مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

توالی‌یابی نسل جدید و برهمکنش‌های ذاتی ویروس-ویروس و ویروس-گیاه

سعیده دهقانپور فراشاه[۱]، مهرداد صالح‌زاده[۲*]، احمد اشرفی[۳]

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
۳- کارشناسی‌ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی ، دانشگاه آزاد واحد ملکان، ایران
mehrdadsalehzadeh@gmail.com

چکیده

برای درک اکولوژی ویروس‌ها، لازم است تا اطلاعات جامع در خصوص برهمکنش‌های ویروس-ویروس و ویروس-میزبان در سیستم‌های طبیعی به‌دست آید. در این مطالعه، مشخص شده است که فناوری توالی‌یابی آر.ان.ای (RNA-Seq)، امکان این تحلیل را بدون مفروضات قبلی در خصوص آلودگی‌ها و علائم ویروسی یا ژن‌های میزبان فراهم می‌کند. توالی‌یابی نسل جدید امکان شناسایی بالقوه‌ی آلودگی‌های چندگانه را تسهیل می‌کند. پاسخ‌های ضد ویروسی میزبان به واسطه خاموشی آر.ان.اِ، تحت شرایط طبیعی اتفاق می‌افتد. از آنجایی‌که تحقیقات درزمینه ویروس‌های گیاهی به‌طور عمده بر بیماری‌های گیاهان زراعی متمرکز بوده‌اند، اطلاعات کمی در خصوص این ویروس‌ها در محیط‌های طبیعی وجود دارد. توالی‌یابی آر.ان.اِ در گیاهان مربوط به یک جمعیت طبیعی برای تعیین هم‌زمان حضور و عدم حضور همه‌ی ویروس‌هایی که توالی آن‌ها گزارش شده است، شناسایی ویروس‌های جدید و سنجش کمّی ترانسکریپتوم میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرد. با معرفی معیارهای تعداد خوانش و پوشش ژنوم، آلودگی‌های ناشی از ویروس آشکار شده و برهمکنش‌های ذاتی و پنهان گیاه-ویروس می‌تواند کاربردهای مهمی در کنترل این عوامل بیماری‌زا داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اکولوژی، ترانسکریپتوم، خاموشی آر.ان.اِ، RNA-Seq.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

مقدمه

کاربرد فناوری‌های پیشرفته نتایج علمی درخشانی را در سال‌های اخیر به دنبال داشته است. میکروسکوپ الکترونی، PCR و امروزه توالی‌یابی نسل جدید (next generation sequencing: NGS) نمونه‌هایی از این فناوری‌های تحول‌آفرین هستند که نقش مهمی در شناخت ویروس‌ها به‌ویژه در زمینه توالی‌یابی ژنوم، تکامل، اکولوژی و بیان ژن بازی می‌کنند. به‌طور کلی داده‌های به‌دست آمده از توالی‌یابی، اطلاعات با ارزشی در زمینه‌های مختلف نظیر شناسایی ویروس بیماری‌زا و برهمکنش آن با میزبان ارائه می‌دهد. به‌دلیل اهمیت اقتصادی بیماری‌های ویروسی در گیاهان زراعی، بیشترین تحقیقات در زمینه ویروس‌های گیاهی، در مورد بیماری‌های ویروسی این دسته از محصولات کشاورزی انجام شده است (۱). اگرچه ویروس‌ها، نقش مهمی در اکوسیستم‌های طبیعی دارند، اطلاعات کمی از اکولوژی ویروس‌ها در محیط‌های طبیعی وجود دارد (۲). مطالعات اولیه در زمینه‌ی ویروس‌های گیاهان وحشی اغلب روی ویروس‌های بیماری‌زای مهم از نظر کشاورزی در جوامع گیاهی مجاور کشتزارها و مزارع گونه‌های زراعی متمرکز بوده‌اند. با در نظر گرفتن یافته‌های اخیر مبنی‌بر این که ویروس‌ها در گیاهان متنوع، شیوع غالبی دارند، اکولوژی ویروس، دیدگاه و چشم‌انداز جدیدی را در خصوص بیولوژی ویروس‌ها و برهمکنش‌های آن‌ها با میکروارگانیسم‌ها و موجودات اطراف ارائه می‌کند (۳). تحقیقات در زمینه‌ی اکولوژی ویروس‌ها، به‌طور معمول از یکی از دو رویکرد پیروی می‌کنند. این رویکردها شامل آشکارسازی و شناسایی فلور ویروس و دیگری برهمکنش بین جمعیت ویروس، ناقلین و گیاهان میزبان در زیستگاه‌های طبیعی است. فناوری توالی‌یابی آر.ان.ای (RNA-Seq) امکان غربالگری هم‌زمان انواع مختلف ویروس‌ها را در یک آزمایش می‌دهد، زیرا بیشتر ویروس‌های گیاهی، ویروس‌های آر.ان.ای‌دار هستند و ویروس‌های دی.ان.ای‌دار، mRNA خود را در طی چرخه‌ی تکثیر، رونویسی می‌کنند. استفاده از روش سرهمبندی "از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

نـــو" (de novo transcriptome assembly)، RNA-Seq را بـه یـک ابـزار قـــوی بـــرای شناســـایی ویروس‌هـــای شناخته‌شده و ویروس‌هـای جدیـد تبـدیل کـــرده اســـت (۴، ۵). در رویکـــرد دوم، برهمکنش‌های ویروس-میزبان و ویروس-ویـــروس بررســـی می‌شـــود (۶). ایـــن برهمکنش‌ها، دیدگاه و چشم‌انداز جدیدی را در خصـــوص بیولـــوژی ویروس‌هـــا و برهمکنش‌هـــای آن‌هـــا بـــا ارگانیســـم‌ها و موجودات اطـراف ارائـه مـی‌کنـد (۷). در اکوسیستم‌های طبیعی، آلودگی بدون علائم متـداول اسـت و بیمـاری‌زایی ویـروس می‌تواند تحت شرایط محیط اطراف، تغییر کند (۸). ادامه یک آلـودگی ویروسـی کـه علائم شدیدی تولید می‌کند، بـه‌طور کلـی با ویروس‌ها یا گیاهان سازگاری نـدارد و در شرایط خاص، ویروس‌ها ممکن اسـت اثرات سودمند کوتاه‌مدتی به نفع خـود بـر روی میزبان خود داشته باشند (۶).

در مطالعـــه‌ی برهمکنش‌هـــای میزبـــان-بیماری‌زا، RNA-Seq فرصـت‌های جدیـد را بـــرای تجزیـــه و تحلیـــل هـــم‌زمـــان ترانسکریپتوم‌های میزبان و بیمـاری‌زا کـه موسوم به RNA-Seq دوگانه است، فراهم می‌کند (۹، ۱۰). کاربرد RNA-Seq دوگانه در سیسـتم قـارچ عامـل بلاسـت و بـرنج، منجر به شناسایی تنظیم افزایشـی ژن‌هـای قارچ مرتبط با آلـودگی و ژن‌هـای میزبـان مـرتبط بـا دفـاع شـد. اگرچـه RNA-Seq دوگانه، ترانسـکریپتوم‌هـای دوگانـه را در سیستم‌های بیماری‌زای قارچی-باکتریـایی شناسایی کـرد، بـا این‌حـال ایـن روش را می‌توان برای آشکارسازی هـم‌زمـان تنـوع ویروس و ترانسکریپتوم میزبان در سیستم میزبان-ویروس اسـتفاده کـرد. RNA-Seq دوگانه، امکان جمع‌آوری کارآمد اطلاعات کلیدی نظیـر تـوالی‌هـای کـل ژنـوم همـه ویروس‌های آلوده‌کننده، ترکیب گونـه‌های ویـــروس در آلودگی‌هـــای چندگانـــه و پاسخ‌های ترانسکریپتوم گیاهان میزبـان را می‌دهد (۱۱).

خاموش‌سازی آر.ان.اِ، در برهمکنش گیـاه میزبـان-ویـروس، یـک مکانیسـم اصـلی دفاعی میزبان در برابر ویروس‌ها است که در آن آنـزیم دایسـر (Dicer) یـا یـک کمپلکس خاموش‌کننده‌ی القاشـده توسـط آر.ان.اِ (RNA induced silencing

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

(RISC :complex، ژنوم ویروس را تشخیص و تجزیه می‌کند (۱۲). در مقابل ویروس‌ها، مکانیسم‌های ضد دفاعی را توسعه داده‌اند که شامل ژن‌های مهارکننده در برابر این مکانیسم دفاعی میزبان است (۱۳). این سیستم ضد دفاعی موجب تسهیل همانندسازی ویروس‌های ایجادکننده آلودگی هم‌زمان با آلودگی‌های چندگانه می‌شود. برای مطالعه این سیستم در زیستگاه‌های طبیعی، تشخیص ویروس‌ها به‌طور جامع در میزبان‌های دارای علائم و بدون علائم و تجزیه و تحلیل برهمکنش بین دفاع میزبان و سیستم ضد دفاعی ویروس در محل آلودگی موضعی ویروس در میزبان لازم است (۱۴).

پلتفرم‌های مورد استفاده

روش توالی‌یابی نسل جدید شامل مجموعه‌ای از روش‌هایی با توانایی بالا یا پربرونداد (high-throughput) برای توالی‌یابی دی.ان.اِ است که از سال ۲۰۰۵ به‌صورت تجاری عرضه شد، هرچند که ظهور برخی از این روش‌ها مربوط به دهه‌ی ۱۹۹۰ است. این فناوری شامل پلتفرم‌های مختلفی است که از لحاظ ویژگی‌های مهندسی و توالی‌یابی شیمیایی با هم تفاوت دارند. فناوری جدید توالی‌یابی تاثیر بزرگی در مطالعات پزشکی به‌ویژه تشخیص، اپیدمیولوژی و کنترل آلودگی داشته است. چنین فرصت‌های مشابهی در مورد بیماری‌شناسی گیاهی نیز وجود دارد. از جمله پلتفرم‌های موجود می‌توان SOLiD sequencing، sequencing 454، helicos ،illumina sequencing nanopore ،sequencing و ion torrent را نام برد (۱۵).

pyrosequencing 454

در پلتفرم sequencing 454 ابتدا دی.ان.اِ به قطعات کوچک شکسته می‌شود. این قطعات دارای انتهای صاف هستند. آداپتورهای A و B به انتهای قطعات متصل شده و دی.ان.ای تک‌رشته ساخته می‌شود. آداپتور B با بیوتین نشانه‌گذاری شده است و به گویچه‌هایی با پوشش استرپتاویدین متصل می‌شود. نسبت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

گویچه‌ها با مولکول‌های دی.ان.اِ کنترل شده است به‌طوری‌که به هرگویچه یک رشته دی.ان.اِ متصل می‌شود. روغن به دانه‌ها اضافه شده و امولسیون آب و روغن به‌وجود می‌آید. چرخه‌ی دمایی و آداپتورها در امولسیون PCR باعث تکثیر مولکول‌های تک‌رشته می‌شود و در نهایت هر گویچه دارای میلیون‌ها کپی همسان از دی.ان.ای اصلی خواهد بود. پس از تکثیر، گویچه‌ها در صفحه "picotiter" قرار داده می‌شوند. این صفحه به گونه‌ای طراحی شده است که در درون هر چاهک فقط یک گویچه جای می‌گیرد. بعد از آن توالی‌یابی با آنزیم‌های pyrosequencing که قبلا به چاهک اضافه شده بود انجام می‌گیرد. همزمان با اضافه شدن نوکلئوتید جدید به رشته‌ی در حال تکثیر یک مولکول پیروفسفات آزاد می‌شود. در pyrosequencing طی فرآیندی آنزیمی این مولکول پیروفسفات برای ساخت ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد. ATP تولیدشده به‌عنوان سوخت جهت تولید نور به کار می‌رود و در نهایت نور منتشرشده توسط یک دستگاه ثبت می‌شود (۱۶-۱۹).

SOLiD sequencing

در SOLiD sequencing همانند روش قبل، دی.ان.ای قطعه قطعه، سپس این قطعات به گویچه‌ها متصل می‌شوند. امولسیون PCR تشکیل و پس از تکثیر، گویچه‌ها بر روی یک اسلاید شیشه‌ای قرار می‌گیرند. در این روش برخلاف روش‌های دیگر توالی‌یابی مستقل از پلیمراز است و از هیبریداسیون و لیگاسیون با برچسب‌های فلورسنت برای توالی‌یابی استفاده می‌شود. جمعاً ۱۶ کاوشگر متفاوت وجود دارد که با ۴ رنگ مختلف نشاندار شده‌اند. به عبارت دیگر هر رنگ به ۴ پروب متصل است. ردیابی با خصوصیت فلورسنتی مشخص می‌کند که کدام کاوشگر متصل شده است. در اولین دور از واکنش لیگاسیون اطلاعات مربوط به توالی موقعیت‌های ۱ و ۲، ۶ و ۷، ۱۲ و ۱۳ بدست می‌آید. سپس این فرآیند با آغازگری شروع می‌شود که در بالادست دارای یک نوکلئوتید بیشتر نسبت به حالت قبل است. این ویژگی آغازگر، شناسایی موقعیت‌های ۲و۳، ۷و۸، ۱۲و۱۳ را فراهم می‌کند و همین روند با جابجایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

آغـازگر در موقعیت‌هـای ۲،۳ و۴ تکـرار می‌شود. واکنش‌ها مربـوط بـه هرکـدام از ایـن ۵ آغـازگر بـه‌طور مسـتقل صـورت می‌گیرد. در پایان نتایج هرکدام از مراحـل توسط نرم‌افزار گـردآوری و نتیجـه‌گیـری می‌شود (۱۶-۱۹).

illumina

اساس این پلـت‌فرم اسـتفاده از فنـاوری cyclic reversible termination (CRT) است. چرخه CRT شامل سه مرحله الحاق (incorporation)، تصـــــــــویربرداری فلورســـنس و بـــرش گـــروه محـــافظ (deprotection) است. پس از قطعه‌قطعـه شـــدن دی.ان.اِ، لیگاســـیون آداپتورهـــا و خالص‌سازی با ژل، ترادف‌هـای تک‌رشـته به صفحه‌های شیشه‌ای آغشته به الیگوهای مکمل می‌چسبند. این الیگوهـا قالـب‌هـای دی.ان.اِ را بـــه دام انداختـــه و بـــه‌عنوان آغازگر جهت تکثیر در مراحل بعـد بکـار می‌روند. تکثیر طـی فرآینـد مشخصـی بـر روی اســـلاید صـــورت می‌گیـــرد کـــه bridge amplification نامیـده می‌شـود. مولکول‌هـــای تک‌رشـــته در ۲ انتهـــا بـــه آغازگرها متصل و چرخه‌های متوالی PCR باعث تولید جزایر کوچک یا خوشـه‌هـایی از مولکول‌هـــای تکثیرشـــده می‌شـــود بـــه گونـــه‌ای کـــه هـــر بـــاز بـــه‌طور موقـــت خاتمه‌دهنده واکنش است همزمان بـا ایـن عمل از یک تصویر با قابلیت تفکیک بـالا برای تعیین نوکلئوتید متصل شـده در هـر خوشـه دی.ان.اِ اسـتفاده می‌شـود. بعـد از تصـویربرداری، خاتمـه‌دهنـده بـه‌صـورت شیمیایی برگشت می‌خـورد و ایـن امکـان فراهم می‌شود که مولکول قالـب گسـترش یابد. به این ترتیـب فرآینـد توالی‌یـابی در اکثر مولکول‌ها به نتیجه می‌رسد (۱۶-۱۹).

helicos sequencing

توالی‌یابی تک مولکولی اولین‌بـار توسـط شـــرکت Helicos BioSciences عرضـــه شـــد. مشـــابه روش ایلومینـــا، helicos sequencing دارای قطعـــات قالـــب و لیگاسـیون آداپتـور اسـت. در ایـن روش آداپتور پلی‌آدنین بـه انتهـای '۳ دی.ان.ای تک‌رشته قالب اضافه می‌شـود و در ادامـه توالی‌یـابی بـا اسـتفاده از فنـاوری CRT، dATP نشـاندار خاتمه‌دهنـده بـا قابلیـت برگشت‌پذیری متصل می‌شـود. یـک لیـزر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

حساس باند قالب را پیش از برش برچسب فلورسنت ردیابی می‌کند. بر این اساس همزمان با تکثیر رشته بوسیله پلیمراز، کار تشخیص با تصویربرداری انجام می‌شود. این پلتفرم برای توالی‌یابی مستقیم آر.ان.اِ بدون نیاز به تهیه cDNA استفاده می‌شود (۱۸، ۱۹).

PacBio sequencing

برخلاف سایر روش‌ها، در این روش دی.ان.اِ پلیمراز در کف میکروسل قرار دارد. قطعات dsDNA لیگازشده با آدپتورهای سنجاق‌سری، دی.ان.ای حلقوی را تشکیل می‌دهند. برای تکثیر از آغازگری استفاده می‌شود که توالی مکمل آن بر روی ساختار سنجاق‌سری قرار دارد. این دی.ان.ای حلقوی به تک مولکول پلیمراز متصل شده و توالی در کف چاهک تکثیر می‌شود. نوکلئوتیدهای نشاندارشده با برچسب فلورسنت با تصویربرداری شناخته می‌شوند. تفاوت این روش اتصال برچسب فلورسنت به قسمت فسفاته نوکلئوتید است. در این حالت همزمان با جاگذاری نوکلئوتید برچسب فلورسنت برش می‌خورد. توالی‌یابی در پلتفرم PacBio sequencing به‌صورت Real time صورت می‌گیرد (۱۸، ۱۹).

ion torrent

مانند سایر روش‌ها، در مرحله اول ion torrent آداپتورها از طریق لیگاسیون یا PCR به قطعات مورد نظر متصل می‌شوند. نقش این آداپتورها اتصال قطعات قالب به ذرات جامد است و کار تکثیر در امولسیون PCR انجام می‌پذیرد. پس از آن هر گویچه در یک چاهک قرار می‌گیرد. در زیر این چاهک‌ها یک نیمه‌هادی حساس به یون قرار گرفته است. همزمان با فعالیت پلیمراز یک یون هیدروژن به‌عنوان بخشی از ماهیت شیمیایی اتصال نوکلئوتید آزاد می‌شود. این یون به‌وسیله حسگر نیمه‌هادی که مکانیزم آن بر پایه تغییر اندک در pH است ثبت می‌شود و در نهایت تعداد یون‌ها و تراکم آنها توالی قطعات دی.ان.اِ را مشخص می‌کند. عملکرد تشخیصی ion torrent به‌صورت مستقیم و بدون نیاز به هیچگونه دوربین یا نوری انجام می‌گیرد. بنابراین این روش، ارزان، دقیق و سریع است (۱۸، ۱۹).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

انتخاب پلتفرم

انتخاب پلتفرم مناسب به خصوصیات آزمایش و فاکتورهای مهمی مانند اندازه ژنوم مورد نظر، پیچیدگی، هزینه، همچنین دقت و عمق پوشش مورد نیاز بستگی دارد. توجه به آنالیز حجم زیاد داده در پلتفرم‌های مختلف برای به حداکثر رساندن ارزش علمی آن مهم است. پلتفرم‌های با طول خوانش بلند به‌دلیل سهولت در آنالیز داده‌های بدست آمده، برای مطالعه ژنوم‌های پیچیده مناسب هستند. چنانچه زمان مهم باشد، پلتفرم‌های کوچکتر انعطاف‌پذیری بیشتری دارند. sequencing 454 هرچند که گران است ولی به‌دلیل وجود قطعات بلند، برای توالی‌یابی ژنوم‌های بزرگ و ناشناخته مناسب است. پلتفرم‌های دیگر مثل helicos جهت توالی‌یابی مستقیم آر.ان.اِ و PacBio برای توالی‌یابی قطعات خیلی بلند قابل استفاده هستند. ممکن است بسته به نوع آزمایش دقت و صحت کار مهم باشد که در این صورت پلتفرم‌های single-molecule sequencers کارایی بهتری دارند (۱۸، ۱۹).

از لحاظ هزینه و دقت کار illumina و SOLiD برای RNA-Seq و پروژه‌هایی که به عمق پوشش بالا نیاز دارند، مناسب هستند. هرچند که کاربرد این دو روش در متاژنومیکس چندان مناسب نیست. ولی نسبت به سیستم Roche1 GS FLX برای مطالعاتی شبیه ChIP-Seq و RNA-Seq کارایی بالاتری دارند. دلیل آن توانایی تولید چند صد میلیون قطعه کوتاه در این دو پلتفرم نسبت به چند صد هزار تا یک میلیون قطعه بلندتر تولیدی در پلتفرم Roche1 GS FLX است. در برنامه‌های کاربردی مثل RNA-Seq تعداد قطعات خوانده‌شده بسیار مهمتر از طول رشته است (۲۰).

بیوانفورماتیک

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده از مرحله اول NGS نیازمند به روش‌های آماری و ابزارهای بیوانفورماتیک است. در واقع یکی از تنگناهای اساسی پیشرفت NGS آنالیز بیوانفورماتیک است. برای تجزیه و تحلیل و تفسیر اطلاعات به‌دست آمده از NGS، روش‌های آماری و ابزارهای بیوانفورماتیک مختلفی طراحی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

شده است. آنالیز WGS (whole genome sequencing) و WES (whole exome sequencing) شامل، خواندن توالی (mapping)، تشخیص واریانت‌ها (جهش نقطه‌ای،indels کوچک) (base-calling and/or polymorphism detect)، تنوع تعداد کپی (alignment of sequence reads to a reference)، تغییرات ساختاری (de novo assembly) و پیش‌بینی اثرات آن بر روی بیان ژن (genomic viewers) است. نتیجه مرحله اول NGS داده‌های خام است که باید رمزگشایی شود تا توالی نوکلئوتیدی دی.ان.اِ تعیین شود که به این فرآیند base calling می‌گویند و بستگی به پلتفرم مورد استفاده دارد. هر base call نشان‌دهنده یک نوکلئوتید و درجه کیفیت مربوط به آن نوکلئوتید است. خوانش‌های حاصل از NGS به فرمت FASTQ است. FASTQC نرم‌افزارهای base calling مورد استفاده در NGS برای سنجش کیفیت خوانش‌های خام (raw reads) است که سه فرمت از آن وجود دارد و معادلات محاسبه درجه کیفیت در آن‌ها متفاوت است. برای هر پلتفرمی نرم‌افزارهای مخصوصی طراحی شده است، بنابراین هر بسته نرم‌افزاری فقط تعداد محدودی فایل ورودی را قبول می کند که در قدم اول باید فایل‌های اولیه را به فرمتی که برای فرآیندهای بعدی لازم است تبدیل کند. برخی از ابزارها بر اساس کیفیت هم‌ترازی عمل می‌کنند، به‌طوری‌که احتمال نادرست بودن نوکلئوتیدهای خاص را در هر موقعیت محاسبه می‌کنند و متعاقب آن احتمال وجود تنوع را تشخیص می‌دهند. تفسیر صحیح از تنوع پیدا شده در درک نقش آنها ضروری است (۱۷).

الگوریتم‌های ترازبندی باید امکان بررسی قطعات کوتاه بدست آمده از این فناوری را فراهم آورد. براین اساس الگوریتم‌های پرکاربردی چون BLAST، BLAT یا CLUSTALW بهترین گزینه نیستند. تعداد زیادی الگوریتم جدید با اقتباس از الگوریتم‌های قبلی برای مدیریت قطعات کوتاه طراحی شده‌اند. در مطالعه‌ی توالی‌ها با استفاده از SSAHA2، BWA، SOAP2، Maq و SHRIMP،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

ژنـومهـا بـا ژنـوم مرجـع مطابقـت داده می‌شود. این روش در کارایی، حساسیت و خواندن دقیق توالی‌ها با طول‌های متفاوت و همچنین در تعیین خوانش‌های زمینـه‌ای بسیار مفید هستند. روش‌های فـوق، بسـته به اینکه از چه روش آماری و با چه عمـق خوانشی برخوردارند، از یکـدیگر متمـایز هستند و برای تشخیص جهـش‌هـا کـه بـر اسـاس تعیـین تـوالی ژنـوم گیـاه بیمـار و نرمال و مقایسه آن با ژنـوم مرجـع اسـت، انجام می‌گیرد. برای این امر، نمونـه گیـاه سالم و آلوده با روش‌های استاندارد تعیین توالی شده و سپس تنها واریانـت‌هـایی را که در نمونه آلوده یافت می‌شوند، انتخاب می‌کنند. پس از مطابقت دادن توالی‌هـا بـا ژنـوم مرجـع بـا اسـتفاده از GATK، SAMtools و SOAPsnp می‌توان تغییرات در اندازه‌ی یک نوکلئوتید را شناسایی کرد (۲۱). بسیاری از الگوریتم‌ها نیز بـا هـدف توالی‌یـابی de novo نظیـر AbySS، ALLPATHS، Edena، SOAPdenovo و Velvet توسـعه پیـدا کـرده‌انـد (۱۷، ۱۹). همچنین می‌توان از سایر روش‌های دیگـر از قبیـل Varscan2، Somaticsniper و JointSNVMix اسـتفاده کـرد (۲۲). از ابزارهـای بیوانفورماتیـک همچـون SIFT، PolyPhe، CHASM و ANOVAR بـرای بررسی تأثیر جهش‌های شناسایی شـده در عملکرد ژن و همچنـین تمـایز بـین انـواع جهش‌ها اسـتفاده مـی‌شـود. بـرای WGS، انواع مختلف تغییرات ساختاری را می‌توان با استفاده از BreakDancer و SVDetect کشف کـرد. در مـورد آر.ان.اِ، آنـالیز داده های RNA-Seq مشتمل بـر تعیـین تـوالی خوانـده‌شـده، کمیّـت بیـان ژن، انـواع ژن/ایزوفرم‌های بیان‌شده و به‌طور معمـول فـرم‌هـای غالـب و یـافتن رونوشـت‌های جدید است (۲۳).

برای توالی‌یـابی آر.ان.اِ جهـت مطالعـات ترانسـکریپتوم، خاموش‌سـازی آر.ان.ای و small RNAs عـلاوه‌بـر مـوارد ذکرشـده جنبـه‌هـای دیگـری نیـز در نظـر گرفتـه می‌شـوند. بنـابراین بـرخلاف روش‌هـای دیگر نه تنهـا نقشـه قطعـات ژنـوم، بلکـه کمیت قطعات نیز مهم است. بر این اساس الگوریتم‌هـای خاصـی بـه‌منظـور محاسـبه تعـداد قطعـات طراحـی شـده‌اند (۲۰). از آنجایی‌که NGS یک فناوری جدید بوده و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

به‌سرعت پیشرفت کرده است هیچ نرم‌افزاری که از شروع تا پایان برای کار با داده‌های NGS مناسب باشد، وجود ندارد. فهرست کاملی از الگوریتم‌ها و برنامه‌ها به‌صورت آنلاین قابل دسترسی هستند (۱۷).

شناسایی ویروس‌ها و ویروئیدها با استفاده از روش تعیین توالی نسل جدید

همراه با تعیین توالی نسل جدید، پیشرفت‌های زیادی در شناسایی ویروس‌ها و ویروئیدهای گیاهی در چند سال اخیر بدست آمده است. شناسایی ویروس‌ها با استفاده از NGS بیشتر در مورد ویروس‌های جانوری و انسانی انجام گرفته است ولی از سال ۲۰۰۹ میلادی حدود ۶۰ مطالعه نیز در مورد شناسایی ویروس‌ها و ویروئیدهای گیاهی صورت گرفته است (۱۸، ۲۴). روش‌های شناسایی ویروس‌ها با استفاده از فناوری NGS را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: ابتدا روش‌هایی که از آر ان ای کل گیاه میزبان آلوده به ویروس یا ویروئید استفاده می‌شود. گروه دوم شامل روش‌های است که از غنی‌سازی (enrichment) استفاده می‌کنند و به‌عبارتی، بدون حضور ژنوم گیاه است. شش ویروس گیاهی جدید به روش استفاده مستقیم از آر ان ای کل گیاه آلوده شناسایی شده است (۲۵).

غنی‌سازی با استفاده از Poly-A RNAs به روش NGS منجربه شناسایی هفت ویروس جدید با ژنوم آر ان ا و دو ویروس با ژنوم دی ان ا از *بادناویروس*‌ها (*Badnaviruses*) شده است (۲۴). تعیین توالی کل آر.ان.ای‌های دو رشته (dsRNA) سبب افزایش قطعات نوکلئوتیدی اختصاصی ویروس‌ها و ویروئیدها می‌شود. در یک مطالعه که دو روش استفاده از آر ان ای کل گیاه آلوده و روش غنی‌سازی dsRNA را برای شناسایی ویروس با هم مقایسه کرده بود، مشخص شد که در روش غنی‌سازی dsRNA از ۲ تا ۵۳ درصد بیشتر از روش آر ان ای کل قطعات ویروسی تشخیص داده می‌شود (۲۰، ۲۶، ۲۷). روش غنی سازی پیکره‌های ویروسی به‌وسیله فیلتر کردن و اولتراسانتریفیوژها نیز یکی از روش‌های پرکاربرد بخصوص برای کشف ویروس‌ها در اقیانوس‌ها است. در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

چندین مطالعه بر روی ویروس‌های گیاهی و جانوری از این روش‌ها استفاده کرده‌اند (۴). یکی دیگر از روش‌های غنی‌سازی که در ویروس‌های دی.ان.ای‌دار مثل *جمینی‌ویروس‌ها* مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از تکنیک تکثیر به روش rolling-circle است. با این روش ابتدا dsDNA حلقوی را که شامل ژنوم ویروس است تکثیر و سپس برای تعیین توالی به توالی‌یابی عمیق (deep sequencing) ارسال می‌شود (۲۴، ۲۵، ۲۹-۳۳).

کاربرد RNA-Seq در ویروس‌شناسی گیاهی

تکنیک NGS مثل RNA-Seq شرکت ایلومینیا (illumine Inc.) شرایط جدید و مناسبی را برای مطالعه رونوشت‌های (transcripts) موجودات زنده فراهم کرده است. در مطالعات RNA-Seq می‌توان با حساسیت بالاتر بیان ژن‌ها را مورد مطالعه قرار داد. تفاوت RNA-Seq با هیبریداسیون ریزآرایه (microarray) این است که در RNA-Seq هیچ نیازی به داشتن اطلاعات در مورد ژن‌های مورد مطالعه نیست و به‌راحتی می‌توان با گیاهان غیر مدل هم کار کرد. مطالعات RNA-Seq زیادی روی گیاهانی مثل *آرابیدوپسیس*، گوجه‌فرنگی و برنج صورت گرفته و بعضی از ژن‌های مرتبط با علائم بیماری مشخص شده است (۸). علاوه‌بر این، تجزیه و تحلیل RNA-Seq نشان می‌دهد که در گیاهان برنج آلوده به ویروس نوارک برنج (rice stripe virus, RSV)، کاهش تنظیم ژن‌های کلروپلاست با توسعه علائم بیماری همراه است و مسیرهای دفاعی میزبان به‌طور انتخابی توسط RSV در هر دو رقم حساس و مقاوم برنج سرکوب می‌شوند (۲۰، ۳۴، ۳۵).

تجزیه و تحلیل توالی‌یابی عمیق آر.ان.ای کوچک ویروس نشان داد که آلودگی RSV باعث تجمع siRNAهای جدید می‌شود و بیان یک خانواده miRNA محافظت‌شده را به‌طور انتخابی اصلاح می‌کند (۳۴، ۳۶). با اینحال، دانش مربوط به پاسخ گیاهان *آرابیدوپسیس* به آلودگی RSV محدود است و برای تعیین شباهت‌ها یا تفاوت‌ها در تعاملات میزبان و ویروس بین میزبانان آلوده به RSV به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

تحقیقات بیشتر نیاز است. تعیین توالی نسل جدید، همراه با بیوانفورماتیک برای کشف جدید و مونتاژ ویروس‌های گیاهی یا ژنوم ویروسی، از سال ۲۰۰۹ برای اولین‌بار در کشف ویروس‌های جدید دی.ان.اِ و آر.ان.اِ مورد استفاده قرار گرفته است. شناسایی ویروس‌های آر.ان.ای‌دار و همچنین تعیین توالی آر.ان.ای‌های کوچک مشتق‌شده از ویروس (vd-sRNA) برای مطالعه نقش خاموش‌شدن آر.ان.اِ در فعل و انفعالات گیاهان آلوده‌شده به ویروس به‌ویژه در ویروس‌های تکثیرشونده در هسته‌ی میزبان بررسی شده‌اند (۲۶، ۳۷، ۳۸).

ناوارو و همکاران (۲۰۰۹) پیدایش و بیماری‌زایی احتمالی vd-sRNAها از ویروس‌هایی که همانندسازی آنها در کلروپلاست انجام می‌شود و نقش vd-sRNAهایی که بیماری‌زایی ویروسی را پشتیبانی می‌کنند، را بررسی کردند (۳۹). تحقیقات متعددی در زمینه توالی‌یابی نسل جدید vsRNAها یا vd-sRNAها در زمینه‌ی خصوصیات، مشخصات، توزیع، تجمع، زیست‌شناسی و همچنین استفاده از آنها در گسترش دامنه میزبانی، تمایز سویه ویروس، حرکت سیستمیک، تعامل ویروس با میزبان، تکامل ویروس و بیماری‌زایی، جهش، هدف قرار دادن mRNA میزبان و موارد دیگر مطالعه انجام شده است (۴، ۳۹-۴۳).

استفاده از روش‌هایی نظیر ریزآرایه و فناوری RNA-Seq، درک اساس مولکولی برهمکنش‌های گیاه میزبان-بیماری‌زا را فراهم می‌کند. با بهره‌گیری از این فناوری‌ها، مطالعات زیادی در مورد تجزیه و تحلیل برگ درزمان آلودگی ویروئیدی گیاهان مختلف میزبان (۴۴، ۴۵) از جمله، ویروس اگزوکورتیس مرکبات (citrus exocortis viroid: CEVd) (۴۲، ۴۶)، ویروئید مرکبات (CVd-III) (۴۷)، ویروئید موزاییک نهان هلو (peach latent mosaic viroid: PLMVd) (۴۸) ویروئید کوتولگی رازک (hop stunt viroid: HSVd) (۴۹، ۵۰)، ویروئید کوتولگی گل داودی (CSVd) (۵۱)، ویروئید ترک خوردن پوست مرکبات (citrus bark cracking viroid:

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

(CBCVd) (۵۲-۵۴) و تغییرات بیان ژن در غده‌های آلوده به PSTVd وجود دارد. به‌طور کلی، این داده‌ها تغییرات ترانسکریپتومی کل را نشان می‌دهد که توسط آلودگی ویروئیدی ایجاد می‌شود. بیان بسیاری از ژن‌های مربوط به فتوسنتز، ساختار دیواره سلولی، متابولیسم و پیام‌رسانی هورمون‌ها، تنظیم آر.ان.اِ، تغییر پروتئین و متابولیسم و پاسخ‌های دفاعی و تنش، در آلودگی با ویروئیدها، تغییر می‌یابد (۵۵).

small RNA-Seq

تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌توانند بر رشد و تولید گیاه تاثیر بگذارند و از اینرو، سبب تغییر در بیان ژن‌های گیاه شوند. بیان ژن‌ها خود تحت کنترل عوامل تنظیمی مختلفی مثل میکروآر.ان.ای‌ها و فاکتورهای رونویسی است. میکروآر.ان.ای‌ها نقش بسیار مهمی در تنظیم و پاسخ به تنش‌های مختلف از طریق برهمکنش با ژن‌های مختلف ایفا می‌کنند. بنابراین مطالعات آر.ان.ای‌های کوچک به‌خصوص miRNA در گیاهان میزبان در برهمکنش با ویروس‌های گیاهی می‌تواند اطلاعات جامعی را در مورد تعداد میکروآر.ان.ای‌های درگیر یا حتی جدیدی که تا به‌حال شناخته نشده‌اند آشکار کند. همچنین با بررسی مسیرهای خاموشی می‌توان پروتئین‌های درگیر با هر یک از میکروآر.ان.ای‌های مورد نظر و مسیر مورد مطالعه را مشخص کرد (۳۵، ۵۶، ۵۷).

بررسی شبکه‌های ژنی گیاهان میزبان در برهمکنش با ویروس

مطالعه شبکه‌های ژنی مرتبط با رونوشت‌ها و آنتولوژی ژن (gene ontology) در پاسخ به ویروس‌ها می‌تواند اطلاعات زیادی را برای ما فراهم کند. با بررسی شبکه‌های ژنی می‌توانیم شبکه‌های مهم درگیر در مقاومت و بیماری‌زایی را مشخص و ژن‌ها یا پروتئین‌های درگیر در این مسیرها را شناسایی کنیم. در سال‌های اخیر با پیشرفت نرم‌افزارها و پایگاه‌های داده‌ها می‌توان برهمکنش بین شبکه‌های ژنی درگیر در بیماری‌زایی را نیز بررسی کرد (۵۶).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

مطالعه تکامل و تنوع ژنتیکی با کمک فناوری NGS

فناوری NGS این امکان را به محققین می‌دهد که افراد مورد آزمایش خود را از نظر تنوع در رونوشت‌ها و ژنوم کامل مورد بررسی قرار دهند. در ویروس‌شناسی گیاهی می‌توان تنوع ژنتیکی در جمعیت ویروس‌ها را به‌طور همزمان و در یک نمونه مورد مطالعه قرار داد. این نوع مطالعات می‌تواند درک بهتری از تئوری شبه‌گونه‌ها (quasispecies theory) و روند تغییر در نوکلئوتیدهای مهم در شرایط مختلف را نشان دهد. همچنین با بررسی رونوشت‌های ژن‌های سازگار میزبان نسبت به شرایط مورد مطالعه، شناسایی و درک بهتری از فرآیند تکاملی آنها به‌دست می‌آید (۱۵، ۱۷، ۳۶، ۵۸، ۵۹).

چالش‌ها

قبل از اینکه فناوری NGS به یک ابزار معمول در شناسایی ویروس‌های گیاهی تبدیل شود، برخی چالش‌های مرتبط با ویروس‌شناسی گیاهی باید مورد بررسی قرار گیرد. این موارد شامل بهبود روش‌های آماده‌سازی نمونه‌ها، طراحی الگوریتم‌های بیوانفورماتیک با قابلیت تفکیک توالی بیماری‌زا از میزبان و بررسی رابطه علت و معلولی بیماری است. در بیماری‌های گیاهی برخلاف اندام‌های انسان، نمونه‌های گیاهی شامل ترکیبی از عوامل بیماری‌زا است. بنابراین نمی‌توان به‌تنهایی با توالی‌یابی نشان داد که کدام یک از این ترادف‌های شناسایی‌شده مسئول بیماری است (۵۹).

نتیجه‌گیری

فناوری NGS این امکان را فراهم کرده است که جمعیت ویروس‌ها و ویروئیدها، در یک نمونه به‌طور همزمان مورد مطالعه قرار گیرد و حتی امکان مطالعه آلودگی‌های مخلوط به چند ویروس و ویروئید نیز وجود دارد. با کمک این فناوری می‌توان اطلاعات زیادی شامل بیان رونوشت‌ها، میکروآر.ان.ای‌ها، آر.ان.ای‌های غیر رمزشونده و شبکه‌های ژنی درگیر را در برهمکنش میزبان-ویروس به‌دست آورد. داده‌های RNA-Seq مربوط به گیاهان آلوده،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

اطلاعات قابل توجهی را در سیستم گیاه-ویروس، ژنوم ویروس و ترانسکریپتوم میزبان نشان می‌دهد. بنابراین، RNA-Seq، شیوه‌ای مفید برای آشکارسازی مولکولی برهمکنش‌های میزبان-ویروس است. در مطالعات قبلی که از تحلیل‌های RNA-Seq دوگانه در بیماری‌زاهای قارچی و باکتریایی استفاده کرده‌اند، تحلیل بیان به‌طور مجزا برای میزبان و بیماری‌زا انجام شده است. در سیستم‌های میزبان-ویروس، تعداد قطعات مشتق شده از ویروس، فرآیندهای تکثیر را نشان می دهد که به‌طور بالقوه موجب افزایش توالی های ویروسی می‌شود. در واقع، بررسی نشان داده است که قطعات ویروس به سطح حداکثر معادل با mRNA کل میزبان رسیده‌اند، حتی زمانی که میزبان هیچ گونه علائم آشکار نشان نداده است. چون تعداد کل قطعات خوانش به‌شدت بستگی به قطعات ویروس دارد، خوانش‌ها در میلیون (read per million: RPM) از هر دو ژن میزبان و ژنوم ویروس در برابر خوانش‌های کل استخراج‌شده از ژن‌های میزبان (mRNA) به‌جای خوانش‌های کل شامل خوانش ویروس محاسبه گردیده است (۱۰).

تغییرات در ترانسکریپتوم ناشی از آلودگی در شرایط طبیعی ممکن است آشکار نباشد در حالی‌که آلودگی‌های ویروسی در آزمایشگاه موجب تغییرات اساسی در ترانسکریپتوم‌های میزبان شده است (۶۰، ۶۱). برخی از عوامل نظیر آب و هوا، ژنوتیپ میزبان و میکروکلیما بر ترانسکریپتوم گیاه اثر دارند. این اختلال (noise) مانع از تشخیص آماری تغییرات ترانسکریپتوم توسط ویروس‌ها می‌شود. چون RNA-Seq، فرصت‌هایی را برای مطالعه‌ی برهمکنش گیاه-ویروس در زیستگاه‌های طبیعی متنوع فراهم می‌کند، برای استخراج اثر آلودگی ویروسی روی میزبان از داده‌های ترانسکریپتوم نویزدار، تحلیل آماری پیشرفته لازم است. شناسایی برهمکنش‌های پنهان گیاه-ویروس در محیط‌های طبیعی مهم است زیرا نه تنها درک اکولوژی برهمکنش بیولوژیک افزایش می‌دهد، بلکه موجب بهبود مدیریت کشاورزی با آشکارسازی رابطه‌ی بیماری‌زا-میزبان می‌شود (۶۲-۶۴).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

References فهرست منابع

1. Rybicki E.P. (2014). A top ten list for economically important plant viruses. Archives Virology. 160: 17–20.
2. Mitchell C.E. and Power A.G. (2003). Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. Nature. 421: 625–7.
3. Stobbe A.H. and Roossinck M.J. (2014). Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more. Frontiers in Plant Science. 5: 150.
4. Barba M., Czosnek H. and Hadidi A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses. 6: 106–36
5. Roossinck M.J. (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and Mutualism. Virology. 479-480: 271–7.
6. Remold S.K. (2012). Unapparent virus infection and host fitness in three weedy grass species. Journal of Ecology. 90: 967–77.
7. Alexander H.M, Mauck K.E, Whitfield A.E. (2014). Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. Eur Journal of Plant Pathology. 138: 529–47.
8. Fraile A. and Garcia-Arenal F. (2016). Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. Current Opinion in Virology. 17:50–6.
9. Tierney L., Linde J. and Muller S. (2012). An interspecies regulatory network inferred from simultaneous RNA-Seq of *Candida albicans* invading innate immune cells. Frontiers in Microbiology. 3:85.
10. Westermann A.J., Gorski S.A. and Vogel J. (2012). Dual RNA-Seq of pathogen and host. Nature Reviews Microbiology. 10: 618–30.
11. Kawahara Y., Oono Y. and Kanamori H. (2012). Simultaneous RNA-Seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. PLoS One. 7: e49423.
12. Shiekh M.A. (2014). Plant defense and the counter defense by viruses. Global Journal of Research and Review. 1: 37-44.
13. Incarbone M. and Dunoyer P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. Trends in Plant Science. 18:382–92.
14. Syller J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. Molecular Plant Pathology. 13: 204–16.
15. Romiguier J., Gayral P., Ballenghien M., Bernard A., Cahais V., Chenuil A., Chiari Y., Dernat R., Duret L. and Faivre N. (2014). Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. Nature. 515: 261-263.
16. Garber M., Grabherr M.G., Guttman M. and Trapnell C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-Seq. Nature Methods. 8: 469-477.
17. Guggisberg A., Lai Z., Huang J. and Rieseberg L.H. (2013). Transcriptome divergence between introduced and native populations of *Canada thistle* and *Cirsium arvense*. New Phytology 199: 595–608.
18. Mokili J.L., Rohwer F. and Dutilh B.E. (2012). Metagenomics and future perspectives in virus discovery. Current Opinion in Virology. 2: 63-77.
19. Xie G., Yu J. and Duan Z. (2013). New strategy for virus discovery: viruses identified in human feces in the last decade. Science China Life Sciences. 56: 688-696.
20. Kim M.S., Whon T.W. and Bae J.W. (2013). Comparative viral metagenomics of environmental samples from Korea. Genomics and Informatics. 11: 121-128.
21. Lam H.Y, Pan C., Clark M.J., Lacroute P., Chen R., Haraksingh R., O'Huallachain M., Gerstein M.B., Kidd J.M., Bustamante C.D and Snyder M. (2012). Detecting and annotating genetic variations using the HugeSeq pipeline. Nature Biotechnology. 30: 226–229.
22. Chen K., Wallis J.W., McLellan M.D., Larson D.E., Kalicki J.M., Pohl C.S., McGrath S.D., Wendl M.C., Zhang Q., Locke D.P., Shi X., Fulton R.S., Ley T.J., Wilson R.K., Ding L. and Mardis

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

E.R. (2009). BreakDancer: an algorithm for high resolution mapping of genomic structural variation. Natural Methods. 6: 677–681.
23. Hormozdiari F., Hajirasouliha I., Dao P., Hach F., Yorukoglu D., Alkan C., Eichler E.E. and Sahinalp S.C. (2010) Next-generation VariationHunter: combinatorial algorithms for transposon insertion discovery. Bioinformatics. 26: 350–357.
24. Wu Q., Ding S.W., Zhang Y. and Zhu S. (2015). Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. Annual Review of Phytopathology. 53: 425.
25. Nakamura S., Yang C.S., Sakon N., Ueda M., Tougan T., Yamashita A., Goto N., Takahashi K., Yasunaga T. and Ikuta K. (2009). Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. PloS One. 4: e4219.
26. Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D. and 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.
27. Massart S., Olmos A., Jijakli H. and Candresse T. (2014). Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. Virus Research. 188: 90-96.
28. Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M. and Geiser D.M. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 318: 283-287.
29. Palacios G., Druce J., Du L., Tran T., Birch C., Briese T., Conlan S., Quan P.L., Hui J. and Marshall J. (2008). A new *arenavirus* in a cluster of fatal transplant-associated diseases. New England Journal of Medicine. 358: 991-998.
30. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A. and Versalovic J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clinical Chemistry. 55: 856-866.
31. Dombrovsky A., Glanz E., Lachman O., Sela N., Doron-Faigenboim A. and Antignus Y. (2013). The complete genomic sequence of pepper yellow leaf curl virus (PYLCV) and its implications for our understanding of evolution dynamics in the genus *polerovirus*. PloS One. 8: e70722.
32. Roossinck M.J. (2012). Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. Annual Review of Genetics. 46: 359-369.
33. Van der Meijden E., Janssens R., Lauber C., Bouwes Bavinck J.N., Gorbalenya A.E. and Feltkamp M. (2010). Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immune compromised patient. PLoS Pathog. 6: e1001024.
34. Kircher M. and Kelso J. (2010). High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. Bioessays. 32:524–36.
35. Kullan J.B., Pinto D.L.P., Bertolini E., Fasoli M., Zenoni S., Tornielli G.B., Pezzotti M., Meyers B.C., Farina L. and Pè M.E. (2015). miRVine: a microRNA expression atlas of grapevine based on small RNA sequencing. BMC Genomics. 16: 393.
36. Licciardello G., Scuderi G., Ferraro R., Giampetruzzi A., Russo M., Lombardo A., Raspagliesi D., Bar-Joseph M. and Catara A. (2015). Deep sequencing and analysis of small RNAs in sweet orange grafted on sour orange infected with two citrus tristeza virus isolates prevalent in Sicily. Archives of Virology. 1-7.
37. Adams I.P., Glover R.H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E. and Navalinskiene M. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathololgy. 10: 537–545.
38. Kreuze J.F., Perez A. and Untiveros M. (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.
39. Navarro B., Gisel A., Rodio M.E., Delgado S., Flores R. and Di Serio F. (2012). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. The Plant Journal. 70: 991–1003.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

40. Flores R., Minoia S., Carbonell A., Gisel A., Delgado S. and López-Carrasco A. (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. Virus Research. 209: 136–145.
41. Hammann C. and Steger G. (2012). Viroid-specific small RNA in plant disease. RNA Biology. 9: 809–819.
42. Wang Y., Wu J., Qiu Y., Atta S., Zhou C. and Cao M. (2019). Global transcriptomic analysis reveals insights into the response of 'etrog' citron (*Citrus medica* L.) to citrus exocortis viroid infection. Viruses. 11: 453.
43. Zhang Y., Singh K., Kaur R. and Qiu W. (2020). Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and decline syndrome. Phytopathology. 101: 1081–1090.
44. Więsyk A., Iwanicka-Nowicka R., Fogtman A., Zagórski-Ostoja W. and Góra-Sochacka A. (2018). Time-course microarray analysis reveals differences between transcriptional changes in tomato leaves triggered by mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. Viruses. 10: 257.
45. Zheng Y., Wang Y., Ding B. and Fei Z. (2017). Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phased secondary small interfering RNAs, and immune responses. Journal of Virology. 91.
46. Thibaut O. and Claude B. (2018). Innate immunity activation and RNAi interplay in citrus exocortis viroid-tomato pathosystem. Viruses. 10: 587.
47. Tessitori M., Maria G., Capasso C., Catara G., Rizza S., De Luca V., Catara A., Capasso A. and Carginale V. (2007). Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III. Biochimica et Biophysica Acta. 1769: 228–235.
48. Herranz M.C., Niehl A., Rosales M., Fiore N., Zamorano A., Granell A. and Pallas V. (2013). A remarkable synergistic effect at the transcriptomic level in peach fruits doubly infected by prunus necrotic ringspot virus and peach latent mosaic viroid. Virology Journal. 10: 164.
49. Kappagantu M., Bullock J.M., Nelson M.E. and Eastwell K.C. (2017). Hop stunt viroid: effect on host (*Humulus lupulus*) transcriptome and its interactions with hop powdery mildew (*Podospheara macularis*). Molecular Plant-Microbe Interaction. 30: 842–851.
50. Xia C., Li S., Hou W., Fan Z., Xiao H., Lu M., Sano T. and Zhang Z. (2017). Global transcriptomic changes induced by infection of cucumber (*Cucumis sativum* L.) with mild and severe variants of hop stunt viroid. Frontiers in Microbiology. 8: 2427.
51. Takino H., Kitajima S., Hirano S., Oka M., Matsuura T., Ikeda Y., Kojima M., Takebayashi Y., Sakakibara H. and Mino M. (2019). Global transcriptome analyses reveal that infection with chrysanthemum stunt viroid (CSVd) affects gene expression profile of chrysanthemum plants, but the genes involved in plant hormone metabolism and signaling may not be silencing target of CSVd-siRNAs. Plant Gene. 18: 100181.
52. Mishra A.K., Kumar A., Mishra D., Nath V.S., Jakše J., Kocábek T., Killi U.K., Morina F. and Matoušek J. (2018). Genome-wide transcriptomic analysis reveals insights into the response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) in Hop (*Humulus lupulus* L.). Viruses. 10:570.
53. Pokorn T., Radišek S., Javornik B., Štajner N. and Jakše J. (2017). Development of hop transcriptome to support research into host-viroid interactions. PLoS One. 12: e0184528.
54. Štajner N., Radišek S., Mishra A.K., Nath V.S., Matoušek J. and Jakše J. (2019). Evaluation of disease severity and global transcriptome response induced by Citrus bark cracking viroid, hop latent viroid, and their co-infection in hop (*Humulus lupulus* L.). International Journal of Molecular Sciences. 20: 3154.
55. Góra-Sochacka A., Więsyk A., Fogtman A., Lirski M. and Zagórski-Ostoja W. (2019). Root transcriptomic analysis reveals global changes induced by systemic infection of *Solanum lycopersicum* with mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. Viruses. 11(11): 992.
56. Ebrahimi Khaksefidi R., Mirlohi S., Khalaji F., Fakhari Z., Shiran B., Fallahi H., Rafiei F., Budak H. and Ebrahimie E. (2015). Differential expression of seven conserved microRNAs in

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]

response to abiotic stress and their regulatory network in *Helianthus annuus*. Frontiers in Plant Science. 6: 741.
57. Rowe J.M., Dunigan D.D., Blanc G., Gurnon J.R., Xia Y. and Van Etten J.L. (2013). Evaluation of higher plant virus resistance genes in the green alga, *Chlorella variabilis* NC64A, during the early phase of infection with *Paramecium bursaria chlorella* virus-1. Virology. 442: 101-113.
58. Angeloni F., Wagemaker N., Vergeer P. and Ouborg J. (2012). Genomic tool boxes for conservation biologists. Evolutionary Applications. 5: 130–143.
59. Rius M., Bourne S., Hornsby H.G. and Chapman M.A. (2015). Applications of next-generation sequencing to the study of biological invasions. Current Zoology. 61: 488-504.
60. Postnikova O.A. and Nemchinov L.G. (2012). Comparative analysis of microarray data in *Arabidopsis* transcriptome during compatible interactions with plant viruses. Virology Journal. 9: 101.
61. Yang C., Guo R., Jie F., Nettleton D., Peng J., Carr T., Yeakley J.M., Fan J-B., and Whitham S.A. (2007). Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. Mol Plant Microbe In. 20: 358–70.
62. Nagano A.J., Sato Y. and Mihara M. Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. Cell. 151: 1358–69.
63. Plessis A., Hafemeister C., Wilkins O., Gonzaga Z.J., Meyer R.S., Pires I., Müller Ch., Septiningsih E.M., Bonneau R. and Purugganan M. (2015). Multiple abiotic stimuli are integrated in the regulation of rice gene expression under field conditions. eLife. 4: e08411.
64. Richards C.L., Rosas U. and Banta J. (2012). Genome-wide patterns of *Arabidopsis* gene expression in nature. PLos Genet. 8: e1002662.

New-Generation Sequencing and Intrinsic Virus-Virus and Virus-Plant Interactions

Saeedeh Dehghanpour Farashah[1], Mehrdad Salehzadeh[2*], Ahmad Ashrafi[3]
1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2- PhD. Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran.
3- MSc. of Plant Pathology, Department of Agriculture, The universityof Malekan Azad, Iran.
mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract

In order to understand the ecology of viruses, it is necessary to obtain comprehensive information on virus-virus and virus-host interactions in natural systems. In this study, it is found that RNA-Seq enabled this analysis without prior assumptions about infectious viruses, virus symptoms, or host genes. New generation sequencing allows identifying potential facilitators of multiple infections. Host antiviral responses occur naturally under RNA silencing. Because research into plant viruses has focused primarily on crop diseases, little is known about these viruses in the wild. RNA sequencing in plants belonging to a natural population is used to determine the simultaneous presence or absence of all viruses whose sequence has been reported, to identify new viruses, and to quantify host transcriptomes. By introducing the criteria for the number of readings and coverage of the genome, virus-induced infections and intrinsic and latent plant-virus interactions can have important applications in controlling these pathogens.

Keywords: Ecology, RNA-Seq, RNA Silencing, Transcriptome.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.4.5.7]