PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (4): 269-277, 2021
eISSN 2084-4883

DOI: 10.14199/ppp-2021-029
Published online: 08.10.2021

Received: 18.06.2021 / Accepted: 30.08.2021

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) jako uniwersalna metoda wykrywania i różnicowania wirusów roślinnych

Next generation sequencing (NGS) as a multipurpose method for detection and differentiation of plant viruses

Agata Kaczmarek[A]*, Krzysztof Treder[B]

Streszczenie

Niniejsza praca opisuje wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w badaniach nad wirusami roślin. Pomimo iż, NGS nie jest jeszcze rutynowo stosowane, coraz częściej jest adaptowane w diagnostyce oraz genomice fitopatogenów. Techniki NGS umożliwiają jednoczesne wykrycie wielu wirusów obecnych w zakażonym materiale. Dzięki nim możliwe jest nie tylko stwierdzenie, jakie wirusy są obecne w jednej badanej próbie, ale również ich zróżnicowanie genetyczne. Jednoczesna identyfikacja wielu wirusów, możliwość wczesnego wykrywania ognisk choroby, śledzenie rozwoju epidemii oraz monitorowanie zmian genetycznych zachodzących w populacji patogenów wirusowych w trakcie rozwoju epidemii sprawiają, że NGS staje się uniwersalnym narzędziem badawczym umożliwiającym nie tylko detekcję, ale również zrozumienie mechanizmów molekularnych pozwalających wirusom adaptować się do zmian środowiskowych (genotypu rośliny – gospodarza, wektora, obecności innych patogenów).

Słowa kluczowe: diagnostyka, fitopatologia, NGS, sekwencjonowanie, wirusy roślin

Abstract

This paper describes the application of next generation sequencing (NGS) in plant virus research. Although NGS has not been routinely used yet, it is increasingly adopted in diagnostics and genomics of phytopathogens. NGS technics enable the simultaneous detection of multiple viruses present in infected material. This makes it possible not only to determine which viruses are present in a single sample but also to determine their concentration and genetic diversity. The simultaneous identification of many viruses, the possibility of early detection of disease outbreaks as well as tracking and monitoring of epidemic development, make NGS a universal research tool that enables not only the detection but also the understanding of molecular mechanisms allowing viruses to adapt to environmental changes (host plant genotype, vector, presence of other pathogens).

Key words: diagnostics, plant pathology, NGS, sequencing, plant viruses

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Radzików, 05-870 Błonie
*corresponding author: a.kaczmarek@ihar.edu.pl
ORCID: [A]0000-0002-7463-5821, [B]0000-0002-8764-0574

Wstęp / Introduction

Historia sekwencjonowania / History of sequencing

Odkrycie budowy kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) przez Watsona i Cricka w 1953 roku dało początek rewolucji w genetyce molekularnej, która od kilku dekad zmienia oblicze naszej cywilizacji (Watson i Crick 1953). Historia technologii sekwencjonowania rozpoczęła się w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku. W 1965 roku grupa Fredericka Sangera opublikowała metodę sekwencjonowania RNA (Sanger i wsp. 1965), która umożliwiła sekwencjonowanie krótkich cząsteczek RNA, takich jak rybosomalne RNA i tRNA. W 1977 roku ten sam zespół opublikował technikę, w której terminacja wydłużania startera przez polimerazę DNA następuje po inkorporacji jednego z czterech trójfosforanów dideoksynukleotydów (terminatorów), dzięki czemu sekwencjonowanie zostało uproszczone do czterech jednocześnie prowadzonych reakcji (Sanger i wsp. 1977). Metoda ta nazywana jest metodą terminacji łańcucha, metodą dideoksy lub po prostu metodą Sangera. Z uwagi na prostotę wykonania, dużą dokładność oraz łatwość automatyzacji metoda Sangera szybko wyparła inne techniki. Impet rozwojowi tej technologii dało opracowanie reakcji PCR (Mullis i wsp. 1986), zastąpienie radioaktywnego znakowania fluorescencyjnym i częściowa automatyzacja procesu przez wykorzystanie komputera do odczytu sekwencji (Smith i wsp. 1986).

W 1987 roku firma Applied Biosystems wprowadziła na rynek pierwszy zautomatyzowany sekwenator Prism 373. Model ten został zastąpiony przez sekwenator kapilarny ABI 310 w roku 1996. Dwa lata później zsekwencjonowano pierwszy pełny genom zwierzęcy, należący do modelowego organizmu nicienia *Caenorhabditis elegans* (Fire i wsp. 1998). Metoda była powszechnie stosowana do sekwencjonowania kolejnych genomów, między innymi została wykorzystana w projekcie sekwencjonowania genomu ludzkiego (Goodwin i wsp. 2016), genomu rośliny modelowej – rzodkiewnika pospolitego oraz genomów zbóż (Noceń i wsp. 2018). Dużą zaletą tej metody jest wysoka wiarygodność odczytywanych sekwencji DNA. Błędne odczytanie zasady zdarza się raz na 1000–10 000 nukleotydów. Jednak jakość sekwencjonowania często jest niska w obrębie 5' i 3' końcowych regionów. Obejmują one mniej więcej od 15 do 40 par zasad w miejscu związania się startera oraz region 3' końcowy zlokalizowany po 700–900 nukleotydach. Obecnie metodą Sangera można sekwencjonować w jednej reakcji jedną matrycę DNA, która powinna być jednorodna, jednak może stanowić mieszaninę sekwencji (np. alleli genu, czy wariantów genomów wirusa transkrybowanych z tego samego genomu rodzicielskiego). Zależnie od liczby kapilar, w jaką jest wyposażony sekwenator, można sekwencjonować od czterech do dziewięćdziesięciu sześciu różnych matryc DNA jednocześnie, uzyskując sekwencje o długości do 1000 par zasad. Niemożliwe jest jednak łączenie (multipleksowanie) próbek, co utrudnia całkowitą automatyzację ich przygotowania i ogranicza przepustowość techniki. Z tych powodów już w połowie lat dziewięćdziesiątych rozpoczęto prace nad nowymi metodami sekwencjonowania, których efektem jest trwający do dziś gwałtowny postęp w tworzeniu nowych technologii, wzrastającej szybkości i coraz niższym koszcie sekwencjonowania genomów. W efekcie niskoprzepustowa technika klasyfikowana jest obecnie jako sekwencjonowanie pierwszej generacji. Natomiast nowe, wysokoprzepustowe metody określane są jako metody następnej lub nowej generacji.

Pirosekwencjonowanie było pierwszą zastosowaną metodą sekwencjonowania następnej generacji. Wysokoprzepustowe sekwenatory (454 Genome Sequencer FLX i Roche GS Junior) firma Roche wprowadziła na rynek w 2005 roku (Margulies i wsp. 2005). Z uwagi na rozwój bardziej efektywnych sposobów sekwencjonowania, wsparcie dla tego urządzenia zakończyło się w 2016 roku.

Kolejną metodą jest sekwencjonowanie przez syntezę (ang. sequencing by synthesis, SBS) (Illumina). Jest to w chwili obecnej jedna z najbardziej popularnych metod sekwencjonowania, a dzięki możliwości multipleksowania, nawet 96 różnych prób może być sekwencjonowanych w tym samym czasie. Od kilku lat firmy, takie jak Oxford Nanopore Technologies (ONT) czy Pacific Biosciences udostępniają na rynku platformy, pozwalające na sekwencjonowanie długich fragmentów kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym.

Sekwencjonowanie następnej generacji na przykładzie Illumina, Pacific Biosciences oraz Oxford Nanopore Technologies (ONT) / Illumina, Pacific Biosciences, and Oxford Nanopore Technologies (ONT) as examples of next generation sequencing

Illumina

W 2006 roku firma Illumina wprowadziła na rynek sekwenator Solexa (Genome Analyser) Next Generation Sequencer. Technologia sekwencjonowania stosowana w tym urządzeniu nadal jest rozwijana, a Illumina ma obecnie kilka platform do sekwencjonowania, w tym dwie do „masowych" analiz oraz najmniejszą do sekwencjonowania małej liczby próbek o krótszych genomach, odpowiednio: NovaSeq, NextSeq, HiSeq, MiSeq, MiniSeq oraz iSeq. Platformy różnią się między sobą ilością uzyskiwanych danych (od 1,8 GB w przypadku MiniSeq do 6000 GB na platformie NovaSeq) oraz liczbą odczytów, które mogą wygenerować w ograniczonym czasie. W przypadku najmniejszej i jednocześnie najnowszej platformy iSeq, wykorzystywanej do badań mikrobiologicznych ze względu na małą liczbę odczytów w porównaniu do innych platform, uzyskuje się maksymalnie 4 miliony odczytów o długości 250 par zasad z obu końców w przeciągu od 9 do 37 godzin. Dla kontrastu platforma MiSeq w przeciągu 55 godzin umożliwia uzyskanie 25 mln odczytów i 15 GB par zasad (Maliogka i wsp. 2018).

Sekwencjonowanie w platformie Illumina składa się z czterech etapów:

- **Przygotowanie biblioteki genomowej (ang. library preparation) –** podczas tego etapu DNA zostaje pocięte na mniejsze fragmenty od około 200 do 600 par zasad. Następnie do każdego z końców pofragmentowanego DNA zostają przyłączone adaptery. Adaptery są to krótkie odcinki dwuniciowego DNA, umożliwiające urządzeniom sekwencyjnym rozpoznanie fragmentów. W sekwencji adaptera znajduje się sekwencja indeksu. Indeksy w zależności od użytego zestawu mają zwykle długość od sześciu do dziesięciu par zasad. Dzięki ich zastosowaniu możliwe jest łączenie (pulowanie) prób i sekwencjonowanie kilkudziesięciu próbek w jednej reakcji. W efekcie przyłączenia adapterów na obu końcach fragmentów DNA znajdują się sekwencje oligonukleotydowe identyfikujące końce 5' i 3'. Poprzez inkubację z wodorotlenkiem sodu uzyskana biblioteka fragmentów DNA zostaje zdenaturowana do formy jednoniciowej. Adaptery są komplementarne do oligonukleotydów kowalencyjnie związanych na powierzchni komory przepływowej, na której następuje kolejny etap.
- **Formowanie klastrów w komorze przepływowej (ang. cluster generation) –** jednoniciowe fragmenty DNA przygotowane w wyżej omówiony sposób zostają przyłączone do oligonukleotydów kowalencyjnie związanych na powierzchni komory przepływowej, a następnie przemyte. Związane DNA zostaje poddane amplifikacji oraz następuje proces tworzenia tzw. mostów amplikonów (ang. bridge amplificon), polegający na replikacji przyłączonego DNA, tworzącego małe klastry (ang. clusters) o tej samej sekwencji. Nieznakowane zasady nukleotydów i polimeraza DNA są następnie dodawane w celu wydłużenia i połączenia komplementarnych nici DNA przyłączonych do komory przepływowej, w efekcie czego powstają „mosty" dwuniciowego DNA pomiędzy starterami. Dwuniciowy DNA jest następnie denaturowany i uzyskiwany jest jednoniciowy DNA, co pozwala na wygenerowanie milionów klastrów.
- **Sekwencjonowanie (ang. sequencing base by base) –** startery i znakowane fluorescencyjnie terminatory (terminatory to zmodyfikowane nukleotydy zatrzymujące syntezę DNA) są dodawane do komory przepływowej. Starter przyłącza się do sekwencjonowanego DNA, natomiast polimeraza DNA wiąże się ze starterem i dodaje pierwszy komplementarny do sekwencjonowanej nici, znakowany fluorescencyjnie terminator. Następnie lasery emitują w komorze przepływowej światło o określonej długości fali, aby aktywować fluorescencyjny znacznik, a każda grupa cząsteczek DNA emituje sygnał fluorescencyjny wystarczająco silny, aby mógł zostać wykryty przez kamerę. Każdy z nukleotydów terminatora (A, C, G i T) emituje inny kolor. Sygnał fluorescencyjny jest rejestrowany i zapisywany w oprogramowaniu. W dalszym etapie znakowana grupa terminatora jest usuwana umożliwiając przyłączenie się kolejnego znakowanego nukleotydu do następnej zasady. Proces ten trwa do momentu zsekwencjonowania milionów klastrów DNA.
- **Analiza –** wygenerowane sekwencje mogą być w dalszym etapie analiz porównane do sekwencji referencyjnej, jeżeli jest ona znana. Umożliwia to identyfikację podobieństw bądź polimorfizmów w zsekwencjonowanym DNA. Jeżeli sekwencja referencyjna nie jest znana, przeprowadzane jest składanie genomu (ang. assembly) oraz jego adnotacji na podstawie analizy zachodzących na siebie segmentów sekwencyjnych (https://www.illumina.com).

Sekwencjonowanie SMRT (Single-Molecule Real Time) / Sequencing SMRT (Single-Molecule Real Time)

Sekwencjonowanie SMRT czy sekwencjonowanie pojedynczej cząsteczki w czasie rzeczywistym po raz pierwszy zostało opublikowane w 2009 roku przez Eid (Eid i wsp. 2009). Technika opiera się na wykorzystaniu nukleotydów z fluoroforami przyłączonymi do fosforanu. Została ona opracowana przez firmę Pacific Biosciences. Proces sekwencjonowania zachodzi w studzienkach na płytce sekwencyjnej ZMWs (ang. zero mode waveguides). Na dnie dołka unieruchomiona jest jedna cząsteczka polimerazy, natomiast w mieszaninie reakcyjnej znajduje się matryca DNA z doczepionymi adapterami tworząca strukturę spinki do włosów. Do tak powstałych kompleksów przyłączane są startery sekwencyjne, a następnie całość wiązana jest z immobilizowaną cząsteczką polimerazy. Podczas sekwencjonowania przyłączane są znakowane fluorescencyjnie nukleotydy znajdujące się w roztworze, każdy z czterech nukleotydów wyznakowany jest innym fluoroforem. Poprzez oświetlenie studzienki laserem od spodu przez mały otwór, wzbudzana jest emisja fluoroforu, którym znakowany jest jedynie dołączany nukleotyd. Po odłączeniu znakowanego pirofosforanu, fluorescencja znika, dzięki temu rejestracja sekwencjonowania odbywa się w czasie rzeczywistym. Długość odczytów dochodzi nawet do 50 000 nt, jednakże przepustowość i dokładność tej technologii jest znacząco niższa niż przedstawione wyżej systemy oparte na sekwencjonowaniu przez syntezę (Żmieńko i Satyr 2020).

MinION (ONT)

Kolejnym przykładem technologii sekwencjonowania następnej generacji jest opracowana przez firmę Oxford Nanopore Technologies w 2014 roku w Wielkiej Brytanii technika wykorzystująca białkowe kanały obecne w błonach komórkowych bakterii (nanopory), przez które translokowana jest pojedyncza nić kwasu nukleinowego. Ten nowy sposób sekwencjonowania pozwala na sekwencjonowanie bardzo długich pojedynczych cząsteczek DNA i RNA bez konieczności ich uprzedniego fragmentowania. Oxford Nanopore

Technologies w swojej technologii wykorzystuje kanały białkowe α-hemolizyny naturalnie występujące w błonach komórkowych gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) (Bayley i Cremer 2001).

Proces zachodzi w sekwenatorze MinION, który jest urządzeniem mniejszym niż smartfon i można go podłączyć do laptopa. Urządzenie zostało zaprojektowane w taki sposób, aby możliwe było sekwencjonowanie próbki zarówno w laboratorium, jak i w terenie. Oxford Nanopore Technologies oferuje również stacje stacjonarne GridION oraz PromethION.

W skład urządzenia MinION wchodzi płytka sekwencyjna, na której umieszczone jest podłoże elektrooporowe z syntetycznego polimeru wraz z ulokowanymi w nim białkami (nanopory) oraz detektor. Przygotowanie bibliotek sekwencyjnych polega na przyłączeniu do obu końców DNA sekwencji adapterowych, które następnie wiążą białko motorowe i przesuwają DNA w stronę nanopora. Dopiero przy kontakcie z nanoporem białko motorowe zostaje aktywowane. Tak przygotowana biblioteka jest gotowa do sekwencjonowania. Gdy cząsteczka kwasu nukleinowego przechodzi przez jeden z nich, zmienia ona przewodnictwo prądów jonowych sygnału w zależności od „przepływających" przez nanopor różnych nukleotydów. Ponieważ nukleotydy mają różne kształty, każdy nukleotyd jest rozpoznawany przez jego wpływ na zmianę prądu jonowego (Stoddart i wsp. 2009; Bayley 2015; Żmieńko i Satyr 2020). Tym, co odróżnia różne technologie sekwencjonowania jest również zminimalizowany etap przygotowania próbki poddanej sekwencjonowaniu (nie są wymagane uprzednie etapy amplifikacji lub fragmentacji wyjściowego materiału), a odczyty DNA/RNA mogą sięgać od pięciu tysięcy do stu tysięcy par zasad (Żmieńko i Satyr 2020).

Analizy bioinformatyczne / Bioinformatics

Analiza bioinformatyczna sekwencji wygenerowanych przez sekwenatory następnej generacji może być przeprowadzona na komputerach stacjonarnych, jednakże rosnąca liczba danych sekwencyjnych wymusza prowadzenie analiz na wysokoprzepustowych serwerach z dużą pojemnością pamięci RAM, w środowisku Linux bądź iOS (Fox i wsp. 2015).

Wiele narzędzi bioinformatycznych działa w oparciu o algorytmy (tzw. pipelines), które umożliwiają składanie z krótkich sekwencji całych genomów i tranksryptomów. Składanie fragmentów genomu (ang. genome assembly) można przeprowadzić poprzez: a) sekwencjonowanie *de novo*, podczas którego mniejsze fragmenty są składane w większe w oparciu o adnotację wygenerowanych kontigów lub superkontigów o określonym poziomie konserwatywności (podobieństwie) względem sekwencji obecnych w Banku Genów NCBI lub innych bazach, b) mapowania względem znanej sekwencji referencyjnej (Barba i wsp. 2014). Składanie sekwencji *de novo* ma ograniczenia, szczególnie w przypadku sekwencjonowania próbek środowiskowych, w których znajduje się kilka gatunków organizmów.

Wykorzystanie NGS w badaniach nad wirusami roślin / Application of NGS in plant viruses research

Techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) rewolucjonizują obecnie diagnostykę chorób roślin, umożliwiając opracowanie metod wykrywania wielu patogenów w jednej próbie bez wcześniejszej znajomości sekwencji genomów wykrywanych patogenów. Dzięki temu możliwe stało się wykrywanie nie tylko znanych sprawców chorób, lecz również nowych, nieznanych dotąd czynników chorobotwórczych. Te cechy są szczególnie przydatne w diagnostyce chorób powodowanych przez wirusy roślinne, z uwagi na ich różnorodność oraz częste duże zróżnicowanie genetyczne w obrębie populacji tego samego wirusa (Minicka i wsp. 2020). NGS wydaje się idealną metodą diagnostyczną do wykrywania wielu wirusów w jednej badanej próbie, zarówno znanych, jak i dotąd nieopisywanych dzięki sekwencjonowaniu *de novo* (Filloux i wsp. 2018). Technika umożliwia również identyfikację szczepów w obrębie tego samego gatunku wirusa.

Pionierskie prace opisujące wykorzystanie NGS do wykrywania roślinnych wirusów pojawiły się w 2009 roku (Adams i wsp. 2009; Al Rwahnih i wsp. 2009; Kreuze i wsp. 2009). Dwie pierwsze grupy zastosowały pirosekwencjonowanie na platformie Roche 454 FLX, podczas gdy trzecia użyła technologii sekwencjonowania opracowanej przez firmę Illumina. Adams i wsp. (2009) zidentyfikowali całkowitą sekwencję genomu wirusa mozaiki pepino (PepMV) poprzez sekwencjonowanie cDNA przygotowanego z całkowitego RNA wyekstrahowanego z rośliny pomidora zainfekowanej PepMV. Analiza wyników, przy użyciu algorytmu BLAST wykazała, że 20,1% sekwencji stanowiły sekwencje PepMV, natomiast spośród pozostałych około 70% było pochodzenia rybosomalnego lub chloroplastowego.

W puli otrzymanych kontigów siedem odpowiadało PepMV, pokrywając 97% genomu wirusa bez 200-nukleotydowego regionu na 5' końcu genomu. Używając opublikowanego genomu PepMV jako sekwencji referencyjnej uzyskano pełne pokrycie, natomiast z pozostałych luźnych sekwencji z otrzymanego sekwencjonowania, dzięki mapowaniu do sekwencji referencyjnej otrzymano sekwencję nieznanego dotąd wirusa gayfeather mild mottle virus z rodzaju *Cucumovirus* (Adams i wsp. 2009).

Trzecia grupa wykryła z dużą czułością zarówno spodziewane, jak i nieznane wirusy infekujące wilec ziemniaczany (*Ipomoea batatas*), którego jadalne bulwy korzeniowe znane są jako słodkie ziemniaki. Genomy zidentyfikowanych wirusów zbudowane były z RNA, ssDNA i dsDNA, co świadczy o tym, że zastosowana metoda ma charakter uniwersalny i nadaje się do diagnostyki zarówno RNA, jak i DNA wirusów (Kreuze i wsp. 2009). Omówione prace stały się przykładem dla wielu zespołów badawczych z całego

świata i w ciągu ostatnich lat powstało wiele publikacji opisujących zastosowanie NGS do wykrywania i różnicowania wirusów roślinnych, z których najważniejsze omówione są w pracach przeglądowych: Barba i wsp. (2014), Roossnick i wsp. (2015), Adams i Fox (2016), Jones i wsp. (2017) oraz Maliogka i wsp. (2018). Autorzy wymienionych prac podkreślają, że zastosowanie NGS spowodowało rewolucyjny postęp w diagnostyce wirusów roślin.

Odkąd w 2014 roku Oxford Nanopore uruchomił MinION Access Programme umożliwiając testowanie urządzenia, sekwencjonowanie z wykorzystaniem nanoporów jest również coraz powszechniej stosowane w diagnostyce wirusów roślinnych. Technika ta jest szczególnie przydatna w sekwencjonowaniu *de novo*, gdzie umożliwia wykrycie nieznanych dotąd wirusów. W 2018 roku Filloux i wsp. (2018) opisali zastosowanie sekwenatora MinION do wykrywania wirusów pochrzynu skrzydlatego (*Dioscorea alata* L.). Wykonana w omawianej pracy analiza skuteczności sekwencjonowania pełnego genomu wirusa z rodzaju *Macluravirus* (rodzina Potyviridae) ujawniła, że sekwencja konsensusowa genomu wirusa uzyskana zarówno przez złożenie *de novo*, jak i przez dopasowanie do genomu referencyjnego była w 99,8% identyczna z sekwencją referencyjną wirusa otrzymaną za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Wynik ten wykazał, że platforma MinION może być stosowana zarówno do wiarygodnego wykrywania i dokładnego sekwencjonowania prawie pełnej długości pozytywnych, jednoniciowych genomowych RNA wirusów roślinnych. W 2018 roku zespół Bronzato Badial stosując jako układ modelowy wirus ospowatości śliwy [wirus szarki, plum pox potyvirus (PPV)] oraz bakterię *Candidatus Liberibacter asiaticus* wykazali, że za pomocą MinION można wykrywać patogeny wirusowe i bakteryjne nie tylko w próbach z zainfekowanych roślin, ale również w mszycach, będących wektorami tych patogenów (Bronzato Badial i wsp. 2018). Zespół Della Bartola zastosował technologię ONT do wykrywania wirusów ziemniaka – PVY, PVX, PVS i PLRV (Della Bartola i wsp. 2020). W przypadku wirusa Y ziemniaka (PVY) badacze wykazali skuteczność metody w wykrywaniu pięciu różnych szczepów tego wirusa. Co ważne, różne szczepy PVY można było wykryć w próbach pobranych z jednej rośliny. Autorzy w wyniku sekwencjonowania uzyskali sekwencje pokrywające ponad 90% genomów wykrywanych wirusów, a zgodność z sekwencjami uzyskanymi technologią firmy Illumina wyniosła 99,5%.

Przygotowanie prób do NGS oraz sposoby wzbogacania sekwencji wirusowych / Sample preparation and viral RNA enhancement

Przygotowanie próbki do sekwencjonowania na ogół składa się z tych samych etapów: ekstrakcji kwasu nukleinowego, fragmentacji bądź doboru wielkości, wzbogacenia sekwencji wirusowych RNA oraz przygotowania bibliotek (Maliogka i wsp. 2018). W chwili obecnej na rynku dostępne są zautomatyzowane systemy umożliwiające tworzenie gotowych bibliotek sekwencji kwasów nukleinowych np.: firma Beckman & Coulter wypuściła na rynek platformy Biomek umożliwiające automatyczne przygotowanie próbek do NGS, w których atutem jest możliwość zastosowania komercyjnie dostępnych zestawów z różnych firm np. NEB albo Illumina. Natomiast firma Agilent ma w swojej ofercie dwie platfomy NGS Workstation, jak również Magnis, do których sprzedaje kompatybilne zestawy. Dodatkowo producenci platform udostępniają specjalne zestawy upraszczające i standaryzujące konstrukcję bibliotek, które dodatkowo mogą być przygotowane do multipleksowania. Aby uzyskać jak najlepsze wyniki należy stosować wyjściowy kwas nukleinowy o wysokim stopniu czystości i jakości. W przeciwieństwie do innych metod diagnostyki molekularnej, czułość i koszt wykonania NGS jest bezpośrednio związany z liczbą i wzajemną proporcją sekwencji obecnych w całkowitym preparacie kwasów nukleinowych. Koszt sekwencjonowania wzrasta, gdy sekwencjonowana jest cała pula sekwencji obecnych w próbie, włącznie z sekwencjami roślinnymi czy pochodzącymi z mikroflory roślin lub gleby.

Sekwencjonowanie całkowitego kwasu nukleinowego poprzez sekwencjonowanie DNA wykrywa DNA wirusy, a poprzez sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) – RNA wirusy i DNA wirusy, które replikują się przez pośrednie RNA. Dlatego RNA-seq ma potencjał by stać się metodą uniwersalną w diagnostyce wirusów roślinnych, wykrywającą wszystkie patogeny wirusowe w jednej próbie. Dzięki temu detekcja pozbawiona jest wady selektywnego wykrywania konkretnej grupy wirusów. To podejście zostało po raz pierwszy zastosowane przez Adams i wsp. (2009) oraz Al Rwahnih i wsp. (2009). Ponadto metodę wykorzystywano do identyfikacji szeregu wirusów w marchwi oraz w owocach cytrusowych do identyfikacji nowego wirusa DNA gayfeather mild mottle virus (Adams i wsp. 2009, 2014).

Największą wadą sekwencjonowania całkowitego RNA/DNA jest to, że sekwencjonowane są wszystkie cząsteczki DNA/RNA obecne w próbie, wśród których większość to sekwencje roślinne, a sekwencje wirusowe stanowią ułamek frakcji całości. Zwiększa to całkowity koszt sekwencjonowania oraz czas analiz bioinformatycznych potrzebnych do odrzucenia sekwencji będących tłem roślinnym. Dlatego metodę tę modyfikowano, aby wzbogacić materiał wyjściowy o sekwencje wirusowe i ułatwić późniejsze analizy bioinformatyczne. Czułe wykrywanie wirusów za pomocą NGS wymagało więc opracowania sposobu wzbogacenia puli sekwencji wirusowych w izolowanych z badanych prób preparatach całkowitego RNA. Ponad 80% całkowitego RNA stanowi RNA rybosomalne (rRNA), a pula mRNA waha się między 1 a 5%. Zawartość RNA wirusowego w całkowitym RNA jest zmienna, lecz nawet przy wysokim mianie wirusa, nadal będzie stanowić nie-

wielką frakcję całkowitego RNA. Dlatego opracowano różne sposoby wzbogacania sekwencji wirusowych w badanych próbach (Fox i wsp. 2015).

Usuwanie rybosomalnego RNA (ang. ribosome depletion)
Metoda polegająca na usunięciu cząstek rRNA z preparatu całkowitego RNA. Ponieważ rRNA stanowi ponad 80% całkowitego RNA, jego usunięcie powoduje, że wzrasta dostępność wirusowego RNA. Obecnie dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów umożliwiających wykonanie tej procedury, których stosowanie zintegrowane jest z protokołem przygotowania bibliotek (RiboZero, Illumina, USA, RiboMinus, Life Technologies, USA). Obok siRNA (short interfering RNA), jest to obecnie jedna z najbardziej efektywnych metod wzbogacania sekwencji wirusowych w diagnostyce wirusów opartej o wykorzystanie NGS (Pecman i wsp. 2017).

Hybrydyzacja subtraktywna (ang. subtractive hybridization)
Ta technika polega na hybrydyzacji kwasów nukleinowych izolowanych z rośliny chorej z kwasami nukleinowymi izolowanymi z rośliny zdrowej i oddzieleniu (subtrakcji) puli hybrydyzującej od wolnych kwasów nukleinowych. Efektem subtrakcji powinno być usunięcie większości roślinnych kwasów nukleinowych z preparatu i pozostawienie w nim głównie DNA lub RNA wirusowego. Taka metodyka została z powodzeniem wykorzystana m.in. przez Adams i wsp. (2009). Mimo, że metoda jest atrakcyjna koncepcyjnie, wymaga dużego nakładu pracy i czasu. Ponadto duża liczba etapów stwarza ryzyko kontaminacji (Roossinck i wsp. 2015).

Krótkie interferujące RNA indukowane przez wirusy (ang. virus-induced short interfering RNA, vsiRNA)
Wirusy o genomach zbudowanych z jednoniciowego RNA stanowią największą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wirusów roślinnych. W trakcie replikacji ich genomowe RNA występuje w formie dwuniciowej (ang. double stranded RNA, dsRNA), ponadto w krótkim czasie wzrasta liczba jego kopii. W komórkach wszystkich żywych organizmów, włącznie z roślinnymi, duża koncentracja dsRNA jest sygnałem infekcji wirusowej i indukuje odpowiedź obronną określaną jako wyciszanie RNA lub interferencja RNA. W pierwszym etapie dsRNA jest rozpoznawane przez kompleks białkowy RISC (indukowany przez RNA kompleks wyciszający, ang. RNA-induced silencing complex). Wchodząca w skład kompleksu RISC rybonukleaza Dicer, trawi dwuniciowe RNA do indukowanych przez wirus krótkich interferujących cząsteczek RNA (vsiRNA) o długości 21–24 nukleotydów. Są one amplifikowane przez polimerazę również wchodzącą w skład kompleksu RISC. Dzięki temu powstaje wiele kopi vsiRNA, które pokrywają cały lub prawie cały genom infekującego roślinę wirusa (Hamilton i Baulcombe 1999). Dlatego izolując z rośliny krótkie RNA można zidentyfikować sekwencje wirusowe w badanej próbie. W takim preparacie znaczący udział stanowi vsiRNA, stanowiący naturalną „bibliotekę" fragmentów RNA komplementarnych do genomu wirusa. Ponadto preparat krótkich RNA jest pozbawiony rybosomalnego RNA i mRNA rośliny. Sekwencjonowanie vsiRNA zostało po raz pierwszy wykorzystane do wykrywania wirusów przez Kreuze i wsp. (2009), a szczegółowa metodyka została przedstawiona w publikacji Kutnjak i wsp. (2015). Ponadto sekwencjonowanie vsiRNA wykorzystano do wykrycia znanych i nieznanych wirusów roślinnych w drzewach owocowych (Barba i wsp. 2014). Zaletą tej strategii jest to, że siRNA można stosować nie tylko do wykrywania wirusów RNA i wiroidów, ale również DNA wirusów, ponieważ w ich cyklu życiowym występują transkrypty RNA, a także do wykrywania zintegrowanych endogennych elementów wirusowych (EVE), o ile są transkrybowane. Pecman i wsp. (2017) wykazali, że izolacja krótkich RNA jako sposób wzbogacania próby o genomy wirusowe daje lepsze wyniki niż rybodeplecja w przypadku wiroidów i wirusów o genomach RNA, jednakże w przypadku wirusów, których genomem jest DNA może mieć mniejszą czułość, ponieważ transkrypt RNA występuje u nich przejściowo. W efekcie sekwencjonowania vsiRNA powstaje pula bardzo krótkich sekwencji, co może komplikować proces składania genomu, szczególnie w przypadku nowych wirusów. Ponadto procedura jest stosunkowo trudna i czasochłonna. Jednak stosując ten sposób sekwencjonowania wykrywano wirusa Y ziemniaka (PVY) z czułością 10-krotnie większą niż za pomocą RT-qPCR (Santala i Valkonen 2018). O czułości metody świadczy również to, że za jej pomocą wykryto subgenomowe RNA wirusa liściozwoju ziemniaka (ang. potato leafroll virus, PLRV), którego nie dało się wcześniej wykryć innymi technikami (Hwang i wsp. 2013).

Dwuniciowe RNA (ang. double stranded RNA, dsRNA)
Genomy niektórych wirusów są zbudowane z dwuniciowego RNA. W zasadzie prawie całkowicie dwuniciowe są również koliste RNA wiroidów. Jak wspominano wyżej dsRNA powstaje również podczas replikacji większości wirusów roślin. Zaletą zastosowania dsRNA jest wzbogacenie wirusowego RNA w preparacie kwasów nukleinowych. Dwuniciowe RNA można specyficznie izolować wykorzystując do tego celulozę lub strącanie chlorkiem litu (Dodds i wsp. 1984). Jako pierwsi tę metodę wzbogacania sekwencji wirusowych zastosowali Al Rwahnih i wsp. (2009). Od tego czasu była z powodzeniem stosowana wielokrotnie (Barba i wsp. 2014; Roossinck i wsp. 2015; Maliogka i wsp. 2018). Wadą tej procedury jest to, że jest czasochłonna, skomplikowana do przeprowadzenia, selektywna względem niektórych wirusów i nie jest efektywna w przypadku (-)ssRNA wirusów, których genom jest zbudowany z jednoniciowego RNA o ujemnej polarności – nie pełni funkcji mRNA (Roossinck i wsp. 2015).

Obecne protokoły izolacji dsRNA opierają się na ekstrakcji fenol/chloroform w celu uzyskania mieszaniny cał-

kowitego DNA i RNA, z której frakcja dsRNA jest wzbogacana chromatograficznie na kolumnie z celulozą CF-11 (Dodds i wsp. 1984). Zmodyfikowaną metodę opublikował zespół Okada i wsp. (2015) do wyizolowania m.in. dsRNA z mykowirusa AaV1 obecnego w grzybach *Alternaria alternata*. Metoda ta oparta jest na zastosowaniu kolumienek wirowniczych (ang. micro-spin columns) zawierających celulozowe złoże pozwalające na specyficzną izolację dsRNA, które wraz z celulozą tworzy swoisty filtr na kolumience. Natomiast zespół Atsumi i wsp. (2015) w miejsce celulozy wykorzystali specyficzne białko GST-DRB4* wiążące dsRNA naturalnie obecne w roślinie rzodkiewnika pospolitego.

Procedura wykorzystująca dsRNA przyczyniła się do odkrycia wielu nowych wirusów RNA, np.: apricot vein clearing-associated virus (AVCaV) czy też nowego fabawirusa o nazwie cherry virus F (Elbeaino i wsp. 2014; Villamor i wsp. 2017).

Analizy bioinformatyczne / Bioinformatics

Jak opisano wyżej, odczytanie wirusowego genomu można przeprowadzić poprzez sekwencjonowanie *de novo* lub mapowanie względem znanej sekwencji referencyjnej. W chwili obecnej na rynku dostępnych jest kilka płatnych i darmowych (lecz o ograniczonej funkcjonalności) narzędzi bioinformatycznych do analizy wyników pochodzących z sekwencjonowania wirusów z zastosowaniem technologii NGS. Jones i wsp. (2017) szczegółowo opisali dostępne narzędzia bioinformatyczne, w tym: VirusHunter, VirFind, ezVIR, ViromeScan, Taxonomer, VIP, VirusDetect, VSD toolkit i Metavisitor. Jak pokazują wyniki, w chwili obecnej największą trudność w przystosowaniu NGS do diagnostyki sprawiają analizy bioinformatyczne, ponieważ efektem niewłaściwego składania są fałszywie pozytywne wyniki oraz nieprawidłowo poskładane genomy, co utrudnia prawidłową interpretację otrzymanych wyników. W 2019 roku Massart i wsp. (2019) wykonali porównanie analizy danych pochodzących z sekwencjonowania małych RNA (sRNA). W porównaniu wzięło udział 21 laboratoriów, z których każde zastosowało inny protokół bioinformatyczny do analiz. Odtwarzalność wyników pomiędzy laboratoriami biorącymi udział w porównaniu wynosiła 91,6%. Natomiast procent uzyskania fałszywie pozytywnych wyników był bardzo niski i wynikał głównie z błędnej interpretacji wyników. To badanie wskazało kluczowy wpływ analiz bioinformatycznych na końcowy wynik. Istnieje również niejednokrotnie konieczność potwierdzenia ostatecznych wyników alternatywnymi metodami, jakimi są: RT-PCR czy też sekwencjonowanie metodą Sangera, szczególnie gdy głębokość odczytu i pokrycie wirusa nie są wysokie.

Wnioski / Conclusions

Metody NGS umożliwiają jednoczesne wykrycie wielu wirusów obecnych w zakażonym materiale. Dzięki nim możliwe jest nie tylko stwierdzenie, jakie wirusy są obecne w jednej badanej próbie, ale również określenie ich zróżnicowania genetycznego. Oferuje to wyjątkowe możliwości w diagnostyce chorób roślin. Jednoczesna identyfikacja wielu wirusów, możliwość wczesnego wykrywania ognisk choroby, śledzenia rozwoju epidemii oraz monitorowanie zmian genetycznych zachodzących w populacji patogenów wirusowych w trakcie rozwoju epidemii sprawiają, że NGS jest uniwersalnym narzędziem diagnostycznym i badawczym umożliwiającym nie tylko detekcję, ale również zrozumienie mechanizmów molekularnych pozwalających wirusom adaptować się do zmian środowiskowych (genotypu rośliny – gospodarza, wektora, obecności innych patogenów). NGS, aby stać się podstawową i rutynową metodą do wykrywania wirusów roślinnych wymaga jeszcze walidacji i odpowiedniego przystosowania protokołów bioinformatycznych.

Podziękowania / Acknowledgements

Prace badawcze finansowane są przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów MINIATURA 3 (2019/03/X/NZ9/01007) oraz OPUS 11 (UMO-2016/21/B/NZ9/03573).

Literatura / References

Adams I., Fox A. 2016. Diagnosis of plant viruses using next-generation sequencing and metagenomic analysis. s. 323–335. W: Current Research Topics in Plant Virology (A. Wang, X. Zhou, red.). Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-32919-2_14

Adams I.P., Glover R.H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., Samuitiene M., Boonham N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathology 10 (4): 537–545. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x

Adams I.P., Skelton A., Macarthur R., Hodges T., Hinds H., Flint L., Nath P.D., Boonham N., Fox A. 2014. *Carrot yellow leaf virus* is associated with carrot internal necrosis. PLOS ONE 9: 109–125. DOI: 10.1371/journal.pone.0109125

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 (2): 395–401. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.028

Atsumi G., Sekine K.T., Kobayashi K. 2015. A new method to isolate total dsRNA. s. 27–37. W: Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 1236 (I. Uyeda, C. Masuta C., red.). Humana Press, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-4939-1743-3_3

Barba M., Czosnek H., Hadidi A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6 (1): 106–136. DOI: 10.3390/v6010106

Bayley H. 2015. Nanopore sequencing: from imagination to reality. Clinical Chemistry 61 (1): 25–31. DOI: 10.1373/clinchem.2014.223016

Bayley H., Cremer P.S. 2001. Stochastic sensors inspired by biology. Nature 413: 226–230. DOI: 10.1038/35093038

Bronzato Badial A., Sherman D., Stone A., Gopakumar A., Wilson V., Schneider W., King J. 2018. Nanopore sequencing as a surveillance tool for plant pathogens in plant and insect tissues. Plant Disease 102 (8): 1648–1652. DOI: 10.1094/PDIS-04-17-0488-RE

Della Bartola M., Byrne S., Mullins E. 2020. Characterization of potato virus Y isolates and assessment of nanopore sequencing to detect and genotype potato viruses. Viruses 12 (4): 478. DOI: 10.3390/v12040478

Dodds J.A., Morris T.J., Jordan R.L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. Annual Review of Phytopathology 22: 151–168. DOI: 10.1146/annurev.py.22.090184.001055

Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., deWinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korlach J., Turner S. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 323 (5910): 133–138. DOI: 10.1126/science.1162986

Elbeaino T., Giampetruzzi A., De Stradis A., Digiaro M. 2014. Deep-sequencing analysis of an apricot tree with vein clearing symptoms reveals the presence of a novel betaflexivirus. Virus Research 181: 1–5. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.030

Filloux D., Fernandez E., Loire E., Claude L., Galzi S., Candresse T., Winter S., Jeeva M., Makeshkumar T., Martin D.P. 2018. Nanopore-based detection and characterization of yam viruses. Scientific Reports 8: 17879. DOI: 10.1038/s41598-018-36042-7

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806–811. DOI: 10.1038/35888

Fox A., Adams I., Hany U., Hodges T., Forde S., Jackson L., Skelton A., Barton V. 2015. The application of next-generation sequencing for screening seeds for viruses and viroids. Seed Science and Technology 43 (3): 531–535. DOI: 10.15258/sst.2015.43.3.06

Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Reviews Genetics 17: 333–351. DOI: 10.1038/nrg.2016.49

Hamilton A.J., Baulcombe D.C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286 (5441): 950–952. DOI: 10.1126/science.286.5441.950

Hwang Y.T., Kalischuk M., Fusaro A.F., Waterhouse P.M., Kawchuk L. 2013. Small RNA sequencing of *Potato leafroll virus*-infected plants reveals an additional subgenomic RNA encoding a sequence-specific RNA-binding protein. Virology 438 (2): 61–69. DOI: 10.1016/j.virol.2012.12.012

Jones S., Baizan-Edge A., MacFarlane S., Torrance L. 2017. Viral diagnostics in plants using next generation sequencing: computational analysis in practice. Frontiers in Plant Sciewnce 8: 1770. DOI: 10.3389/fpls.2017.01770

Kreuze J.F., Perez A., Untiveros M., Quispe D., Fuentes S., Barker I., Simon R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. Virology 388 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.virol.2009.03.024

Kutnjak D., Rupar M., Gutierrez-Aguirre I., Curk T., Kreuze J.F., Ravnikar M. 2015. Deep sequencing of virus-derived small interfering RNAs and RNA from viral particles shows highly similar mutational landscapes of a plant virus population. Journal of Virology 89 (9): 4760–4769. DOI: 10.1128/JVI.03685-14

Maliogka V., Minafra A., Saldarelli P., Ruiz-García A., Glasa M., Katis N., Olmos A. 2018. Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies. Viruses 10 (8): 436. DOI: 10.3390/v10080436

Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.-J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.-B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437: 376–380. DOI: 10.1038/nature03959

Massart S., Chiumenti M., De Jonghe K., Glover R., Haegeman A., Koloniuk I., Komínek P., Kreuze J., Kutnjak D., Lotos L., Maclot F., Maliogka V., Maree H.J., Olivier T., Olmos A., Pooggin M.M., Reynard J.S., Ruiz-García A.B., Safarova D., Schneeberger P.H.H., Sela N., Turco S., Vainio E.J., Varallyay E., Verdin E., Westenberg M., Brostaux Y., Candresse T. 2019. Virus detection by high-throughput equencing of small RNAs: large-scale performance testing of sequence analysis strategies. Phytopathology 109 (3): 488–497. DOI: 10.1094/PHYTO-02-18-0067-R

Minicka J., Zarzyńska-Nowak A., Budzyńska D., Borodynko-Filas N., Hasiów-Jaroszewska B. 2020. High-throughput sequencing facilitates discovery of new plant viruses in Poland. Plants 9 (7): 820. DOI: 10.3390/plants9070820

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. W: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51: 263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032

Noceń J., Puchta M., Czembor J.H. 2018. Wykorzystanie nowoczesnych technologii sekwencjonowania DNA (NGS) w bankach genów i hodowli roślin. Praca przeglądowa. [Using the next generation DNA sequencing (technology NGS) in gene banks and plant breeding. A review]. Agronomy Sciences 73 (1): 5–17. DOI: 10.24326/asx.2018.1.1

Okada R., Kiyota E., Moriyama H., Fukuhara T., Natsuaki T. 2015. A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. Journal of General Plant Pathology 81: 103–107. DOI: 10.1007/s10327-014-0575-6

Pecman A., Kutnjak D., Gutiérrez-Aguirre I., Adams I., Fox A., Boonham N., Ravnikar M. 2017. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. Frontiers in Microbiology 8: 1998. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01998

Roossinck M.J., Martin D.P., Roumagnac P. 2015. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. Phytopathology 105 (6): 716–727. DOI: 10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW

Sanger F., Brownlee G.G., Barrell B.G. 1965. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. Journal of Molecular Biology 13 (2): 373–398. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80104-8

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 (12): 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463

Santala J., Valkonen J.P.T. 2018. Sensitivity of small RNA-based detection of plant viruses. Frontiers in Microbiology 9: 939. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00939

Smith L.M., Sanders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B., Hood L.E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 321: 674–679. DOI: 10.1038/321674a0

Stoddart D., Heron A.J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. 2009. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (19): 7702–7707. DOI: 10.1073/pnas.0901054106

Villamor D.E., Pillai S.S., Eastwell K.C. 2017. High throughput sequencing reveals a novel fabavirus infecting sweet cherry. Archives of Virology 162: 811–816. DOI: 10.1007/s00705-016-3141-z

Watson J.D., Crick F.H. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171 (4356): 737–738. DOI: 10.1038/171737a0

Żmieńko A., Satyr A. 2020. Sekwencjonowanie nanoporowe i jego zastosowanie w biologii. Postępy Biochemii/Advances in Biochemistry 66 (3): 193–204. DOI: 10.18388/pb.2020_328