مجله پژوهش‌های راهبردی در علوم کشاورزی و منابع طبیعی جلد ۹ شماره ۱ صفحه‌های ۵۱ تا ۶۴ (۱۴۰۳)

مروری کوتاه بر فناوری‌های نوین در زمینه سنجش و مدیریت بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی گیاهان ۱ – سنجش[1]

کرامت‌اله ایزدپناه[2،3]

چکیده

برای مدیریت موفقیت‌آمیز بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی گیاهان، سنجش[4] موثر بیمارگرها ضروری است. سنجش ممکن است زیستی[5] (مبتنی بر عفونت‌زایی)، ریخت‌شناختی[6] (شکل و اندازه برای نمونه بر مبنای الکترون میکروسکوپی) یا براساس ویژگی‌های پروتئین و نوکلئیک اسید بیمارگر باشد. شیوه‌های مبتنی بر ویژگی‌های پروتئین دربرگیرنده روش‌های گوناگون سرولوژیک مانند ELISA[7]، میکروآری، الکتروفورز و حسگرهای زیستی است. شیوه‌های مبتنی بر ویژگی‌های ژنوم بیمارگر دربرگیرنده دورگه‌سازی نوکلئیک اسید، الکتروفورز، تراشه میکروآری، انواع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[8] و توالی‌یابی‌های نسل جدید (NGS)[9] است. ترکیبی از روش‌های مختلف (مانند immuno-electron microscopy، immunoelectrophoresis و immunocapture PCR) نیز ممکن است بهره‌گیری شوند. در این مقاله به قابلیت اجرا، حساسیت، اختصاصیت و موردهای استفاده از این روش‌ها اشاره شده است. در حال حاضر، متداول‌ترین و کاراترین فناوری‌ها برای ردیابی هدفمند بیمارگرهای ویروسی و شبه ویروسی ELISA، PCR، LAMP[10] و انواع روش‌های مبتنی بر این‌ها و برای شناسایی و ردیابی غیرهدفمند انواع بیمارگرها در گیاه، فناوری‌های مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید است. بیوانفورماتیک در موفقیت و پیشرفت این فناوری‌ها نقش برجسته‌ای داشته است. همه این فناوری‌ها بوم‌سازگار و در داخل کشور قابل اجرا هستند.

واژه‌های کلیدی: پروژه پژوهشی، ردیابی ویروس، فرهنگستان علوم، فناوری‌های نوین ردیابی.

مقدمه

از زمان شناسایی ویروس‌ها به عنوان گروه جدیدی از بیمارگرهای گیاهی (Beijerinck, 1898)، سنجش ویروس همواره یکی از دغدغه‌های دانشمندان بوده است؛ زیرا بدون کاربرد یکی از شیوه‌های سنجش، انجام پژوهش‌های موثر در مورد ویروس‌ها، اگر نه غیر ممکن، ولی بسیار دشوار بود. از سوی دیگر، مدیریت بیماری‌های ویروسی گیاهان نیز بدون سنجش موثر ویروس

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۷
بخشی از طرح «بررسی فناوری‌های نوین بوم‌سازگار در کشاورزی و منابع طبیعی» گروه علوم کشاورزی فرهنگستان علوم ج. ا. ایران.
۲- نویسنده مسئول، پست الکترونیک: izadpana@shirazu.ac.ir
۳- استاد دانشگاه شیراز (عضو پیوسته فرهنگستان علوم ج. ا. ایران).

4. Assay 5. Biological 6. Morphological 7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
8. Polymerase chain reaction (PCR) 9. Next generation sequencing (NGS)
10. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

امکان‌پذیر نمی‌باشد. در این جا لازم است اشاره شود که سنجش ممکن است چونی[1] یا چندی[2] باشد. سنجش چونی یا کیفی دربرگیرنده تشخیص[3] و ردیابی[4] و سنجش چندی یا کمی عبارت از اندازه‌گیری مقدار یا غلظت ویروس است.

به دلیل غیرقابل کشت بودن در محیط مصنوعی، وابستگی کامل به یاخته‌های زنده و اندازه بسیار کوچک، روش‌های اولیه سنجش ویروس‌ها به طور عمده زیستی و بر پایه عفونت‌زایی بود. تعیین دامنه میزبانی، نوع واکنش و نشانه‌ها روی گیاهان محک نسبت به مایه‌زنی مکانیکی محیط دارای ویروس و به دنبال آن بررسی واکنش ایجاد شده و درصد گیاهان مبتلا شده، شیوه اولیه سنجش در بررسی ویروس موزائیک توتون (TMV)[5] بود. کشف این پدیده که TMV پس از مایه‌زنی مکانیکی در برخی از گیاهان به‌جای نشانه‌های سیستمیک، لکه‌های موضعی ایجاد می‌کند و این‌که تعداد این لکه‌ها متناسب با غلظت ویروس است و نیز لکه‌های موضعی در مقایسه با نشانه‌های سیستمیک در مدت بسیار کوتاه‌تری پدیدار می‌شوند، تحولی در روش سنجش چندی به وجود آورد (Holmes, 1929; Roberts, 1964)، اما برای بیشتر ویروس‌ها، میزبان با نشانه لکه موضعی قابل دید وجود نداشت و برای بخشی از آن‌ها که به طور مکانیکی قابل انتقال بودند، تشخیص با تعیین دامنه میزبانی و نوع نشانه‌های آن‌ها و سنجش کمی با تعیین درصد گیاهانی که پس از مایه‌زنی تولید نشانه می‌کردند، انجام می‌شد. تلاش‌های زیادی شده بود که برای هر ویروس فهرست گیاهان حساس و غیرحساس تهیه و در دسترس پژوهشگران قرار بگیرد (برای نمونه Horvath, 1993 و Brunt *et al*., 1996 را ببینید).

روش‌های سنجش زیستی با وجود برخورداری از حساسیت زیاد، بدون دقت لازم و بسیار وقت‌گیر بودند و نتایج حاصل از آن‌ها از شرایط محیط، نوع و رقم گیاه و بسیاری از عامل‌های کوچک و بزرگ دیگر تاثیرپذیر بودند. در نتیجه، دانشمندان همواره در پی یافتن و کاربرد روش‌های دیگر برای سنجش بودند. در دهه‌های سوم تا ششم سده بیستم، روش‌های بیشمار شیمیایی و فیزیکی برای سنجش ویروس‌ها ابداع شدند که شاخص‌ترین آن‌ها استفاده از الکترون میکروسکوپ بود. تحول دیگری که در این دوره رخ داد کشف ویروس‌های گیاهی دیگر و همچنین قابلیت ایمنی‌زایی TMV و سایر ویروس‌ها در بدن جانوران آزمایشگاهی بود که به ابداع و کاربرد انواع روش‌های سرولوژیک در سنجش چندی و چونی ویروس‌ها انجامید. این روش‌ها به مراتب آسان‌تر، سریع‌تر و اختصاصی‌تر بودند و یکی از آن‌ها که بر مبنای واکنش آنزیمی ELISA قرار داشت، نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر آسان‌تر، حساس‌تر و دقیق‌تر بود.

سنجش ویروس نه‌تنها از جهت بررسی‌های علمی بلکه از نظر مدیریت بیماری‌های ویروسی نیز پراهمیت است. به عبارت دیگر، رابطه تنگاتنگی میان سنجش ویروس و کنترل بیماری ناشی از آن وجود دارد. نمونه ملموس آن نقش آزمون‌های PCR در مدیریت همه‌گیری اخیر کرونا بود.

امروزه نیز به‌طور کم و بیش از بسیاری از شیوه‌های فیزیکی، شیمیایی و سرولوژیک و حتی زیستی سنجش ویروس استفاده می‌شود، اما در این‌جا تنها به برخی از آن‌ها به طور اختصار اشاره شده و تاکید بیشتر این مقاله بر فناوری‌های جدید و کاربرد شیوه‌های مولکولی خواهد بود. پیشرفت‌های جدید در این زمینه به طور عمده در جهت افزایش حساسیت، دقت، سرعت، اختصاصیت و آسانی اجرا بوده است (Cassedy *et al*., 2021).

روش‌های مبتنی بر ایمنی‌زایی

پس از این‌که معلوم شد TMV و بسیاری از ویروس‌های گیاهی دیگر می‌توانند در بدن جانور تولید پادتن[6] اختصاصی را تحریک کنند، شیوه‌های تشخیص و ردیابی سرولوژیک این ویروس‌ها رونق گرفت و در پژوهش‌های ویروس‌شناسی

1. Qualitative 2. Quantitative 3. Diagnosis 4. Detection 5. Tobacco mosaic virus (TMV) 6. Antibody

نقش بسیار مهمی دارد. برتری روش‌های سرولوژیک آسانی اجرا و اختصاصی بودن آن‌ها بود. روش‌هایی مانند آزمون نشت در آگار[۱] سال‌ها برای شناسایی و تعیین رابطه ویروس‌ها به‌کار گرفته شدند و هنوز هم کاربرددارند. کاستی این روش‌ها کم بودن حساسیت و دشواری چندی (کمی)سازی آن‌ها بود. برای رفع برخی از این کاستی‌ها از شیوه‌هایی مانند رسوب در قطره‌های ریز[۲] و تعیین آخرین حد رقیق شدن آنتی‌ژن برای انجام واکنش استفاده می‌شد. شیوه دیگر فایق آمدن بر مشکل سنجش، تلفیق سرولوژی با روش‌های دیگر بود که از آن میان می‌توان تلفیق با الکترون‌میکروسکوپی[۳]، تلفیق با الکتروفورز و تلفیق با واکنش آنزیمی را نام برد.

در تلفیق با الکترون میکروسکوپی، به‌دام‌اندازی[۴] پیکره‌های ویروس توسط مولکول‌های پادتن، حساسیت سنجش میکروسکوپی را افزایش می‌دهد و مشاهده هاله‌ای از پادتن در پیرامون پیکره ویروس[۵] سنجش چونی (تشخیص) ویروس را تکمیل می‌کند. برای رفع کمبود تمایز رنگی[۶] پیکره‌های ویروس در میکروسکوپ، افزون بر رنگ‌آمیزی منفی یا مثبت، از برچسب ذره‌های فلزی مانند طلا[۷]، به ویژه برای تعیین جایگاه ویروس در یاخته استفاده می‌شود (Milne, 1993). یکی از روش‌های تلفیق سرولوژی با الکتروفورز که هنوز هم از آن استفاده می‌شود، آزمون لکه‌گذاری پروتئین[۸] است که بیشتر برای تعیین هویت پروتئین‌ها و تشخیص ویروس‌ها به‌کار می‌رود.

پیشرفت دیگری که در دهه ۱۹۷۰ میلادی در زمینه سنجش ویروس به وجود آمد، ابداع شیوه‌های تلفیق سرولوژی با واکنش آنزیمی بود که ELISA نامیده شد و در آن از اختصاصیت پادتن و ایجاد حساسیت زیاد توسط آنزیم متصل به آن استفاده می‌شود. روش‌های ELISA افزون بر افزایش فراوان حساسیت، قابل کمی‌کردن هستند، با کاهش مقدار مصرف پادتن و دیگر مواد لازم، ارزان‌تر از دیگر روش‌ها تمام می‌شوند و توانایی آزمایش همزمان صدها نمونه را در یک روز دارند. در شیوه‌های گوناگون ELISA به طور معمول واکنش در داخل حفره‌های میکروپلیت از جنس پلی‌استایرین انجام می‌شود و نتیجه پایانی به‌طور چشمی سنجیده شده و یا به‌کمک دستگاه پلیت ریدر[۹] که مقدار جذب نور در طول موج معینی را نشان می‌دهد، اندازه‌گیری می‌شود. با ماشینی کردن مرحله‌های مختلف آزمون ELISA این امکان بوجود آمده که نمونه مورد آزمایش از یک سو وارد یک سیستم زنجیره‌ای شده و از سوی دیگر نتایج ثبت‌شده خارج شود.

این توانمندی‌های ELISA موجب شده که با وجود رواج روش‌های مولکولی، هنوز یکی از شیوه‌های متداول سنجش ویروس‌ها و پروتئین‌ها در آزمایشگاه‌های پزشکی و بیماری‌شناسی گیاهی باشد. با وجود این، آزمون‌های ELISA هرچند در اصول یکسان هستند در شیوه اجرا از تنوع زیادی برخوردارند. در این جا تنها از دو روش DIBA[۱۰] و TPIA[۱۱] نام برده می‌شود که می‌توانند جنبه کاربردی بیشتری داشته باشند. در این دو روش، تهیه نمونه بسیار آسان است و به جای میکرو پلیت از صفحه کاغذ نیتروسلولز یا نایلون استفاده می‌شود و با گذاشتن قطره کوچکی از عصاره یا فشار دادن برشی از بافت روی کاغذ، نمونه برای مرحله‌های بعدی آماده می‌شود (Hibi & Saito, 1985; Huth, 1999). بدین ترتیب، می‌توان به آسانی و بدون نیاز به وسیله‌های ویژه نمونه را تهیه و آن را برای مرحله‌های بعدی آزمایش نگهداری و یا برای ادامه آزمایش به آزمایشگاه دوردستی ارسال کرد. این روش‌ها برای ردیابی ویروس‌ها در مزرعه‌ها و باغ‌ها به خوبی اجراشدنی است، همان‌طور که چند سال پیش برای ردیابی ویروس تریستزا در ناحیه‌های مرکبات‌خیز جنوب کشور مورد استفاده قرار گرفت.

1. Agar-gel diffusion test
2. Microprecipitin test
3. Serologically specific electron microscopy
4. Trapping
5. Decoration
6. Contrast
7. Gold labeling
8. Western blotting
9. Plate reader
10. Dot immunobinding assay
11. Tissue-print immune assay

یکی دیگر از کاربردهای ایمونولوژی در ردیابی و تشخیص، استفاده از آن در سنجش نشت جانبی[1] است. در این آزمون ماده‌ای که قرار است سنجش شود (پروتئین، نوکلئیک اسید، ویروس، سم، هورمون یا یک ترکیب شیمیایی) در انتهای یک نوار باریک کاغذی (به طور معمول از جنس سلولز) بارگذاری می‌شود و به روش موئینگی (کاپیلاری) درون نوار حرکت می‌کند و وقتی به ماده ردیاب[2] که روی نوار جاسازی شده برسد، با آن ترکیب و تشکیل باندی می‌دهد که با چشم دیده می‌شود و می‌توان با دستگاه آن را خوانش‌کرد. برای ویروس‌ها و پروتئین‌ها یکی از مواد ردیاب پادتن ماده‌ای است که قرار است شناسایی شود و روش کاربرد آن LIFA[3] نام دارد. این آزمون بسیار سریع است و می‌تواند در مدت ۳۰ دقیقه به نتیجه برسد (Bahadir & Sezginturk, 2016; Koczula & Gallotta, 2016).

سنجش نشت جانبی روشی آسان، ارزان، اجراشدنی در شرایط مختلف و بدون نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت است. از این روش در پزشکی برای آزمایش ترشح‌های مختلف بدن (بزاق، خون، ادرار و عرق) و در صنایع غذایی برای آزمایش ترکیب‌های مختلف و آلاینده‌های محیط و آب استفاده می‌شود. در گیاهان می‌توان از عصاره خام گیاه برای ردیابی ویروس یا پروتئین‌های ویژه و هورمون‌ها استفاده کرد. اجرای آن نیاز به تخصص ندارد چنان‌که آزمایش بارداری به آسانی توسط خانم‌های خانه‌دار انجام می‌گیرد. با وجود این ویژگی‌های سودمند، هنوز آن‌طور که باید و شاید این روش برای سنجش ویروس‌های گیاهی مورد استفاده قرار نگرفته است.

هرچند واکنش‌های سرولوژیک اختصاصی هستند، گاه لازم است (به ویژه در بررسی همه‌گیری) واریانت معین یا گروه معینی از واریانت‌های ویروس یا پروتئین ردیابی شوند. در این صورت می‌توان از پادتن یک‌همسانه‌ای[4] استفاده کرد. از آن‌جا که یاخته‌های نوع B که مولد پادتن هستند، هر یک ممکن است پادتن متفاوتی از یک ویروس یا پروتئین تولید کنند، در این روش به منظور خالص‌سازی، تنها از یک یاخته تولیدکننده پادتن استفاده می‌شود که آن را در محیط کشت خارج از بدن تکثیر و یک همسانه[5] تولیدکننده پادتن از آن تهیه می‌کنند. البته، برای این‌که بتوان این یاخته را در محیط کشت به طور نامحدود تکثیر کرد، آن را با یک یاخته سرطانی ترکیب و به اصطلاح یک هیبریدوما[6] تهیه و از آن استفاده می‌کنند.

قابلیت اجرا و کاستی‌های سرولوژی

روش‌های سرولوژیک برای سنجش ویروس‌ها و بیمارگرهای دیگر بسیار مفید و همگی در ایران اجراشدنی هستند. پادتن لازم برای این آزمایش‌ها را می‌توان در داخل کشور تولید یا با قیمت گزاف از خارج تهیه کرد. یکی از دشواری‌های تهیه پادتن در داخل کشور، لزوم خالص‌سازی ایمیونوژن (ویروس یا پروتئین) پیش از تزریق به جانور آزمایشگاهی است که امکان انجام آن در بسیاری از آزمایشگاه‌ها وجود ندارد. با کاربرد فناوری پروتئین نوترکیب[7] که هم اکنون در بسیاری از آزمایشگاه‌های کشور اجراشدنی است، تولید پروتئین پوششی یا هر پروتئین دیگر ویروس برای تزریق به جانور آزمایشگاهی امکان‌پذیر شده است. بدیهی است برای تولید پروتئین نوترکیب دانستن ترادف نوکلئوتیدی ژن آن پروتئین و تکثیر و همسانه‌سازی آن ضروری است. همچنین، روش‌های سرولوژیک برای ویروئیدها که پوشش پروتئینی (آنتی‌ژن) ندارند و فیتوپلاسماها که کشت یا جداسازی آن‌ها از گیاه امکان‌پذیر نشده اجراشدنی نیست، هرچند تولید پادتن یک‌همسانه‌ای و استفاده از آن در ردیابی و تشخیص فیتوپلاسما[8] گزارش شده است (Loi *et al.*, 2002) و تولید پادتن بر ضد پروتئین‌های نوترکیب فیتوپلاسمایی (به ویژه پروتئین‌های غشایی) امکان‌پذیر است. همچنین، در موردهایی سعی شده که با تزریق عصاره

1. Lateral flow assay (LFA) 2. Detector 3. Lateral immunoflow assay
4. Monoclonal antibody 5. Clone 6. Hybridoma 7. Recombinant protein 8. Phytoplasma

گیاه مبتلا به جانور آزمایشگاهی برای مجموعه پروتئین‌های موجود در گیاه (از جمله فیتوپلاسما) آنتی‌سرم تهیه شود و سپس با جذب پادتن‌های گیاه سالم از این مجموعه (به کمک عصاره گیاه سالم)، برای فیتوپلاسما آنتی‌سرم ضعیفی به دست آید (Salehi *et al*., 2011; Salehi *et al*., 2016). به همین دلیل، سیستم تشخیص سرولوژیک مناسب و کارا برای باکتری سخت‌کشت عامل هوانگ‌لانگ‌بینگ[1] مرکبات نیز تهیه نشده است. این در حالی است که برای اسپیروپلاسمای عامل استابورن مرکبات[2] که قابل کشت در محیط مصنوعی است دشواریی برای تهیه پادتن وجود نداشته است. خوشبختانه در مواردی که برای ردیابی اختصاصی استفاده از واکنش سرولوژیک امکان‌پذیر نیست، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توانسته است این کاستی را جبران کند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

یکی از موثرترین تحول‌های زیست‌فناوری ابداع و رواج شیوه‌های PCR در سال‌های آخر قرن بیستم بود که در آن تولید میلیون‌ها نسخه از روی یک مولکول DNA در عرض چند دقیقه تا چند ساعت امکان‌پذیر شده است (Mullis *et al*., 1986). شیوه‌های PCR به طور فزاینده‌ای در ردیابی، تشخیص و بررسی ویروس‌ها و سایر بیمارگرها مورد استفاده قرار گرفته‌اند و کمتر آزمایشگاهی می‌توان یافت که امکان استفاده از این شیوه‌ها را نداشته باشد. از آن‌جا که بیشتر ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم RNA هستند، لازم است ابتدا ژنوم یا قطعه مورد آزمایش با فرایندی به نام ترانویسی برعکس[3] به کمک یک آنزیم ترانسکریپتاز برعکس[4] به DNA تبدیل شده و سپس تکثیر یابد. این آنزیم می‌تواند همزمان با دیگر اجزای واکنش به محیط PCR اضافه شود. به تازگی نیز آنزیمی ساخته شده که می‌تواند هم کار ترانویسی برعکس و هم کار پلیمراز DNA را انجام دهد (Hoffmeistereva *et al*., 2022).

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در PCR تشخیص مقدماتی ویروس با الکتروفورز محصول PCR امکان‌پذیر و اغلب در همین حد کافی است. برای اطمینان بیشتر و جستجوی گوناگونی و تغییرهای احتمالی، محصول PCR تعیین ترادف می‌شود و مورد بررسی بیشتر قرار می‌گیرد. در رابطه با روش‌های بر پایه PCR توجه به چند نکته زیر ضروری است:

۱- برای تشخیص همزمان چند ویروس می‌توان از PCR چندگانه[5] استفاده کرد که در آن آمیخته‌ای از آغازگرهای چند ویروس مورد نظر به کار می‌رود. در طراحی آغازگرها دقت می‌شود که دمای اتصال آن‌ها نزدیک به هم و طول قطعه حاصل از آن‌ها متفاوت باشد تا بتوان در الکتروفورز، آن‌ها را شناسایی و از هم جدا نمود.

۲- برای تعیین گروه احتمالی بیمارگرها می‌توان از آغازگرهای عمومی یا آغازگرهای دژنره[6] استفاده کرد. این نوع آغازگرها برای چندین گروه از بیمارگرها از جمله پوتی‌ویروس‌ها، جمینی‌ویروس‌ها، فیتوپلاسماها و ویروئیدها وجود دارد.

۳- امکان دارد در موردهایی که غلظت ویروس در گیاه کم است نتیجه مناسبی از PCR معمولی (یک مرحله‌ای) حاصل نشود. چنین وضعیتی در ردیابی ویروس‌ها و بیمارگرهای شبه ویروسی درختان زیاد مشاهده شده است. یکی از راه‌های متداول برای رفع این دشواری استفاده از PCR دومرحله‌ای[7] است که در آن محصول دور اول PCR به کمک آغازگرهای جدیدی برای دور دوم PCR می‌شود. راه دوم تلفیق PCR با ایمونولوژی[8] است که در آن عامل مورد نظر ابتدا به کمک پادتن اختصاصی (در صورت وجود) در لوله آزمایش به دام انداخته می‌شود و سپس آزمون PCR انجام می‌گیرد. راه دیگر کاربرد PCR کمی Real time است که حساسیت آن بیشتر از PCR معمولی است.

1. Huanglongbing (HLB) 2. Citrus stubborn 3. Reverse transcription 4. Reverse transcriptase
5. Multiplex PCR 6. Degenerate primers 7. Nested PCR 8. Immunocapture PCR

۴- روش‌های پایه‌ای PCR به طور کلی کیفی (غیرکمی) هستند. برای تعیین غلظت بیمارگر در محیط، لازم است از روش‌های کمی مانند Real time PCR استفاده شود. در این روش، تکثیر DNA و سنجش آن همزمان انجام و از این رو زمان لازم برای انجام آزمون کاهش می‌یابد، غلظت بیمارگر در نمونه اولیه قابل اندازه‌گیری است و در ضمن حساسیت ردیابی نیز افزایش می‌یابد (Shabani *et a*l., 2021).

در بررسی‌های همه‌گیرشناسی که مستلزم بررسی شمار زیادی نمونه از باغ‌ها یا مزرعه‌ها است، می‌توان با فشار دادن برش تازه‌ای از ساقه یا برگ روی کاغذ نیتروسلولوز یا نایلون (همان طور که در مورد TPIA گفته شد) نمونه اولیه را برداشت کرد (Nagata *et al*., 2004). پس از خشک‌شدن و در زمان و مکان مناسب برش کوچکی از کاغذ (۰/۵ تا ۱ میلی‌متر مربع) به جای نمونه گیاه در PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از برتری‌های روش‌های PCR نسبت به روش‌های سرولوژیک یکی سرعت عمل و حساسیت بیشتر PCR و دیگری آسان‌تر بودن تهیه آغازگرهای اختصاصی نسبت به تهیه پادتن‌های اختصاصی و کیت‌های سرولوژیک است. لزوم خالص‌سازی ایمیونوژن، فرایند تولید و استخراج پادتن از بدن جانور آزمایشگاهی و محدودیت استفاده از جانورهای آزمایشگاهی برای تهیه پادتن در برخی از کشورها نیز از دیگر دشواری‌های کاربرد آزمون‌های سرولوژیک است. پادتن برای آزمون سرولوژیک همیشه در اختیار نیست، در حالی که آغازگرهای لازم برای PCR را در هر زمان می‌توان ساخت. شوربختانه، در حال حاضر موسسه قابل اطمینانی برای ساخت آغازگر و سایر مواد لازم برای آزمون‌های PCR و تعیین ترادف محصول PCR در داخل کشور وجود ندارد و پژوهشگران داخلی برای تهیه مواد لازم به چند شرکت خارجی وابسته بوده و مجبور به پرداخت هزینه‌های گزاف ارزی هستند که اغلب از عهده آن برنمی‌آیند.

LAMP[1]

افزون بر PCR، چندین روش دیگر نیز برای فراوان‌سازی DNA و ردیابی ویروس‌ها یافت شده که بیشتر آن‌ها در پژوهش‌های ویژه پزشکی مورد استفاده‌اند (Cassedy *et al*., 2021; Gill *et al*., 2008; Shabani *et al*., 2021). از میان آن‌ها، از روش‌های بر پایه LAMP در بیماری‌شناسی گیاهی بیشتر استفاده می‌شود (Panno *et al*., 2020). در روش‌های LAMP-پایه که در سال ۲۰۰۰ میلادی توسط Notomi *et al*. (2000) ابداع شد، به جای پلیمراز Taq (که از آن در PCR استفاده شده است) از پلیمراز Bst (که از *Geobacillus stearothermophilus* به دست آمده)، بهره‌گیری می‌شود. این پلیمراز در دمای یکنواخت ۶۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس فعال است و DNA را از راه جایگزینی رشته[2] تکثیر می‌کند. ساخت رشته‌های DNA همراه با تشکیل حلقه[3] در انتهای رشته‌ها انجام می‌گیرد. اختصاصی بودن واکنش‌ها با استفاده از ۴ تا ۶ آغازگر تامین می‌شود. انجام واکنش را می‌توان به کمک نشانگرهای مختلف سنجید. با این روش می‌توان در مدت کمتر از یک ساعت یک میلیارد نسخه از روی DNA تولید کرد (Panno *et al*., 2020).

یک برتری LAMP بر PCR نبود نیاز آن به دستگاه گران‌قیمت و حساس (ترموسایکلر) است که از آن در PCR استفاده می‌شود. سرد و گرم کردن پی‌درپی محیط واکنش در PCR گاهی باعث کاهش یا از بین رفتن اختصاصیت می‌شود. پلیمراز Taq نسبت به بازدارنده‌ها که اغلب در عصاره گیاه وجود دارند، حساس است. در حالی که پلیمراز Bst کمتر زیر تاثیر بازدارنده‌ها قرار می‌گیرد. به دلیل سرعت عمل زیاد و اختصاصیت بیشتر، روش LAMP برای ردیابی بیمارگرها در پست‌های قرنطینه مناسب‌تر از PCR خواهد بود.

1. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 2. Strand displacement 3. Loop

فراوان‌سازی دایره غلتان[1]

یکی دیگر از راه‌های تکثیر DNA استفاده از سازوکار فراوان‌سازی دایره غلتان است که در مورد مولکول‌های حلقه‌ای اجراشدنی است. ساخت رشته‌های جدید DNA به کمک پلیمراز از محل اتصال آغازگرهای کوتاه تصادفی شروع و روی حلقه DNA با سازوکار جایگزینی رشته ادامه می‌یابد و در نتیجه رشته‌های بلندی متشکل از شمار زیادی مولکول تکراری[2] تولید می‌شود. برخلاف PCR که به تغییر دما در هر چرخه وابسته است، در این‌جا فراوان‌سازی در دمای ثابت انجام می‌شود. پلیمراز مورد استفاده phi29 است که از باکتریوفاژ گرفته شده و اغلب برای بهتر شدن، تغییرهایی در آن داده شده است. آغازگرهای کوتاه تصادفی[3] به هرجای مولکول حلقه‌ای که اتصال یابند، ساخت رشته جدید را آغاز می‌کنند (Kieser & Budowle, 2019). افزون بر امکان فراوان‌سازی DNA، با استفاده از پلیمراز RNA[4] فرایند ترانویسی نیز امکان‌پذیر است (Mohsen & Kool, 2016).

کشف شیوه سنجش فراوان‌سازی دایره غلتان، ردیابی جمینی‌ویروس‌ها و نانوویروس‌ها و ستلایت‌های آن‌ها را متحول کرده است. در واقع با این شیوه می‌توان هرگونه حلقه DNA موجود در عصاره گیاه را تکثیر کرد و سپس به کمک شیوه‌های دیگر، ویژگی‌های آن‌ها را تعیین نمود (Haible *et al*., 2006). فراوان‌سازی دایره غلتان روشی است آسان و ارزان که برای اجرا نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت ندارد.

حسگرهای زیستی[5]

یکی از زمینه‌های در حال توسعه و پیشرفت برای ردیابی ویروس‌ها و آلودگی‌های ویروسی، استفاده از حسگرهای زیستی است. حسگر زیستی وسیله‌ای است که برای تعیین وجود و مقدار ماده زیستی طراحی و ساخته شده و در آن، تغییرهای فیزیکوشیمیایی که مرتبط با وجود ماده زیستی هدف است به کمک یک گیرنده به صورت فیزیکی و تولید پیام قابل مشاهده نمایش داده می‌شود (Hong & Lee, 2018). حسگرهای زیستی از نظر نوع ماده استفاده شده، گیرنده‌ها و پیام‌ها گوناگونند. Malik *et al*., (2023) آن‌ها را از نظر نوع مبدل‌ها[6]، زیست-گیرنده‌ها (پادتن، آنزیم، اپتامر، ذره‌های نانو، یاخته)، سیستم ردیابی (نوری، مغناطیسی، دمایی، الکتریکی، الکترونیکی، مکانیکی) و فناوری (نانو، الکتریکی، تراشه‌ای، SPR[7]) طبقه‌بندی کرده اند. برای آگاهی از شیوه تهیه حسگرهای زیستی به مقاله‌های چندی که در این زمینه وجود دارد از جمله Bhalla *et al*. (2016) و Jablonski *et al*. (2021) را ببینید.

از حسگرهای زیستی از سال‌ها پیش به‌طور گسترده‌ای در پزشکی و صنعت (صنایع غذایی و دارویی) استفاده شده است (مقاله‌های Hong & Lee, 2018 و Mehrorta, 2016 را ببینید). در رابطه با ویروس‌های گیاهی یکی از نخستین بررسی‌ها در سال ۲۰۱۰ توسط لاتنر و همکاران (Lautner *et al*., 2010) انجام گرفت که در آن از یک DNA-اپتامر[8] برای تشخیص گزینشی پروتئین پوششی ویروس ساقه‌آبله‌ای سیب[9] و روش تصویرسازی SPR بهره‌گیری شد. همچنین، Perdikaris *et al*. (2011) وسیله قابل حملی متشکل از یاخته‌های زنده پستانداران طراحی کردند که غشاء آن‌ها با پادتن چند ویروس به طور تکی یا آمیخته اشباع شده بود. ترکیب هر یک از ویروس‌ها با پادتن اختصاصی باعث تغییر پتانسیل الکتریکی غشای یاخته شد. پژوهشگران بر این اساس امکان ساختن وسیله‌ای که بتوان در مدتی حدود یک ساعت ویروس را تشخیص داد، مطرح کردند. به تازگی Neguyen *et al*. (2021) از تصویرسازی هایپرسپکترال[10] برای ردیابی ,ویروس

1. Rolling circle amplification
2. Tandem repeats
3. Short random primers
4. RNA polymerase
5. Biosensors
6. Transducers
7. Surface plasmon resonance
8. DNA aptamer
9. Apple stem pitting
10. Hyperspectral

تازه شناسایی شده رگ روشنی مو[1] (از جنس *Badnavirus*) استفاده کردند. تصویربرداری هایپرسپکترال بر پایه طیف گسترده ای از نور (به جای استفاده از سه نور متداول قرمز، سبز و آبی) است. نوری که به هر پیکسل می‌تابد به شمار زیادی باند طیفی شکسته می‌شود و در نتیجه اطلاعات بیشتری به دست می‌آید. این نوع تصویرسازی توانمندی‌های خوبی برای ردیابی زودهنگام عفونت‌های اولیه و پیش از بروز نشانه‌ها دارد. پیش از بروز نشانه‌ها ممکن است تغییرهای غیرقابل مشاهده‌ای مانند بسته‌شدن روزنه‌ها، کاهش تعریق، کاهش میزان فتوسنتز، افزایش فلوئورسنس و دفع گرما در گیاه به وجود آید. حسگرهای هایپرسپکترال در تصویربرداری پهبادی نیز می‌توانند موثر واقع شوند. ابداع و استفاده از حسگرهای زیستی برای سنجش ویروس همچنان در حال پیشرفت است. ازجمله می‌توان به کار اخیر Ghorbani *et al.*, (2023) اشاره کرد که با ترکیبی از ایمونولوژی، کروماتوگرافی و نانوذره‌های طلا شیوه‌ای ساده برای تشخیص ویروس‌های گیاهی گزارش کردند که سریع‌تر از ELISA و PCR پاسخ می‌دهد.

در این‌جا لازم است به چند پژوهش که در مورد ویروس‌ها با کاربرد حسگرهای زیستی در داخل کشور انجام شده نیز اشاره شود. Safarnejad *et al*. (2017) در موسسه گیاهپزشکی موفق شدند که با کاربرد کوانتوم-دات‌های کادمیوم تلورایید[2] و استفاده از پادتن‌های اختصاصی، حسگرهای زیستی را برای شناسایی و ردیابی چند ویروس از جمله ویروس تریستزای مرکبات طراحی کنند (Shojaei *et al*., 2016; Safarnejad *et al*., 2017). برخی از این سیستم‌ها حساس‌تر از ELISA گزارش شدند. حسگر زیستی دیگری نیز برای ردیابی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیمو ترش تهیه کردند که در آن از پادتن پروتئین غالب غشایی[3] فیتوپلاسما استفاده شده بود (Rads *et al*., 2012). همچنین، آن‌ها سیستم مشابهی برای ردیابی شبه‌قارچ *Polymyxa betae* طراحی کردند (Safapour *et al*., 2012). این شبه‌قارچ ناقل خاکزی ویروس رگبرگ زرد نکروتیک (ریشه گنائی) چغندر است. در زمینه پزشکی نیز کارهایی در داخل کشور انجام شده که از آن میان می‌توان به کار Shamsipur *et al*. (2017) برای ردیابی حساس و سریع ویروس پاپیلومای انسانی با استفاده از نانوحسگرهای DNA و کار Shokorlou & Heidarzade, (2023) در دانشگاه محقق اردبیلی برای ردیابی و تشخیص سرطان پروستات با استفاده از نانو حسگر پلاسمونی اشاره کرد.

ریزآرایه[4] و درشت‌آرایه[5]

ریزآرایه عبارت از شبکه‌ای دو بعدی از شمار بسیار زیادی خانه یا نقطه میکروسکوپی روی یک صفحه ۱ تا ۴ سانتیمتر مربعی از جنس شیشه یا سیلیکون است که در هر خانه یا نقطه آن یک شناسگر مولکولی از جنس نوکلئیک اسید یا پروتئین معین جاسازی و تثبیت شده است. نوکلئیک اسید جاسازی شده شناسگر[6] cDNA یا cRNA است. نمونه‌ای که قرار است بررسی شود (هدف)[7] برای انجام واکنش احتمالی با برخی از شناسگرها به این صفحه یا تراشه[8] اضافه می‌شود. واکنش میان شناسگر و هدف بر پایه بازجفتی[9] و دورگه‌سازی[10] است. به طور معمول یک رنگ فلوئورسنت به نمونه هدف متصل می‌شود تا بتوان انجام واکنش را پس از شستشوی تراشه (صفحه ریزآرایه) به آسانی تشخیص داد. درشت آرایه مانند ریزآرایه است، منتها اندازه (۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر مربع) و وسعت خانه‌های آن بیشتر و شمار آن‌ها کمتر است. ظرفیت درشت‌آرایه ۱۰ تا ۱۰۰ قطعه DNA در سانتی‌متر مربع است، در حالی که این رقم در مورد ریزآرایه ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ ژن و گاهی بیشتر است. در مورد پروتئین‌ها آزمایش بر اساس واکنش پروتئین-پروتئین خواهد بود و برای شناسگر می‌توان از پادتن یا اپتامر استفاده کرد.

1. Grapevine vein clearing virus 2. CdTe 3. Immunodominant membrane protein antibody 4. Microarray
5. Macroarray 6. Probe 7. Target 8. Chip 9. Base pairing, complementation 10. Hybridization

از ریزآرایه نوکلئیک اسیدی در زیست‌شناسی و به ویژه ژنتیک برای بررسی گوناگونی ژنتیکی، تعیین همزمان میزان بیان ژن‌ها و در پزشکی برای تشخیص بیماری‌ها و تعیین تغییرهای متابولیکی آن‌ها، اثر داروها و بررسی گوناگونی ژنتیکی بیمارگرها استفاده شده است. در مورد ویروس‌های گیاهی، ویروئیدها و فیتوپلاسماها نیز افزون بر تشخیص و ردیابی، برای بررسی‌های همه‌گیرشناسی و گوناگونی بیمارگرها و نیز در قرنطینه و گواهی کردن محصول‌ها و تشخیص تراریختی (GMO)[1] در محصول‌ها از ریزآرایه و درشت‌آرایه استفاده شده است (Bhat & Rao, 2020; Hadidi *et al*., 2004). برتری استفاده از ریزآرایه نسبت به برخی دیگر از روش‌های تشخیص که به‌طور معمول در هر آزمایش یک یا شمار اندکی هدف یا واکنش را بررسی می‌کنند، این است که هم‌زمان برای شمار زیادی هدف یا هزاران واکنش نتیجه مورد نظر را به‌دست می‌دهد. برای نمونه، Nicolaisen, (2011) ریزآرایه‌ای برای ردیابی ۵۲ ویروس گیاهی معرفی نمود. Sip *et al*. (2010) یک ریزآرایه DNA برای ویروس‌های سیب‌زمینی تهیه کردند که توانست افزون بر ویروس‌هایی که با این سیستم شناسایی شده بودند، ویروس‌های دیگری نیز ردیابی کند. با وجود این ابداع روش‌های تعیین ترادف نسل جدید (NGS)[2] توانسته است رقیب موثری برای بسیاری از امکانات ریزآرایه باشد.

دورگه‌سازی مولکولی[3]

اساس این روش ردیابی، بازجفتی میان نوکلئیک اسید هدف با مکمل آن در مولکول شناسگر است. شناسگر ترادف کوتاهی از نوع DNA (DNA probe) یا RNA (riboprobe) است که یک ماده رنگی یا رادیوایزوتوپ به آن متصل شده است (برخلاف ریزآرایه که در آن برچسب تشخیص به هدف متصل می‌شود). بطور معمول ارتباط RNA-RNA با ثبات‌تر از ارتباط DNA-DNA یا RNA-DNA است. برای اجرای این روش، ابتدا نمونه‌های هدف روی غشاء ویژه قطره‌گذاری (نقطه‌گذاری) می‌شوند و سپس شناسگر به غشاء اضافه و زیادی آن از روی غشاء شسته می‌شود. ماده رنگی یا پیام رادیوایزوتوپ آشکار می‌سازد که واکنش (بازجفتی) در کدامیک از نقطه‌ها (نمونه‌ها) انجام گرفته است. برای تشخیص یا ردیابی همزمان چند هدف (برای نمونه چند ویروس) در یک آزمایش، می‌توان چند شناسگر را با هم آمیخت و یا از شناسگری استفاده کرد که در طول آن بخش‌های مکمل برای چند ویروس قرار داده شده باشد (شناسگرهای چندگانه[4]). در این قبیل شناسگرها برای هر ویروس هدف قطعه نوکلئیک اسید مکملی (بیشتر به اندازه ۲۰۰ تا ۴۰۰ نوکلئوتید) وجود دارد. برای نمونه، (2012) Peiro *et al.*, از یک شناسگر چندگانه برای ردیابی ۱۰ بیمارگر درختان میوه هسته‌دار استفاده کردند و یا در پژوهشی (Sanchez-Navarro *et al*., 2018a) ۱۳ ویروس و ۵ ویروئید مو با یک شناسگر چندگانه به صورت همزمان ردیابی شدند. از سوی دیگر، شناسگر ممکن است چنان طراحی شود که بتواند گروهی از ویروس‌ها (برای نمونه پوتی‌ویروس‌ها) را شناسایی کنند (Sanchez-Navarro *et al*., 2018b). از این شناسگرهای چندگانه برای گواهی محصول‌ها و نیز بافت‌هایی که برای تکثیر گیاه به‌کار می‌روند (مانند پیوندک و قلمه) بهره‌گیری شده است (Pallas *et al*., 2018).

توالی‌یابی نسل جدید (NGS)[5]

یکی از تحول‌های مهم قرن کنونی در عرصه بررسی‌های زیستی، دستیابی به فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید است. این فناوری‌ها همراه با شیوه‌هایبیوانفورماتیک برای واکاوی انبوه داده‌ها، پیشرفت‌های شگرفی در زمینه‌های گوناگون علوم

1. Genetically modified organism 2. Next generation sequencing 3. Molecular hybridization 4. Polyprobe
5. Next generation sequencing

زیستی به وجود آورده‌اند. در ویروس‌شناسی از این فناوری‌ها نه تنها برای ردیابی و تشخیص، بلکه برای تعیین نقش ژن‌ها و مولکول‌های مختلف در بیماری‌زایی و تغییرهای مولکولی در یاخته و بسیاری از پدیده‌های دیگر نیز استفاده شده است.

درتوالی‌یابی نسل دوم[1]، هر آزمون دربرگیرنده چند صد هزار تا بیش از ۴۰ میلیارد خوانش کوتاه است. هر خوانش بسته به نوع فناوری (پلتفرم) از ۳۵ تا حدود ۴۰۰ و گاهی تا ۸۰۰ نوکلئوتید طول دارد. به‌کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، داده‌های مورد نظر جدا و مورد واکاوی قرار می‌گیرند. درباره پلتفرم‌ها و قابلیت‌های دستگاه‌های مختلف توالی‌یابی نسل جدید، مقاله‌های توصیفی بسیاری منتشر شده است. برای مقایسه پلتفرم‌های مختلف و کاربردهای هر یک، خوانندگان می‌توانند مقاله‌های Pervez *et al.* (2022) و Reuter *et al.* (2015) را ببینند.

بیشتر روش‌های سنجش که پیش از این به آن‌ها اشاره شد، اختصاصی و برای یک یا چند بیمارگر شناخته شده هستند. بر عکس، در فناوری‌های نسل جدید، ردیابی و تشخیص با هدف ویروس یا عامل معینی نیست و بدون اطلاع پیشین از درون گیاه انجام می‌شود. با وجود این، در این روش، با یک آزمون تمام ویروس‌ها و دیگر میکروارگانیسم های موجود در گیاه، حتی آن‌ها که نشانه‌هایی ایجاد نکرده‌اند، شناسایی می‌شوند. در مواردی نیز ویروس‌ها یا بیمارگرهای جدید برای نخستین بار شناسایی شده‌اند (Pecman *et al*., 2017; Verdin *et al*. 2017; Villamor *et al*., 2016).

توالی‌یابی نسل سوم[2] که هم‌اکنون در حال پیشرفت است، فناوری خوانش قطعه‌های بلند DNA است و به همین مناسبت «توالی‌یابی خوانش بلند» نیز نامیده می‌شود. آماده‌سازی نمونه در این روش بسیار آسان‌تر است و توالی‌یابی نیز در دستگاه‌های ساده‌تر (حتی قابل حمل) امکان‌پذیر است. از آن‌جا که این روش در مقایسه با توالی‌یابی نسل دوم دشواری کمتری برای سرهم کردن (مونتاژ) قطعه‌های کوچک دارد، می‌تواند در بررسی‌های زیستی از جمله تعیین ژنوم کامل سودمندتر واقع شود. با وجود این، میزان اشتباه در این نوع توالی‌یابی بیشتر از توالی‌یابی نسل دوم است (Schadt *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

در چند دهه گذشته تحول‌های شگرفی در زمینه سنجش ویروس‌ها و بیمارگرهای شبه ویروسی گیاهان به عمل آمده است. سنجش این بیمارگرها ابتدا به شیوه‌های زیستی آغاز شد. این شیوه‌ها دربرگیرنده انتقال مکانیکی و انتقال با پیوند، ناقل، دانه گرده، بذر و بافت‌کاری[3] بودند و گرچه، هنوز هم برای برخی از پژوهش‌ها الزامی هستند، اما امروزه برای سنجش جای خود را به شیوه‌های مطمئن‌تر، آسان‌تر و موثرتر داده‌اند. روش‌های بر پایه ایمونولوژی به دلیل اختصاصی بودن، دقت و آسانی اجرا، خواه به طور مستقیم و خواه در ترکیب با سایر روش‌ها در شناسایی و ردیابی ویروس‌ها نقش مهمی داشته اند و از آن میان در ترکیب با واکنش آنزیمی و روش‌های گوناگون ELISA از حساسیت فراوانی برخوردارند. در بررسی‌های همه‌گیری‌شناسی که نیازمند آزمایش نمونه‌های زیاد است، آماده‌سازی نمونه‌ها را می‌توان به روش‌های TPIA[4] و DIBA[5] در مزرعه یا باغ انجام داد. در زمینه استفاده از حسگرها، با وجود پیشرفت‌های خوبی که به عمل آمده، سازوکار بیشتر بر پایه ایمونولوژی بوده است و ضرورت دارد بر مبنای دیگر تغییرها در گیاه بیمار نیز بتوان تشخیص را انجام داد.

یکی از دشواری‌های استفاده از شیوه‌های بر پایه ایمونولوژی، کمبود یا نبود پادتن برای برخی از بیمارگرها است. در مقایسه، تهیه آغازگرهای اختصاصی یا گروهی برای آزمون‌های PCR همیشه امکان‌پذیر است، اما دلیل مهمتر برای رایج شدن PCR، افزون بر ردیابی، تهیه مقدار کافی DNA برای توالی‌یابی و دست‌یابی به ژنوم است.

1. Second generation sequencing
2. Third generation sequencing
3. Tissue implantation
4. Tissue-print immunoassay
5. Dot immunobinding assay

در بیشتر روش‌های ردیابی از جمله PCR و ELISA، بیمارگرهای هدف، خواه به طور انفرادی یا گروهی، مشخص هستند. از این رو، استفاده از آن‌ها در تشخیص بیماری‌های ناشناخته و یا در قرنطینه گیاهی دارای محدودیت است. برای رفع این محدودیت و سالم‌گزینی و در مواردی که بیمارگر هدف معین نیست می‌توان از ریزآرایه استفاده کرد که صدها و هزارها نقطه موجود در آن هر یک پادتن، نوکلئیک اسید یا اپتامر بیمارگر یا مولکول معینی است و بنابراین می‌تواند برای تشخیص طیفی گسترده از بیمارگرها مورد استفاده قرار گیرد. با وجود این، در این گونه موردها بهترین روش، کاربرد توالی‌یابی پر بازده[1] یا نسل جدید است که می‌تواند بسته به عمق خوانش در میان انبوه داده‌ها همه ویروس‌های موجود در گیاه را شناسایی کند و حتی در موردهایی به کشف ویروس جدید بیانجامد. داده‌های توالی‌یابی پر بازده نشان داده است که در درختان و گیاهان چندساله شمار زیادی ویروس وجود دارند که نشانه‌های آن‌ها روشن نیست، اما ممکن است طغیان کنند. همچنین، در منطقه‌های کشت جدید، اغلب در گیاهان بومی ویروس‌هایی وجود دارند که امکان سرایت آن‌ها به گیاهان انتقال‌یافته وجود دارد. بنابراین، توالی‌یابی پربازده می‌تواند کمک موثری به تعیین ویروم[2] منطقه یا گیاه وارداتی بنماید. لازم است اشاره شود که شناسایی برخی ویروس‌ها به این شیوه نیاز به تایید به روش‌های دیگر مانند PCR دارد.

همه فناوری‌های مربوط به سنجش در داخل کشور اجراشدنی و به عبارت دیگر بوم‌سازگار هستند. آنچه که لازم است، سرمایه‌گذاری برای تشکیل آزمایشگاه‌ها و تهیه دستگاه‌ها و از سوی دیگر پژوهش‌های کاربردی و توسعه‌ای برای راه‌اندازی آن‌ها است. پیشرفت‌های بیشتر در زمینه سنجش ویروس‌ها و بیمارگرهای شبه‌ویروسی مانند حسگری از راه دور[3]، استفاده از پهباد برای رصد کردن آلودگی‌های اولیه و کاربرد هوش مصنوعی دور از انتظار نیست.

منابع

Bahadir, E. B. & Sezgintur, K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82: 286-306.

Beijerinck, M. W. (1898). Over een contagium vivum fluidum als oorzaak van de vlekziekte der tabaks bladen. *Versl. Gewone Vergad. Wis. Natuurkd.Afd. K. Akad.Wet. Amsterdam* 7, 229-235.

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. (2016). Introductions to Biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60: 1-8. Doi: 10.1042/EBC20150001.

Bhat, A. J. & Rao, G. P. (2020). DNA microarray for detection of plant viruses. Pp. 357-367 in: *Characterization of Plant Viruses*. Springer. Doi: 10.1007/978-1-0716-0334-5-37.

Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M. & Watson, L. (1996). *Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CAB International. 1484 p.

Cassedy A., Parle-McDermott A. & Kennedy, R. O. (2021). Virus detection: A review of the current and emerging molecular and immunological methods. *Frontiers in Molecular Biosciences,* Doi: 10.3389/fmolb.2021.637559.

Ghorbani, A. Astaraki, S., Rostami, M. & Pakdel A. (2023). Unleashing the power of colloidal gold immunochromatographic assay for plant virus diagnostics. *MethodsX*, Doi: 10.1016/j.mex.2023.102498.

Gill, P. & Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies- A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 24: 224-243. Doi: 10.1080/1525 7770701845204.

Hadidi, A., Czosnek, H. & Barba, M. (2004). DNA microarrays and their potential applications for the detection of plant viruses, viroids and phytoplasmas. *Plant Pathology*, 86: 97-104.

Haible, D., Kober, S., & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135: 9-16.

1. High throughput sequencing (HTS) 2. Virome 3. Remote sensing

Hibi, T. & Saito, Y. (1985). A dot immunobinding assay for detection of tobacco mosaic virus in infected tissues. *Journal of General Virology,* 66: 1191-1194. Doi: 10.1099/0022-1317-66-5-1191.

Hoffmeisterva, H., Kratochvilova, K., Cerovska, N., Slavikova, L., Dusek, J., Muller, K., Fousek, J., Plchova, H., Navratil, O., Kundu, J.K. & Moravec, T. (2022). One-enzyme RTX-PCR for the detection of RNA viruses from multiple virus genera and crop plants. *Viruses*, 14:298. Doi: 10.3390/v14020298.

Holmes, F.O. (1929). Local lesions in tobacco mosaic. *Botanical Gazette*, 87: 39.

Hong, S. & Lee, C. (2018).The current status and future outlook of quantum dot-based biosensors for plant virus detection. *Journal of Plant Pathology*, 34: 85-92. Doi: 10. 5423/ PPJ.RW.08.2017.0184.

Horvath, J. (1993). Host plants in diagnosis. Pp 16-48 in: REF Matthews (Ed), *Diagnosis of Plant Virus Diseases.* CRC Press. 374 p.

Huth, W. (1999). Tissue print immune assay, a rapid and reliable method for routinely detecting graminae viruses. *Plant Research and Development,* 49: 7-18.

Jablonski, M., Poghossian, A., Keusgen, M., Wege, C. & Schoning, M. J. (2021). Detection of plant virus particles with a capacitive field-effect sensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 5669-5678.

Kieser,. R & Budowle, B. (2019). Rolling circle amplification: A (random) primer on the enrichment of an infinite linear DNA template. *WIREs Forensic Science*. Doi: 10.1002/wfs2.1359.

Koczula, K.M. & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry* 60: 111-120.

Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R. & Chen, T.A. (2002). Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Patholog*, 108: 81-86.

Malik, S., Singh, J., Goyat, R., Saharan, V., Chaudhry, V., Umar, A., Ibrahim, A., Akbar, S., Ameen, S. & Baskoutas, S. (2023). Nanomaterials based biosensors and their applications: A review. *Heliyon*, 7 (9). Doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19929.

Milne, R.G. (1993). Electron microscopy of *in vitro* preparations. Pp. 215-251 in: REF Matthews (Ed), *Diagnosis of Plant Virus Diseases.* CRC Press. 374 p.

Mohsen, M.G. & Kool, E.T. (2016). The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription. *Accounts of Chemical Research,* 11: 2540-2550. Doi.: 10.1021/acs.accounts.6b00417.

Mullis, K., Faloona, F.A., Scarf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology* 51, Pt1, 263-273.

Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., de Avila, A.C. & Giordano, L.B. (2004). Print –capture PCR for detection of tomato begomoviruses from plants and whiteflies. *Fitopatologia Brasileira,* Doi: 10.1590/s0100-41582004000100014.

Nicolaisen, M. (2011). An oligonucleotide-based microarray for detection of plant RNA viruses. *Journal of Virological Methods*,173: 137-143.

Neguyen, C., Sagan,V., Maimaitiyiming, M., Maimaitijiang, M., Bhadra, S. & Kwasniewski, M. (2021). Early detection of plant viral disease using hyperspectral imaging and deep learning. *Sensors*, Doi: 10. 3390/s21030742.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekava, T., Watanabi, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research,* 28. Doi:10.1093/nar/28.12.e63.

Pallas, V., Sanchez-Navarro, J.A. & James, D. (2018). Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiology.* 9. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02087.

Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A.G., Bella, P., Torta, L., Stassi, R. & Davino, S. (2020). Loop-mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants (Basel*). Doi: 103390plants9040461

Pecman, A., Kutnjak, D., Gutierrez-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, 2017. Doi:10.3369/fmicb.2017.01998.

Peiro,A. Pallas,V. & Sanchez-Navarro, J.A. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 469-475.

Perdikaris, A., Vassilakos, N., Yiakoumettis, I., Kektsidou, O. & Kintzios,S. (2011). Development of a portable, high throughput biosensor system for rapid plant virus detection. *Journal of Virological Methods*, 177: 94-99.

Pervez, M.T., ul Hasnain, M.J., Abbas, S.H., Moustafa, M.F., Aslam, N. & Shah, S.S.M. (2022). A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. *BioMed Research*, Doi: 10.1155/2022/3457806.

Rads, F., Mohsenifar, A., Tabatabaei, M., Safarnejad, M. R., Shahryari, F., Safarpour, H., Foroutan, A., Mardi, M., Davoudi, D. & Fotokian, M. (2012). Detection of *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia with a quantum dot fret-based biosensor. *Journal of Plant Pathology*, 94: 525-534.

Reuter, J. A., Spacek, D. & Snyder, M. P. (2015). High- throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*, 58: 586-597. Doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.

Roberts, D. A. (1964). Local-lesion assay of plant viruses. Pp 194-210 in: M. K. Corbett and H. D. Sisler (Eds.), *Plant Virology*, Univ. Florida Press, 527p.

Safarnejad, M. R., Samiee, F., Tabatabaei, M. & Mohsenifar, A. (2017). Development of quantum dot-based nanobiosensors against Citrus tristeza virus (CTV). *The Sensors & Transducers journal*, 213: 54-60.

Safarpour, H., Safarnejad, M. R., Tabatabaei, M., Mohsenifar, A., Rad, F., Basirat, M., Shahryari, F. & Hasanzadeh, F. (2012). Developmentof a quantum dots FRET-based biosensor for efficient detection of *Polymyxa betae* . *The Canadian Journal of Plant Pathology*, 34: 507-515.

Salehi, M., Izadpanah, K., Siampour, M & Esmailzadeh-Hosseini, S. A.(2011). Polyclonal antibodies for the detection and identification of Fars alfalfa witches'broom phytoplasma. *Bulletin of Insectology*, 64: S59-S60.

Salehi, M., Rasoulpour, R. & Izadpanah, K. (2016). Molecular characterization, vector identification and partial host range determination of phytoplasmas associated with faba bean phyllody in Iran. *Crop Protection*, 89: 12-20.

Sanchez-Navarro, J.A., Fiore, N., Fajardo, T.V.M., & Pallas, V. (2018a). Simultaneous detection of the 13 viruses and 5 viroids affecting grapevine by molecular hybridization using a unique probe or 'polyprobe'. Pp. 41-42 in:*Proc. 19th Conf. ICVG, Santiago.*

Sanchez-Navarro, J.A., Cooper, C.N. & Pallas, V. (2018b). Polyvalent detection of members of the Potyvirus genus by molecular hybridization using a 'genus probe'. *Phytopathology*, 108: 1522-1529. Doi: 10.1094/PHYTO-04-18-0146-R.

Schadt, E.E., Turner, S. & Kasarskis, A. (2010). A window into third generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19: R227-R240. Doi.org/10.1093/hmg/ddq416.

Shabani, E., Dowlatshahi, S. & Abdekhodaie, M.J. (2021). Laboratory detection methods for the human coronaviruses. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(2): 225-246.

Shamsipur, M., Nasirian, V., Mansouri, K., Barati, A., Veisi-Raygani, A. & Kashanian, S. (2017). A highly sensitive quantum dots DNA nanobiosensor based on fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of nanomolar amounts of human papilloma virus 18. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 136:140-147.

Shojaei, T. R., Salleh, M. A. M., Sijam, K., Rahim, R. A., Mohsenifar, A., Safarnejad, R. & Tabatabaei, M. (2016). Fluorometric immunoassay for detecting the plant virus citrus tristeza using carbon nanoparticles acting as quencher and antibodies labeled with CdTe quantum dots. *Microchim. Acta*, 183:2277-2287.

Shokorlou, Y. M. & Heidarzadeh, H. (2023). Mirrored nano-structured plasmonic biosensor using two-dimentional materials for detection of PSA. *Optics and Lasers in Engineering*, 170, Doi: 10.1016/j.optlaseng.2023.107762.

Verdin, E., Wipf-Scheibel, C., Gognalons, P., Aller, F., Jacquemond, M. & Tepfer, M. (2017). Sequencing viral siRNA to identify previously undescribed viruses and viroids in a panel of ornamental plant samples structured as matrix of pools. *Virus Research*, 241: 19-28. Doi: 10.1016/j.virusres.2017.05.019.

Villamor, D.E.V., Mekuria, T.A., Pillai, S.S. & Eastwell, K.C. (2016). High-throughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: Insight to the etiology of stem pitting disease. *Phytopathology*, 106: 519-52.

Strategic Research Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 9(1):51-64 (2024)

New Technologies for Assay and Management of Plant Viruses and Virus-Like Agents: 1- Assay

Izadpanah K.[1, 2]

Effective assay of the disease agents is a prerequisite for successful management of plant diseases caused by viruses and virus-like pathogens. The assays may be biological (i.e., based on infectivity), morphological (shape and size, e.g., based on electron microscopy), or based on the properties of the pathogen proteins and nucleic acids. Methods based on the properties of the pathogen proteins include various serological techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microarray, electrophoresis and certain types of biosensing. Methods based on the properties of the pathogen genome include hybridization tests, microarray chips, polymerase chain reaction (PCR) and next generation sequencing (NGS) technologies. Combinations of these methods such as immuno-electron microscopy, immuno-electrophoresis and immunocapture PCR may also be used. In this article feasibility, sensitivity, specificity and uses of these techniques are pointed out. At the present the most commonly used methods for targeted detection of plant pathogens are various modifications of ELISA, LAMP and PCR. Types of NGS technologies are the methods of choice for non-target assay of plants for these pathogens. Bioinformatics tools have played an unparalleled role in the advancement of new technologies. All technologies are eco-compatible and can be used or adapted in the country.

Key words: Academy of Sciences, New detection technologies, Research projects, Virus detection methods.

1. Corresponding author, Email: izadpana@shirazu.ac.ir
2. Professor of Shiraz University (Fellow of Academy of Sciences of I.R. Iran).