

Ta članek je objavljen pod licenco Creative Commons [Priznanje avtorstva-Deljenje pod enakimi pogoji 4.0 Mednarodna](#).

IZZIVI UPORABE VISOKO-PRETOČNEGA SEKVENCIRANJA (HTS) ZA RUTINSKO DIAGNOSTIKO VIROIDOV

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Tipologija / Article type: Pregledni članek / Review article

Prispelo / Arrived: 25. 10. 2025

Sprejeto / Accepted: 10. 12. 2025

Objavljeno / Published: December 2025

Izvleček

Viroidne bolezni predstavljajo nenehno grožnjo svetovnemu kmetijstvu, saj lahko ti majhni in strukturno preprosti patogeni okužijo širok spekter gospodarsko pomembnih rastlin. Učinkovito preprečevanje in obvladovanje viroidnih okužb zato zahteva diagnostične pristope, ki omogočajo zanesljivo, občutljivo in specifično identifikacijo povzročiteljev bolezni. Z razvojem biokemije in molekularne biologije se je v zadnjih letih izboljšala občutljivost in specifičnost številnih diagnostičnih metod. Z zniževanjem stroškov sekvenciranja in večjo dostopnostjo se zelo hitro povečuje zanimanje za uporabo tehnologij visoko-pretočnega sekvenciranja (HTS) v rutinski rastlinski diagnostiki. Kljub velikemu potencialu HTS pa uvedba teh tehnologij v laboratorijsko prakso ostaja zahtevna. Med ključne izzive sodijo izbira ustrezne sekvence platforme in laboratorijskih protokolov, uporaba primernih bioinformacijskih orodij, zagotavljanje strokovno usposobljenega kadra ter vzpostavitev ustrezne računalniške infrastrukture. Čeprav so že oblikovani določeni standardi in smernice za uporabo HTS, ti zaradi specifičnih potreb laboratorijev niso univerzalno uporabni. Pregledni članek obravnava ključne vidike različnih pristopov HTS, njihove prednosti in omejitve ter prikazuje njihovo uporabnost na primeru diagnostike viroidnih bolezni.

Ključne besede: diagnostika, visoko-pretočno sekvenciranje (HTS), nanopore tehnologija (ONT), bioinformatika, viroidi

CHALLENGES IN THE APPLICATION OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING FOR ROUTINE DIAGNOSTICS OF VIROIDS

Abstract

Viroid diseases pose a continual threat to global agriculture, as these small and structurally simple pathogens are capable of infecting a wide range of economically important plant species. Effective prevention and management of viroid infections therefore require diagnostic approaches that ensure reliable, sensitive, and specific identification of the causal agents. Advances in biochemistry and molecular biology have, in recent years, significantly improved the sensitivity and specificity of many diagnostic methods. With decreasing sequencing costs and increasing accessibility, interest in the use of high-throughput sequencing (HTS) in routine plant diagnostics has grown rapidly. Despite the great potential of HTS, the implementation of these technologies into laboratory practice remains challenging. Key obstacles include the selection of an appropriate sequencing platform and laboratory protocols, the use of suitable bioinformatic tools, the availability of adequately trained personnel, and the establishment of suitable computational infrastructure. Although certain standards and guidelines for HTS have already been developed, they are not universally applicable due to the specific needs of individual laboratories. This review article discusses the key aspects of different HTS approaches, their advantages and limitations, and illustrates their applicability using the example of viroid disease diagnostics.

Key words: diagnostics, high-throughput sequencing (HTS), Oxford Nanopore technology (ONT), bioinformatics, viroids

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-pošta: tanja.gucek@ihps.si

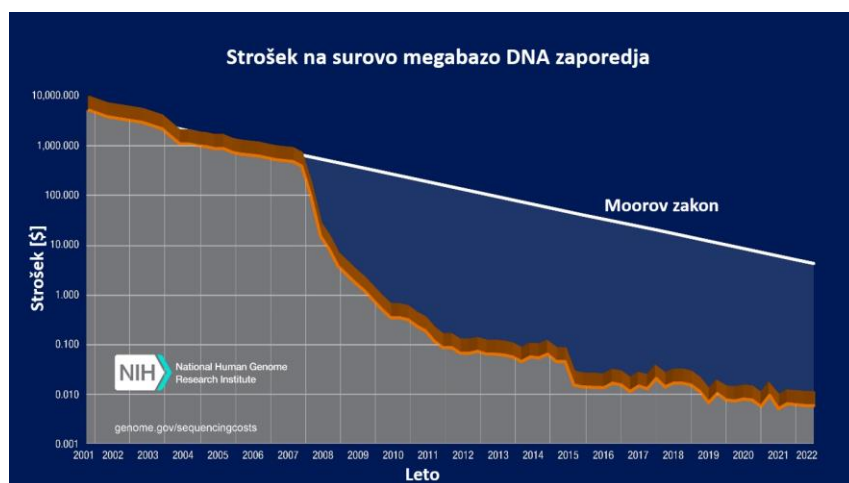
² Dr., IHPS, e-pošta: sebastjan.radisek@ihps.si

1 TEHNOLOGIJE VISOKO-PRETOČNEGA SEKVENCIRANJA (HTS)

Tehnologije visoko-pretočnega sekvenciranja (angl. high throughput sequencing, HTS), znane tudi kot sekvenciranje naslednje generacije (angl. next-generation sequencing, NGS) ali globoko sekvenciranje (angl. deep sequencing) so ključne v rastlinski diagnostiki (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022). Omogočajo zaznavanje nukleinskih kislin kateregakoli organizma v vzorcu in s tem identifikacijo novih povzročiteljev bolezni kot tudi bolezni neznanega izvora (Barba in sod., 2014; Hadidi in sod., 2016; Lebas in sod., 2022). Predstavljajo zelo učinkovito, hitro in cenovno ugodno platformo za določanje nukleotidnega zaporedja (v nadaljevanju sekvenciranje) DNA, ki presega zmogljivosti tradicionalnih metod sekvenciranja DNA, razvitih v poznih 70. letih prejšnjega stoletja (Barba in sod., 2014; Lebas in sod., 2022; Wu in sod., 2015).

Zgodnji začetki razvoja tehnologij sekvenciranja segajo do leta 1953, ko sta James Watson in Francis Crick odkrila strukturo DNA vijačnice. V letih 1964 in 1965 je Robert Holley prvi sekvenciral nukleinsko kislino (tRNA), leta 1977 pa sta Gilbert in Sanger neodvisno razvila različni metodi sekvenciranja DNA, kar je v biologiji povzročilo pravo revolucijo (Barba in sod., 2014). Metoda sekvenciranja po Sangerju je omogočila številne dosežke, kot je sekvenciranje človeškega genoma ter genomov nekaterih živalskih in rastlinskih vrst, vendar se je kmalu izkazalo, da je zaradi številčnih omejitev potreben razvoj novih tehnologij HTS in sod., 2014; Wu in sod., 2015).

Postopoma so metodo sekvenciranja po Sangerju zamenjale tehnologije HTS, ki so dnevno količino podatkov povečale za 100 do 1000-krat (Wu in sod., 2015). Posledično je z razvojem HTS padla tudi cena sekvenciranja (slika 1). Do leta 2007 je bila v večini primerov v uporabi metoda sekvenciranja po Sangerju, po letu 2008 pa so se vedno bolj uveljavile tehnologije HTS, kar je omogočilo drastičen padec cen (Wetterstrand, 2023).



Slika 1: Prikaz stroškov (v ameriških dolarjih) DNA sekvenciranja na surovo megabazo (angl. raw megabase) v letih od 2001 do 2022, ocenjeno s strani Nacionalnega inštituta za zdravje (NIH, ZDA) (Wetterstrand, 2023).

1.1 Platforme

Leta 2000 je ameriško podjetje MPSS Lynx Therapeutics razvilo prvo NGS platformo (Barba in sod., 2014). Kmalu so se na trgu pojavile različne izvedbe tehnologij HTS, ki so vodile v razvoj zmogljivejših HTS in posledično v uporabo številnih platform (preglednica 1) (Barba in sod., 2014; Mehetre in sod., 2021; Wu in sod. l., 2015). Nekatere med njimi so postopoma propadle oz. jih je kupilo podjetje Illumina, ki na trgu prevladuje še danes (Barba in sod., 2014; Mehetre in sod., 2021).

HTS pristopi se razlikujejo v biokemiji, pripravi vzorca, načinu sekvenciranja, zajemanja rezultatov in analizi podatkov. Komercialno dostopnih platform je veliko (preglednica 1), med drugimi platforma GS FLX+ (454 Life Sciences/Roche), platforma SOLiD (ABI), platforma Ion Torrent/Ion S5 (Life Technologies), platforme podjetja Illumina (HiSeq, MiSeq, NextSeq, GAIIx, NovaSeq, MiniSeq, iSeq), platforme podjetja Pacific Biosciences (PacBio; PacBioRS/RSII, Sequel), platforme podjetja Oxford Nanopore Technologies (ONT; MinION, PromethION, GridION) ter številne druge (Barba in sod., 2014; Berry in sod., 2020; Kutnjak in sod., 2021; Mehetre in sod., 2021; Wu in sod., 2015).

Obstajata dve glavni skupini sekvenčnih platform: metoda določanja kratkih odčitkov (angl. short-read sequencing, SRS), ki ustvarja odčitke dolžine do več sto nukleotidov, in metoda določanja dolgih odčitkov (angl. long-read sequencing, LRS; tudi imenovana sekvenciranje posameznih molekul, SMS), ki ustvarja odčitke dolžine do sto kilobaz (kb) (Kutnjak in sod., 2021).

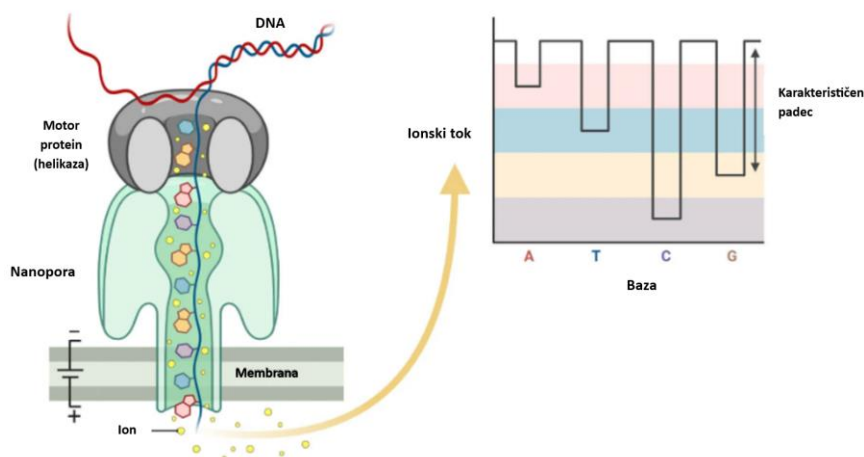
Preglednica 1: Tehnologije sekvenciranja glede na obdobje uporabe. Podane so glavne tehnologije, tip branja, ključne platforme, dolžine branja in natančnost (Illumina, 2025; Tamang, 2024; Wu in sod., 2015)

Obdobje	Glavna tehnologija	Tip branja*	Ključne platforme	Dolžina branja	Natančnost
~1977–danes	Sanger (dideoksinukleotidi, kapilarna elektroforeza)	Posamezna branja	ABI 3730 / 3730xl, Beckman CEQ, MegaBACE	do 1 kb	>99,99%
~2000–2015	Masovno vzporedno kratko branje (amplifikacija + sinteza)	SRS	Roche 454 GS FLX+, Illumina GAIIx / HiSeq / NovaSeq, ABI SOLiD, TFS Ion Torrent, BGI DNBSEQ	50–700 bp	98–99,9%
~2011–2020	Analiza posamezne molekule (brez PCR amplifikacije)	LRS	PacBio RS II / Sequel / Revio, ONT MinION / PromethION	10–100 kb (ONT>1 Mb)	90–99,9%
~2020–danes	Integrirane platforme z AI analitiko, v realnem času in več-modalnimi podatki	LRS / kombinirano	PacBio Revio, ONT Q20+, Illumina Infinity, Ultima Genomics UG100, Element AVITI	20–100 kb	>99,9%

*SRS= metoda določanja nukleotidnega zaporedja kratkih odčitkov (Short-Read Sequencing); LRS= metoda določanja nukleotidnega zaporedja dolgih odčitkov (Long-Read Sequencing); kb, kilobaza

Trenutno je za SRS najbolj pogosto uporabljena sekvenčna platforma Illumina, za LRS pa Pacific Biosciences (PacBio) in Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Berry in sod., 2020; Kutnjak in sod., 2021). SRS platformi, kot sta Illumina in Ion Torrent, ponujata visoko zmogljivost, kar omogoča obsežne raziskave rastlinskih virusov in viroidov. Vendar takšna visoka zmogljivost ni vedno potrebna, zlasti pri analizi manjšega števila vzorcev v rutinski diagnostiki (Pecman in sod., 2022). Platforma Ion Torrent/Ion S5 je kljub večjemu pojavljanju napak glede na Illumino, široko uporabljena, saj je cenovno ugodna in enostavna za uporabo (Berry in sod., 2020).

Platforma podjetja PacBio podobno kot Illumina temelji na sekvenciranju s sintezo, glavna razlika je v tem, da pri slednji detekcija temelji na signalu pomnoženih fragmentov DNA, PacBio pa deluje na osnovi SMRT tehnologije (angl. Single Molecule Real-Time). PacBio omogoča LRS in posledično zelo dolge odčitke dolžine do 10 kb, vendar pa je imela platforma v preteklosti poleg visoke zmogljivosti tudi veliko stopnjo napak (do 14 %) (Berry in sod., 2020; Wu in sod., 2015), ki se lahko zmanjša z uporabo načina HiFi (angl. High Fidelity) (>99,9%) (CD Genomics, 2025). Platforma ONT (Slika 2) (Tamang, 2024) je LRS in omogoča prilagodljive rešitve z različnimi pretočnimi celicami, od manjših (2,8 Gb na sekvenciranje, s Flongle adapterjem), do večjih, kot so MinION (do 50 Gb na sekvenciranje), GridION (do 250 Gb) in PromethION (do 14 Tb) (Tamang, 2024). Ena ključnih prednosti sekvenciranja z napravo MinION je možnost analize podatkov v realnem času in krajši čas do rezultata (24–48 ur) (Maina in sod., 2024; Pecman in sod., 2022).



Slika 2: Osnovni princip delovanja sekvenčne tehnologije ONT. Motorni protein (helikaza) odvijne DNA tako, da v nanoporo proti pozitivni strani membrane vstopa enoverižna DNA. Vsaka baza povzroči značilno zmanjšanje ionskega toka, kar omogoča določitev nukleotidnega zaporedja DNA (povzeto po (Tamang, 2024)).

Tehnologija ONT temelji na spremljanju prehoda molekul DNA ali RNA skozi proteinsko poro, kar privede do spremembe električne napetosti, ki jo lahko izmerimo (slika 2) (Tamang, 2024). Z ONT lahko sekvenciramo izjemno dolga zaporedja DNA ali RNA. Vendar pa sta v preteklosti potreba po visoki začetni količini RNA (500 ng) in visoka stopnja napake (do 15 %, odvisno od uporabljene pretočne celice) omejila njeno uporabnost (Berry in sod., 2020; Maina in sod., 2024; Pecman in sod., 2022). Z razvojem ONT tehnologije se je zmanjšala tudi stopnja napake (do 5 %), ki se lahko z dodatnimi korekcijami zniža na 99.996% (CD Genomics, 2025). Prednost ONT je, da je MinION prenosna naprava, ki se priključi prek USB-ja, kar omogoča uporabo v različnih laboratorijskih okoljih (Maina in sod., 2024). Uporaba MinION-a za detekcijo virusov je v porastu, saj se uporablja v epidemiološkem spremljanju, identifikaciji mikrobioma in diagnostiki na terenu (Mehetre in sod., 2021). Sekvenciranje z ONT se hitro razvija in pričakuje se, da bo v prihodnosti bolj široko uporabljano (Kutnjak in sod., 2021).

1.2 HTS postopek

Za identifikacijo rastlinskih patogenov lahko uporabimo dve vrsti HTS: ciljno (angl. amplicon/targeted sequencing/metabarcoding) in naključno sekvenciranje (angl. shotgun/random sequencing) (EPPO, 2022). Pri ciljnim sekvenciranjem gre za uporabo specifičnih barkod oz. amplikonov, ki nastanejo s PCR ali sorodnimi protokoli. Začetni oligonukleotidi (ZO) so navadno načrtovani tako, da specifično pomnožijo ohranjeno regijo več različnih tarčnih organizmov (bakterije, glive, rastline, virusi, insekti, nematode) in lahko generirajo nukleotidna zaporedja čim večjega števila vrst. Pri »shotgun« načinu pa naključno sekvenciramo katero koli DNA ali RNA prisotno v vzorcu (ne glede na njen izvor) in pridobimo celoten genom vseh prisotnih patogenov (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022).

Ne glede na uporabljen postopek lahko HTS razdelimo na osem korakov (slika 3), ki obsegajo vzorčenje, laboratorijski in bioinformacijski del in na koncu potrditev in interpretacijo rezultatov (Lebas in sod., 2022). Za vsak korak obstajajo različni protokoli, ki se z razvojem tehnologije redno spreminjajo in jih je posledično potrebno redno posodabljanje (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022).

1. korak: vzorčenje. Zahteve za HTS vzorec so podobne kot za ostale diagnostične teste (EPPO, 2021), le da lahko v tem primeru vzorec vsebuje več različnih patogenov (Lebas in sod., 2022).

2. korak: ekstrakcija nukleinskih kislin. Izbira metode ekstrakcije je odvisna od tipa nukleinske kisline (DNA ali RNA), zahtev platforme glede velikosti fragmentov in matriksa (npr. semena, listi, steblo, zemlja, ...). V večini primerov zadostujejo protokoli, ki se uporabljajo za PCR in PCR v realnem času (qPCR), v nekaterih primerih pa so podane še dodatne zahteve z višjo integriteto nukleinskih kislin in nižjo koncentracijo (EPPO, 2022). Večina razpoložljivih protokolov priporoča oceno kakovosti in količine nukleinskih kislin pred pripravo knjižnice. Pri nekaterih pristopih obogatitve (npr. VANA [angl. Virion-Associated Nucleic Acids], ekstrakcija dsRNA) so koncentracije pridobljenih nukleinskih kislin lahko nižje od zahtevane količine za pripravo knjižnice, zato je lahko pred gradnjo knjižnice potreben korak naključne amplifikacije (Kutnjak in sod., 2021).

3. korak: priprava knjižnice. Cilj priprave je izolirati in pogosto tudi namnožiti zadostno količino nukleinskih kislin ustrezne velikosti, ki so na obeh koncih obdane z adapterji in indeksi (oligonukleotidnimi zaporedji) potrebnimi za sekvenciranje. Adapterji so kratka nukleotidna zaporedja, ki se razlikujejo med platformami, in omogočajo pritrditev na sekvencer in s tem začetek sekvenciranja. Indeksi se uporabljajo pri sočasnem sekvenciranju več tarč (angl. multiplexing) za povezovanje posameznih fragmentov nukleinske kisline z izvornim vzorcem. Protokol se razlikuje glede na uporabljen HTS test (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022).

Za **ciljno sekvenciranje** je zelo pomembna izbira ustreznih ZO, ki omogočajo pomnožitev tarčne regije na 3'-koncu in zaporedja adapterja na 5'-koncu (indeksi so opcijski). Priporočljiva je uporaba polimeraze, ki naredi manj napak (angl. high-fidelity), da ne pride do napačnega zaporedja nukleotidov. Pomembno je tudi število ciklov PCR reakcije, ker se mora reakcija ohraniti v eksponentni fazi (EPPO, 2022).

Pri »shotgun« sekvenciranju je na voljo več protokolov, ki so komercialno dostopni. Izbira protokola je odvisna od tehnologije sekvenciranja, tehničnih kriterijev, časa, osebja ter stroškov reagentov in potrošnega materiala. V primeru RNA se najprej izvede korak reverzne transkripcije, pri nekaterih platformah pa se lahko uporabi direktno sekvenciranje RNA (ONT; PacBio) (Lebas in sod., 2022).

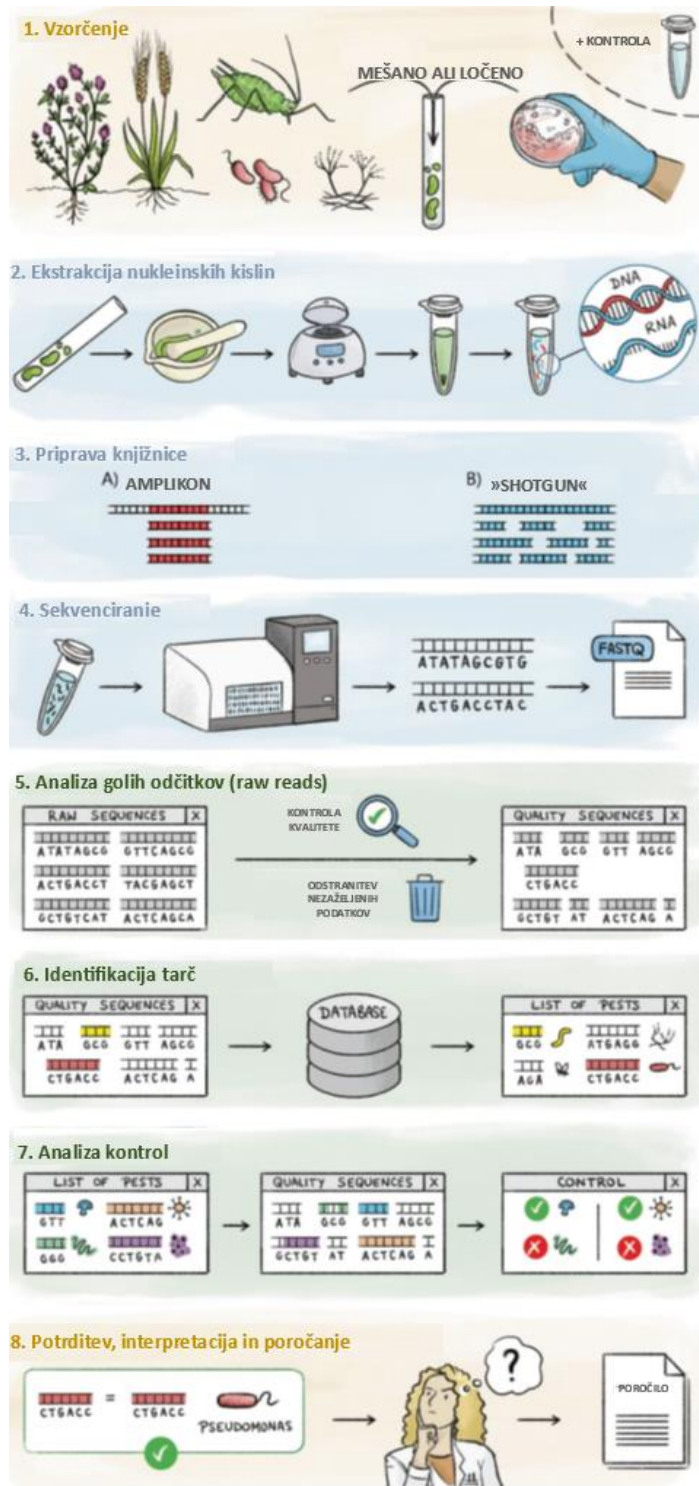
Opcijsko v 3. koraku:

- obogatitev (angl. enrichment/ target selection) je neobvezen korak, ki pri »shotgun« sekvenciranju predstavlja odstranitev ne-tarčnih zaporedji (rastlinska ribosomska RNA, rRNA- ribodeplecija), ultracentrifugacija pred ekstrakcijo, obogatitev dvoverižne RNA (dsRNA) ali zajem sonde (angl. probe capture, uporaba tarčno specifičnih oligonukleotidov) (EPPO, 2022; Liefting in sod., 2021).

- združevanje vzorcev (angl. pooling of samples/ multiplexing) je prav tako lahko del priprave knjižnice, ker zmanjša stroške sekvenciranja. Vzorec se označi z indeksom (angl. index/ barcode/ tag /MID), ki je kratko

oligonukleotidno zaporedje obdano (ali ne) z adapterjem, in se uporablja za označevanje vzorcev. Indeks je lahko dodan na en ali oba konca fragmenta nukleinske kisline in se sekvencira sočasno s tarčo ali v ločeni regiji, kar omogoča da vsako zaporedje lahko povežemo z originalnim vzorcem (po koraku »razzdruževanja«) (Lebas in sod., 2022). Zaradi združevanja se poveča verjetnost napak in kontaminacije, prav tako pa morajo biti vzorci prej normalizirani, da se zmanjša pristranskost zaradi združevanja (EPPO, 2022).

4. korak: sekvenciranje. Vsak laboratorij naj bi uporabljal optimalno platformo in dolžino odčitkov glede na namen uporabe HTS testa. Obstajajo številne platforme, ki so komercialno dostopne in se zelo pogosto posodablja, kar ima lahko vpliv na rezultate. Poleg kvalitete sekvenciranja (število odčitkov, dolžina odčitkov, število napak, globina pokritosti,...) je pomemben tudi strošek sekvenciranja in sod., 2022).



Slika 3: Postopek izvedbe HTS pri rastlinski diagnostiki (povzeto po (Lebas in sod., 2022)).

5. korak: analiza surovih odčitkov (angl. raw reads). Ta korak obsega bioinformacijsko analizo, vključno s kontrolo kakovosti generiranih zaporedij in odstranitvijo adapterjev (neobvezno), indeksov in začetnih oligonukleotidov. V primeru združenih vzorcev, korak »razzdruževanja« (angl. demultiplexing) omogoča dodelitev generiranih zaporedij ustreznim vzorcem. Dodatno se lahko izvede tudi analize, ki zmanjšajo količino podatkov in izboljšajo kakovost analize, kot je na primer združevanje smernih in protismernih odčitkov na osnovi prekrivajočih se regij ali odstranjevanjem podvojenih odčitkov (Kutnjak in sod., 2021; Lebas in sod., 2022).

6. korak: Identifikacija tarč. Bioinformacijska analiza je namenjena povezovanju zaporedij s specifičnimi organizmi. Glede na namen HTS testiranja je lahko anotacija zaporedij taksonomska (vrsta, rod, družina, ...) ali funkcijska (določitev ali odčitek pripada kodiranemu območju, intronu, promotorju, microRNA,...). Identifikacija se lahko izvede na posameznih odčitkih, po »de novo« sestavljanju, po mapiranju odčitkov na referenčno zaporedje ali z uporabo kombinacije vseh pristopov (Lebas in sod., 2022).

7. korak: analiza kontrol. Ta analiza omogoča preverjanje ali so vse kontrole, vključno s HTS-analizo, dale pričakovane rezultate, z namenom, da se odpravijo lažno pozitivni in/ali lažno negativni rezultati. Za preverjanje morebitne kontaminacije, ki se lahko pojavi med HTS-analizo, se lahko v različnih korakih uporabi pozitivne, negativne in tuje (angl. alien) kontrole. Tuja kontrola vsebuje tarčo (škodljivca ali ne), ki spada v isto skupino kot tarčni organizmi, vendar se v testnem vzorcu ne more pojaviti (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022; Massart in sod., 2022).

8. korak: potrditev tarče, interpretacija in poročanje. Zadnji korak obsega potrditev identitete tarč zaznanih v vzorcu, razlago biološkega in fitosanitarnega pomena identifikacije tarč (zlasti pri novih odkritjih) in poročanje rezultatov HTS-testa (Lebas in sod., 2022).

1.3 Bioinformatika

Medtem ko so postopki v laboratoriju in sekvenciranje (angl. wet lab) postali široko dostopni in uporabnikom prijazni, analiza in interpretacija podatkov (angl. dry lab), še vedno zahteva specializirano znanje bioinformatike in ustrezno računalniško infrastrukturo (Berry in sod., 2020). Bioinformacijski del obsega uporabo različnih programov, ki omogočajo analizo surovih podatkov. Rezultati, ki jih generira bioinformacijski analizni postopek (angl. pipeline) so odvisni od uporabljene programske opreme (verzije), nastavitve parametrov in pragov ter natančnosti in popolnosti podatkovnih baz zaporedij, uporabljenih za referenco (EPPO, 2022). Razvitih je bilo veliko bioinformacijskih analiznih postopkov, ki lahko delujejo v okolju Linux, prek spletnih vmesnikov, kot komercialni paketi ali odprtokodna programska oprema. Razvoj gre v smeri poenostavljenih rešitev na »en klik«, ki pa potrebujejo ustrezno usposobljeno osebje, ki razume njihovo delovanje, da jih lahko pravilno uporabi glede na podatke in cilje analize (EPPO, 2022; Ren in sod., 2017).

Na splošno, ne glede na izbiro programske opreme ali analiznega postopka za detekcijo in identifikacijo patogenov v vzorcu, obstajajo skupni koraki, ki jih je mogoče upoštevati za uspešno analizo (Berry in sod., 2020). Najprej se preveri kakovost sekvenčnih podatkov, kot tudi kakovost surovih odčitkov. Surovi podatki platforme se običajno očistijo, obrežejo in filtrirajo, da se odstranijo nizkokakovostni in podvojeni odčitki (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022). Odstranitev odčitkov genomov/ transkriptomov gostitelja se izvaja zato, da se zmanjša šum ozadja (npr. odčitki gostitelja in okolja) in poveča frekvenca odčitkov patogenov. Ta korak prav tako zmanjša čas nadaljnje analize. Nadaljnje odstranjevanje šuma ozadja se doseže z mapiranjem odčitkov vzorca na odčitke negativne kontrole, da se zagotovi odstranitev morebitnih kontaminacij, kot so odčitki povezani z reagenti. Preostali odčitki se običajno sestavijo »de novo«, tako da se ustvarijo dolgi segmenti zaporedij (angl. contig). Pri platformah, ki proizvajajo kratke odčitke, ta korak zagotavlja zanesljivost rezultatov in večjo natančnost nadaljnje identifikacije patogenov (Berry in sod., 2020; Lebas in sod., 2022; Massart in sod., 2022).

Taksonomska identifikacija dobljenih segmentov zaporedij se izvede z ujemanjem z geni in zaporedji v nukleotidnih ali proteinskih bazah podatkov, za to se najpogosteje uporabljajo različice programa BLAST (BLASTx, BLASTn, MegaBLAST, BLASTp; NCBI, ZDA). Pogosto se te baze podatkov prenesejo lokalno, da se skrajša čas obdelave. Eden izmed bolj zahtevnih korakov metagenomskih analiz in odkrivanja patogenov je interpretacija rezultatov. Manj izkušeni laboratoriji se lahko soočijo s težavami pri prepoznavanju lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov, vključno z razlikovanjem med ozadjem, kontaminacijo in resnično prisotnimi patogeni. To je še posebej zahtevno, kadar je koncentracija patogena v vzorcu nizka (Berry in sod., 2020; Kutnjak in sod., 2021).

Eden glavnih dejavnikov, ki vplivajo na natančnost in popolnost sestave genoma, je kakovost sekvenciranih odčitkov (angl. reads) in globina pokritosti (angl. read depth). Ti vidiki se razlikujejo med platformami in pristopi kratkih in dolgih odčitkov. Če zahteve glede kakovosti odčitkov in globine pokritosti niso izpolnjene,

konsenznega zaporedja ni mogoče upoštevati. Običajno se takšni nepopolni/genomi z vrzelmi dopolnijo z dodatnim sekvenciranjem. Kakovost sestave bo prav tako odvisna od uporabljenega algoritma za sestavljanje. Obstaja veliko algoritmov za sestavljanje genomov in določanje konsenza, ki se močno razlikujejo po zapletenosti, natančnosti, hitrosti in prilagodljivosti. Na splošno obstajata dva glavna pristopa k sestavljanju genomov: sestavljanje na osnovi referenčnega genoma (angl. reference-based/mapping-based) in »de novo« sestavljanje (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022).

Sestavljanje na osnovi referenčnega genoma je zelo uporabno orodje za sestavljanje znanih genomov, saj odčitke vzorca poravnamo na referenčni genom na podlagi najboljše poravnave z referenco. V tem primeru je ključna izbira reference, ki se ne sme preveč razlikovati od vzorca, da se lahko večina odčitkov ustrezno nalega. Analiza na osnovi referenčnega genoma je mogoča z uporabo programov osnovanih na ukazni vrstici (BWA MEM, Bowtie2) oziroma komercialno dostopnih orodjih, kot sta Geneious in CLC Genomics Workbench, kot tudi odprtokodnih orodjih, kot so Galaxy Platform, Pathosphere, EDGE in številni drugi (Berry in sod., 2020).

»De novo« sestavljanje genomov temelji na povezovanju odčitkov vzorca med seboj z uporabo prekrivajočih se zaporedij, da se ustvarijo daljši segmenti zaporedij. Uporablja se kadar je patogen nov, neznan, referenčni genom ne obstaja ali pa se predvideva, da so prisotne insercije, delecije in ponovitve. Najpogosteje se uporablja orodja kot so SPAdes, Velvet, Minia, ABySS, IDBA-UI, ALLPATHS-LG in SOAPdenovo, ki so lahko del komercialno dostopnih orodjih kot sta Geneious in CLC Genomics Workbench (Berry in sod., 2020; Kutnjak in sod., 2021). Če v genomu nastanejo vrzeli, jih lahko zapolnimo *in silico* z uporabo orodjih kot so Bandage, Mauve, CLC Genomics Workbench in EDGE. Za povečanje natančnosti sestavljanje genomov je najboljša uporaba kombinacije obeh načinov sestavljanja (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022).

Detekcijo patogenov si lahko olajšamo tudi z uporabo orodjih, kot je diagnostična analiza nukleinskih kislin z e-sondami (angl. E-probe Diagnostic Nucleic Acid Analysis; EDNA) (Pasha in sod., 2024). Z uporabo nadgradnje sistema EDNA, ki se imenuje Microbe Finder (MiFi), lahko načrtujemo e-sonde, ki omogočajo neposredno detekcijo tarčnih patogenov v surovih bazah HTS podatkov. Na ta način se lahko izognemo dolgotrajnemu koraku bioinformacijske analize. Platforma MiFi vsebuje dve ključni orodji, MiProbe za načrtovanje e-sond in MiDetect za detekcijo patogenov. Omogoča detekcijo genomov virusov, viroidov, gliv, oomicet in bakterij v rastlinah in drugih organizmih (Pasha in sod., 2024).

Vse platforme in algoritmi za sestavljanje imajo omejitve zato se pričakuje, da bodo v rezultatih prisotne napake. Kontrola kakovosti in pregled sestavljenega zaporedja je zato zelo pomemben korak analize. Zaradi napak namreč lahko prihaja do nepričakovanih insercij ali delecij, premikov bralnih okvirjev ali stop kodonov (Berry in sod., 2020; Jia in sod., 2012). Bioinformatika tako predstavlja ključen del analize, pri katerem so za ustrezno interpretacijo rezultatov zelo pomembne izkušnje in ustrezna usposobljenost osebja.

1.4 Prednosti in slabosti HTS za sodobno diagnostiko patogenov

Tehnologija HTS postaja nepogrešljivo orodje za sodobno diagnostiko virusov in viroidov v rastlinah, tako kot ostale diagnostične metode pa ima seveda številne prednosti in slabosti (preglednica 2). Njegova glavna prednost je nepristranska detekcija, ki omogoča odkrivanje znanih in novih patogenov brez predhodnega znanja o njihovi prisotnosti, hkrati pa iz enega vzorca razkrije celoten spekter okužb (Lebas in sod., 2022; Massart in sod., 2022; Pecman in sod., 2022; Rong in sod., 2023). HTS se odlikuje po visoki občutljivosti, sposobnosti prepoznavanja genetskih različic in možnosti ponovne analize podatkov. Kljub temu njegova rutinska uporaba ostaja omejena zaradi visokih stroškov, zahtevne bioinformacijske obdelave, pomanjkanja standardizacije, ker se protokoli za delo v laboratoriju in analizo podatkov zelo razlikujejo (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022; Pecman in sod., 2022; Rivarez in sod., 2023; Rong in sod., 2023). Kljub padcu cen HTS analiz, ki omogoča lažjo dostopnost, velik izziv še vedno predstavlja dejstvo kako določiti optimalno količino podatkov (število odčitkov), ki so potrebni za natančno in zanesljivo detekcijo patogenov (Visser in sod., 2016).

Preglednica 2: Prednosti in slabosti HTS (Berry in sod., 2020; Lebas in sod., 2022; Massart in sod., 2022; Pecman in sod., 2022; Visser in sod., 2016).

Vidik	Prednosti HTS	Slabosti HTS
Detekcija patogenov	Nepristranska detekcija – ni potrebe po predhodnem znanju o patogenu; omogoča odkrivanje znanih, divergentnih in novih virusov ter viroidov v enem postopku.	Prisotnost sekvence patogena ne pomeni nujno aktivne okužbe; težave pri ločevanju med dejansko infekcijo in kontaminacijo.
Število tarč v analizi	Sočasna detekcija več patogenov v enem vzorcu (virusi, viroidi, bakterije, glive).	Različni protokoli in metode lahko dajejo različne rezultate – omejena primerljivost med laboratoriji.
Občutljivost in natančnost	Zazna patogene v zelo nizkih koncentracijah, tudi v latentnih okužbah; visoka ponovljivost rezultatov.	Visoka občutljivost poveča tveganje zaznavanja kontaminacij (npr. iz laboratorija ali okolja).
Genetske informacije	Omogoča identifikacijo sevov, mutacij, rekombinacij in analizo genetske raznolikosti patogenov.	Interpretacija genetskih razlik zahteva poglobljeno bioinformacijsko znanje in kakovostne referenčne baze, ki so pogosto nepopolne.
Uporabnost v diagnostiki	Primerna za odkrivanje kompleksnih mešanih okužb in spremljanje evolucije patogenov.	V številnih državah še ni uradno priznana diagnostična metoda – zahteva dodatno potrditev (npr. PCR).
Dolgoročna uporabnost podatkov	Možnost ponovnih analiz, ko se razširijo baze podatkov ali pojavijo nova vprašanja.	Shranjevanje in obdelava velikih količin podatkov zahtevata močno računalniško infrastrukturo.
Ekonomika in izvedba	Omogoča hiter vpogled v celoten virom rastline v enem postopku. Velika ponudba zunanjih izvajalcev storitev.	Visoki stroški opreme, reagentov in analize; zahteva strokovno usposobljeno osebje.
Standardizacija	Postopki se hitro razvijajo in postajajo dostopnejši.	Pomanjkanje enotnih protokolov za vzorčenje, pripravo knjižnic in analizo podatkov.

Ena glavnih ovir za uvedbo tehnologij HTS v laboratorijih za varstvo rastlin je pomanjkanje mednarodnih smernic, ki bi zajemale tako laboratorijske kot bioinformacijske postopke in obsegale usposabljanje in preverjanje usposobljenosti osebja, ustrezno infrastrukturo in opremo, ter zagotavljanje kakovosti v skladu z nacionalnimi in mednarodnimi (npr. ISO) standardi. Poleg tega je treba v rutinski uporabi upoštevati tudi različne dejavnike, kot so določitev mejnih vrednosti meril kakovosti in njihov sprejemljiv razpon, da se zagotovi zanesljivost rezultatov (Lebas in sod., 2022).

2 VIROIDI

Viroidi so najmanjši doslej opisani patogeni, sestavljeni zgolj iz 246–401 nukleotidov nekodirajoče krožne RNA (circRNA) (Flores, 2001; Katsarou in sod., 2022; Navarro in sod., 2012) z neznanim evlucijskim izvorom (Rueda in sod., 2025). Odkar so jih leta 1971 odkrili v krompirju (Diener, 1971), so viroide obravnavali kot redke biološke entitete, saj so v zadnje pol stoletja o njih poročali le pri 45 vrstah kritosemenk. Nedavne HTS študije pa so ta pogled postavile pod vprašaj, saj so razkrile na tisoče novih viroidom podobnih entitet, razširjenih po najrazličnejših ekoloških nišah. Presenetljivo je, da večina teh na novo odkritih krožnih RNA kaže znake razmnoževanja v bistveno enostavnejših organizmih, vključno z evkarionti in prokarionti, ne pa samo v rastlinah (Rueda in sod., 2025).

Viroidi imajo pomemben negativen gospodarski vpliv pri kokosovih palmah (700.000 okuženih palm na Filipinih zaradi CCCVd [angl. coconut cadang-cadang viroid; *Cocadviroid cadangii*]), pri sadnem drevju (do 95 % izgube pridelka avokada zaradi ASBVd [angl. avocado sunblotch viroid; *Avsunviroid albamaculaperseae*]), pri okrasnih rastlinah (do 65 % zmanjšanje rasti krizantem zaradi CSVd [angl. chrysanthemum stunt viroid; *Pospiviroid impedichrysanthemi*]), pri vrtninah (do 64 % izgube pridelka krompirja zaradi PSTVd [angl. potato spindle tuber viroid; *Pospiviroid fusituberis*]), kot tudi pri pridelavi hmelja (do 70 % nižja vsebnost α -kislin zaradi CBCVd [angl. citrus bark cracking viroid; *Cocadviroid rimocitri*]) (Guček, 2020; Hammond, 2017; Rodriguez in sod., 2017; Verhoeven in sod., 2017).

Diagnostika viroidov je zapletena, da bi bila metoda detekcije učinkovita, mora izpolnjevati kriterije "ASSURED": cenovno dostopna (angl. affordable), občutljiva (angl. sensitive), selektivna (angl. selective), enostavna za uporabo (angl. user-friendly), hitra in robustna (angl. rapid and robust), brez potrebe po opremi

(angl. equipment-free) in dostopna končnim uporabnikom (angl. deliverable to end users). Vendar pa ne obstaja "popolna" metoda zaznavanja ali ena zlata standardna metoda, saj ima vsaka tehnologija svoje prednosti in slabosti (Katsarou in sod., 2019).

Tradicionalno se za zaznavanje viroidov uporabljajo molekularni testi, kot so RT-PCR in RT-qPCR (Guček in sod., 2017). Vendar pa HTS kot ne-tarčna metoda omogoča zaznavo katerega koli viroida, tudi nepričakovanih oziroma neznanih (Rollin, 2023). Z uporabo HTS so na podlagi analiz sRNA, total RNA in dsRNA odkrili nove gostitelje in identificirali številne viroide, kot so PSTVd, CEVd (angl. citrus exocortis viroid; *Pospiviroid exocortiscitri*), ADFVd (angl. apple dimple fruit viroid; *Apscaviroid fossulamali*), PLMVd (angl. peach latent mosaic viroid; *Pelamoviroid latenspruni*), HSVd (angl. hop stunt viroid; *Hostuviroid impediuhumuli*) in GYSVd (angl. grapevine yellow speckle viroid 1 in 2; *Apsaviroid alphaflavivitis/ betaflavivitis*) (Hadidi in sod., 2016). Med drugim so na tak način v hmelju odkrili tudi CBCVd (Jakse in sod., 2015).

HTS je omogočil tudi odkritje novih ali prej neznanih viroidov (preglednica 3) (Ito in sod., 2013; Ortega-Acosta in sod., 2024; Rueda in sod., 2025; Wu in sod., 2015; Zhang in sod., 2014). Za odkrivanje novih viroidov je bil razvit poseben računalniški algoritem PFOR (angl. progressive filtering of overlapping small RNAs), ki deluje na principu siRNA (malih interferenčnih RNA) (Wu in sod., 2012). V rastlini namreč okužba z viroidi sproži nastanek viroidnih siRNA, ki lahko z visoko gostoto prekrijejo celoten genom viroida. Vendar pa zaradi velike heterogenosti populacij viroidov teh siRNA ni mogoče sestaviti v celotne genome viroidov s konvencionalnimi algoritmi, kot je npr. Velvet. PFOR omogoča postopno odstranjevanje malih RNA, ki se ne prekrivajo oz. tistih, ki jih ni mogoče sestaviti in posledično identifikacijo viroidov iz obeh znanih družin (Wu in sod., 2012, 2015). S posodobitvijo algoritma na PFOR2 se je še povečala učinkovitost filtriranja viroidov (Zhang in sod., 2014). Na ta način so bili odkriti novi viroidi, med drugim GLVd (angl. grapevine latent viroid; *Apscaviroid latensvitis*), ki so ga uvrstili kot novo vrsto rodu *Apscaviroid* (Zhang in sod., 2014). Uporaba algoritmov PFOR/PFOR2 je omogočila tudi odkritje dveh viroidom podobnih RNA: GHVd RNA (angl. grapevine hammerhead viroid-like RNA) in AHVd RNA (angl. apple hammerhead viroid-like RNA) (preglednica 3) (Wu in sod., 2012, 2015; Zhang in sod., 2014).

Preglednica 3: Seznam novih viroidov odkritih s HTS.

Viroid (angleško ime)	Družina/Rod	Referenca
persimmon viroid 2 (PVD2)	Apscaviroid	(Ito in sod., 2013)
grapevine hammerhead viroid-like RNA (GHVd RNA)	Avsunviroidae	(Wu in sod., 2012)
apple hammerhead viroid-like RNA (AHVd-like RNA)	Avsunviroidae	(Zhang in sod., 2014)
grapevine latent viroid (GLVd)	Apscaviroid	(Zhang in sod., 2014)
mexican opuntia viroid (MOVd)	Pospiviroidae	(Ortega-Acosta in sod., 2024)
opuntia viroid 2 (OVd-2)	Apscaviroid	(Ortega-Acosta in sod., 2024)

Iskanje novih viroidov na osnovi že obstoječih podatkov HTS je mogoče tudi z uporabo drugih orodij. V svoji raziskavi so Rueda in sod. (2025) izvedli celovito bioinformacijsko iskanje klasičnih rastlinskih viroidov (družina Pospiviroidae, 40 znanih vrst) z uporabo genetske baze podatkov Logan (Chikhi in sod., 2025). S strukturno analizo so identificirali 13.000 genomov, ki izpolnjujejo značilnosti družine Pospiviroidae: majhno krožno RNA zaporedje, paličasto sekundarno strukturo ter prisotnost osrednjih in terminalnih domen, ohranjenih pri vseh viroidih. Med temi so odkrili 20 genomov, ki verjetno predstavljajo nove vrste rastlinskih viroidov. Ti rezultati nakazujejo širši spekter rastlinskih gostiteljev, kot je bilo prej znano. Viroide je tako mogoče zaznati pri novih vrstah kritosemenk, od zeliščnih, kot je črni poper (angl. piper nigrum viroid, PnVd), indigo (angl. strobilanthes cusia viroid, ScVd), do lesnatih rastlin, kot so topoli (angl. populus viroid, PVD) ali magnolije (angl. magnolia viroid, MVd). Novi viroidi so bili prav tako odkriti v okoljskih vzorcih (angl. MAG-X Vd), od sedimentov, do vzorcev blata goveda. Hkrati so v omenjeni raziskavi potrdili tudi veliko novih gostiteljev, med drugim so viroid PSTVd našli v godži jagodah. Uporaba HTS metod v kombinaciji z obsežnimi bazami podatkov tako pripomore k boljšemu razumevanju biologije viroidov, hkrati pa poudarja tudi bolj omejeno genetsko raznolikost in številčnost tipičnih rastlinskih viroidov v primerjavi z drugimi krožnimi RNA molekulami, kot so obeliski in viroidom podobne RNA z ribocimi (Rueda in sod., 2025).

3 RUTINSKA DIAGNOSTIKA VIROIDOV S HTS

Tehnologije HTS se nenehno izboljšujejo, da postanejo hitrejše, učinkovitejše in cenejše. Leta 2009 so se HTS tehnologije začele uporabljati tudi na več področjih rastlinske virologije, vključno s sekvenciranjem genomov virusov in viroidov, odkrivanjem in zaznavanjem patogenov, ekologijo in epidemiologijo ter replikacijo in transkripcijo. Identifikacija in karakterizacija znanih in neznanih virusov in viroidov v okuženih rastlinah sta med najuspešnejšimi uporabi teh tehnologij (Barba in sod., 2014). Uporaba HTS tehnologij se je povečala zaradi možnosti prepoznavanja mešanih patogenih okužb v enem samem testu, za katere bi sicer potrebovali več različnih testov. Viroidi se navadno analizirajo v kombinaciji z virusi, saj se s HTS najpogosteje raziskuje celoten virom (vsi virusi in viroidi) gostitelja. Zgodovinsko gledano se je HTS manj uporabljal zaradi svoje zahtevnosti in višje cene (Rollin, 2023). Vendar pa se je z razvojem tehnologij to spremenilo in HTS se zdaj že več kot desetletje uporablja za odkrivanje novih virusov in viroidov ter postaja standardno orodje v raziskavah in diagnostiki rastlinske virologije (Massart in sod., 2022; Rivarez in sod., 2021).

Različni pristopi RNA sekvenciranja (RNA-Seq) so bili obsežno uporabljeni za odkrivanje in karakterizacijo rastlinskih virusov in viroidov, pri čemer se uporabljajo različni vhodni tipi nukleinskih kislin, metode priprave knjižnic in sekvencne platforme. Ribosomske RNA (rRNA) so izjemno pogoste in predstavljajo 80–90 % celotne RNA, pri čemer je ribodeplecija ključna za obogatitev patogenov v vzorcu (Liefiting in sod., 2021). HTS pristopi vključujejo uporabo celotne RNA (totRNA), rRNA-depletirane celotne RNA (rRNA-depleted totRNA), dvoverižne RNA (dsRNA), majhnih RNA (sRNA), poliadeniliranih RNA (polyA RNA) ali z virusom povezanih nukleinskih kislin (VANA) (Javaran in sod., 2023; Maina in sod., 2024; Pecman in sod., 2017; Rivarez in sod., 2021). Za široko detekcijo virusov in viroidov v posameznih vzorcih ali relativno majhnemu številu združenih vzorcev (Pecman in sod., 2017; Rivarez in sod., 2021) se najpogosteje uporabljata sekvenciranje rRNA-depletirane totRNA (Visser in sod., 2016) ali sRNA, medtem ko sta dsRNA in VANA primernejša za obogatitev v večjih skupinah vzorcev (Rivarez in sod., 2021).

Število odčitkov, potrebnih za detekcijo virusov in viroidov, je odvisno od števila virusnih/viroidnih odčitkov v podatkih, velikosti virusnega/viroidnega genoma in kompleksnosti viroma. Nekateri virusi ali viroidi so lahko v podatkih bolj zastopani, odvisno od stopnje okužbe, ki je lahko odvisna od gostitelja in/ali virusa/viroida, odziva rastline na okužbo v primeru majhnih RNA (sRNA) ter narave genoma pri različnih tipih knjižnic (npr. DNA, poli(A)-izbrane RNA, RNA knjižnice z odstranjenimi ribosomi) (Visser in sod., 2016).

Veliko težavo pri vpeljavi HTS v rutinske analize predstavlja vprašanje kontaminacije, saj so ti testi enako ali celo bolj občutljivi na kontaminirane vzorce kot PCR metode. Zaradi številnih korakov priprave in uporabe velikega števila reagentov obstaja povečano tveganje vnosa tuje nukleinske kisline, ki jo HTS zaradi širokega spektra detekcije in visoke občutljivosti zlahka zazna. Kontaminacija se lahko pojavi v katerikoli fazi laboratorijskega postopka, od vzorčenja in izolacije nukleinskih kislin do priprave knjižnic in samega sekvenciranja (Massart in sod., 2022). Viri kontaminacije vključujejo nepravilno rokovanje z vzorci, onesnažene površine, opremo, reagente ali prenos ostankov iz prejšnjih analiz, pogosta pa je tudi navzkrižna kontaminacija med več zaporednimi sekvenciranjem. Pri združevanju vzorcev se lahko pojavi navzkrižna kontaminacija na primer zaradi preskakovanja indeksov. Določeni laboratorijski reagenti, kot so kompleti za izolacijo DNA in molekularno čista voda, lahko dodatno vplivajo na rezultate. Zato je nujno dosledno upoštevati dobre laboratorijske prakse, kot so uporaba čistih reagentov, redno čiščenje opreme in fizična ločitev vzorcev z visoko koncentracijo tarčnih organizmov. Kljub temu do popolne odprave kontaminacije ni mogoče priti, zato je njeno spremljanje skozi celoten HTS-postopek ključnega pomena. Prav tako lahko uporaba ustreznih kontrol precej pripomore k lažjemu spremljanju vpliva kontaminacije (EPPO, 2022; Massart in sod., 2022).

V rutinski diagnostiki tehnologije HTS odpirajo nove možnosti za razumevanje statusa patogena v določeni regiji preko programov monitoringa, za certifikacijo sadilnega materiala, za karantensko testiranje (po vnosu) za preprečevanje vnosa patogenov v državo, kot tudi monitoring uvoženega rastlinskega blaga, ki bi lahko predstavljal nova tveganja (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022). Pri HTS je lahko tarča eden ali več različic, vrst, rodov, družin ali skupin organizmov (bakterije, glive, virusi, viroidi), ki se testirajo kot posamezni vzorci ali izolati ali pa v različnih matriksih (rastline, zemlja, voda). Obseg HTS-testa mora biti opredeljen v skladu s standardoma EPPO PM 7/98 (EPPO, 2021) in EPPO PM 7/151 (EPPO, 2022). Slednji opisuje posebne izzive povezane z laboratorijskimi postopki in bioinformacijskimi analizami, validacijo ter nadzorom kakovosti pri HTS testih.

Za učinkovito vključitev HTS v rutinske analize viroidov bo ključnega pomena vzpostavitev referenčnih baz, standardnih protokolov in postopkov validacije (EPPO, 2022; Lebas in sod., 2022). V študiji Bester in sod. (2022) so dokazali, da je z dobro validacijo celotnega HTS postopka možna zanesljiva rutinska analiza viroidov kot so HSVd, CEVd in CDVd (angl. citrus dwarfing viroid; *Apscaviroid nanocitri*) v agrumih.

4 ZAKLJUČKI

Razvoj tehnologij HTS napreduje izjemno hitro, postopki sekvenciranja se nenehno izboljšujejo, kar zmanjšuje napake, znižuje stroške in povečuje zanesljivost rezultatov. Takšna dinamika pa hkrati otežuje vzpostavljane stabilnih in primerljivih diagnostičnih protokolov za rutinsko spremljanje in odkrivanje patogenov. Čeprav novi pristopi odpirajo številne raziskovalne priložnosti, pogosto mine več let, preden so ustrezno validirani in uvedeni v redno diagnostično prakso. Zato je nujno, da se načrtovanje na področju zdravja rastlin, tako finančno kot kadrovske, usmerja dolgoročno (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022).

Ob laboratorijskih izboljšavah je v zadnjem desetletju izjemen napredek dosegla tudi bioinformatika, predvsem zaradi povečane računalniške moči in dostopnosti storitev v oblaku. Razvitih je bilo veliko bioinformacijskih orodij, kar dodatno otežuje standardizacijo analiznih postopkov. Kljub tej raznolikosti je pričakovati, da bodo z nadaljnjim razvojem področja in z mednarodnim sodelovanjem raziskovalcev standardizirane prakse postopoma postale samoumevne. Čeprav začetne investicije v HTS lahko delujejo visoke, se pri dovolj velikem obsegu testiranja pogosto povrnejo že v nekaj letih, obenem pa laboratorijem omogočajo bistveno hitrejši in učinkovitejši odziv na pojave in širjenje patogenov (Berry in sod., 2020; EPPO, 2022).

V zadnjih letih se HTS vse pogostejše uporablja tudi pri diagnostiki viroidov, saj omogoča hkratno zaznavanje znanih in novih viroidnih zaporedij brez potrebe po predhodnem poznavanju njihovega genoma. Ta pristop bistveno povečuje zanesljivost diagnostike, zlasti pri gostiteljih, kjer so viroidne okužbe pogoste ali ekonomsko pomembne. Z poenostavitvijo računalniških algoritmov, standardizacijo in validacijo postopkov se bodo lahko HTS tehnologije v bližnji prihodnosti uporabljale za rutinske analize viroidov.

Zahvala

Avtorja se za finančno podporo zahvalujeta Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in investicijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS, raziskovalni program P4-0077).

5 VIRI

- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). [Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology](https://doi.org/10.3390/v6010106). *Viruses*, 6(1), 106–136. <https://doi.org/10.3390/v6010106>
- Berry, I. M., Melendrez, M. C., Bishop-lilly, K. A., Rutvisuttinunt, W., Pollett, S., Talundzic, E., Morton, L., & Jarman, R. G. (2020). [Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health : Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity](https://doi.org/10.1093/infdis/jiz286). 221(Suppl 3). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz286>
- Bester, R., Steyn, C., Breytenbach, J. H. J., de Bruyn, R., Cook, G., & Maree, H. J. (2022). [Reproducibility and Sensitivity of High-Throughput Sequencing \(HTS\)-Based Detection of Citrus Tristeza Virus and Three Citrus Viroids](https://doi.org/10.3390/plants11151939). *Plants*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/plants11151939>
- CD Genomics. (2025). [Error Rate of PacBio vs Nanopore: How Accurate Are Long-Read Sequencing Technologies](https://www.cd-genomics.com/blog/pacbio-nanopore-error-rate-correction-strategies/). <https://www.cd-genomics.com/blog/pacbio-nanopore-error-rate-correction-strategies/>
- Chikhi, R., Camargo, A. P., Miller, C. J., Fiamenghi, M. B., Agostinho, P., Majidian, S., Autric, G., Hugues, M., Lee, J., Medvedev, P., Gupta, P., Shen, J., Morales-tapia, A., & Sihuta, K. (2025). Logan: Planetary-Scale Genome Assembly Surveys Life's Diversity.
- Diener, T. O. (1971). [Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5095900). *Virology*, 45(2), 411–428. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5095900>
- EPPO. (2021). PM 7/98 (5) [Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity](https://doi.org/10.1111/epp.12780). *EPPO Bulletin*, 51(3), 468–498. <https://doi.org/10.1111/epp.12780>
- EPPO. (2022a). PM 7/151 (1) [Considerations for the use of high throughput sequencing in plant health diagnostics](https://doi.org/10.1111/epp.12884). *EPPO Bulletin*, 52(3), 619–642. <https://doi.org/10.1111/epp.12884>
- EPPO. (2022b). PM 7/151 (1) [Considerations for the use of high throughput sequencing in plant health diagnostics1](https://doi.org/10.1111/epp.12884). *EPPO Bulletin*, 52(3), 619–642. <https://doi.org/10.1111/epp.12884>
- Flores, R. (2001). [A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570283). *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III*, 324(10), 943–952. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570283>
- Guček, T. (2020). Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju. In Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
- Guček, T., Trdan, S., Jakše, J., Javornik, B., Matoušek, J., & Radišek, S. (2017). Diagnostic techniques for viroids. *Plant Pathology*, 66, 339–358.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. (2016). [Next-Generation Sequencing and Genome Editing in Plant Virology](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325). *Frontiers in Microbiology*, 7, 1325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01325>
- Hammond, R. W. (2017). Economic significance of viroids in vegetable and field crops. In A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, & P. Palukaitis (Eds.), *Viroids and Satellites* (pp. 5–14). Academic Press, Elsevier.
- Illumina. (2025). [Sequencing platforms](https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html). <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- Ito, T., Suzuki, K., Nakano, M., & Sato, A. (2013). [Characterization of a new apscaviroid from American persimmon](https://doi.org/10.1007/s00705-013-1772-x). *Archives of Virology*, 158(12), 2629–2631. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1772-x>

- Jakse, J., Radisek, S., Pokorn, T., Matousek, J., & Javornik, B. (2015). [Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid \(CBCVd\) as a highly aggressive pathogen on hop](https://doi.org/10.1111/ppa.12325). *Plant Pathology*, 64(4), 831–842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>
- Javaran, V. J., Poursalavati, A., Lemoyne, P., Ste-Croix, D. T., Moffett, P., & Fall, M. L. (2023). [NanoViromics: long-read sequencing of dsRNA for plant virus and viroid rapid detection](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192781). *Frontiers in Microbiology*, 14(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192781>
- Jia, P., Li, F., Xia, J., Chen, H., Ji, H., Pao, W., & Zhao, Z. (2012). [Consensus Rules in Variant Detection from Next- Generation Sequencing Data](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038470). 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038470>
- Katsarou, K., Adkar-Purushothama, C. R., Tassios, E., Samiotaki, M., Andronis, C., Lisón, P., Nikolaou, C., Perreault, J. P., & Kalantidis, K. (2022). [Revisiting the Non-Coding Nature of Pospiviroids](https://doi.org/10.3390/cells11020265). *Cells*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/cells11020265>
- Katsarou, K., Bardani, E., Kallemi, P., & Kalantidis, K. (2019). [Viral Detection: Past, Present, and Future](https://doi.org/10.1002/bies.201900049). *BioEssays*, 41(10). <https://doi.org/10.1002/bies.201900049>
- Kutnjak, D., Tamisier, L., Adams, I., Boonham, N., Candresse, T., Chiumenti, M., Jonghe, K. De, Kreuze, J. F., Lefebvre, M., Silva, G., Malapi-wight, M., Margaria, P., Mavrič, I., Mcgreig, S., Miozzi, L., Remenant, B., Reynard, J., Rollin, J., Rott, M., & Schumpp, O. (2021). A Primer on the Analysis of High-Throughput Sequencing Data for Detection of Plant Viruses.
- Lebas, B., Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G. J., Blouin, A. G., Boonham, N., Candresse, T., Chandelier, A., De Jonghe, K., Fox, A., Gaafar, Y. Z. A., Gentit, P., Haegeman, A., Ho, W., Hurtado-Gonzales, O., Jonkers, W., Kreuze, J., Kutnjak, D., ... Massart, S. (2022). [Facilitating the adoption of high-throughput sequencing technologies as a plant pest diagnostic test in laboratories: A step-by-step description](https://doi.org/10.1111/epp.12863). *EPPO Bulletin*, 52(2), 394–418. <https://doi.org/10.1111/epp.12863>
- Liefting, L. W., Waite, D. W., & Thompson, J. R. (2021). [Application of oxford nanopore technology to plant virus detection](https://doi.org/10.3390/v13081424). *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/v13081424>
- Maina, S., Donovan, N. J., Plett, K., Bogema, D., & Rodoni, B. C. (2024). [High-throughput sequencing for plant virology diagnostics and its potential in plant health certification](https://doi.org/10.3389/fhort.2024.1388028). *Frontiers in Horticulture*, 3(May), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fhort.2024.1388028>
- Massart, S., Adams, I., Al Rwahnih, M., Baeyen, S., Bilodeau, G. J., Blouin, A. G., Boonham, N., Candresse, T., Chandelier, A., De Jonghe, K., Fox, A., & Al., E. (2022). [High-throughput sequencing for the diagnostic of plant pathologies and identification of pests: recommendations and challenges](https://doi.org/10.24072/pci.infections.100002). *Peer Community Journal*, 2(article e62). <https://doi.org/10.24072/pci.infections.100002>
- Mehetre, G. T., Leo, V. V., Singh, G., Sorokan, A., Maksimov, I., Yadav, M. K., Upadhyaya, K., Hashem, A., Alsaleh, A. N., Dawoud, T. M., Almaary, K. S., & Singh, B. P. (2021). [Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review](https://doi.org/10.3390/v13030412). *Viruses*, 13(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/v13030412>
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M. E., Delgado, S., Flores, R., & Di Serio, F. (2012). [Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.020). *Biochimie*, 94(7), 1474–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.020>
- Ortega-Acosta, C., Ochoa-Martínez, D. L., & Rodríguez-Leyva, E. (2024). [High-Throughput Sequencing Reveals New Viroid Species in Opuntia in Mexico](https://doi.org/10.3390/v16081177). *Viruses*, 16(8). <https://doi.org/10.3390/v16081177>
- Pasha, A., Espindola, A. S., Ziebell, H., & Ochoa-Corona, F. M. (2024). [Highly curated and reliable e-probes for detection of viral pathogens in unassembled HTS datasets from hops](https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-09-24-0106-FI). *PhytoFrontiers*. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-09-24-0106-FI>
- Pecman, A., Adams, I., Gutiérrez-Aguirre, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnikar, M., & Kutnjak, D. (2022). [Systematic Comparison of Nanopore and Illumina Sequencing for the Detection of Plant Viruses and Viroids Using Total RNA Sequencing Approach](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.883921). *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.883921>
- 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](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998). *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Ren, J., Ahlgren, N. A., Lu, Y. Y., Fuhrman, J. A., & Sun, F. (2017). [VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0283-5). *Microbiome*, 5(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0283-5>
- Rivarez, M. P. S., Pecman, A., Bačnik, K., Maksimović, O., Vučurović, A., Seljak, G., Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Ravnikar, M., & Kutnjak, D. (2023). [In-depth study of tomato and weed viromes reveals undiscovered plant virus diversity in an agroecosystem](https://doi.org/10.1186/s40168-023-01500-6). *Microbiome*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01500-6>
- Rivarez, M. P. S., Vučurović, A., Mehle, N., Ravnikar, M., & Kutnjak, D. (2021). [Global Advances in Tomato Virome Research: Current Status and the Impact of High-Throughput Sequencing](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671925). *Frontiers in Microbiology*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671925>
- Rodriguez, M. J. B., Vadamalai, G., & Randles, J. W. (2017). Economic significance of palm tree viroids. In A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, & P. Palukaitis (Eds.), *Viroids and Satellites* (pp. 39–49). Academic Press, Elsevier.
- Rollin, J. (2023). [Development and validation of innovative sequencing tools for the fast and efficient detection of plant virus](https://orbi.uliege.be/handle/2268/304496) [Université de Liege – Gembloux AGRO-BIO TECH Development]. <https://orbi.uliege.be/handle/2268/304496>
- Rong, W., Rollin, J., Hanafi, M., Roux, N., & Massart, S. (2023). [Validation of High-Throughput Sequencing as Virus Indexing Test for Musa Germplasm: Performance Criteria Evaluation and Contamination Monitoring Using an Alien Control](https://doi.org/10.1094/phytofr-03-22-0030-fi). *PhytoFrontiers*, 3(1), 91–102. <https://doi.org/10.1094/phytofr-03-22-0030-fi>
- Rueda, O., Cervera, A., Babaian, A., Chikhi, R., & de la Pena, M. (2025). Discovery of novel plant viroids (Pospiviroidae family) and viroid-host associations through planetary data mining. In B. Navarro & K. Kalantidis (Eds.), *Viroids and Viroid-like RNAs*, Book of abstracts (Issue September, p. 14).
- Tamang, S. (2024). [Oxford Nanopore Sequencing: Principle, Protocol, Uses, Diagram](https://microbenotes.com/oxford-nanopore-sequencing/). *Microbe Notes*. <https://microbenotes.com/oxford-nanopore-sequencing/>
- Verhoeven, J. T. J., Hammond, R. W., & Stancanelli, G. (2017). Economic significance of viroids in ornamental crops. In A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, & P. Palukaitis (Eds.), *Viroids and Satellites* (pp. 27–38). Academic Press, Elsevier.
- Visser, M., Bester, R., Burger, J. T., & Maree, H. J. (2016). [Next-generation sequencing for virus detection: Covering all the bases](https://doi.org/10.1186/s12985-016-0539-x). *Virology Journal*, 13(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0539-x>

- Wetterstrand, M. S. (2023). [DNA Sequencing Costs: Data](https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data). National Human Research Institute. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>
- 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](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120030). *Annual Review of Phytopathology*, 53, 425–444. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120030>
- Wu, Q., Wang, Y., Cao, M., Pantaleo, V., Burgyan, J., Li, W. X., & Ding, S. W. (2012). [Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm](https://doi.org/10.1073/pnas.1117815109). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3938–3943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117815109>
- Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., Ma, L., Cheng, J., Xu, Y., Lu, M., Wang, H., Ding, S. W., Li, S., & Wu, Q. (2014). [Discovery of Replicating Circular RNAs by RNA-Seq and Computational Algorithms](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004553). *PLOS Pathogens*, 10(12), e1004553. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004553>