مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

نقش توالی‌یابی نسل جدید و فناوری ویرایش CRISPR/Cas13 در شناسایی و مبارزه با ویروئیدهای بیمارگر گیاهی

20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4

مهرداد صالح‌زاده[۱]، سعیده دهقانپور فراشاه[۲]*

۱- دانشجوی دکترای بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

۲- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

sdfarashah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳
صفحه ۱۲۲-۱۰۷

چکیده

بیماری‌های گیاهی ناشی از ویروئیدهای بیمارگر گیاهی تهدیدی جدی برای تولید محصولات کشاورزی در جهان است. به‌تازگی اقداماتی که از طریق بیوتکنولوژی مولکولی آغاز شده، راهکارهای موثری برای پیشگیری و کنترل ویروئیدهای آلوده‌کننده‌ی گیاهی بوده است. توالی‌یابی نسل جدید تعاملات مستقیم و غیرمستقیم ویروئیدها با فاکتورهای میزبانی را بررسی کرده و با استفاده از این فناوری تغییر در پروتئوم و رونوشت‌های میزبان در هنگام آلودگی با ویروئیدها مشخص می‌شود و با بررسی تعاملات بین ویروئید-گیاه، می‌توان از راهکارهای سودمند برای مبارزه با این عوامل بیماری‌زا بهره برد. همچنین پیشرفت‌های اخیر در ویرایش هدفمند دی.ان.اِ یا آر.ان.اِ با سیستم‌های مرتبط با CRISPR/Cas از ابزارهای بسیار جذاب قابل استفاده در زمینه محافظت از گیاهان است. در این مقاله‌ی مروری، پیشرفت سیستم‌های CRISPR/Cas را تا به امروز در مبارزه با ویروئیدهای بیماری‌زای گیاهی بررسی می‌کنیم و استفاده از این روش‌ها در کنترل برخی از ویروئیدهای گیاهی با هدف قرار دادن توالی‌ها یا ژن‌های خاص در این عوامل ذکر خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: ویروئید، بیوتکنولوژی مولکولی، توالی‌یابی نسل جدید، کریسپر.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

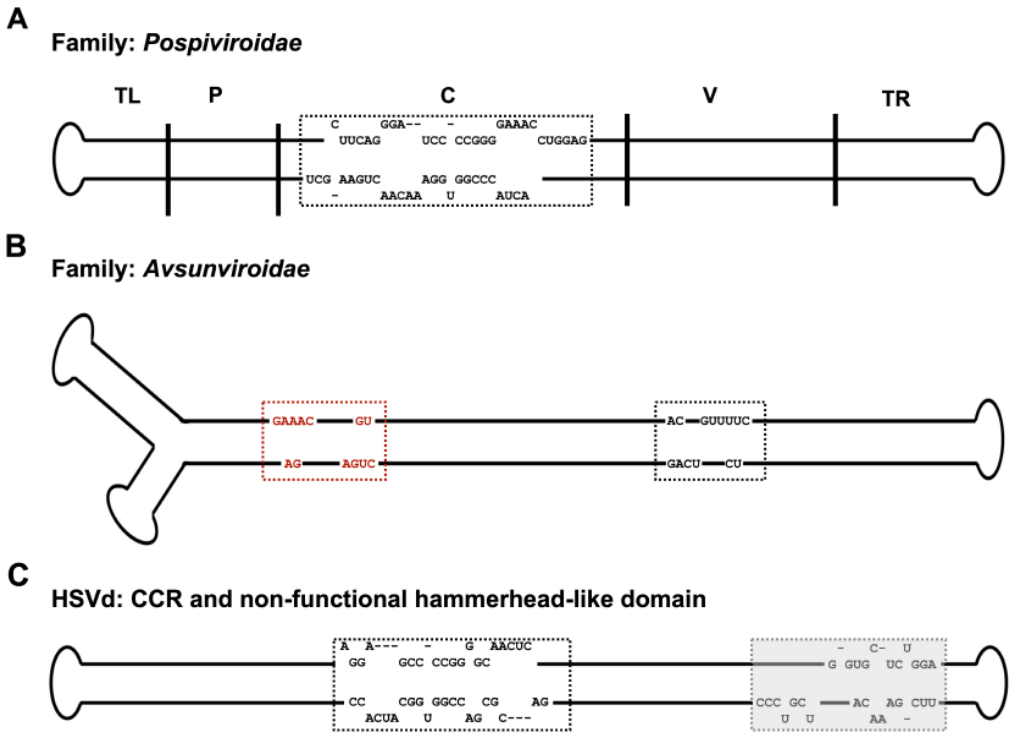
مقدمه

تئودور دینر اولین ویروئید مرتبط با عامل ایجادکننده بیماری غده دوکی سیب‌زمینی را در سال ۱۹۷۱ کشف کرد. نتایج تحقیقات او نشان داد که عامل بیماری دارای آر.ان.ای با وزن مولکولی ۲۵۰۰۰-۱۱۰،۰۰۰ دالتون است که بسیار کوچکتر از ژنوم ویروس‌ها بوده و هیچ پروتئین پوششی در گیاهان آلوده تولید نمی‌کند. همچنین مشخص شد که آر.ان.ای ویروئید بسیار کوچک است و نمی‌تواند حاوی اطلاعات ژنتیکی لازم برای تکثیر خود باشد. بنابراین برای تکثیر باید به آنزیم‌های میزبان اتکا کند. ویروئیدها، کوچکترین عامل عفونی شناخته‌شده به اندازه‌ی ۲۴۶-۴۰۱ نوکلئوتید هستند و به‌صورت مستقل تکثیر می‌شوند. ویروئیدها به شکل دایره‌ای و خطی با درجه بالایی از جفت‌شدگی درونی هستند. برخلاف ویروس‌ها، ویروئیدها فاقد پروتئین‌های پوششی هستند و برای تکثیر کاملاً به آنزیم‌های سلول میزبان بستگی دارند. در حال حاضر ۳۲ گونه از ویروئیدها شناخته شده‌اند. گونه‌های ویروئیدی براساس وجود یا عدم وجود منطقه مرکزی محافظت‌شده (central conserved region, CCR) در ژنوم خود به دو خانواده تقسیم می‌شوند، خانواده اول Pospiviroidae که گونه‌ی مهم آن عامل ویروئید دوکی‌شدن غده سیب‌زمینی (potato spindle tuber viroid; PSTVd) است و دیگر اعضای آن شامل پنج جنس که دارای منطقه مرکزی حفاظت‌شده و مشترک هستند. تکثیر و تجمع در اعضاء این خانواده در هسته‌ی گیاه میزبان انجام می‌شود. خانواده‌ی بعدی شامل اعضای Avsunviroidae است که گونه‌ی معروف آن ویروئید لکه آفتابی آووکادو (avocado sunblotch viroid; ASBVd) است و اعضای این خانواده فاقد CCR بوده و در هر دو آر.ان.ای ژنومی و مکمل دارای ریبوزیم‌های سرچکشی هستند. همچنین اعضای این خانواده در پلاستیدهای میزبان و به‌طور عمده در کلروپلاست‌ها تکثیر و تجمع می‌یابند (Randles et al. 2003; Di Serio et al. 2017).

شکل ۱ ساختارهای اولیه و ثانویه مورد استفاده برای طبقه‌بندی ویروئیدها را به خوبی نشان می‌دهد (Charith Raj and Jean- Pierri, 2020).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]



شکل ۱- ساختارهای اولیه و ثانویه برای طبقه‌بندی ویروئیدها.

تصویر (A) ساختار ثانویه میله‌مانند مربوط به ویروئید دوکی شدن غده‌ی سیب‌زمینی (PSTVd) که پنج دومین عملکردی در ساختار ثانویه آن نشان داده شده است که شامل: دومین انتهایی سمت چپ (TL)، بیماری‌زایی (P)، مرکزی (C)، متغیر (V) و دومین انتهایی در سمت راست (TR) که توسط خطوط عمودی جدا شده‌اند. توالی منطقه حفاظت‌شده مرکزی (CCR)، که ویژگی مشخصه اعضای خانواده Pospiviroidae است، در داخل جعبه نشان داده شده است. تصویر (B) ساختار ثانویه منشعب‌شده ویروئید لکه آفتابی آووکادو (ASBVd) را نشان می‌دهد و نوکلئوتیدهای محافظت‌شده هسته کاتالیزوری مربوط به ساختار سرچکشی ویروئید را نشان می‌دهند که حضور این ساختارها از ویژگی‌های اصلی اعضای خانواده Avsunviroidae است. توالی‌های موجود در جعبه‌های قرمز و سیاه به‌ترتیب موتیف‌های تشکیل‌دهنده‌ی ساختار سرچکشی که باعث برش ویروئید هنگام همانندسازی می‌شود را نشان می‌دهند. تصویر (C) ساختار ثانویه میله‌مانند ویروئید کوتولگی گیاه رازک (HSVd) را نشان می‌دهد که به‌ترتیب شامل ناحیه‌ی حفاظت‌شده‌ی مرکزی (جعبه‌ی سیاه رنگ) و دومین غیرعملکردی شبه سرچکشی (جعبه سایه‌دار) نشان داده شده است (Charith Raj and Jean- Pierri, 2020).

خسارت ناشی از ویروئیدها

ویروئیدها در اکثر موارد، در میزبان خود به‌صورت سیستمیک پخش می‌شوند. با اینحال، خسارت‌های ناشی از ویروئیدها در مقایسه با ویروس‌ها یا سایر عوامل بیماری‌زای گیاهی، به‌طور معمول در یک کشور یا چند ناحیه‌ی محدود از یک کشور دیده می‌شود و به سطح جهانی نمی‌رسند. به استثنای ویروئید کادانگ-کادانگ نارگیل (coconut cadang-cadang viroid; CCCVd) و ویروئید تینانجاجا

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

نارگیل (coconut tinangaja viroid; CTiVd) که باعث زوال درخت و توقف تولید نارگیل در سال‌های آخر قبل از مرگ درخت می‌شود (Hadidi, 2017)، صدمه ناشی از ویروئیدها در گیاهان می‌تواند شدید باشد. از جمله‌ی این ویروئیدهای خسارت‌زا می‌توان به ویروئید لکه‌آفتابی آووکادوو و ویروئید کوتولگی گل داودی (chrysanthemum stunt viroid; CSVd) اشاره کرد که در حد شدید باعث ایجاد خسارت می‌شوند. ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی در حد متوسط و ویروئید کوتولگی رازک (hop stunt viroid; HSVd) و برخی ویروئیدها مانند ویروئیدهای میوه انار یا برخی از ویروئیدهای مرکبات در حد خفیف آسیب می‌زنند (Singh et al. 2003).

خسارت اقتصادی ناشی از آلودگی PSTVd می‌تواند از ۱۷ تا ۶۴ درصد باشد. عملکرد گیاهان رازک آلوده به HSVd در ژاپن ۵۰ درصد یا بیشتر کاهش یافته و گیاهان آلوده می‌توانند در پایان هفتمین دوره رشدی از نظر ارتفاع ۳۵ درصد کاهش داشته باشند. آلودگی درختان نارگیل توسط CCCVd بسیار زیان‌آور گزارش شده است زیرا باعث از بین رفتن بیش از ۴۰ میلیون درخت نارگیل در فیلیپین و خسارتی معادل چهار میلیارد دلار در آمریکا شده است. ویروئید ترک‌خوردگی پوست مرکبات (citrus bark cracking viroid; CBCVd)، بیشتر گونه‌های مرکبات را آلوده می‌کند اما خسارت ناشی از آن تاکنون برآورد نشده است (Lavagi et al. 2017).

دامنه‌ی میزبانی ویروئیدها

دامنه میزبانی طبیعی ویروئیدها شامل گیاهان زراعی، زینتی، انگور، درختان میوه و گونه‌های مختلف نخل است. هیچ ویروئیدی که به حیوانات از جمله پستانداران حمله کند، گزارش نشده است (Waltz, 2018). برخی از گونه‌های ویروئیدی مانند HSVd و PSTVd دامنه میزبانی گسترده‌ای دارند در حالی‌که برخی دیگر مانند ویروئید کلروز خفیف گل داودی (chrysanthemum chlorotic mottle viroid; CChMVd) دارای دامنه‌ی محدود میزبانی هستند. هنگامی‌که یک گونه ویروئید یک میزبان حساس را آلوده می‌کند، بسته به نوع توالی ویروئیدی، ژنوتیپ گیاه میزبان و شرایط محیطی آلودگی ویروئیدی می‌تواند از بدون علائم تا شدید باشد. تعداد زیادی از علائم ناشی از بیماری‌های ویروئیدی مشابه سایر عوامل بیماری‌زا باعث کاهش رشد و شکنندگی بافت‌های گیاهان آلوده شده و علائم مختلفی بر روی برگ ایجاد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

می‌کنند. علائم دیگر ممکن است شامل ترک خوردن پوست، ناهنجاری‌هایی در میوه یا غده و کاهش تعداد و اندازه گل‌های تولیدشده باشد. فاکتورهای زیادی ممکن است در بروز علائم ویروئیدی تأثیر بگذارد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به شرایط محیطی به‌ویژه دما و ژنوتیپ میزبان اشاره کرد (Jakse et al. 2015).

بیماری‌زائی ویروئیدها

بیماری‌زایی ویروئیدها در سطح سلولی ممکن است شامل تشکیل اجسام پارامورال (paramural) یا پلاسمالمازوم (plasmalemmasomes)، تغییرات در دیواره سلولی و یا ناهنجاری‌هایی در کلروپلاست از قبیل تشکیل رسوبات متراکم الکترونی (electron dense granuls) در سیتوپلاسم و کلروپلاست برای تکثیر ویروئید باشد. بیماری‌زائی ویروئیدی همچنین ممکن است شامل تغییرات مهمی در متابولیسم میزبان و تغییر در مکانیسم‌های بیوشیمیایی، مولکولی و رونویسی در میزبان باشد. مکانیسم خاموشی آر.ان.ای نیز در بیماری‌زایی ویروئیدی نقش دارد. در همین راستا برخی از ژن‌های میزبان که به سیگنال‌های ناشی از ویروئیدها پاسخ می‌دهند، شناسایی شده‌اند (Barba et al. 2016).

انتقال

ویروئیدها به‌صورت مکانیکی از طریق پیوند، بذر، گرده و یا حشرات منتقل می‌شوند. همه ویروئیدها به‌صورت مکانیکی منتقل می‌شوند. به استثنای CCCVd و CTiVd که درختان نخل را از طریق گرده آلوده می‌کنند، سایر ویروئیدها از طریق پیوند منتقل می‌شوند. حداقل ۱۴ نوع ویروئید به ترتیب توسط بذر، گرده و حشره منتقل می‌شود. ویروئیدهایی که از طریق بذر منتقل می‌شوند عبارتند از: ویروئید پوست پینه‌ای سیب (apple scar skin viroid; ASSVd)، CCCVd، ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (citrus exocortis viroid; CEVd)، ویروئید مخفی کلومنئا (columnea latent viroid; CLVd)، CSVd، ویروئید مخفی بادمجان (eggplant latent viroid; ELVd)، HSVd، ویروئید خال زرد شماره یک انگور (grapevine yellow speckle viroid-1; GYSVd-1)، ویروئید عامل بدشکلی میوه‌ی فلفل (pepper chat fruit viroid; PCFVD)، ویروئید کوتولگی انتهایی گوجه‌فرنگی (tomato apical stunt viroid; TASVd) و ویروئید کوتولگی کلروتیک گوجه‌فرنگی (tomato chlorotic dwarf viroid; TCDVd). ویروئیدهایی که از طریق گرده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

منتقل می‌شوند شامل ASBVd، CCCVd، HSVd، CSVd، PCFVd، ویروئید موزاییک پنهان هلو (peach latent mosaic viroid; PLMVd) و PSTVd هستند. ویروئیدهایی که از طریق حشرات منتقل می‌شوند عبارتند از ASBVd، ASSVd، PSTVd، TASV، TCDVd و ویروئید موکوی گوجه‌فرنگی (tomato planta macho viroid; TPMVd) (Chertow, 2018).

سیستم توالی‌یابی نسل جدید و فناوری کریسپر در ارتباط با ویروئیدها

حجم و تنوع مبادلات بین‌المللی ژرم‌پلاسم گیاهان و ارقام گیاهی تازه معرفی‌شده به‌طور قابل‌توجهی به توزیع بین‌المللی ویروئیدها کمک کرده است. برخی ویروئیدهای مهم اقتصادی مانند ASSVd، CCCVd، CSVd، HSVd و PSTVd توسط بذر و دانه گرده منتقل می‌شوند. ردیابی فراوانی وقوع ویروئیدها در میزبان‌های آلوده، صدمه‌ی ناشی از آن‌ها، مسیرهای ورود این ویروئیدها به مناطق جدید و همچنین کشف ظهور انواع جدیدی از ویروئیدها با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل بعدی (next generation sequencing; NGS) امکان‌پذیر شده است. برای مثال در تشخیص ویروئیدها و تعامل آن‌ها با میزبان، ازجمله در محصولات چندساله چوبی مانند درختان میوه‌ی دانه‌دار، هسته‌دار و مرکبات که تیتر کمی از ویروئید دارند، توالی‌یابی نسل جدید حساس، دقیق و سریع عمل می‌کند. علاوه‌بر این، با استفاده از فناوری NGS، تنوع، غلظت، دامنه‌ی میزبانی و میزان گسترش و انواع جدید ویروئیدها در میزبآن‌های مختلف گیاهی کشف و شناخته می‌شود. انتظار می‌رود که روش‌های موثر ویرایش مهندسی ژنوم، مبتنی‌بر تکرارهای کوتاه پالیندرومیک متقاطع بصورت خوشه‌ای (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) و پروتئین‌های Cas مرتبط با آن (CRISPR/Cas) نقش مهمی در ایجاد مقاومت گیاه در برابر آلودگی‌های ویروئیدی داشته باشد (Chiumenti et al. 2014).

سیستم CRISPR/Cas13 توانایی ایجاد تداخل در تکثیر ویروئیدها در گیاهان آلوده را با شناسایی ویروئیدها در مدت زمان بسیار کوتاه را دارد. بنابراین، هر دو سیستم NGS و CRISPR/Cas13 توانایی بیشتری در تحقیقات ویروئیدی و تشخیص آن‌ها به محققین ارائه می‌کنند و هر دو فناوری ابزاری مهم و قدرتمند در شناسایی و کنترل بیماری‌های مهم ویروئیدی از نظر اقتصادی خواهند بود (Chiumenti et al. 2014).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

NGS و ویروئیدها

فناوری‌های مبتنی‌بر NGS برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ به‌صورت تجاری در دسترس قرار گرفتند و استفاده از آن‌ها از سال ۲۰۰۴ رویکرد اساسی و کاربردی تحقیقات در بسیاری از رشته‌های زیستی، از جمله ویروئیدشناسی گیاهی بوده است. پیشرفت عمده ارائه شده توسط NGS در مقایسه با روش‌های تعیین توالی مبتنی‌بر سنگر، توانایی تولید حجم عظیمی از داده‌ها را دارد که به‌طور معمول شامل بیش از یک میلیارد خوانش کوتاه است. مقرون به‌صرفه بودن، توانایی آن‌ها در ارائه سریع و دقیق اطلاعات ژنوم از ویژگی‌های مثبت این نسل از توالی‌یابی است. سیستم‌های NGS به‌طور مداوم در حال توسعه هستند و کیفیت داده‌های توالی تولید شده و هزینه‌های مربوطه در این نوع سیستم همه‌روزه بهبود می‌یابند (Ito et al. 2013).

فناوری‌های مبتنی‌بر NGS برای شناسایی ویروئیدها و سایر عوامل بیماری‌زا بدون نیاز به داشتن دانش قبلی از بیماری بوده و می‌تواند یک عامل بیماری‌زا را در حد گونه و نژاد شناسایی کند. همچنین یک پروتکل عمومی برای استخراج آر.ان.ای برای بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی این است این روش عمومی بسیار حساس بوده و به کیفیت بالایی از آر.ان.ای نیاز ندارد (Adkar-Purushothama et al. 2020).

NGS و شناسایی تغییرات رونویسی (بیان ژن) مرتبط با آلودگی‌های ویروئیدی

برای مطالعه بیان ژن‌ها در گیاهان آلوده به ویروئیدها از روش‌هایی مانند الکتروفورز ژل دوبعدی همراه با طیف‌سنجی جرمی و ریزآرایه استفاده شده است. در مقایسه با این روش‌ها، روش NGS در تشخیص، شناسایی و تغییرات رونویسی حساس‌تر است. قابلیت بالای بازسازی اطلاعات، هزینه کمتر و تجزیه و تحلیل دقیق تغییرات رونویسی در میزبان آلوده به ویروئید برای درک بیماری‌زایی ناشی از آن‌ها و کنترل بیماری بسیار مهم است. ترکیبی از ریزآرایه و تجزیه و تحلیل توالی آر.ان.ای (RNA Seq) در مقیاس بزرگ برای مطالعه بیان ژن در دو رقم گوجه‌فرنگی آلوده به PSTVd استفاده شد. ارقام عبارت بودند از رقم حساس راتگرز (Rutgers) و رقم پا کوتاه میکروتام (MicroTom). مشاهده شد تغییرات ترانسکریپتومی مربوط به آلودگی ویروئیدی در رقم راتگرز گسترده بود و بیش از ۵۰۰۰ ژن در ارتباط با اجزای مختلف سلولی تحت تأثیر قرار گرفتند. در این بررسی مشخص

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

شد که ژن‌های کلروپلاستی، بسیاری از ژن‌های رمزگذار مرتبط با پروتئین‌های هسته‌ای و پروتئین‌های مرتبط با غشا، پروتوپلاستی، ریبوزوم‌ها، دیواره سلولی و آپوپلاست تحت تاثیر قرار گرفتند. در ادامه مشخص شد که رقم MicroTom در سنتز براسینواستروئیدها نقص دارد و نسبت به ویروئید حساسیت بیشتری نشان می‌دهد. هنگامی‌که هورمون‌ها به‌صورت خارجی روی گیاهان آلوده تیمار می‌شوند، ژن‌های درگیر در استرس و سایر محرک‌های دفاعی در این رقم شروع به القاء می‌شوند. این مشاهدات نشان می‌دهد که القاء پیام‌های مرتبط با بیماری‌زایی ویروئیدها مانند ویروئید دوکی‌شدن غده‌ی سیب‌زمینی ممکن است شامل پیام‌رسانی به‌واسطه براسینواستروئیدها باشد (Suzuki et al. 2017).

توالی‌یابی عمیق ژنوم با استفاده از تکنیک RNA Seq برای شناسایی ۱۱۶۰۰ برچسب توالی بیان‌شده (expressed sequence tag, EST) برای تهیه‌ی کتابخانه cDNA ژنومی از کل آر.ان.ای استخراج‌شده از برگ‌های گل داودی آلوده به CSVd استفاده شده است که اطلاعات خوبی از رونویسی در آن گیاه را ارائه می‌دهد (Pirovano et al. 2017).

تغییرات بیان ژن در رازک آلوده به ویروئید CBCVd از طریق تجزیه و تحلیل رونوشت‌های گیاهی با NGS نشان داد که آلودگی با CBCVd منجربه فعالیت گسترده بیش از ۲۰۰ ژن در گیاه شد که شامل بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های ایمنی گیاهی، پاسخ‌های فوق حساسیت، مسیرهای پیام‌رسانی فیتوهورمونی، فتوسنتز و متابولیسم پروتئین بود. علاوه‌بر این، ژن‌های رمزگذار آر.ان.ای پلی‌مراز وابسته به آر.ان.اِ، پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی، کیتیناز و همچنین ژن‌هایی که به پاسخ‌های دفاعی گیاه مربوط هستند، بیان شدند (Mishra et al. 2018).

جدول ۱ خلاصه‌ای از تحولات در فناوری‌های تعیین توالی و تأثیر آن‌ها در تحقیقات ویروئیدشناسی را نشان می‌دهد.

جدول ۱- تحولات در فناوری‌های تعیین توالی و تأثیر آن‌ها در تحقیقات ویروئیدشناسی (Charith Raj and Jean-Pierri, 2020).

سال	تکنولوژی توالی‌یابی	تأثیر تکنیک در تحقیقات ویروئیدشناسی
۱۹۶۰	اثر انگشت آر.ان.اِ (RNA fingerprinting)	شناسایی ساختار شیمیایی اولین ویروئید
۱۹۷۰	تشخیص قطعات نسبتا هضم‌شده دارای مارکر یا برچسب رادیواکتیو شده در دوسر قطعات هضم‌شده	تعیین توالی اولین آر.ان.ای ویروئیدی و روشن‌شدن ساختارهای ثانویه
۱۹۸۰	تکنیک ختم زنجیره‌ی توالی نوکلئوتیدی سانگر	تعیین دومین‌های ساختاری و عملکردی در ویروئیدها، تعیین دومین

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

	(Sanger's chain-termination technique) و تکنیک تخریب شیمیائی ماکسام گیلبرت (Maxam and Gilbert's chemical degradation technique)	حفاظت‌شده‌ی مرکزی (CCR) و ساختارهای چکش‌سری خودبرشی (hammerhead self-cleavage)، کاربرد در توالی‌یابی ویروئیدها و شناسایی ایزوله‌های ویروئیدی
۱۹۹۰ تاکنون	توالی‌یابی خودکار (automated sequencers)	مطالعات جهش‌زائی، مطالعات ساختاری و شناسایی شبه‌گونه‌ها (quasi-species)
۲۰۰۵ تاکنون	توالی‌یابی نسل جدید	شناسایی ار.ان.ای.های مشتق‌شده از ویروئیدها (viroid derived small RNAs (vd-sRNA))، شناسایی شبه‌گونه‌ها، تعیین نرخ جهش‌زائی و پویایی جمعیت ویروئیدها در مقیاس‌های کوچک و بزرگ

مطالعات ویروئیدی با ابزار NGS

به‌دلیل کوچک بودن ژنوم ویروئیدها، توالی ژنومی کامل آن را می‌توان در یک اجرا توسط NGS تعیین کرد زیرا توالی صدها هزار تا میلیون‌ها آر.ان.ای کوچک مشتق شده از ویروئیدها با اندازهای حدود ۲۱-۲۴ نوکلئوتید می‌تواند برای بدست آوردن توالی‌های مورد علاقه ویروئیدی شناسایی و نقشه‌یابی شود. توالی‌های ویروئیدی همچنین می‌توانند با توالی‌های خاص از ژنوم میزبان مقایسه شوند تا ژن‌هایی در میزبان که منجربه خاموشی آر.ان.ای ویروئید شده و بیان آن‌ها هنگام آلودگی ویروئیدی تنظیم می‌شوند، تعیین شوند. مطالعات با کمک NGS به‌مخصوص با تکنیک RNA Seq می‌تواند در زمینه شناسایی ویروئیدهای جدید، کسب اطلاعاتی در زمینه خصوصیات ویروئیدی، توزیع، محل تجمع ویروئید در سلول، تمایز سویه، نحوه‌ی حرکت سیستمیک ویروئید در میزبان، برهمکنش‌های بین میزبان- ویروئید، تکامل ویروئیدی، نحوه‌ی بیماری‌زایی، جهش هدف‌دار، گسترش دامنه میزبانی و موارد دیگر کاربرد داشته باشد (Wang et al. 2018).

جستجو و شناسایی ویروئیدهای باستانی توسط ترانسکریپتوم آر.ان.ای برای چندین سال، به دلیل پیشرفت در فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید منجر به تعیین توالی کامل ژنوم ویروئیدهای مدرن و باستانی شده و انقلابی بزرگ در درک ما از تکامل و مهاجرت ویروئیدها ایجاد کرده است. تجزیه و تحلیل توالی‌های مرتبط با ویروئیدهای باستانی در هرباریوم‌های بیماری‌شناسی مربوط به نمونه‌های گیاهان باستانی ممکن است به ما اجازه دهد در مورد تاریخچه تکاملی ویروئیدها در دهه‌های گذشته، قرن‌ها یا حتی چند هزار سال گذشته دانش لازم را کسب کنیم. این احتمال

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

وجود دارد که مطالعات ویروئیدها با سیستم‌های توالی‌یابی نسل جدید نشان دهند که ویروئیدها فسیل‌های زنده‌ای از جهان آر.ان.ای باستان هستند (Pääbo et al. 2018).

NGS در برنامه‌های قرنطینه و صدور گواهی سلامت کاربرد بسیار دارد. درحالی‌که برای شناسایی ویروئیدها از طریق RT-PCR، دانش قبلی از توالی ویروئیدی مورد نیاز است. با اینکه هزینه‌های سنجش مبتنی‌بر RT-PCR نسبت به تجزیه و تحلیل NGS کمتر است، با این حال، هزینه‌های توالی‌یابی با سیستم NGS طی سالیان گذشته رقابتی‌تر و مقرون به‌صرفه‌تر شده است. سیستم توالی‌یابی نسل جدید ممکن است به‌عنوان ابزار اصلی تشخیص ویروئیدهای گیاهی در قرنطینه و برنامه‌های صدور گواهی سلامت گیاه که در آن محدودیت‌های مختلف اعمال شده و تشخیص و شناسایی ویروئیدها بسیار مهم است، استفاده شود. ویروئیدهای دارای اهمیت قرنطینه‌ای در آمریکای شمالی عبارتند از: ASSVd، pear blister canker viroid (PBCVd) و PSTVd در کانادا، chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CCMVD0)، chrysanthemum stunt viroid (CSVd)، CEVd، CCCVd و ELVd در مکزیک و HSVd سویه کاچکسیا (cochexia)، PLMVd، PBCVd و PSTVd در ایالات متحده. ویروئیدهایی که از نظر صدور گواهینامه در اتحادیه اروپا مهم‌اند شامل apple dimple fruit viroid (ADFVD)، ASSVd، CEVd، HSVd سویه کاچکسیا، PLMVd، PBCVd و CCCVd هستند. در سایر کشورها ممکن است ویروئیدهای مشابه یا متفاوتی برای قرنطینه یا صدور گواهینامه اهمیت داشته باشند. به‌عنوان مثال، همه ویروئیدها در استرالیا از اهمیت قرنطینه برخوردار هستند در حالی‌که در چین HSVd سویه کاچکسیا، CEVd و CCCVd از نظر قرنطینه مهم‌اند. در شیلی ASBVd، CCCVd، PSTVd، TASVd و TCDVD را از نظر قرنطینه مهم می‌دانند. توالی‌یابی نسل جدید در سال ۲۰۱۵ نشان داد که عامل اصلی کوتاهی رشد و از بین رفتن گیاهان رازک در اسلوونی CBCVD است و سازمان حفظ نباتات اروپا و مدیترانه (EPPO) این ویروئید را به هشدار EPPO اضافه کرد (Jeger et al. 2017).

استفاده از سیستم‌های CRISPR/Cas برای ایجاد تداخل در تکثیر ویروئیدها در گیاهان

سیستم‌های CRISPR/Cas را می‌توان به دو روش اصلی برای بهبود مقاومت گیاهان زراعی در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

برابر ویروئیدهای گیاهی استفاده کرد. نخست، از سیستم‌های CRISPR/Cas می‌توان برای ایجاد جهش‌های هدفمند در ژن‌های خاص در گیاهان میزبان استفاده کرد تا توانایی و اجازه تکثیر و انتشار موفقیت‌آمیز ویروئید را در گیاه کاهش داد و مانع از عفونت سازگار ویروئید در گیاه شد. دوم، سیستم‌های CRISPR/Cas ممکن است به گونه‌ای طراحی شوند که به‌طور موثر ژنوم ویروئیدی را در گیاهان مورد هدف قرار دهند. فناوری CRISPR/Cas با هدف قرار دادن مستقیم ویروئیدهای آر.ان.ای‌دار می‌توانند به‌طور مستقیم از تکثیر و گسترش موفقیت‌آمیز ویروئید در گیاهان جلوگیری کنند. اگرچه سیستم‌های CRISPR/Cas پتانسیل زیادی در کنترل عفونت‌های ویروسی و ویروئیدی گیاهی در محصولات زراعی و به طور کلی بهبود محصولات دارند، اما تنگناهای قابل‌توجهی در استقرار پایدار آن‌ها در گیاهان وجود دارد. برای غلبه بر چنین محدودیت‌هایی، لازم است در نظر بگیریم که چگونه و به چه شکلی می‌توان سیستم CRISPR/Cas را به‌صورت پایدار به بافت‌های گیاه رساند. همچنین دستورالعمل‌های مناسب برای اطمینان از کارایی مطلوب این سیستم علیه ویروئیدها و ویروس‌ها، سازگاری آن‌ها با محیط زیست و اطمینان از اینکه سیستم ویرایش CRISPR/Cas برای یک هدف مشخص انتخاب شود نیز باید در نظر گرفته شود. سیستم پروتئین Cas متصل به CRISPR و یک مکانیسم دفاع باکتریایی در برابر عفونت فاژ و انتقال پلاسمیدهای خارجی است و این سیستم به‌عنوان یک پلتفرم هدف‌یابی دی.ان.ای یا آر.ان.ای و یک راهنمای قوی برای ویرایش ژنوم، اختلال در رونویسی، مدولاسیون اپی‌ژنتیک و عکسبرداری ژنوم محسوب می‌شود (Liu et al. 2018).

این فناوری امکان دستکاری و اصلاح دقیق هر توالی ژنومی تعیین‌شده توسط یک قطعه کوتاه از آر.ان.ای راهنما (g-RNA) را داده و به این ترتیب، امکان کاهش بیماری، تصحیح موتاسیون‌های اشتباه، ایجاد برش در عوامل نوکلئیک اسید خارجی و یا فعال‌سازی ژن‌های مهارکننده غیرفعال سرطانی را با استفاده از همجوشی پروتئین دومین افکتور و Cas بدون نوکلئاز فراهم می‌کند. به علاوه، این فناوری یک اندونوکلئاز قابل هدایت بوده و محققان را قادر به بررسی عملکرد و نقش ژن‌های مختلف و چندگانه از طریق هدف‌یابی هم زمان جایگاه‌های کروموزومی و ژنومی در یک آزمایش کرده و به‌طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش درک ما از فرآیندهای بیماری‌زایی می‌شود.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

این فرآیندها شامل مجموعه‌ی زیادی از ژن‌ها یا موتاسیون‌ها است (Ali et al. 2015).

فناوری اصلاح مولکولی جدید CRISPR/Cas13a برای کنترل آلودگی ویروسی و ویروئیدی در بسیاری از موارد مفید و موفقیت‌آمیز بوده است. این سیستم به‌تازگی با موفقیت یک مداخله‌ی مهندسی‌شده با آر.ان.ای ویروس موزاییک شلغم، در *Nicotiana benthamiana* را ایجاد و منجر به کاهش شدید آلودگی ویروسی در گیاه شد. برنامه هدف‌گیری دقیق توالی ویروئیدی برای غیرفعال‌سازی PSTVd، PLMVd و ASBVd که از نظر اقتصادی مهم هستند به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و موفقیت‌های چشمگیری در این مطالعات به دست آمده است (Zhang et al. 2018).

مناطق مختلفی از هر یک از ویروئیدهای ذکرشده می‌توانند به‌طور ویژه با سیستم CRISPR/Cas13a مورد هدف قرار گیرد. به‌طور خلاصه، مناطق مهمی که در ژنوم ویروئید می‌تواند مورد هدف قرار گیرد شامل دومین انتهایی سمت چپ (A-PSTVd terminal left domain:1) که محل شروع توالی سنتز توالی ویروئیدی نبوده ولی در بیماری‌زایی ویروئید نقش دارد، سه برآمدگی به نام U359 یا ناحیه‌ی محافظت‌شده‌ی ۱ (C1) که در تکثیر PSTVd نقش دارند، منطقه حفاظت‌شده مرکزی به نام B-PSTVd-1 یا سنجاق سر I که بین ۷۹ تا ۱۱۰ نوکلئوتید در رشته فوقانی آر.ان.ای ویروئیدی بوده، ناحیه‌ی سنجاق سر یا Hairpin II با ۲۲۷ تا ۳۲۸ نوکلئوتید در رشته تحتانی از مهمترین اهداف برای دستکاری ژنوم ویروئید با سیستم CRISPR/Cas13a است. از دیگر مناطق مناسب برای هدف‌گیری ویروئیدها حلقه E، بین نوکلئوتید ۹۷ (از سمت آمینی حلقه) تا نوکلئوتید ۱۰۵ در انتهای کربوکسیلی حلقه و نوکلئوتید شماره‌ی ۲۲۵ از سمت آمینی تا نوکلئوتید ۲۶۳ در قسمت کربوکسیلی (واقع در دامنه انتهایی سمت راست ژنوم)، موتیف RY در ویروئید C-PSTVd، متشکل از دو حلقه داخلی نامتقارن، با توالی '5-ACAGG-3 (از نوکلئوتید ۱۷۷-۱۷۳) در رشته فوقانی و توالی '5-CUCUUCC (از نوکلئوتید ۱۹۰-۱۸۴) در رشته مکمل هستند (Chen et al. 2018).

جایگاه‌های شروع PLMVd

جایگاه‌های هدف‌گیری در ویروئید PLMVd جایگاه‌هایی در نوکلئوتید C51 بر روی رشته سنس نوکلئوتید U286 بر روی رشته‌ی مکمل هستند. هر دو جایگاه بسیار محافظت‌شده و دارای توالی GUC در بالادست خود هستند. این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

جایگاه‌ها محل شکاف ویروئید در هر دو رشته هستند که در قاعده یک سنجاق بلند واقع شده است که احتمالاً محل پیشبر ویروئید و محلی برای نشستن آر.ان.ای پلیمراز میزبان روی ویروئید هستند. از آنجایی‌که شروع تکثیر آر.ان.ای‌های PLMVd در نزدیکی جایگاه‌های خودشکاف (جایگاه‌هایی که توسط خود ویروئید شکافته می‌شود تا همانندسازی اتفاق بیفتد) رخ می‌دهد، با فناوری ویرایش CRISPR/Cas13a در این نواحی می‌توان رونویسی آر.ان.ای PLMVd را کاهش داد (Smargon et al. 2017).

جایگاه‌های شروع E-ASBVd

این جایگاه‌ها به‌ترتیب در نوکلئوتیدهای U121 و U119 بر روی رشته‌های سنس و مکمل قرار دارند. جایگاه‌های شروع فقط دو نوکلئوتید از یکدیگر فاصله دارند و هر جایگاه با همان توالی UAAAA شروع می‌شود، که نشان می‌دهد پیشبرهای ویروئیدی محل مهمی برای هدف‌گیری توسط این سیستم است (Waltz et al. 2018).

نتیجه‌گیری

برخلاف NGS، سیستم CRISPR/Cas فقط برای ویروئیدهای شناخته‌شده به‌کار می‌رود. ویرایش CRISPR/Cas مانند گیاهان تراریخته دی.ان.ای دائمی خارجی را در ژنوم میزبان گنجانده و کاربردهای کشاورزی این فناوری دقیق، هم اکنون محصولات ارزشمندی را برای بازارهای مختلف در دنیا ایجاد کرده است. بنابراین، این فناوری می‌تواند در دنیا برای تولید گیاهان مقاوم در برابر ویروئیدها یا دیگر عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد.

گسترش تکنیک‌های مولکولی نقش محوری در پیشگیری و کنترل ویروئیدهای بیماریزای گیاهی دارد و ظهور و توسعه فناوری CRISPR/Cas تولید و دستیابی به منابع مقاومتی جدید را سرعت می‌بخشد. توسعه و درک سیستم CRISPR/Cas و اکتشاف و شناسایی عملکرد ژن‌های مقاومت مغلوب توسط این سیستم‌ها در آینده می‌تواند یک روش مهم در پیشگیری و کنترل بیماری‌های ویروئیدی به‌شمار آید.

هدف قرار دادن، تخریب یا دخالت در ژنوم‌های ویروئیدی یا پروتئین‌ها و فاکتورها میزبانی که به تکثیر و انتشار ویروئیدها کمک می‌کنند و هدف گیری ژن‌های مقاومت مغلوب یک چشم‌انداز امیدوارکننده در ایجاد گیاهان مقاوم در برابر ویروئیدهای گیاهی است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

فهرست منابع References

Adkar-Purushothama CR, Bolduc F, Bru P, Perreault JP. 2020. Insights into potato spindle tuber viroid quasi-species from infection to disease. Frontires in Microbiology, 11: 1235.

Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz M. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. Genome Biology. 16:238.

Barba M, Ilardi V, Pasquini G. 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases. Advances of Virus Research 47–61 .

Charith Raj AP, Jean-Pierre P. 2020. Impact of nucleic acid sequencing on viroid biology. Int. J. Mol. Sci. 21(15): 5532.

Chen JS, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 360: 436-439 .

Chertow DS. 2018. Next-generation diagnostics with CRISPR. Science. 360: 381-382.

Chiumenti M, Torchetti EM, Di Serio F, Minafra A. 2014. Identification and characterization of a viroid resembling apple dimple fruit viroid in fig (*Ficus carica* L.) by next generation sequencing of small RNAs. Virus Research. 188: 54–59.

Di Serio F, Li SF, Pallas V, Owens RA, Randles JW, Sano T, Verhoeven TJ, Vidalakis G, Flores R. 2017. Viroid taxonomy. **In: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P, editors**. Viroids and Satellites. Academic Press; Oxford, UK. 135–146.

Hadidi A, Flores R, Candresse T, Barba M. 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. Frontiers in Microbiology. 7: 1325.

Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P. 2017. Viroids and Satellites. Academic Press; Cambridge, MA, USA: Elsevier; Oxford, UK.

Ito T, Suzaki K, Nakano M, Sato A. 2013. Characterization of a new apscaviroid from American persimmon. Archives of Virology. 158: 2629-2631.

Jeger M, Bragard C, Caffier D, Candresse T, Dehnen-Schmutz K, Gilioli G, Gregoire JC, Miret JAJ, MacLeod A, Navarro MN. 2017. Pest categorization of cadang-cadang viroid. EFSA Journal. 15(7): e04928.

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. Plant Pathology. 64: 831-842.

Lavagi I, Matousek J, Vidalakis G. 2017. Other cocadviroids. In: **Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P, editors**. Viroids and satellites. Academic Press; Cambridge, MA, USA: Elsevier; Oxford, UK. 275–287.

Liu H, Soyars C, Li J, Fei Q, He G, Peterson BA, Meyers BC, Nimchuk ZL, Wang X. 2018. CRISPR/Cas9-mediated resistance to Cauliflower mosaic virus. Plant Direct. 2: e00047.

Mishra AK, Kumar A, Mishra D, Nath VS, Jakše J, Kocábek T, Killi UK, Morina F, Matoušek J. 2018. Genome-wide transcriptomic analysis reveals insights into the response to citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hop (*Humulus lupulus* L.). Viruses. 10: 570.

Pääbo S. 2015. The human condition-a molecular approach. Cell. 157:216-226.

Pirovano W, Miozzi L, Boetzer M, Pantaleo V. 2015. Bioinformatics approaches for viral metagenomics in plants using short RNAs: Model case of study and application to a Cicer arietinum population. Frontiers in Microbiology. 5: 790.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

Randles JW. 2003. Economic impact of viroid diseases. In: **Hadidi A, Flores R, Randles JW, Semancik JS, editors**. Viroids. CSIRO Publishing; Collingwood, Australia. 3-11.

Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS. 2017. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. Molecular Cell. 65: 618-630.

Suzuki T, Fujibayashi M, Hataya T, Taneda A, He YH, Tsushima T, Duraisamy GS, Siglova K, Matoušek J, Sing T. 2003. Characterization of host-dependent mutations of apple fruit crinkle viroid replicating in newly identified experimental hosts suggests maintenance of stem-loop structures in the left-hand half of the molecule is important for replication. Journal of General Virology. 98: 506–516.

Waltz E. 2018. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. Nature Biotechnology. 36: 6–7.

Wang Y, Atta S, Wang X, Yang F, Zhou C, Cao M. 2018. Transcriptome sequencing reveals novel Citrus bark cracking viroid (CBCVd) variants from citrus and their molecular characterization. PLoS ONE. 13: e0198022.

Zhang Z, Qi S, Tang N, Zhang X, Chen S, Zhu P, Ma L, Ching J, Xu Y, Lu M. 2018. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. PLoS Pathogy. 10: e1004553.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]

The Role of Next Generation Sequencing and CRISPR/Cas13 Editing Technology in Identifying and Controlling Plant Pathogenic Viroids

Mehrdad Salehzadeh[1], Saeedeh Dehghanpour Farashah[2*]

1- PhD Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

sdfarashah@yahoo.com

Abstract

Plant diseases caused by plant pathogenic viroids are a serious threat to agricultural production in the world. Recently, initiatives initiated through molecular biotechnology have been effective strategies for the prevention and control of plant-infecting viroids. Sequencing of the new generation examines the direct and indirect interactions of viroids with host factors, and using this technology, changes in the proteome and host transcripts during infection with viroids are identified, and by examining the interactions between viroids and plants, Useful strategies to combat these pathogens. Recent advances in targeted DNA or RNA editing with CRISPR/Cas related systems are also very attractive tools that can be used in plant protection. In this review article, we review the progress of CRISPR/Cas systems to date against plant pathogenic viroids, and the use of these methods in controling some plant viroids by targeting specific sequences or genes in these factors will be discussed.

Keywords: Viroid, Molecular Biotechnology, Next Generation Sequencing, Crisper.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.7.4]