

PRI ISKANJU RASTLINSKIH VIRUSOV IN VIROIDOV V RASTLINAH Z NEPOJASNJENIM VZROKOM BOLEZENSKIH ZNAMENJ JE POSTALO NEPOGREŠLJIVO ORODJE VISOKOZMOGLJIVO SEKVENCIRANJE (HTS)

Anja PECMAN¹, Denis KUTNJAK², Ion GUTIERREZ AGUIRRE³, Katarina
BAČNIK⁴, Nataša MEHLE⁵, Magda TUŠEK ŽNIDARIČ⁶, Maja RAVNIKAR⁷

¹⁻⁷Nacionalni inštitut za Biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

^{1,4}Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana Ljubljana

⁷Univerza Nova gorica, Nova gorica

IZVLEČEK

Visokozmogljivo sekvenciranje (HTS) je generična metoda, ki omogoča sekvenciranje vseh nukleinskih kislin v najrazličnejših vzorcih (rastlinski material, vodni vzorci, zemlja, zrak). Pri analizi vzorcev za določanje virusnih in viroidnih nukleinskih kislin uporabljamo različne tehnologije HTS. Z uporabo bioinformatičnih orodij in postavitvijo avtomatskega delotoka smo v preteklih letih analizirali različne rastline z nepojasnenim vzrokom bolezenskih znamenj, pri katerih s klasičnimi diagnostičnimi metodami nismo zaznali patogenih mikroorganizmov. Z analizo HTS smo razkrili okužbe z različnimi virusi, nekateri so bili prvič najdeni v Sloveniji. Tehnologije HTS uporabljamo tudi za odkrivanje virusov v okoljskih vodah. HTS zaradi cenovne dostopnosti v zadnjem času postaja neprecenljivo orodje ne le v raziskavah, temveč tudi v uradni diagnostiki in v certifikacijskih shemah.

Ključne besede: rastlinski virusi/ viroidi, določanje, diagnostika, visokozmogljivo sekvenciranje (HTS)

ABSTRACT

HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING BECAME AN INVALUABLE TOOL FOR DETECTION AND DISCOVERY OF PLANT VIRUSES/VIROIDS IN THE PLANTS WITH UNEXPLAINED INFECTION SYMPTOMS

High-throughput sequencing (HTS) is a generic method, enabling sequencing of all nucleic acids in the broad range of different samples (e.g. plant material, water

¹ mlada raziskovalka, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² dr., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ mlada raziskovalka, prav tam

⁵ dr., prav tam

⁶ dr., prav tam

⁷ prof. dr., prav tam

samples, soil and air samples). In the sample analysis, different HTS platforms could be used for virus and viroid detection. In past years, we analysed several plants with unexplained symptoms of unknown etiology using classic diagnostic methods. However, no pathogenic microorganisms were detected in some of them. By using bioinformatics tools and an automatic analysis pipeline, the results of the HTS analysis revealed plant infections with several viruses, few of them for the first time in Slovenia. HTS technology is also used for the analysis of viruses in environmental waters. Lately, with fast development of methods and drop of prices, HTS is becoming an invaluable tool, not just for research but also for plant virus official diagnostics and is used also in certification schemes.

Key words: plant viruses/ viroids, detection, diagnostics, high-throughput sequencing (HTS)

1 UVOD

Pri visokozmogljivem sekvenciranju (high-throughput sequencing - HTS) se določa nukleotidna zaporedja milijonom naključnih odčitkov fragmentov in se jih z bioinformatičnimi orodji sestavlja v znane ali povsem nove genome. Tehnologijo uspešno uporabljamo na različnih področjih genomike, kot so medicinska mikrobiologija, žlahtnjenje rastlin, populacijska genetika, študije evolucije ter diagnostika človeških, živalskih in rastlinskih bolezni. Vpeljava HTS v rastlinsko virologijo je pomenila revolucijo v raziskavi virusov, saj je pripomogla k številnim novim odkritjem rastlinskih virusov, njihovih različkov in mutacij. Trenutno se razvija v validirano rutinsko diagnostično orodje, ki bo lahko nadomestilo številne tarčne metode, ki jih trenutno uporabljamo v presejalnih analizah.

2 DETEKCIJA RASTLINSKIH VIRUSOV

Znanstveno raziskovanje rastlinskih virusov sega v začetek 20. stoletja. V prvih nekaj desetletjih je temeljilo predvsem na opazovanju bolezenskih znamenj na gostitelju in testnih rastlinah ter kasneje na osnovi pregleda vzorcev z elektronskim mikroskopom. Z razvojem specifičnih seroloških metod in metod na bazi PCR se je začela nova doba virusne diagnostike. Z opazovanjem bolezenskih znamenj na gostitelju in testnih rastlinah ter s proučevanjem morfologije virusov z elektronskim mikroskopom ne moremo identificirati vrste ali različka virusov (določimo lahko največ rod). Specifične serološke metode in metode na bazi PCR omogočajo identifikacijo virusov, vendar lahko s temi metodami določimo le tiste, ki jih iščemo ciljno, s specifično pripravljenimi reagenti za vsak posamezen virus oziroma različek (Hull 2014; Boonham in sod., 2014).

Uporabo HTS za detekcijo rastlinskih virusov so prvič objavile leta 2009 tri različne raziskovalne ekipe (Adams in sod., 2009; Kreuze in sod., 2009; Al Rwahnih in sod., 2009). V nadaljevanju je uporaba HTS za detekcijo rastlinskih virusov hitro naraščala, saj je ta tehnologija zelo povečala zmožnost odkrivanja le-teh (Boonham in sod., 2014; Adams and Fox 2016). HTS je namreč edina generična molekularna metoda, ki

omogoča sekvenciranje vseh nukleinskih kislin v najrazličnejših vzorcih (rastlinski material, vodni vzorci, zemlja, zrak) ter določi njihovo identiteto do različka virusa natančno (Kutnjak in sod., 2014). Poleg tega omogoča izjemo hitro identifikacijo novih virusov (Pecman in sod., 2017) ter znanih, do sedaj še ne sekvenciranih virusov (Pecman in sod., 2018). Aplikacije in rezultati o odkrivanju novih virusov, novih virusnih različkov in hitrega sekvenciranja celotnega genoma so zbrani v številnih preglednih člankih (Barba in sod., 2013; Massart in sod., 2014; Villamor in sod., 2019). Tehnologije HTS uporabljamo tudi v raziskavah okoljskih voda. Odkrili smo prisotnost in infektivnost rastlinskih virusov v vodi, ki bi lahko predstavljala epidemiološko pot za okužbo rastlin v primeru uporabe takšne vode za namakanje (Bačnik in sod., 2018).

V rastlinah predstavljajo virusne in viroidne nukleinske kisline majhen delež v primerjavi z rastlinskimi nukleinskimi kislinami in ostalo mikrofloro, zato lahko virusne/ viroidne nukleinske kisline obogatimo na različne načine (Roossinck in sod., 2015; Adams in Fox 2016; Wu in sod., 2015). Najpogosteje se uporablja sekvenciranje celokupne RNK, sekvenciranje celokupne RNK z odstranjeno ribosomalno RNK, sekvenciranje dvojno vijačne RNK (double stranded RNA; dsRNA) in sekvenciranje malih RNK (small RNA, sRNA).

3 DIAGNOSTIKA RASTLINSKIH VIRUSOV S HTS

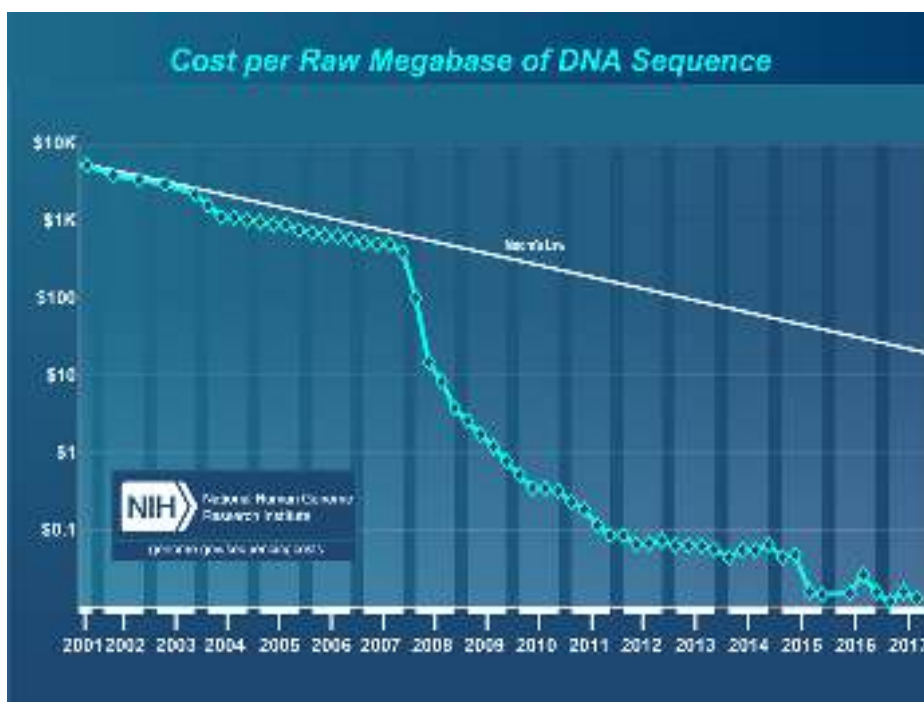
240

Zaradi revolucionarnega vpliva, ki ga ima HTS v virologiji, saj omogoča celovit pogled v virom rastline, ne da bi potrebovali kakršnokoli predhodno informacijo o genomu virusov/ viroidov, ki jih odkrivamo, se je HTS iz raziskovalnih študij razširil tudi v diagnostiko. V sklopu različnih projektov, v katere smo vključeni tudi slovenski raziskovalci (npr. EU projekt Valitest, COST DIVAS FA1407, različni Euphresco projekti: VirusCollect2 2015-F-132, VirusCollect2 2015-F-132, Faster cheaper identification of emerging virus problems 2017-A-243, Community Network for Plant Health Bioinformatics 2018-A-289, Next Generation Sequencing (NGS) standards and best practices for regulatory applications 2018-E-294), ter pri katerih sodelujeta tudi Organizacija za varstvo rastlin v Evropi in Mediteranu (EPPO) ter Mednarodna konvencija o varstvu rastlin (IPPC), potekajo številne raziskave in usklajevanja ter priprava smernic (Olmos in sod., 2018) za uporabo te tehnologije kot rutinske diagnostične metode za detekcijo rastlinskih virusov in viroidov. V sklopu evropskega programa COST DIVAS FA1407 je skupina znanstvenikov iz področja rastlinske virologije pripravila smernice, kako ravnati v primeru detekcije (novih) virusov/ viroidov s HTS (Massart in sod., 2017) v raziskavah in pri uradni diagnostiki (Olmos in sod., 2018; CPM Recommendation, 2018).

HTS tehnologija omogoča, da z enim testom dobimo vpogled v vse prisotne DNK in RNK molekule, ter tako skrajša čas same diagnostike rastlin z nepojasnjenimi bolezenskimi znamenji, saj v enem koraku razkrije celotno bolezensko stanje rastline. Edina omejitev pri detekciji patogenov so razpoložljive baze podatkov nukleinskih kislin s katerimi se primerja generirane podatke. S HTS lahko torej razkrijemo ali gre za mešane okužbe, nepričakovane okužbe novih gostitelje, okužbe z virusi pri katerih

genom še ni bil odkrit, oziroma okužbe z do sedaj še neznanimi virusi. S tega stališča je HTS tudi bolj cenovno učinkovit, saj ni potrebno delati več različnih specifičnih testov, čas do končnega rezultata pa je krajši (Maree in sod., 2018). Poleg tega pa tudi cena same tehnologije z razvojem močno pada (Slika 1). To pomeni, da HTS analiza lahko nadomesti v primeru paradižnika veliko število ELISA testov ali na bazi PCR pripravljenih testov za karantenske in druge viruse, okuževaje testnih rastlin in elektronsko mikroskopijo; sklop metod, ki se sicer uporablja na vzorcih z bolezenskimi znamenji neznanega izvora (trenutno na NIBu izvajamo specifične teste za šest različnih karantenskih virusov in za več kot deset drugih gospodarsko pomembnih virusov, ki lahko okužijo paradižnik).

241



Slika 1: Cena sekvenciranja enega milijona nukleotidov DNK od leta 2001–2017. Prikazano spreminjanje cene je rezultat spremljanja cen sekvenciranja v centrih za sekvenciranje, ki so financirani s strani National Human Genome Research Institute (NHGRI) (<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>).

HTS se v rutinski diagnostiki lahko uporablja za: (a) nadzor nad statusom škodljivih organizmov v regiji, (b) preverjanje matičnega razmnoževalnega materiala rastlin, (c) testiranje rastlin v karanteni (po vstopu v regijo) in posledično preprečevanje vnosa škodljivih organizmov, (d) spremljanje uvoza blaga s potencialnim tveganjem.

Razumevanje statusa škodljivcev v regiji je ključno za fitosanitarno regulacijo in ustrezne ukrepe (Olmos in sod., 2018).

Seveda pa ima kot vsaka nova tehnologija tudi HTS svoje izzive. En izmed ključnih tehničnih izzivov je validacija tehnologije. Validacija za molekularne diagnostične metode je podrobno opisana v EPP0 PM7/98 (OEPP/EPPO 2018), v primeru HTS pa so prilagoditve že v pripravi. Pomemben izziv v tem kontekstu je tudi hitro spreminjanje in izboljševanje tehnologij, bioinformatičkih delotokov in podatkovnih baz, kar pomeni da so potrebne verifikacije za zagotavljanje primernosti testov (Maree in sod., 2018), kar pa je tudi značilnost vseh novih tehnologij.

Ker je velik del tehnologije bioinformatička obdelava podatkov, potekajo tudi na tem področju različne aktivnosti v sklopu številnih projektov (COST FA1407, Euphresco projekt: Community Network for Plant Health Bioinformatics 2018-A-289). Diagnostiki in raziskovalci v sklopu različnih delavnic pridobivajo znanje; s sodelovanjem v različnih medlaboratorijskih primerjavah pa preizkušajo svojo usposobljenost (PT-proficiency test) in ustreznost metodologije (TPS – test performance study). Rezultati medlaboratorijske primerjave v okviru projekta COST DIVAS FA1407 so pokazali potrebo po harmonizaciji postopkov in pripravo dobrih bioinformatičkih baz (Massart in sod., 2018). Medlaboratorijske primerjave pripomorejo k razumevanju ključnih pasti bioinformatike, ter vodijo k njenemu odpravljanju, predvsem z nadaljnimi projekti (Euphresco - Community Network for Plant Health Bioinformatics 2018-A-289), z izobraževanjem ter izoblikovanjem boljših delotokov z namenom pripraviti HTS za učinkovito diagnostiko.

4 ZGLEDI UPORABE HTS V DIAGNOSTIKI

V Sloveniji HTS uporabljamo pri združenih vzorcih rastlin z nepojasnenimi bolezenskimi znamenji. Vzorce združujemo, da minimiziramo stroške analiz, najdbe pa potem ločeno preverjamo. Na ta način smo določili že številne s klasičnimi metodami spregledane viruse. Na primer, z uporabo HTS smo na peteršilju z močnimi bolezenskimi znamenji odkrili virus Y zelene (apium virus Y – ApVY) in virus ozkolistnosti korenja (carrot thin leaf virus – CTLV) – kar je bilo objavljeno kot prva najdba v Sloveniji (Mehle in sod., 2019). Rastline peteršilja z znamenji virusne okužbe so bile vzorčene v septembru 2016. Vzorec je bil najprej pregledan z elektronskim mikroskopom, kjer so bili opaženi filamentozni virusni delci velikosti 750-850 x 12-13 nm. Z ELISA testom je bil vzorec testiran in negativen na virus Y krompirja, virus mozaike lubenice in virus rumenega mozaika buče. Celokupno RNK smo izolirali z RNeasy plant mini kitom (Qiagen, Chatsworth, CA). Pripravo knjižnice in sekvenciranje (male RNK, Illumina sekvenciranje) smo izvedli v SeqMatic LLC (Fremont, CA) po postopku opisanem v Pecman in sod., 2017, analizo sekvenc pa po protokolu opisanem v Pecman in sod. (2017) v kombinaciji z uporabo programa SPAdes (Bankevich in sod., 2012). Prisotnost virusov odkritih s HTS smo nato potrdili z ELISA testom (ApVY) in s specifičnim PCR (CTLV). V Sloveniji smo z metodo HTS odkrili prisotnost virus mozaika zobnika (HMV) in sicer na novem gostitelju paradižniku z izredno močno izraženimi bolezenskimi znamenji

(Pecman in sod., 2018). Potrjevanje več novih najdb virusov poteka tudi na bučevkah in drugih rastlinah (Mehle in sod., 2019).

5 LASTNOSTI RAZLIČNIH HTS PLATFORM

Prva generacija sekvenciranja, imenovana SANGER je v uporabi že več desetletij in zahteva poznavanje genomov, ki jim določamo nukleotidno zaporedje. V sklopu druge generacije sekvenciranja, kjer te informacije ne potrebujemo, je prva komercialna HTS tehnologija postala dostopna javnosti leta 2005. Podjetje Roche (takrat 454 Life Sciences) je predstavilo 454 pirosekvenciranje. Na trg so po letu 2005 prišle številne druge platforme. Danes je sekvenator podjetja Illumina najbolj uporabljena platforma za sekvenciranje, zavzemala naj bi 70% celotnega trga. Pri Illumini uporabljajo sekvenciranje s sintezo, kar omogoča večji izplen sekvenciranja za nižjo ceno (preglednica 1).

Preglednica 1: Glavne značilnosti različnih HTS platform. Preglednica je prirejena po (Kulski 2016).

	Tehnologija sekvenciranja/HTS platforma	Dolžina odčitka (nukleotidi)	Čas sekvenciranja	Cena za 1 milijon nukleotidov (\$)	Cena naprave (\$)
Prva generacija	Sanger/Life Technologies	800	2 h	2400	95.000
Druga generacija	454/Roche	700	24/48 h	10	500.000
	HiSeq/Illumina	2x150	27/240 h	0,1	750.000
	MiSeq/Illumina	2x300	27 h	0,13	125.000
	Ion Proton/Life Technologies	200	2-5h	1	215.000
	Ion PGM/Life Technologies	200	2-5h	1	80.000
Tretja generacija	SMRT/PacificBioscience	>10,000	0.5-6 h*	2	750.000
	Nanopore/Oxford Nanopore Technologies	>2,000,000**	4-48 h	<1	Od 1000 \$ dalje

* <https://www.cd-genomics.com/pacbio-smrt-system-single-molecule-real-time-sequencing.html>

** <https://nanoporetech.com/about-us/news/longer-and-longer-dna-sequence-more-two-million-bases-now-achieved-nanopore>

V sklop tretje generacije sekvenciranja prištevamo tehnologijo SMRT (Single-molecule real-time) podjetja PacificBioscience in nanopore tehnologijo podjetja Oxford Nanopore Technology. Pri slednji gre za branje nukleotidnega zaporedja pri prehodu molekule RNK/ DNK skozi nanoporo, kar pomeni, da je možno hkrati

odkrivati celotne sekvence, kar izredno pospeši in olajša sestavljanje genomov za njihovo identifikacijo. Glavna prednost tehnologije je majhnost naprave za sekvenciranje ter hitrost pridobivanja podatkov. Ravno zaradi majhnosti in v zadnjem času tudi cenovne ugodnosti ter on-site možnosti uporabe imajo lahko napravo tudi manjši laboratoriji.

Nanopore tehnologija se že intenzivno uporablja za določanje različnih patogenih mikrobov, tudi rastlinskih virusov (Filloux in sod., 2018; Bronzato Badial in sod., 2018), v prihodnosti pa bi lahko postala ena izmed ključnih diagnostičnih presejalnih metod laboratorijev.

6 SKLEPI

HTS je izjemno revolucionarno in pomembno orodje pri detekciji rastlinskih virusov in viroidov. Tehnologija je v zadnjih letih bliskovito napredovala, po eni strani z nižanjem cen kemikalij in posledično storitev, po drugi strani pa z dostopnostjo same izvedbe in zmanjševanjem časa potrebnega za pridobitev končnih rezultatov. Tehnologija se že uporablja v diagnostiki rastlinskih virusov in viroidov, pomemben preskok pa bo vpeljava te tehnologije kot prve presejalne diagnostične metode za pregled vzorcev s sumom na prisotnost virusov/ viroidov. To bo omogočila standardizacija metode, ki je v teku in se odvija v okviru različnih mednarodnih projektov kot so Valitest, Inextvir, Euphresco projekti (VirusCollect2 2015-F-132, VirusCollect2 2015-F-132, Faster cheaper identification of emerging virus problems 2017-A-243, Community Network for Plant Health Bioinformatics 2018-A-289, Next Generation Sequencing (NGS) standards and best practices for regulatory applications 2018-E-294). Pri teh projektih sodelujemo tudi slovenski raziskovalci. Pri vseh je poleg EU diagnostičnih laboratorijev aktivno udeležena tudi EPPO ter uradni laboratoriji iz držav zunaj EU (Kanada, Avstralija, USA), kar zagotavlja širok konsenz uporabe tehnologije. V prihodnosti pa predvidevamo, da se bodo raziskave še bolj usmerile v HTS kot presejalno metodo, ne le za viruse in viroide, pač pa tudi za druge mikroorganizme.

7 LITERATURA

- Adams, I., in Fox A. 2016. "Diagnosis of Plant Viruses Using Next-Generation Sequencing and Metagenomic Analysis." *Current Research Topics in Plant Virology*, 323–35. 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): 537–45. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., in sod., 2012. "SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing." *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455–77. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Barba, M., Czosnek, H., in Hadidi, A. 2013. "Historical Perspective, Development and Applications of next-Generation Sequencing in Plant Virology." *Viruses* 6 (1): 106–36. doi:10.3390/v6010106.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R. 2014. "Methods in Virus Diagnostics: From ELISA to next Generation Sequencing." *Virus*

- Research 186: 20–31. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- Bronzato Badial, A., Sherman, D., Stone, A., Gopakumar, A., Wilson, V., Schneider, W., in King, J. 2018. "Nanopore Sequencing as a Surveillance Tool for Plant Pathogens in Plant and Insect Tissues." *Plant Disease* 102 (8): 1648–52. doi:10.1094/PDIS-04-17-0488-RE.
- Filloux, D., Fernandez, E., Loire, E., Claude, L., Galzi, S., Candresse, T., Winter, S., in sod. 2018. "Nanopore-Based Detection and Characterization of Yam Viruses." *Scientific Reports* 8 (1). Springer US: 17879. doi:10.1038/s41598-018-36042-7.
- Hull, R. 2014. "Introduction." *Plant Virology*, 3–14. doi:10.1016/B978-0-12-384871-0.00001-7.
- IPPC work programme for a CPM Recommendation. 2018. "CPM Recommendation: High-Throughput Sequencing (HTS) Technologies as a Diagnostic Tool for Phytosanitary Purposes."
- Bačnik, K., Kutnjak, D., Pecman, A., Gutierrez Aguirre, I., Mehle, N., Tušek Žnidarič, M., Ravnikar, M. 2018. "ISFEV 2018, BOOK OF ABSTRACTS." In *Infectivity Tests Coupled with Metagenomic Analysis Reveal the Presence of Several Infectious Viruses in Wastewaters*, 19.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., in 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). Elsevier Inc.: 1–7. doi:10.1016/j.virol.2009.03.024.
- Kulski, J. K. 2016. *Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and "Omic" Applications*. doi:http://dx.doi.org/10.5772/61964.
- Kutnjak, D., Silvestre, R., Cuellar, W., Perez, W., Müller, G., Ravnikar, M., in Kreuze, J. 2014. "Complete Genome Sequences of New Divergent Potato Virus X Isolates and Discrimination between Strains in a Mixed Infection Using Small RNAs Sequencing Approach." *Virus Research* 191. Elsevier B.V.: 45–50. doi:10.1016/j.virusres.2014.07.012.
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M. in Boonham, N. 2018. "Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges" 9 (August): 1–4. doi:10.3389/fpls.2018.01082.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J-S. in sod. 2017. "A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies." *Frontiers in Microbiology* 8 (January). doi:10.3389/fmicb.2017.00045.
- Massart, S., Chiumenti, M., De Jonghe, K., Glover, R., Haegeman, A., Koloniuk, I., Komínek, P. in sod. 2018. "Virus Detection by High-Throughput Sequencing of Small RNAs: Large-Scale Performance Testing of Sequence Analysis Strategies." *Phytopathology* 109 (3): 488–97. doi:10.1094/phyto-02-18-0067-r.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H. in Candresse, T. 2014. "Current Impact and Future Directions of High Throughput Sequencing in Plant Virus Diagnostics." *Virus Research* 188. Elsevier B.V.: 90–96. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.029.
- Mehle, N., Dreo, T., Pirc, M., Dermastia, M., Tušek Žnidarič, M., Kutnjak, D., Pecman, A., Camloh, M., Jakoš, N., Jakomin, T., Prijatelj Novak, Š., Blatnik, A., Matičič, L., Ravnikar, M. 2019. Program strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin: naloge zdravstvenega varstva rastlin po javnem pooblastilu; končno poročilo o opravljenem delu na strokovni nalogi za leto 2018. Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo, 2019. 312
- Mehle, N., Kutnjak, D., Tušek Žnidarič, M. in Ravnikar, M. 2019. "First Report of Apium Virus Y and Carrot Thin Leaf Virus in Parsley in Slovenia." *Plant Disease* 103 (3): 592. doi:10.1094/PDIS-04-18-0690-PDN.
- OEPP/EPPO. 2018. "PM 7/98 (3) Specific Requirements for Laboratories Preparing Accreditation for a Plant Pest Diagnostic Activity." *EPPO Bulletin*. Vol. 48. doi:10.1111/epp.12508.
- Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D. in Liefting, L. 2018. "High-Throughput Sequencing Technologies for Plant Pest Diagnosis: Challenges and Opportunities" *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 48(2): 219–24. doi:10.1111/epp.12472.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N. in Ravnikar, M. 2017. "Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches." *Frontiers in Microbiology* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01998.

- Pecman, A., Kutnjak, D., Mehle, N., Tušek Žnidarič, M., Gutiérrez-Aguirre, I., Pirnat, P., Adams, I., Boonham, N., in Ravnikar, M. 2018. "High-Throughput Sequencing Facilitates Characterization of a 'Forgotten' Plant Virus: The Case of a Henbane Mosaic Virus Infecting Tomato." *Frontiers in Microbiology* 9 (November): 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.02739.
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., Roumagnac, P. 2015. "Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery." *Phytopathology* 105 (6): 716–27. doi:10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW.
- 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). Elsevier Inc.: 395–401. doi:10.1016/j.virol.2009.02.028.
- Villamor, D. E. V., Ho, T., Al Rwahnih, M., Martin, R. R. in Tzanetakis, I. E. 2019. "High Throughput Sequencing For Plant Virus Detection and Discovery," 1–10. doi:10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW.
- Wu, Q., Ding S.-W., Zhang, Y., Zhu, S. 2015. "Identification of Viruses and Viroids by Next-Generation Sequencing and Homology- Dependent and Homology- Independent Algorithms." *Annu. Rev. Phytopathol* 53: 425–44. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120030.