف بررسی مجموعه ترنسکریپت‌های بیان شده در یک ارگانیسم معین صورت می‌گیرد. با توجه به اینکه اکثر ویروس‌های گیاهی، ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.اِ هستند و ویروس‌هایی با ژنوم دی.ان.اِ، mRNA را در سیکل زندگی خود ترنسکریپت می‌کنند، توالی‌یابی آر.ان.اِ قادر است انواع مختلفی از ویروس‌ها را به‌طور همزمان در یک آزمایش غربال کند (Kreuze et al. 2009; Barba et al. 2014). در این روش با اندازه‌گیری mRNA می‌توان به بینش جدیدی در مورد بیان ژن و اینکه چگونه بیان ژن ممکن است در گیاهان سالم و آلوده تغییر کند، دست یافت. بنابراین یکی از کاربردهای این روش، تشخیص تغییرات بیان ژن مرتبط با آلودگی ویروسی است. در مطالعه برهمکنش بیمارگر-گیاه، توالی‌یابی آر.ان.اِ فرصت‌های جدیدی را برای آنالیز همزمان ترنسکریپتوم‌های میزبان و بیمارگر فراهم می‌کند (توالی‌یابی آر.ان.ای دوگانه (dual RNA-sequencing) (Westermann et al. 2016). علاوه‌بر این، می‌توان از آن برای آشکار سازی تنوع ویروس و ترنسکریپتوم میزبان به‌طور همزمان در یک سیستم میزبان-بیمارگر استفاده کرد. در مورد ویروئیدها از روش‌هایی چون الکتروفورز دو بعدی همراه با طیف‌سنجی جرمی (mass spectrometry)، نمایش افتراقی (differential display) و ریزآرایه (microarry) برای مطالعه بیان ژن در گیاهان آلوده استفاده می‌شود که NGS در مقایسه با این روش‌ها در تشخیص و شناسایی تغییرات رونویسی حساس‌تر است، قابلیت تکرارپذیری بالاتر و هزینه کمتری

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

دارد. آنالیز دقیق‌تر تغییرات رونویسی در گیاهان آلوده به ویروئید برای درک بیماری‌زایی ویروئید و کنترل بیماری مهم است (Hadidi et al. 2017). تکنیک‌های مبتنی‌بر توالی‌یابی آر.ان.اِ می‌توانند آنالیز جامع ترنسکریپتوم را فراهم کنند که امکان ارزیابی بیان ژن بین واریته‌ها، مراحل مختلف فنولوژیکی، پاسخ به استرس‌های محیطی (خشکسالی، دما) یا مطالعه پاسخ گیاه به عوامل عفونی را فراهم می‌کند. در پاسخ سیستم دفاعی گیاه علیه ویروس، موفقیت آلودگی به توان گیاه برای مقاومت در برابر حمله ویروس بستگی دارد. زمانیکه ویروس به پاسخ‌های گیاه غلبه می‌کند، گیاه حساس می‌شود و علائم بیماری ایجاد می‌شود. بنابراین در برهمکنش ویروس-گیاه، بیان چندین مجموعه ژن در پاسخ به آلودگی ویروسی تغییر می‌کند که این می‌تواند شامل ژن‌های شناخته‌شده و یا ژن‌هایی باشد که قبلاً شناخته نشده‌اند. چندین روش و ابزار برای تشخیص ویروس، بیان ژن ویروسی و سازگاری میزبان با استفاده از مجموعه داده‌های NGS ایجاد شده است. در بین آن‌ها، توالی‌های ویروسی اغلب به‌صورت de novo با استفاده از خوانش‌ها یا بدون هیچ سازگاری به ژنوم ویروسی مونتاژ می‌شوند. به‌عنوان مثال، با استفاده از داده‌های حاصل از این روش، بیان ژن‌های میزبان را در گیاهان غیرآلوده (سالم) و آلوده به ویروس موزائیک شلغم (turnip mosaic virus) مقایسه کردند. مقایسه داده‌ها نشان داد که از ۱۰۶۰۳ ژن میزبان، ۴ ژن با آلودگی ویروس تغییر یافته بود و همچنین در گیاهان آلوده، بیان آرگونات ۲، ۳/۲ برابر بیشتر از گیاهان غیر آلوده بود (Kamitani et al. 2016).

در گیاهان میزبان، ویروس‌ها می‌توانند متابولیت‌های میزبان را برای ترجمه و تکثیر ژنوم‌های خود دستکاری کرده و پاسخ‌های میزبان را از طریق سرکوبگرها سرکوب کنند. برهمکنش بین گیاه میزبان و ویروس مهاجم باعث می‌شود در سلول‌های میزبان، مسیرهای خاصی up-regulate یا down-regulate شوند (Pumplin et al. 2013). یکی از وظایف اصلی ویروس شناسان گیاهی، درک مکانیسم‌های اساسی برهمکنش گیاه-ویروس است. برای دست‌یابی به این هدف، پروفایل ترنسکریپتوم اتخاذ شده است که نشان می‌دهد ویروس چگونه میزبان را کلنیزه می‌کند، چگونه میزبان، پاسخ‌های دفاعی را در برابر ویروس افزایش می‌دهد، چگونه برهمکنش سازگار میزبان-ویروس منجر به علائم بیماری می‌شود که این امر با ظهور NGS بسیار ممکن خواهد شد (Sun et al. 2016). برای درک مکانیسم پاسخ گیاه به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

آلودگی با ویروس نواری برنج (RSV) و شناسایی ژن‌های دخیل در برهمکنش گیاه-RSV، روش‌های ترنسکریپتومیک مبتنی‌بر NGS برای مطالعه برهمکنش برنج-RSV استفاده شده است. آنالیز توالی‌یابی آر.ان.اِ نشان داد که در گیاهان برنج آلوده به RSV، کاهش بیان ژن‌های کلروپلاست با توسعه بیماری همراه است و مسیرهای دفاعی میزبان در ارقام حساس و مقاوم برنج به‌صورت انتخابی توسط RSV سرکوب می‌شوند. آنالیز deep sequencing، آر.ان.اِی کوچک نشان داد که آلودگی با RSV، تجمع siRNAها (آر.ان.اِهای مداخله‌گر کوچک، short interfereance RNA) یا miRNAهای جدید را تحریک می‌کند و به‌صورت انتخابی، بیان یک خانواده miRNA حفاظت شده را تغییر می‌دهد. این داده‌ها نشان‌دهنده این است که RSV به‌طور انتخابی بیان ژن‌های میزبان را در مراحل مختلف توسعه علائم ویروسی تغییر می دهد. HTS می‌تواند برای مطالعه برهمکنش ویروس-گیاه-ناقل از طریق آنالیز ترنسکریپتومیک یا مطالعه مکانیسم‌های مقاومت مانند خاموشی آر.ان.اِ (RNA silencing) در گونه‌های مختلف درختان میوه استفاده شود و در نتیجه می‌تواند به توسعه ابزارهای کنترل جدید منجر شود (Yang et al. 2016).

بررسی quasispeciesهای ویروسی، اکولوژی و تنوع ژنتیکی بین و درون میزبان

quasispeciesها یا شبه‌گونه‌های ویروسی، جهش‌هایی هستند که به‌طور عمده توسط ویروس‌های آر.ان.اِی‌دار به دلیل عدم فعالیت تصحیح آر.ان.اِ پلیمراز وابسته به آر.ان.اِ (RNA dependent RNA polymerase) در طی تکثیر ایجاد می‌شوند. این quasispeciesها برای مدت طولانی ناشناخته باقی مانده‌اند. یکی از کاربردهای NGS، بررسی همین quasispeciesهاست. اطلاعات در مورد quasispeciesها برای شناخت تکامل، گسترش، بیماری‌زایی و فرار از پاسخ ایمنی میزبان مهم است (Prabha et al. 2013). فرآیندهایی مانند سازگاری (complementation)، نوترکیبی، نوآرایی (reassortment)، نرخ بالای جهش و وجود quasispecies باعث می‌شود ویروس‌ها از سیستم ایمنی میزبان پیشی بگیرند. واسطه‌های مولکولی که محرک این فرآیندها هستند با توالی‌یابی و آنالیزهای بعدی قابل تفسیر هستند (Sunitha et al. 2016).

برای درک اکولوژی ویروس‌ها، به دست آوردن اطلاعات جامع در مورد اثر متقابل ویروس-ویروس و ویروس-میزبان در سیستم‌های طبیعی ضروری است. توالی‌یابی آر.ان.اِ چنین آنالیزهایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

را بدون هیچ فرض قبلی در مورد ویروس‌های آلوده‌کننده، علائم ویروس یا ژن‌های پاسخ دهنده میزبان انجام می‌دهد. NGS فرصت‌های جدیدی برای درک تکامل و پویایی جمعیت‌های ویروسی در میزبان‌های فردی در طی آلودگی فراهم می‌کند. به دلیل تولید سریع و نرخ بالای جهش در اکثر ویروس‌ها، جمعیت ویروس آلوده‌کننده یک میزبان می‌تواند تنوع ژنتیکی قابل توجهی را در طی آلودگی ایجاد کند. این تنوع به نوبه خود مانند تنوع ژنتیکی در هر جمعیت بیولوژیکی تحت فرآیندهای انتخاب طبیعی و رانش ژنتیکی تصادفی است. جمعیت ویروسی که یک میزبان فردی (تکی) را آلوده می‌کند در معرض یک روند تکاملی قرار دارد. این روند تکاملی ممکن است برای تداوم آلودگی ویروسی مهم باشد. روش‌های NGS می‌توانند به درک بیشتر تکامل ویروس در میزبان کمک کنند. ظهور و پیدایش NGS با پتانسیلی که برای بررسی هزاران توالی ویروسی از یک میزبان معین دارد، به‌طور چشمگیری توانایی ما را در توصیف تنوع توالی درون میزبان در آلودگی‌های ویروسی بهبود بخشیده است (Nelson and Hughes, 2015).

مطالعه بیولوژی جمعیت ویروس‌های آر.ان.اِی‌دار تا همین اواخر دشوار بود زیرا لازم بود ویژگی‌های یک جمعیت ویروسی متنوع را فقط از تعداد کمی از توالی‌ها استنباط کنیم. در دسترس‌بودن روش‌های NGS که تصویری بسیار عمیق‌تر از تنوع ویروسی درون میزبان ارائه می‌دهد، به طرز چشمگیری پتانسیل تغییر این وضعیت را دارد. با استفاده از این روش‌ها ما قادر خواهیم بود ارزیابی‌های بسیار دقیق‌تری از تنوع نوکلئوتیدی مترادف و غیر مترادف نسبت به گذشته به دست آوریم و از این طریق، بینشی در مورد اندازه‌های موثر جمعیت ویروسی و نقش انتخاب طبیعی ارائه دهیم (Rosario et al. 2014).

NGS در شناسایی small RNA

خاموشی آر.ان.اِ (RNA silencing) مکانیسم دفاعی ضد ویروسی اساسی در گیاهان است که آنزیم‌های میزبان، آر.ان.اِی ویروسی را به قطعات ۲۴-۲۱ نوکلئوتید برش می‌دهند. با به کارگیری سیستم پاسخ ایمنی گیاه می‌توان ویروس‌های آلوده‌کننده گیاه را تشخیص داد. در حین تکثیر ویروس، dsRNA حاصل از ویروس توسط اندوریبونوکلئاز میزبان (dicer) شکسته می‌شود و در نتیجه تکثیر ویروس محدود می‌شود. این آر.ان.ای‌های کوچک شکسته‌شده یا small RNAها برای NGS مورد استفاده قرار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

می‌گیرند. این مولکول‌ها را می‌توان از گیاهان آلوده جدا کرد و در معرض HTS قرار داد و برای بازسازی ژنوم‌های ویروسی مورد استفاده قرار داد (Varvara et al. 2018).

NGS از siRNA فرصت‌های مناسبی را برای شناسایی ویروس‌ها یا ویروئیدهای آلوده‌کننده گیاهی در تیترهای بسیار کم، در آلودگی‌های بدون علائم و ویروس‌ها و ویروئیدهای ناشناخته فراهم می‌کند. NGS می‌تواند هزاران تا میلیون‌ها توالی siRNA از مواد گیاهی آلوده به ویروس یا ویروئید را فراهم کند. هنگامی که siRNAهای مشتق از ویروئیدها یا ویروس‌ها ۲۱-۲۴ نوکلئوتید باشد، می‌توان ژنوم ویروس یا ویروئید را مونتاژ کرد. آنالیز توالی siRNA گیاه میزبان، می‌تواند با حساسیت بالا حضور هر گونه بیمارگر ویروسی را نشان دهد. deep sequencing، small RNA با توانایی شناسایی ویروس‌های آر.ان.اِی دار و دی.ان.اِی دار به‌عنوان یک تکنیک تشخیص و شناسایی با کارایی بالا در نظر گرفته می‌شود. deep sequencing، siRNA برای تشخیص و شناسایی ویروس‌ها در محصولات مختلف دارای علائم بیماری از قبیل کاساوا، لوبیا، برنج و پاپایا استفاده شده است. با استفاده از این روش، ویروس‌های جدید آلوده‌کننده مزارع کاساوا در کلمبیا، از گیاهان با علائم CFSD (cassava frogskin disease) شناسایی و گزارش شدند (Carvajal-Yepes et al. 2017). CFSD یک بیماری قرنطینه‌ای است که باعث خسارات قابل‌توجهی به عملکرد می‌شود و به آلودگی توسط چندین بیمارگر ارتباط دارد. از آن‌جایی‌که تولید siRNAهای اختصاصی ویروس و ویروئید، تحریک پاسخ ایمنی میزبان را به یک آلودگی فعال نشان می‌دهد، شناسایی ویروس‌ها و ویروئیدها با توالی‌یابی small RNA، شواهدی را برای تکثیر در میزبان فراهم می‌کند (Qingfa et al. 2015).

نتیجه‌گیری

امروزه در آزمایشگاه‌های تشخیصی قرنطینه پس از ورود، روش‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، هر کدام از این تکنیک‌ها، توانایی ما را در تشخیص کارآمد آلودگی ویروسی از لحاظ حساسیت بهبود بخشیده‌اند، با اینحال، استفاده از این تکنیک‌ها تا حد زیادی به عوامل ویروسی شناخته شده محدود شده است.

از دیدگاه تاریخی، شناسایی ویروس‌های جدید اغلب نتیجه تحقیقات اتیولوژیک در مورد ویروس‌هایی با اهمیت اقتصادی و بیماری‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

شبه‌ویروسی محصولات کشاورزی است. پیشرفت‌های اخیر در فناوری NGS، فرصت‌های جدیدی را برای شناسایی و تشخیص بیمارگرهای ویروسی ایجاد کرده است. بدون شک، ویروس‌شناسی گیاهی نیز از این کشفیّات سود برده است.

در گیاهان که ویروس‌ها بخش مهمی از بیماری‌های شناخته‌شده را تشکیل می‌دهند و اکثریت بیماری‌های تازه شناسایی‌شده را شامل می‌شوند، میزان شناسایی ویروس‌ها طی دهه‌های گذشته دستخوش تغییرات زیادی شده است و ویروس‌های جدید زیادی شناسایی شده‌اند. آنالیز virome گیاهان با استفاده از NGS، شناسایی ویروس‌های مرتبط با بیماری را که به طرق دیگر امکان شناسایی آن‌ها وجود ندارد را تسریع کرده است.

NGS و بیوانفورماتیک، تعیین توالی سریع آر.ان.اِی و دی.ان.اِی را برای ویروس‌ها و ویروئیدهای گیاهی فراهم کرده‌اند. اگرچه در مورد کارایی HTS در تشخیص ویروس‌ها هیچ شکی وجود ندارد، این فن‌آوری هنوز برای استفاده روتین گران است، اما می‌تواند در برنامه‌های قرنطینه بسیار کارآمد باشد و فرصت برای ارزیابی بهتر وضعیت سلامت گیاهان را فراهم کند و از مبادلات بین المللی مواد گیاهی آلوده در سراسر جهان جلوگیری کند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

References فهرست منابع

Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalin-skiene M, Samuitiene M, Boonham N. 2009. Next generation sequencing and metagenomics analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathology 10: 537-545.

Adams IP, Miano DW, Kinyua ZM, Wangai A, Kimani E, Phiri N, Reeder R, Harju V, Glover R, Hany U, Souza-Richards R, Deb Nath P, Nixon T, Fox A, Barnes A, Smith J, Skelton A, Thwaites R, Mumford R, Boonham N . 2013. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya. Plant Pathology 62:741–749.

Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Rowhani A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. Virology 387: 395-401.

Barba M, Czosnek H, Hadidi A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6:106–36.

Baráth D, Jaksa-Czotter N, Molnár J, Varga T, Balássy J, Szabó LK, Kirilla Z, Tusnády GE, Preininger E, Várallyay E. 2018. Small RNA NGS revealed the presence of cherry virus A and little cherry virus 1 on apricots in Hungary. Viruses 10: 318.

Bhat AI, Rao GP. 2020. Characterization of Plant Viruses, Springer Protocols Handbooks, Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.

Bishop-Lilly KA, Turell MJ, Willner KM, Butani A, Nolan NM, Lentz SM, Akmal A, Mateczun A, Brahmbhatt TN, Sozhamannan S, et al. 2010. Arbovirus detection in insect vectors by rapid, high-throughput pyrosequencing. PLoS Neglected Tropical Diseases 4: e878.

Boukari W, Alcala-Briseno RI, Kraberger S, Fernandez E, Filloux D, Daugrois JH, Comstock JC, Lett JM, Martin D, Varsani A, Roumagnac P, Polston JE, Rott PC. 2017. Occurrence of a novel masterovirus in sugarcane germplasm collections in Florida, Guadeloupe ana Reunion. BMC Virology Journal 14:146.

Boukari W, Alcalá-Briseño RI, Kraberger S, Fernandez E, Filloux D, Daugrois JH, Comstock JC, Lett JM, Martin DP, Varsani A, Roumagnac P, Polston JE, Rott PC. 2017. Occurrence of a novel mastrevirus in sugarcane germplasm collections in Florida, Guadeloupe and Réunion. Virology Journal 14:146.

Candresse T, Filoux D, Muhire B, et al. 2014. Appearance can be deceptive: revealing a hidden viral infection with deep sequencing in a plant quarantine context. PlosOne 9: e102945.

Candresse T, Filloux D, Muhire B, Julian C, Galzi S, Fort G, Bernardo P, Daugrois JH, Fernandez E, Martin DP, Varsani A, Roumagnac P. 2014. Appearances can be deceptive: Revealing a hidden viral infection with deep sequencing in a plant quarantine context. PLoS One 7:e42758.

Carvajal-Yepes M, Cuervo M, Olaya C, Martínez A, Lozano I, Niño D, Aranzales E, Debouck D, Wenzl P, Cuellar W, Tohme J. 2017. Next generation sequencing for virus discovery and large-scale virus screening in the cassava collection at CIAT's genebank. Poster presented at the Workshop on the use of Next Generation Sequencing technologies for plant pest diagnostics, EPPO, Bari, Italy.

Chase W, Nelson CW, Hughes AL. 2015. Within-host nucleotide diversity of virus populations: insights from next-generation sequencing. Infection Genetics and Evolution 0: 1–7.

Chiu CY. 2013. Viral pathogen discovery. Current Opinion in Microbiology 16:468-478.

Costello L .2003. Diagnosing abiotic disorders of landscape plants: A diagnostic guide. University of California Agriculture and Natural Resources Publication. Oakland, CA. p: 242.

Flores R, Gago-Zachert S, Serra P, Sanjuan R, Elena SF. 2014. Viroids-survivors from the RNA world? Annual Review of Microbiology 68: 395–414.

Giampetruzzia A, Roumia V, Robertoa R, Malossinib U, Yoshikawac N, Nottea PL, Terlizzi F, Credid R, Saldarelli P. 2011. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. Virus Research 163: 262–8.

Hadidi A, Flores R, Candresse T, Barba M. 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. Frontiers in Microbiology 7:1325.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P. 2017. Viroids and satellites; Academic Press: Cambridge, MA, USA; Elsevier: Oxford, UK; ISBN 978-0-12-801498-1.

He Y, Cai L, Zhou L,Yang Z, Hong N, Wang G, Li S, Xu W. 2017. Deep sequencing reveals the first fabavirus infecting peach. Scientific Report 7: 11329.

Jakse J, Radisek S, Pokorn T, Matousek J, Javornik B. 2015. Deep sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. Plant Pathology 64: 831–842.

Junglen S, Drosten C. 2013. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. Current Opinion Microbiology 16:507- 513.

Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H. 2016. RNA-Seq reveals virus–virus and virus–plant interactions in nature. FEMS Microbiology Ecology. 92(11).

Kesanakurti P, Belton M, Saeed H, Rast H, Boyes I, Rott M. 2016. Screening for plant viruses by next generation sequencing using amodified double strand RNA extraction protocol with an internalamplification control. Journal of Virological Methods 236: 35–40.

Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, et al. 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 388:1–7.

Lipkin WI, Firth C. 2013. Viral surveillance and discovery. Current Opinion in virology 3:199-204.

Liu S, Chen Y, Bonning BC. 2015. RNA virus discovery in insects .Current Opinion in Insect Science 8:54–56.

Liu S, Vijayendran D, Bonning BC. 2011. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. Viruses 1849-1869.

Loebenstein G. 2008. "Plant virus diseases: economic aspects" in desk encyclopedia of plant and fungal virology, eds Regenmortel MHV, Mahy Brian WJ (Oxford: Academic Press), 426–430.

MacDiarmid R, Rodoni B, Melcher U, Ochoa-Corona M, Roossinck M. 2013. Biosecurity implications of new technology and discovery in plant research. PLoS Pathogenes. 9:e1003337.

Martelli GP. 2017. "An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause," in Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management, eds Meng B, Martelli GP, Golino DA, Fuchs M (Cham: Springer International Publishing), 31–46.

Mollov D, Maroon-Lango C, Kuniata L. 2016. Detection by next generation sequencing of a multi-segmented viral genome from sugarcane associated with Ramu stunt disease. Virus Genes 52: 152-155.

Ng TFF, Duffy S, Polston JE, Bixby E, Vallad GE, Breitbart M. 2011. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. PLoS ONE 6: e19050.

Ng TFF, Willner DL, Lim YW, Schmieder R, Chau B, Nilsson C, Anthony S, Ruan YJ, Rohwer F, Breitbart M. 2011. Broad surveys of DNA viral diversity obtained through viral metagenomics of mosquitoes. PLoS ONE 6: e20579.

Ng TFF, Chen LF, Zhou Y, Shapiro B, Stiller M, Heintzman PD, Varsani A, Kondov NO, Wong W, Dent X, Andrews TD, Moorman BJ, Meulendyk T, MacKay G, Gilbertson RL, Delwart E. 2014. Preservation of viral genomes in700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.111 (47): 16842–16847.

Opoku EB, Landgraf M, Pack K, Bandte M, Bargen SV, et al. 2018. Emerging plant viruses in urban green: detection of the virome in birch (*Betula sp.*). Journal of Horticultural 5: 233.

Prabha k, Baranwal VK, Jain RK. 2013. Applications of next generation high throughput sequencing technologies in characterization, discovery and molecular interaction of plant viruses. Indian Journal Virology 24(2):157–165

Postnikova OA, Nemchinov LG. 2012. Comparative analysis of microarray data in *arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. Virology Journal 9:101

Pumplin N, Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. Nature Reviews Microbiology 11:745–60.

Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. Journal of General Virology 93:1853–1868.

Rosario K, Capobianco H, Ng TF, Breitbart M, Polston JE. 2014. RNA viral metagenome of whiteflies leads to the discovery and characterization of a whitefly-transmitted carlavirus in North America. PLoS ONE 9: e86748.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

Rott M, Xiang Y, Boyes I, Belton M, Saeed H, Kesanakurti P, Hayes S, Lawrence T, Birch C, Bhagwat B, et al. 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. Plant Disease 101: 1489–1499.

Rumbou A, Candresse T, Marais A, Svanella-Dumas L, Landgraf M, Bargen S, Büttner C. 2020. Unravelling the virome in birch: RNA-Seq reveals a complex of known and novel viruses. PLoS One15(6): e0221834.

Rumbou A, Candresse T, Marais A, Theil S, Langer J, Jalkanen R, et al. 2018. A novel badnavirus discovered from Betula sp. affected by birch leaf-roll disease. PLoS ONE 13(3): e0193888.

Rosario K, Padilla-Rodriguez M, Kraberger S, Stainton D, Martin DP, Breitbart M, et al. 2013. Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Epiprocta) from Puerto Rico. Virus Research 171: 231–237.

Sun F, Fang P, Li J, Du L, Lan Y, Zhou T, Fan Y, Shen W, Zhou Y. 2016. RNA-seq-based digital gene expression analysis reveals modification of host defense responses by rice stripe virus during disease symptom development in Arabidopsis. Virology Journal 13:202.

Suttle CA .2007. Marine viruses–major players in the global ecosystem. Nature Reviews Microbiology 5 (10) :801–812.

Kasibhatla SM, Waman VP, Kale MK, Kulkarni-Kale U .2016. Analysis of next-generation sequencing data in virology - opportunities and challenges. Reviewed chapter.173-203.

Maliogka VI, Minafra A, Saldarelli P, Ruiz-García AB, Glasa M , Katis N, Olmos A. 2018. Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies. Viruses 10: 436.

Villamor DEV, Mekuria TA, Pillai SS, Eastwell KC. 2016. Highthroughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: insights to the etiology of stem-pitting disease. Phytopathology 106:519–527.

Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR, Tzanetakis IE. 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. Phytopathology109:716-725.

Westermann AJ, Forstner KU, Amman F, et al. 2016. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. Nature 529:496–501.

Wu Q, Ding SW, Zhang Y, Zhu S. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology- dependent and homology- independent algorithms. Annual Review of Phytopathology. 53:20.1–20.

Yang J, Zhang F, Li J, Chen JP, Zhang HM. 2016. Integrative analysis of the microRNAome and transcriptome illuminates the response of susceptible rice plants to rice stripe virus. PLoS ONE 11:e0146946.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]

Application of Next Generation Sequencing Technologies in Plant Virology

Fereshteh Esmaeilzadeh[1], Davoud Koolivand[2*]

1- Ph.D Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

koolivand@znu.ac.ir

Abstract

With progress in science, new technologies open a window to answer the questions. Besides biological, serological and molecular methods, Next-generation sequencing (NGS) is one of the methods that changed our understanding of plant viruses, especially in the areas of identification, genome and transcriptome sequencing, evolution, taxonomy and quarantine programs. Recent methods make it possible to detect and identify all known and unknown viruses in a plant without the need for prior knowledge of the pathogen by the identify of total viral content and transcriptome of plant samples in healthy and disease conditions whearse ther are problems such as storage and analysis and interpretation of a large amount of data produced. Increases in the speed of detection of new viruses, viroids and hosts can prevent entering new viruses and viroids from foreign countries. More accurate and faster identification of plant viruses and their full effects on different hosts is one of the most important steps in disease management. In this article, we will review the applications of NGS in the diagnosis and detection of viruses, identification of diseases of unknown etiology and the study of host-pathogen interactions.

Keywords: Discovery, Quarantine, Transcriptum, Virus.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.7.3]