دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extension Article

Next Generation Sequencing Technique and Its Application in Plant Virology

ZOHREH DAVOODI, JAHANGIR HEIDARNEJAD✉, HOSSEIN MASOUMI
Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Received: 25.12.2018 Accepted: 04.08.2019

Davoodi Z, Heidarnejad J and Masoumi H (2019) Next generation sequencing technique and its application in plant virology. Plant Pathology Science 8(2):77-85. DOI:10.2982/PPS.8.2.77

Abstract

DNA sequencing is used by virtually all branches of biological research. Among the first advanced sequencing technologies, scientists were able to elucidate genetic information from any particular biological system using the Sanger sequencing method. Although Sanger sequencing generates high quality sequencing data, its limitations such as scalability, speed and resolution often preclude scientists from obtaining the essential information. To overcome these barriers, next generation sequencing technique (NGS) was introduced at the beginning of the 21st century. This technique provided a highly efficient, rapid, and low cost DNA sequencing platform beyond the reach of the standard and traditional DNA sequencing technologies that developed in late 1970s. In 2009, NGS technologies began to be applied to several areas of plant virology including virus/viroid genome sequencing, discovery and detection, ecology, epidemiology and replication. It is expected that NGS plays very significant roles in many plant virology researches.

Key words: DNA sequencing, Viroid, Virus, Illumina/Solexa

✉ Corresponding author: jheydarnejad@uk.ac.ir

مقاله ترویجی

تکنیکِ نسل جدید توالی‌یابی و کاربرد آن در ویروس‌شناسی گیاهی

زهره داودی، جهانگیر حیدرنژاد ✉ و حسین معصومی
بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۳
داودی ز، حیدرنژاد ج و معصومی ح (۱۳۹۸) تکنیکِ نسل جدید توالی‌یابی و کاربرد آن در ویروس‌شناسی گیاهی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۸۵-۷۷. DOI: 10.2982/PPS.8.2.77

چکیده

تعیین توالی دی‌ان‌ای در همه شاخه‌های علوم زیستی کاربرد دارد. در میان اولین فن‌آوری‌های پیشرفته نسل توالی‌یابی، دانشمندان با ظهور توالی‌یابی سنگر، توانستند اطلاعات ژنتیکی گونه‌ها را در هر سیستم بیولوژیکی مشخص کنند. اگرچه هنوز هم این تکنیک به‌دلیل کیفیت توالی‌های خوانده شده، مورد توجه است، اما محدودیت هایی چون مقیاس کار، سرعت و تفکیک‌پذیری موانعی است که مانع دسترسی دانشمندان به اطلاعات اساسی مورد نیاز شده است. برای غلبه بر این موانع، فنآوری توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در شروع قرن ۲۱ ارائه شد. این فن‌آوری، توالی‌یابی بسیار کارآمد، سریع و کم هزینه را نسبت به فن‌آوری استاندارد و سنتی توسعه یافته در اواخر دهه ۱۹۷۰، فراهم نمود. در سال ۲۰۰۹ فن‌آوری NGS برای چندین جنبه ویروس‌شناسی گیاهی از جمله توالی‌یابی ژنوم، کشف و ردیابی، اکولوژی، اپیدمولوژی و تکثیر ویروس‌ها و ویروئیدها استفاده شد. انتظار می‌رود که فن‌آوری NGS نقش بسیار مهمی در بسیاری از تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی داشته باشد.

واژگان کلیدی: توالی‌یابی دی‌ان‌ای، ویروئید، ویروس، Illumina/Solexa

مقدمه

روش اولیه بسیار پرزحمت توالی‌یابی دی‌ان‌ای در اوایل دهه ۱۹۷۰، توسط فردریک سنگر (Frederick Sanger) در دانشگاه کمبریج (Cambridge) انگلستان و هم‌چنین والتر گیلبرت (Walter Gilbert) و آلن ماکسام (Allan Maxam) در دانشگاه هاروارد (Harvard) ابداع شد (Maxam and Gilbert 1977). فن‌آوری توالی‌یابی اولیه، پژوهش‌های گروه‌های سنگر و گیلبرت بود که دو روش متمایز برای شناسایی نوکلئوتیدها در قطعه دی‌ان‌ای در اواخر دهه ۱۹۷۰ ارائه دادند. در میان این روش‌ها، روش سنگر که به‌عنوان روش خاتمه دهنده زنجیره شناخته می‌شود، تجاری شده و مورد استفاده قرار گرفته است. حداکثر طول قطعات قابل توالی‌یابی با سنگر حدود ۱۰۰۰ جفت باز است و هزینه این روش برای هر یک کیلو باز حدود نیم دلار است که برای تعیین توالی ژنوم انسان بسیار پرهزینه می‌باشد. هدف فن‌آوری‌های ارائه شده در سال ۲۰۰٤، توسعه فن‌آوری‌های پیشرفته و قادر به توالی‌یابی ژنوم انسان با کاهش هزینه‌ها و فقط در چند روز می‌باشند. از آن زمان، بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی در حال توسعه سیستم‌های تعیین توالی می‌باشند. ابتدا در سال ۲۰۰٤، روش 454 Life Science معرفی شد که بر اساس روش پایروسکونسینگ (Pyrosequensing) می‌باشد. در اوایل سال ۲۰۰۷، روش محبوب Illumina معرفی شد که بر اساس تشکیل پل است. در همان سال، سیستم دیگری تحت عنوان SOLiD بر اساس اتصال معرفی شد. همه این تکنیک‌های بالا نیاز به تکثیر قبل از توالی‌یابی دارند که مرحله پرهزینه و وقت‌گیر آن می‌باشد. به همین دلیل، از سال ۲۰۰۸ فن‌آوری‌های جدید دیگر معرفی شدند (Masoudi-Nejad *et al*. 2013).

✉ مسئول مکاتبه:jheydarnejad@uk.ac.ir

به‌دلیل تولید سریع و نرخ بالای جهش اکثر ویروس‌ها، جمعیت ویروس‌های آلوده کننده گیاهان می‌توانند تنوع ژنتیکی قابل توجهی در طول دوره آلودگی ایجاد کنند. ظهور فنآوری توالی‌یابی نسل جدید (Next generation sequencing=NGS) با توانایی بالقوه برای بررسی هزاران توالی ویروس از یک میزبان، به‌طور چشمگیری توانایی ما را در توصیف تنوع توالی در میزبان آلوده به ویروس، افزایش داد (Nelson and Hughes 2015).

در مقاله حاضر، ابتدا روش‌های تعیین توالی سنگر و چالش‌های موجود در این زمینه بررسی می‌شود. سپس نسل بعدی روش‌های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا و مواردی که امروزه به‌صورت تجاری در دنیای ژنتیک کاربرد بیشتری دارد به اختصار معرفی می‌شود. سپس، اشاره‌ای به برنامه‌های کاربردی نسل بعدی توالی‌یابی و در نهایت نقش آن در کشف و تعاملات مولکولی ویروس‌های گیاهی ارائه می‌شود.

۱-نسل‌های مختلف فنآوری توالی‌یابی

۱-۱-نسل اول توالی‌یابی: روش سنگر (Chain-termination)

مبنای روش سنگر کاربرد دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (ddNTPs) به‌عنوان ختم کننده زنجیر دی‌اِن‌ا است. روش کلاسیک ختم زنجیرسازی نیاز به دی‌اِن‌ای تک رشته‌ای به‌عنوان الگو، آغازگر، دی‌اِن‌ای پلیمراز، دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) و نوکلئوتیدهای تغییر یافته (dideoxyNTPs) برای ختم طویل شدن رشته دی‌اِن‌ا دارد. در این روش دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات به‌وسیله رادیواکتیو نشاندار شده (معمولا با S^{32}) و روی ژل اکریل آمید، الکتروفورز و سپس ژل از لایه شیشه‌ای جدا شده و یک فیلم رادیولوژی روی ژل قرار می‌گیرد و بعد از اثرگذاری رادیواکتیو روی فیلم، نتایج تفسیر می‌شوند. مدتی بعد از روش دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات نشاندار شده با فلورسنس استفاده شد. روش تعیین توالی ختم زنجیرسازی، همراه با آنالیز توالی دی‌اِن‌ا با توان عملیاتی بالا در حال حاضر در اکثر پروژه‌های تعیین توالی استفاده می‌شود (Murphy *et al*. 2005, Herzyk 2014).

چالش‌های روش سنگر

۱- هزینه: پس از گذشت سه دهه، هزینه توالی‌یابی روش سنگر حدود ۰/۵ دلار برای هر کیلو باز می‌باشد که هنوز هم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی بالا می‌باشد.

۲- اندازه کوتاه قطعات: این روش تن‌ها توانایی توالی‌یابی قطعات نسبتا کوتاه (۳۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید) را دارد. مانع اصلی برای تعیین توالی قطعات بزرگ‌تر دی‌اِن‌ا، توان ناکافی برای جداسازی قطعات بزرگ دی‌اِن‌ا در هنگام الکتروفورز است که لازم است به طریقی از هم جدا شوند که تفکیک در حد یک نوکلئوتید میسر باشد.

۳- نیاز برای اتوماسیون کامل: برای اتوماسیون کامل آماده‌سازی نمونه مشکلاتی وجود دارد. تعیین توالی سنگر تن‌ها در زمانی می‌تواند انجام شود که غلظت بالایی از دی‌اِن‌ا در دسترس باشد که تولید جمعیت زیاد از قطعات دی‌اِن‌ا، از طریق همسانه‌سازی باکتریایی امکان‌پذیر است که این کار به تن‌هایی زمان زیادی را طلب می‌کند (Shendure *et al*. 2004, Masoudi-Nejad *et al*. 2013)

۱-۲- نسل دوم (جدید) توالی‌یابی (Deep/next-generation sequencing)

پس از تعیین توالی به روش سنگر، نسل بعدی از فنآوری توالی‌یابی به نام توالی‌یابی نسل جدید (NGS) توسط جامعه علمی معرفی شد. این نسل برخی از موانع مهم را برطرف کرده و حوزه‌هایی از علوم تحقیقات در مورد بیماری‌های انسان تا کشاورزی و علوم تکاملی را توسعه داده است. اساسا مفهوم فنآوری NGS شبیه به سنگر می‌باشد. بازهای قطعات کوچک دی‌اِن‌ا به‌وسیله سیگنال‌های منتشر شده در زمان سنتز هر قطعه تشخیص داده می‌شود. روش NGS این فرآیند را به‌جای یک یا تعداد کمی از قطعات دی‌اِن‌ا با میلیون‌ها واکنش موازی انجام می‌دهد.

۱-۳- نسل سوم توالی‌یابی (Next-next-generation sequencing)

در حال حاضر جدیدترین سیستم توالی‌یابی که به نسل سوم توالی‌یابی معروف است، توسط شرکت

Helicos Bioscience معرفی شده و قادر به توالی‌یابی یک مولکول منفرد می‌باشد. ویژگی برتر این فنآوری در مقایسه با تکنیک‌های NGS، عدم نیاز به تکثیر دی‌اِن‌اِ با واکنش PCR می‌باشد که باعث افزایش دقت و کاهش زمان لازم برای توالی‌یابی شده است و هم‌چنین دارای قابلیت شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به زنجیره در حال ساخت، در زمان واقعی و بلافاصله پس از اضافه شدن است. هم‌چنین طول متوسط توالی‌های قرائت شده توسط این سیستم ۱۳۰۰ جفت باز است که از طول توالی‌های خوانده شده توسط تمام دستگاه‌های نسل دوم بیشتر است، البته میزان توالی‌های قرائت شده در مقایسه با سیستم‌های نسل دوم کمتر است. این فنآوری شامل تکنیک‌های Helicos و PacBio می‌باشد (Gupta and Gupta 2014).

۱-٤- نسل چهارم توالی‌یابی (Other/ fourth generation sequencing)

انواع مختلفی از فنآوری‌های دیگر وجود دارد تحت عنوان Oxford Nanopore، Polonator و ژنومیک کامل که توسط نسل دوم و سوم تعریف نشده‌اند و می‌توانند به‌عنوان نسل بالاتر از فن‌آوری توالی‌یابی قرار بگیرند. البته موفقیت این فن‌آوری‌های جدید در مقایسه با فن‌آوری‌های موجود، باید به اثبات برسند (Gupta and Gupta 2014).

۲- فن‌آوری‌های نسل جدید یا نسل دوم توالی‌یابی

در اواخر دهه ۱۹۹۰، نسل جدید دستگاه‌های توالی‌یابی توسط شرکت‌های Roche/454 Life Science، Illumina/Solexa و ABI/SOLiD ایجاد و در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ تجاری‌سازی شدند. این دستگاه‌های توالی‌یابی از نظر طول خوانش‌ها، اطلاعات توالی‌های تولید شده و کیفیت داده‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشند که در ادامه شرح داده می‌شوند (Gupta and Gupta 2014).

۲-۱-فنآوری Roche/454 Life Science

در اواخر دهه ۱۹۹۰ برای اولین‌بار فنآوری موسوم به پایروسکونسینگ برای تعیین توالی دی‌اِن‌اِ در مقیاس وسیع توسط شرکت آمریکایی 454 Life Sciences پیشنهاد و سپس این روش توسط شرکت سوئیسی رش (Roche) خریداری شد. در این سیستم ابتدا نمونه دی‌اِن‌اِ به قطعات کوچک با طول تقریبا ۱۰۰ جفت باز شکسته و سپس دو آداپتور A و B به دو انتهای قطعات متصل می‌شود، این آداپتورها محل اتصال آغازگرهای لازم برای تکثیر و توالی‌یابی هستند. این قطعات با ذرات کوچکی که پوششی از استرپتاویدین در سطح خود دارند، مخلوط و به کمک آداپتور B خود به این ذرات متصل می‌شوند. سپس قطعات دو رشته‌ای، واسرشته و تک رشته‌ای می‌شوند. این مخلوط به اندازه کافی رقیق می‌باشد، به‌طوری که به هر ذره منفرد تن‌ها یک رشته دی‌اِن‌اِ متصل است. سپس با اضافه کردن ترکیبات لازم برای تکثیر قطعات دی‌اِن‌اِی متصل به ذرات، این مخلوط به امولسیون تبدیل می‌شود، به این ترتیب هر ذره با رشته دی‌اِن‌اِ متصل به آن در یک قطره امولسیون به دام افتاده و واکنش PCR به‌طور مستقل در هر قطره انجام می‌شود (Emulsion PCR). در مرحله بعد به‌منظور تعیین توالی، ذرات حاوی دی‌اِن‌اِ بر روی یک صفحه سیلیکونی متشکل از تعداد زیادی چاهک منظم با حجمی در حد پیکولیتر پخش می‌شوند. سپس آنزیم‌های لازم یعنی دی‌اِن‌اِ پلیمراز، سولفوریلاز و لوسیفراز به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. در این مرحله چاهک‌ها به‌طور جداگانه ومتوالی در معرض dNTP های مختلف قرار می‌گیرند و بین هر بار افزودن سوبسترای دئوکسی نوکلئوتیدی یک مرحله شستشو انجام می‌شود. با ورود هر نوکلئوتید مکمل، یک مولکول پیروفسفات آزاد شده و آنزیم سولفوریلاز این مولکول پیروفسفات را با استفاده از آدنوزین فسفوسولفات (APS) به ATP تبدیل می‌کند. آنزیم لوسیفراز نیز به کمک ATP تولید شده لوسیفرین را به اکسی‌لوسیفرین تبدیل می‌کند که این واکنش همراه با ساطع شدن نور است. نور ساطع شده توسط دوربین‌های متصل به صفحه سیلیکونی ثبت شده و به‌صورت پیک در یک گراف نمایان می‌شود. در آخرین نسخه ارائه شده از سوی شرکت Roche، این فنآوری می‌تواند تا ۱۴ گیگا باز توالی با طول متوسط ۷۰۰ جفت باز تولید کند (Masoudi-Nejad *et al*. 2003, Gupta and Gupta 2014).

۲-۲- فنآوری Illumina/Solexa

در سال ۲۰۰۶ شرکت Solexa دستگاه Genome Analyzer را به بازار ارائه کرد که در سال ۲۰۰۷ توسط کمپانی Illumina خریداری و از آن زمان به بعد با نام Illumina/Solexa شناخته می‌شود. این روش تعیین توالی با استفاده از خاصیت رنگ‌های پایان دهنده ولی برگشت‌پذیر طراحی شده است. برای انجام توالی یابی، ابتدا دی‌اِن‌اِ مورد نظر به قطعاتی با طول کمتر از ۸۰۰ جفت باز شکسته می‌شود. این قطعات با انتهای صاف بوده و دارای یک نوکلئوتید اضافه A در انتهای ۳ٰ می‌باشند. سپس این قطعات از دو انتها به آداپتورهایی که در انتهای خود دارای یک نوکلئوتید اضافی T هستند، متصل می‌شوند. فرآورده‌های حاصل پس از واسرشته شدن از یک انتها با آغازگرهای متصل و مکمل با توالی آداپتور به یک سطح جامد به نام Flow cell متصل شده و بر روی این سطح تثبیت می‌شوند و از انتهای دیگر آزاد خود با دیگر توالی‌های مکمل موجود در سطح Flow cell متصل شده و به این ترتیب یک ساختار پل مانند تشکیل می‌شود که الگوی تکثیر در واکنش PCR می‌باشد (Bridge PCR). پس از انجام واکنش PCR تعداد زیادی نسخه از قطعات دی‌اِن‌اِ دو رشته‌ای بر روی سطح جامد تولید می‌شوند که به آنها اصطلاحا خوشه گفته می‌شود. در مرحله بعد به‌منظور تعیین توالی قطعات، مولکول‌های دی‌اِن‌اِ تک رشته‌ای و خطی می‌شوند، پس از هیبریداسیون، آغازگر مخصوص توالی‌یابی به توالی مکمل آداپتوری در انتهای هر رشته Flow cell برای تعیین توالی در دستگاه مربوطه آماده است. در هر سیکل توالی‌یابی، مخلوطی از چهار نوکلئوتید که هر کدام با یک رنگ فلورسانت مختلف نشانه‌گذاری شده‌اند به سطح Flow cell اضافه می‌شود. پس از شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به رشته دی‌اِن‌اِی در حال سنتز، رنگ فلورسانت به همراه گروه خاتمه دهنده از انتهای ۳ٰ باز برداشته شده و با اضافه شدن مخلوط نوکلئوتیدی به سطح، سیکل بعدی آغاز می‌گردد. طول متوسط توالی‌های خوانده شده توسط این فنآوری ۳۵-۱۵۰ جفت باز است (Masoudi-Nejad *et al*. 2013, Gupta and Gupta 2014).

۲-۳- فنآوری ABI/SOLiD

در سال ۲۰۰۶ کمپانی SOLiD فنآوری توالی‌یابی از طریق اتصال را به بازار معرفی کرد و در همین سال توسط شرکت Applied Biosystems(ABI) خریداری شد. مراحل آماده‌سازی نمونه دی‌اِن‌اِ تقریبا مشابه با سیستم توالی‌یابی ۴۵۴ می‌باشد، به‌طوری که نمونه دی‌اِن‌اِ موردنظر به قطعات کوچک شکسته و پس از اتصال آداپتور به انتهای قطعات حاصل، این قطعات از طریق Emulsion PCR تکثیر می‌شوند. در مرحله تعیین توالی، آغازگر توالی‌یابی که مکمل توالی آداپتور در انتهای قطعات دی‌اِن‌اِ است به این قطعات متصل می‌شود، سپس یکسری اکتامرهای الیگونوکلئوتیدی نشاندار شده با رنگ‌های فلورسانت برای اتصال به آغازگر با یکدیگر رقابت می‌کنند که در این اکتامر دو باز وسط (بازهای ٤ و ٥) با یکی از چهار رنگ فلورسانت نشاندار شده است، به این ترتیب پس از اتصال اکتامر به آغازگر، این بازها شناسایی خواهند شد. اکتامر اولیگونوکلئوتیدی پس از باز پنجم شکسته و رنگ فلورسانت رها می‌شود. سپس با اتصال سایر اکتامرها، چرخه‌های هیبریداسیون و اتصال تکرار می‌شوند. پس از یکسری چرخه‌های اتصال، قطعه مورد نظر با آغازگر مخصوص توالی‌یابی دیگری که مکمل موقعیت n-1 است هیبرید شده و مجددا چرخه‌های اتصال اکتامر اولیگونوکلئوتیدی به آغازگر تکرار شده تا بازهای دیگر توالی‌یابی شوند. پس از پنج دور هیبریداسیون آغازگرهای توالی‌یابی مختلف با قطعه موردنظر و تکمیل چرخه‌های اتصال برای هر اکتامر الیگونوکلئوتیدی نشاندار، هر باز با استفاده از دو آغازگر مختلف و در طی دو واکنش مستقل توالی‌یابی می‌شود. با استفاده از این فنآوری، توالی‌هایی به طول ۳۵-۷۵ جفت باز خوانده می‌شود (Masoudi-Nejad *et al*. 2003, Gupta and Gupta 2014).

۳-کاربردهای متنوع نسل جدید توالی‌یابی

سرعت بالا و هزینه پایین توالی‌یابی با استفاده از روش نسل جدید در مقایسه با روش تعیین توالی سنگر

کابردهای فراوانی را برای آن ایجاد کرده است. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به توالی‌یابی دوباره کل ژنوم، توالی‌یابی مجدد ژنوم‌های شناخته شده، توالی‌یابی مجدد هدفدار، توالی‌یابی ترانسکریپتوم، توالی‌یابی آرِاناِی کوچک، برهمکنش پروتئین- دی‌اِناِ و متاژنومیکس اشاره نمود (Gupta and Gupta 2014).

۳-۱- توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در تشخیص ویروس‌ها

در ابتدا برای تعیین توالی ویروس‌های گیاهی از روش سنگر استفاده می‌شد؛ مانند سایر علوم، ظهور فنآوری توالی‌یابی نسل جدید منجر به انقلابی در کشف ویروس و فرصت‌های جدیدی برای تشخیص ویروس شد. برای اولین بار تعدادی از محققین ویروس‌شناس، استفاده از فنآوری NGS را در سال ۲۰۰۹ منتشر کردند (Adams *et al*. 2009, Al Rwahnih *et al*. 2009) که از روش‌های توالی‌یابی مختلفی استفاده کرده‌اند (عمدتا Roche 454 و Illumina). مطالعات گسترده‌ای با تعیین توالی mRNA با موفقیت انجام شده است (Wylie *et al*. 2013). با این حال اشکال این روش به‌خصوص برای ویروس‌های با غلظت پایین این می‌باشد که بخش عظیمی از توالی از دست رفته است به این دلیل که اکثر توالی مربوط به آرِاناِ میزبان می‌باشد. یکی دیگر از روش‌های غالب استفاده شده، جداسازی dsRNA است (Roossinck *et al*. 2010, Al Rwahnih *et al*. 2011). با توجه به اینکه آرِاناِهای داخلی گیاه ساختار دو رشته‌ای تشکیل نمی‌دهند اما تکثیر به واسطه ویروس‌های آرِاناِ دار انجام می‌شود، در نتیجه این روش به شدت توسط اسیدهای نوکلئیک ویروسی غنی می‌شود. البته با توجه به این‌که برخی ویروس‌ها مانند ویروس‌های دی‌اِناِ دار، dsRNA کم یا اصلا ندارند، در نتیجه این روش برای این ویروس‌ها قابل استفاده نمی‌باشد. یک عملکرد ویژه تشخیص ویروس بر اساس NGS، روش Vector-enabled metagenomics (VEM) می‌باشد که در آن حشرات برای شناسایی ویروس‌های موجود در محیط نمونه‌برداری می‌شوند (Ma *et al*. 2011, Rosario *et al*. 2013).

۳-۲- توالی‌یابی نسل جدید و آشکارسازی علت بیماری‌های ناشناخته و آلودگی‌های پنهان

استفاده از فن‌آوری‌های توالی‌یابی نسل جدید در ویروس‌شناسی گیاهی نشان داد که برخی بیماری‌ها با علت ناشناخته در میزبان‌های علفی یا عامل نهفته آلودگی در گونه‌های مختلف میزبانان وحشی توسط ویروس‌های جدید و ناشناخته ایجاد می‌شوند. تاکنون بر اساس این روش، ویروس‌های جدید زیر شناخته شده‌اند: ۱- در گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa*) یک کوکوموویروس موقت به نام Gayfeather mild mottle virus، ۲- در سیب‌زمینی شیرین دو ویروس dsDNA دار (بادناویروس) و یک ویروس ssDNA دار (مستروویروس)، ۳- در فلفل و بادمجان به ترتیب ویروس لکه حلقوی زرد فلفل (*Pepper yellow leaf curl virus*) و پیسک خفیف بادمجان (*Eggplant mild leaf mottle*) ۴- در فلفل سیاه، دو ویروس دی‌اِناِی‌دار با نام پیشنهادی DNA virus 1 و DNA virus 2 ۵- در چمن وحشی ویروس کوتولگی غلات (*Cereal dwarf virus*). اکثر بیماری‌های با علت ناشناخته آلوده کننده محصولات هسته‌داران، سیب و مرکبات که با پیوند قابل انتقال هستند، عوامل بیماری‌زای سیستمیکی را نشان می‌دهند که با استفاده از سیستم نسل جدید توالی‌یابی، به مطالعه آن‌ها پرداخته‌اند (جدول ۱). فنآوری NGS هم‌چنین گزینه خوبی برای بررسی بیماری‌هایی با علت ناشناخته در انگور می‌باشد. یک مارافی‌ویروس جدید (*Grapevine Syrah 1 virus*) در ارتباط با کاهش انگور syrah شناسایی شده است. هم‌چنین، ویروس‌های آرِاناِی‌دار جدید با نام‌های موقتی Grapevine Pinot gris virus و Grapevine virus F. (*Vitivirus*) و دو ویروس دی‌اِناِی‌دار که اولی متعلق به جنس بادناویروس با نام موقتی Grapevine vein clearing virus، و دومی یک جمینی‌ویروس با نام موقتی Grapevine red-blotch-associated virus یا Grapevine red-leaf-associated virus کشف شده‌اند (Barba *et al*. 2014).

جدول ۱. نتیجه نسل جدید توالی‌یابی ویروس گیاهی از siRNA، RNA کل یا dsRNA میوه‌های معتدله، مرکبات یا انجیر آلوده (Barba *et al*. 2014).

Table 1. Next-generation sequencing of plant viral siRNA, total RNA or dsRNA from virus-infected temperate fruit crop, citrus or fig hosts (Barba *et al*. 2014).

Host	Study finding	Sample preparation/target	Sequencing platform
Raspberry	A novel virus isolated from infected raspberry plants was completely sequenced and characterized. It was designated as *Raspberry latent virus*. The virus is a novel dicot-infecting reovirus in the family *Reoviridae*, subfamily *Spinareovirinae.*	dsRNA	Illumina
Citrus	In *Citrus tristeza virus* (CTV) infected citrus plants It was shown that the citrus homologues of Dicer-like ribonucleases mediate the genesis of the 21 and 22 nt CTV siRNAs and that the ribonucleases act not only on the genomic RNA but also on the 30 co-terminal subgenomic RNAs and, particularly, on their dsRNA forms. A novel citrus miRNAs was also indentified and how CTV influences their accumulation was determined.	CTV sRNAs, gRNA sgRNAs	Illumina
Citrus	A novel DNA virus species, member of the family *Geminiviridae*, was identified and associated with citrus chlorotic dwarf disease. A provisional name of Citrus chlorotic dwarf-associated virus was proposed.	siRNAs and total DNA	Illumina HiSeq2000
Apple, Citrus, Grapevine	Detected ASPV, ACLSV and an unknown mycovirus. Detected two variants of CTV and ASGV. Detected variants of GLRaV-3, GVA and an unknown mycovirus.	siRNAs	Illumina
Apple	Identified agents associated with green crinkle disease of apple trees. The disease is a complex one as the following viruses were identified associated with it: ASGV, ASPV, ACLSV, ApLV, ApPCLSV and PCMV.	siRNAs	Illumina HiSeq2000
Fig	Detected *Fig mosaic virus* and *Fig latent virus*-1 for their elimination from infected clones. It is the first application of next-generation sequencing technology to detect an identify known and new species of viruses infecting fig trees.	DsRNAs	Illumina
Citrus	A novel virus was discovered by analysis of the contigs assembled from the virus siRNAs sequences which showed similarity with luteovirus sequence, particularly with *Pea enation mosaic virus*, the type member of the genus *Enarnovirus*. The complete genome of the virus was determined and the new virus was provisionally named Citrus vein enation virus.	siRNAs	Solexa-Illumina

ACLSV=*Apple chlorotic leaf spot virus*, ApLV=*Apricot latent virus*, ApPCLSV= *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, ASGV=*Apple stem grooving virus*, ASPV= *Apple stem pitting virus*, CTV=*Citrus tristeza virus*, GLRaV-3=*Grapevine leaf roll associated virus* 3, GVA=*Grapevine virus* A, PCMV=*Peach chlorotic mottle virus*, PNRS=*Prunus necrotic ring spot virus*, PPV=*Plum pox virus*.

۴-چالش‌های فنآوری NGS

بزرگترین مزیت فنآوری NGS، توانایی تولید حجم انبوهی از اطلاعات در زمان کوتاه، خود به یک محدودیت بزرگ تبدیل می‌گردد. تجزیه، تفسیر و نتیجه‌گیری خروجی‌های به‌دست آمده فراتر از مهارت‌های انسانی است و نیاز به کمک سیستم‌های پیشرفته کامپیوتری و یا سیستم‌های محاسبه‌گر پیچیده دارند. هم‌چنین حجم بالای اطلاعات تولید شده توسط این فنآوری نیاز به ذخیره‌سازی و قابلیت کنترل کیفیت دارد و ممکن است هزینه‌های مربوط به ذخیره‌سازی و آنالیز داده‌ها بالاتر از هزینه‌های مربوط به تولید داده‌های توالی باشد. اگر چه چالش‌های زیادی در ارتباط با فن‌آوری NGS وجود دارد ولی مزایای استفاده از این فن‌آوری بیشتر از معایب آن می‌باشد (Herzyk 2014).

نتیجه‌گیری

روش تشخیص ویروس‌ها در آزمایشگاه‌ها با معرفی روش الایزا در سال ۱۹۷۰ پیشرفت عظیمی نمود و برای طیف وسیعی از ویروس‌های مختلف با تغییر بسیار کمی استفاده شد، الایزا روش آسانی است و نیاز به تخصص بالایی ندارد و با هزینه پایین و مواد در دسترس در آزمایشگاه‌های معمول در سراسر جهان در حال استفاده می‌باشد. در دو دهه اخیر روش‌های توالی‌یابی دی‌اِن‌اِی به دلیل صرفه‌جویی در زمان و هم‌چنین در زمان زیاد بودن نمونه‌ها و در دسترس نبودن آنتی‌بادی کافی، به‌عنوان اولین جایگزین الایزا مورد توجه قرار گرفته‌اند. از بین این روش‌ها بدون شک فن‌آوری NGS به محققین فرصت‌های زیادی برای انجام آسان تحقیقات با درک بهتر مسائل علمی در سطح کل ژنوم و نه تنها در سطح خاصی از بافت یا یک اندام را فراهم نموده است. البته عامل اصلی در توسعه این تکنیک علم پزشکی است که خواستار تعیین توالی کل ژنوم انسان با هزینه بسیار کم می‌باشد. در حال حاضر فنآوری NGS، کشف و شناسایی سریع ویروس‌ها را در آزمایشگاه‌ها امکان‌پذیر کرده است و تاکنون با استفاده از این تکنیک توانسته‌اند برخی از بیماری‌های ناشناخته در میزبان‌های علفی، ویروس‌های جدید و ناشناخته موجود در گیاهان وحشی و هم‌چنین ویرس‌های آلوده کننده درختان مانند انگور، توت و مرکبات را شناسایی کنند.

References منابع

1. Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E and Navalinskiene M (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathology 10:537-545.
2. 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.
3. Al Rwahnih M, Daubert S, Urbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A (2011) Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. Archives of Virology 156:397-403.
4. Barba M, Czosnek H and Hadidi A (2014) Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6:106-136.
5. Boonham N, Kreuze J, Winter S, Vlugt R and Bergervoet J (2014)Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. Virus Research 96:1-12.
6. Gupta A K and Gupta UD (2014) Next Generation Sequencing and Its Applications. Pp.345-367. In: Verma AS and Singh A (eds.). Animal Biotechnology Models in Discovery and Translation. Academic Press, Elsevier Science.

7. Herzyk P (2014) Next-Generation Sequencing. Pp. 125-145. In: Padmanabhan S (ed.). Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Academic Press, Elsevier Science.
8. Ma M, Huang Y, Gong Z, Zhuang L, Li C and Yang H (2011) Discovery of DNA viruses in wild-caught mosquitoes using small RNA high throughput sequencing. PLoS One 6:e24758.
9. Mardis ER (2007) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics 24:131-141.
10. Masoudi-Nejad A, Narimani Z and Hosseinkhan N (2013) Next Generation Sequencing and Sequence Assembly: Methodologies and Algorithms. Springer, New York, 86p.
11. Maxam A M and Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74:560-564.
12. Murphy KM, Berg KD and Eshleman JR (2005) Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. Clinical Chemistry 51:35-39.
13. Nelson CW and Hughes AL (2015) Within-host nucleotide diversity of virus populations: Insights from next-generation sequencing. Infection, Genetics and Evolution 30:1-7.
14. Roossinck MJ, Saha P, Wiley GB, Quan J, White JD and Lai H (2010) Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. Molecular Ecology 19:81-88.
15. Rosario K, Padilla-Rodriguez M, Kraberger S, Stainton D, Martin DP and Breitbart M (2013) Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Epiprocta) from Puerto Rico. Virus Research 171:231-237.
16. Shendure J, Mitra RD, Varma C and Church GM (2004) Advanced sequencing technologies: methods and goals. Nature Reviews Genetics 5:335-344.
17. Wylie SJ, Li H, Dixon KW, Richards H and Jones MGK (2013) Exotic and indigenous viruses infect wild populations and captive collections of temperate terrestrial orchids (Diuris species) in Australia. Virus Research 171:22-32.