مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کنترل ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی با سیستم CRISPR/Cas

سعیده دهقانپور فراشاه[۱]، مهرداد صالح زاده[۲*]، احمد اشرفی[۳]

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

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

۳- کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه آزاد واحد ملکان، ایران

mehrdadsalehzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۸
صفحه ۱۳۶-۱۱۹

چکیده

بیماری‌های گیاهی ناشی از ویروس‌ها تهدیدی جدی برای تولید محصولات کشاورزی در جهان است و مهندسی ضدویروس که توسط بیوتکنولوژی مولکولی آغاز شده است، استراتژی موثری برای پیشگیری و کنترل ویروس‌های آلوده‌کننده‌ی گیاهی محسوب می‌شود. پیشرفت‌های اخیر در ویرایش هدفمند دی.ان.اِ یا آر.ان.اِ با سیستم تکرار کوتاه پالیندرومیک یا مرتبط با CRISPR از ابزارهای قابل استفاده در زمینه محافظت از گیاهان در برابر ویروس‌ها است. در این مقاله مروری، توسعه سیستم‌های CRISPR/Cas مورد بررسی قرار می‌گیرد و برنامه‌های آن‌ها در کنترل ویروس‌های مختلف گیاهی با هدف قرار دادن توالی‌های ویروسی یا ژن‌های حساسیت در میزبان ذکر می‌شود. علاوه‌بر این، برخی از ژن‌های مقاومت بالقوه مغلوب را که قابل استفاده در اصلاح گیاهان علیه ویروس‌ها هستند، معرفی و بر اهمیت اصلاح ضدویروسی مبتنی‌بر ژن مغلوب برای تولید گیاهان عاری از ویروس بدون نقص رشد، تأکید می‌شود. همچنین چالش‌ها و فرصت‌های استفاده از تکنیک‌های CRISPR/Cas در پیشگیری و کنترل ویروس‌های گیاهی مورد بحث قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: پالیندرومیک، ژن‌های مقاومت، ویرایش هدفمند، ویروس‌های گیاهی.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

مقدمه

فناوری هدف‌گیری دقیق اصلاح ژنهای خاص در گیاهان پتانسیل زیادی برای روشن‌کردن عملکردهای ژنی و همچنین برای بهبود صفات زراعی ایجاد کرده است. جدیدترین و پیشرفته‌ترین فناوری ویرایش ژن که می‌تواند برای دستیابی به این هدف مورد بهره برداری قرار گیرد، مبتنی‌بر سیستم‌های ژن‌های مرتبط با تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای (CRISPR/Cas) در سیستم‌های پروکاریوتی است که ظاهراً ساده تر، کارآمدتر و همه‌کاره‌تر از سایر تکنیک‌های ویرایش ژنومی از قبیل نوکلئازهای انگشت روی و نوکلئازهای موثر مانند فعال‌کننده رونویسی است. فناوری CRISPR/Cas قبلاً در زمینه‌های مختلف علوم زیستی، به‌ویژه پزشکی و بیوتکنولوژی، انقلابی ایجاد کرده و یک رویکرد بدیع (یا مکمل) جدید و قدرتمند برای اصلاح گیاهان نسبت به سیستم‌های کلاسیک ارائه داده است. با توجه به اینکه ویروس‌های گیاهی می‌توانند تلفات مخربی را روی بهره‌وری محصولات وارد کنند، جای تعجب نیست که در سال‌های اخیر، علاقه به استفاده از جنبه‌های مختلف فناوری CRISPR/Cas برای توسعه گیاهان مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زای ویروسی به وجود آمده است (Abudayyeh et al. 2017). این فناوری نوظهور انقلابی در زمینه‌های مختلف علوم زیستی، پزشکی و بیوتکنولوژی ایجاد کرده و علاقه قابل‌توجهی را در بین زیست‌شناسان گیاهی، چه در علوم پایه و چه در زمینه حفاظت و اصلاح نباتات، ایجاد کرده است.

در این بررسی، اصول اساسی سیستم‌های CRISPR/Cas و چگونگی استقرار آنها در گیاهان و محصولات کشاورزی برای کنترل عفونت‌های ویروسی گیاهان را شرح داده می‌شود. همچنین در مورد چگونگی استفاده از اندونوکلئازهای Cas برای مهندسی مقاومت در گیاهان علیه ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی با هدف قرار دادن مستقیم دی.ان.ای یا آر.ان.ای ویروسی و نیز چگونگی غیرفعال‌سازی ژن‌های حساسیت میزبان بحث خواهد شد.

در آخر، چالش‌هایی را در مورد تولید محصولات تراریخته مقاوم به ویروس با استفاده از CRISPR/Cas که به بازار عرضه می‌شوند، بیان خواهد شد.

مروری بر سازوکار سیستم CRISPR/Cas9

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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

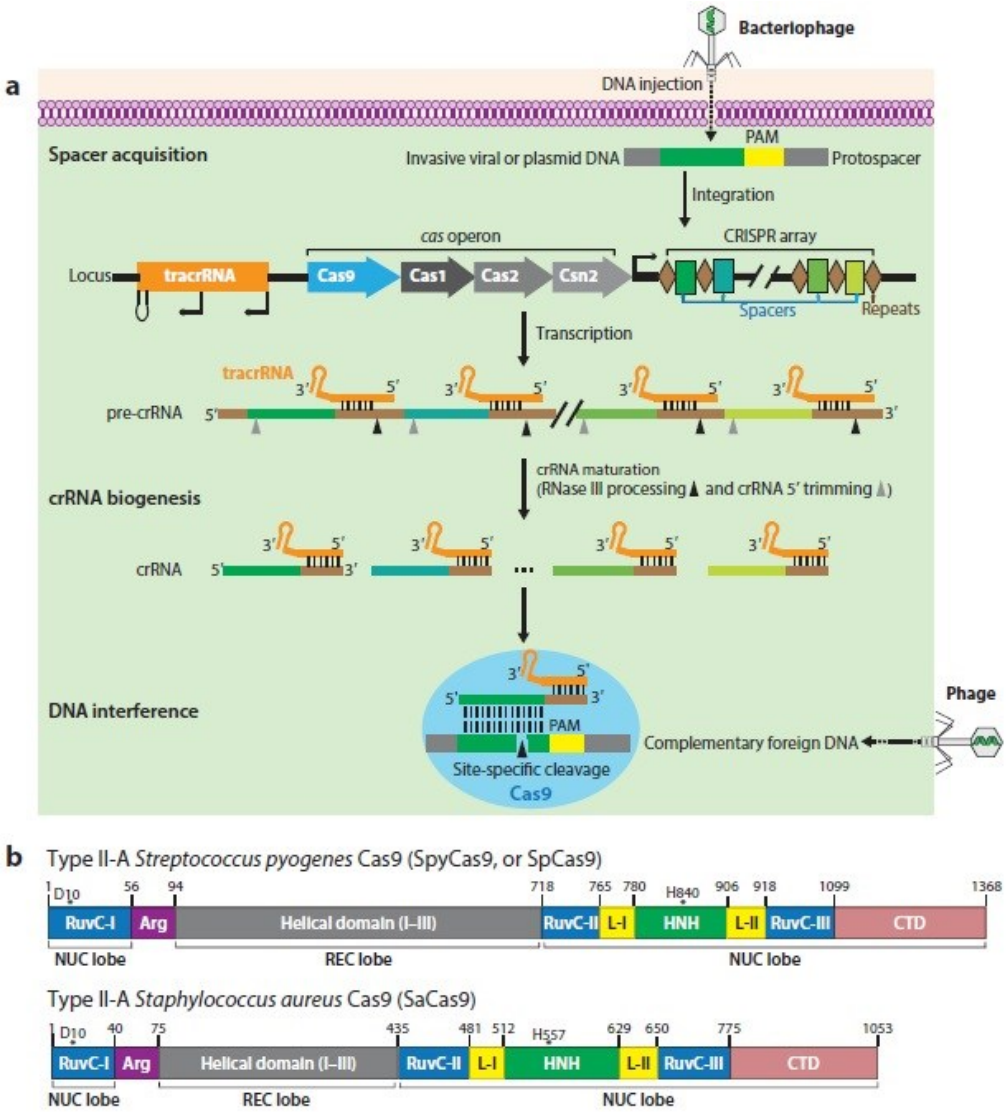
برابر ویروس‌های گیاهی استفاده کرد. نخست، از سیستم‌های CRISPR/Cas می‌توان برای ایجاد جهش‌های هدفمند در ژن‌های خاص در گیاهان میزبان استفاده کرد تا توانایی و اجازه تکثیر و انتشار موفقیت‌آمیز ویروس را در گیاه کاهش داده و مانع از عفونت سازگار ویروس در گیاه شد. دوم، سیستم‌های CRISPR/Cas ممکن است به‌گونه‌ای طراحی شوند که به‌طور موثر در گیاهان ژنوم ویروسی را مورد هدف قرار دهند. به‌عنوان مثال، سیستم‌های CRISPR/Cas9 با هدف قرار دادن مستقیم ویروس‌های دی.ان.ای‌دار و آر.ان.ای‌دار می‌توانند به‌طور مستقیم از تکثیر و گسترش موفقیت‌آمیز ویروس در گیاهان جلوگیری کنند.

اگرچه سیستم‌های CRISPR/Cas پتانسیل زیادی در کنترل عفونت‌های ویروس‌های گیاهی در محصولات زراعی و به‌طور 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 تا پروتکل‌های مناسب برای اطمینان از کارایی مطلوب این سیستم علیه ویروس‌ها و سازگاری آنها با محیط زیست ایجاد شود. همچنین بسیار مهم است که سیستم صحیح ویرایش CRISPR/Cas برای یک هدف مشخص انتخاب شود (Rao et al. 2017).

سیستم CRISPR/Cas یک سیستم دفاعی پروکاریوتیک (آرکئی یا باکتری) مبتنی‌بر آر.ان.اِ است که قطعات خارجی از قبیل ویروس‌ها و پلاسمیدها را در مکان‌های خاصی از CRISPR/Cas ادغام می‌کند. پس از ادغام، آر.ان.ای‌های پیش رو (precrRNA) از این مکان‌ها رونویسی می‌شوند و پس از بلوغ precrRNA، crRNAها به پروتئین‌های اندونوکلئاز Cas متصل و هدایت می‌شوند تا دی.ان.ای پلاسمید یا ویروسی را که دارای توالی مکمل CRR هستند را شناسایی و جدا کند. این قطعات به دست آمده به ارگانیسم‌های پروکاریوتی امکان تولید یک حافظه مولکولی دائمی در برابر نفوذ ویروس‌ها و پلاسمیدهای قبلی را می‌دهد و یک ایمنی قوی در برابر هجوم‌های مکرر بیماری‌زاها فراهم می‌کند (شکل ۱) (Jiang and Doudna, 2017).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]



شکل ۱- مداخله‌ی دی.ان.اِ به واسطه‌ی Cas9 در ایمنی تطبیقی باکتریایی.

الف: جایگاه کروموزومی (لوکوس) CRISPR معمول در یک سیستم CRISPR–Cas نوع ۲ شامل آرایه‌ای از توالی‌های تکراری (تکرارها، لوزی‌های قهوه‌ای) هستند که در بین آن‌ها، قطعات کوچکی از توالی‌های غیر تکراری (اسپیسرها یا فاصله‌اندازها، مربعات رنگی) و نیز مجموعه‌ای از ژن‌های (Cas) متصل به CRISPR (فلش‌های رنگی) قرار گرفته‌اند. قبل از اپرن ژن *Cas*، ژن CRISPR RNA فعال‌کننده ترانس (*tracrRNA*) قرار دارد که RNA غیر رمزکننده منحصربه فرد را با همولوژی با توالی‌های تکراری رمزگذاری می‌کند. در صورت عفونت فاژ، یک فاصله‌انداز جدید (رنگ سبز تیره) مشتق شده از عناصر ژنتیکی در درون آرایه‌ی CRISPR از طریق دستگاه اکتسابی قرار می‌گیرد (Csn2-Cas1, Cas2). در صورت تلفیق و یکپارچه‌سازی، فاصله‌انداز جدید با همه فاصله‌اندازهای دیگر به یک پیش‌ساز بلند (pre-CRISPR RNA crRNA) حاوی تکرارها (خطوط قهوه‌ای) و فاصله‌اندازها (خطوط سبز تیره، سبز روشن و زرد) رونویسی می‌شود. ژن *tracrRNA* به صورت مجزا رونویسی شده و سپس به تکرارهای pre-crRNA برای بلوغ crRNA یا برش RNase III

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

متصل می‌شود. پیرایش بیشتر انتهای آمینی crRNA (فلش‌های خاکستری) توسط نوکلئازهای ناشناخته موجب کاهش طول توالی راهنما به ۲۰ نوکلئوتید می‌شود. در طی مداخله، ساختار crRNA–tracrRNA بالغ از اندونوکلئاز Cas9 استفاده کرده و دی.ان.ای خارجی حاوی توالی مکمل crRNA 20 nt را قبل از توالی PAM برش می‌دهد. ب: نمای شماتیک از سازمان دهی دومین ارتولوگ‌های Cas9 معرف از زیرانواع مجزا. ستاره‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود باقی‌مانده‌های کلیدی و حفاظت‌شده برای فعالیت دی.ان.اِ به‌واسطه‌ی Cas9 است.

حروف اختصاری: Arg: پل هلیکس (یا بریج هلیکس) غنی از آرژینین؛ crRNA: CRISPR RNA؛ CTD: دومین کربوکسیل انتهایی؛ nt: نوکلئوتید؛ NUC: لوب نوکلئاز؛ PAM: موتیف مجاور پروتواسپیسر؛ REC: لوب تشخیص؛ *tracrRNA*: CRISPR RNA فعال‌کننده‌ی ترانس (Jiang and Doudna, 2017).

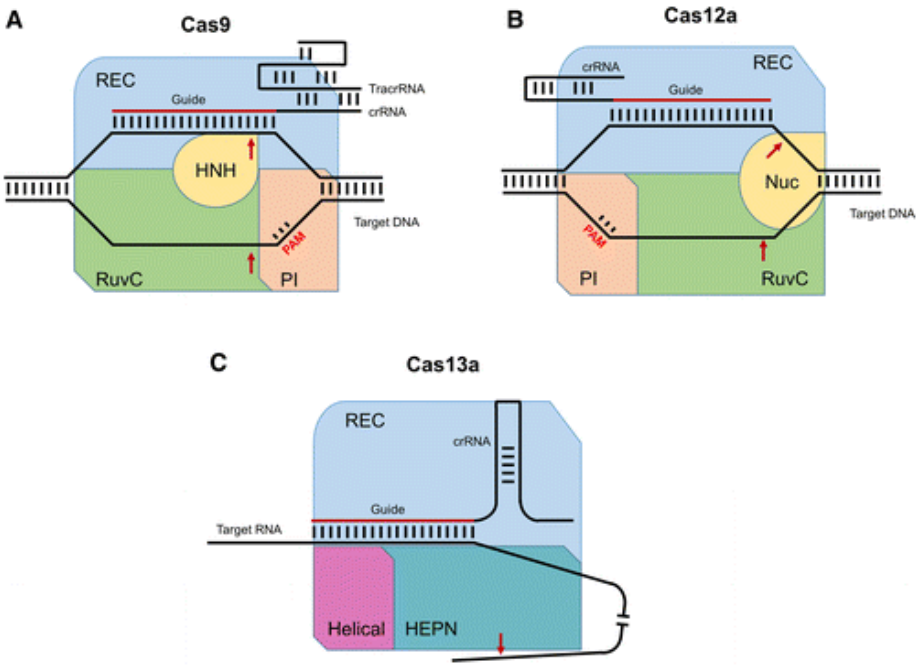
اجزای اصلی ساختار CRISPR/Cas طبیعی از نظر ترکیبات پروتئینی و crRNA، معماری، ساختار مکان ژنومی و سازوکارهای ایجاد و فعالیت CRR به‌طور قابل‌توجهی متنوع هستند. در این طبقه‌بندی پیچیده آنها در دو کلاس عمده و شش نوع مختلف قرار می‌گیرند و هر نوع به چندین زیرگروه تقسیم می‌شوند. که هر کدام از چندین زیرواحد مختلف برای انجام وظیفه‌ی خود استفاده می‌کنند. در بررسی‌های ویروس‌شناسی از سیستم ۲ به‌دلیل سادگی و سرعت بالا، برای برش ژنوم استفاده و بهره‌برداری می‌شود. قابل ذکر است، سیستم کلاس ۲ CRISPR/Cas9 از *استرپتوکوکوس پایوژنس* (*Streptococcus pyogenes*) گرفته‌شده که به‌عنوان اولین و گسترده ترین ابزار برای ویرایش ژن استفاده می‌شود و تمامی اجزا و ترکیبات آن به‌خوبی شناخته شده است. فعال‌سازی این سیستم نیاز به یک آر.ان.ای کوچک اضافی دارد، یک crRNA غیرفعال‌کننده (*tracrRNA*) که در بلوغ crRNA نقش دارد و از یک منبع جدای ژنومی در بالادست مکان ژنی CRISPR، رونویسی می‌شود. جفت‌بازهای tracrRNA با توالی‌های تکراری precrRNA جفت شده و یک dsRNA تولید می‌شود که در مرحله‌ی بعد توسط RNase III شکاف داده می‌شود تا crRNA بالغ تولید شود که انتهای آمینی آنها توسط آنزیم‌های ناشناخته اصلاح شود. crRNA بالغ حاصل *tracrRNA* می‌تواند از طریق بخش *tracrRNA* با اندونوکلئاز Cas9 ارتباط برقرار کند. در ادامه یک توالی در بخش crRNA، مجموعه را به سمت دی.ان.ای بیگانه سوق می‌دهد. این مجموعه اسید نوکلئیک خارجی را مورد حمله قرار نخواهد داد مگر اینکه حاوی موتیف‌های PAMs باشد(Mahas et al. 2019).

پروتئین‌های Cas9 که از گونه‌های مختلف پروکاریوتی سرچشمه می‌گیرند ممکن است جایگاه‌های مختلف PAM را تشخیص دهند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

به‌عنوان مثال، پرکاربردترین Cas9 از *S. pyogenes* (SpCas9) با یک ′۵ –PAM ′3-NGG ارتباط برقرار می‌کند. این تعامل باعث پیچیدگی رشته دی.ان.ای هدف، تشکیل ترکیبی spacer-DNA RNA و تجزیه دی.ان.اِ می‌شود. Cas9 شامل دو حوزه نوکلئازی به نام‌های HNH و RuvC است که هر دوی آنها ۳ نوکلئوتید را در بالادست PAM اما در رشته‌های مختلف دارند. HNH رشته دی.ان.اِ را با crRNA مکمل می کند، در حالی‌که RuvC رشته دیگر را می‌شکافد و منجربه شکستگی دو رشته در دی.ان.اِ مهاجم می‌شود (شکل ۲) (Kalinina et al. 2019).



شکل ۲- نمایش شماتیک تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای منظم و متقاطع و ژن‌های مرتبط با CRISPER/Cas.
A. اندونوکلئاز Cas9 در یک مجموعه با دو آر.ان.ای کوچک CRISPR RNA (crRNA) و crRNA غیرفعال‌کننده (*tracrRNA*) به جایگاه هدف دی.ان.ای متصل و باعث شکستن فوری دو رشته در ۳ نوکلئوتید (nt) بلافاصله در بالادست موتیف PAM می‌شود. تشخیص دی.ان.اِ توسط توالی راهنمای ۲۰ نوکلئوتیدی به نام crRNA است که با رنگ قرمز نشان داده شده است. REC معادل لوب تشخیص، PI معادل دومین‌های برهمکنش‌دهنده با PAM و HNH و RuvC حاوی دومین‌های نوکلئازی که به‌ترتیب رشته‌های هدف و غیرهدف را می‌شکافند، هستند.
B. Cas12a همراه با آر.ان.ای کوچک، crRNA عمل می‌کند و به جایگاه دی.ان.ای هدف در پایین دست PAM متصل می‌شود. تشخیص دی.ان.اِ توسط توالی راهنمای ۲۳ تا ۲۵ نوکلئوتیدی از CRR که با رنگ قرمز نشان داده شده است، انجام می‌شود. Cas12a باعث تحریک شکستگی دو رشته انتهای آمینی و کربوکسیلی به کمک موتیف مجاور پروتواسپیسر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

(PAM) انجام می‌شود. حوزه‌های Nuc و RuvC خاصیت نوکلئازی داشته و به‌ترتیب رشته‌های هدف و غیرهدف را می‌شکنند.

C. Cas13a همراه با آر.ان.ای کوچک crRNA عمل می‌کند و به جایگاه آر.ان.ای هدف متصل می‌شود. شناسایی آر.ان.اِ با توالی راهنمای crRNA همراه می‌شود که با رنگ قرمز نشان داده شده است. HEPN دامنه نوکلئازی که محل هدف آر.ان.اِ را از محل شناسایی دور می‌کند با پیکان نشان داده شده است (Kalinina et al. 2019).

مقاومت از طریق CRISPER/Cas 9 در برابر ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی

این نوع مقاومت در برابر ویروس‌های گیاهی با هدف قرار دادن ژنوم ویروسی در مورد برخی ویروس‌های دی.ان.ای‌دار گیاهی از جمله Geminiviridae و Caulimoviridae که شامل دو خانواده مهم از ویروس‌های دی.ان.ای‌دار گیاهی بوده و به ترتیب شامل ۴۸۵ گونه با ژنوم دی.ان.ای تک‌رشته (ssDNA) و ۸۵ گونه با ژنوم دی.ان.ای دو رشته (dsDNA) هستند، مورد مطالعه قرار گرفته است. قبل از ظهور سیستم‌های CRISPR/Cas، نوکلئازهای حاوی دومین انگشت روی (ZFNs) و نوکلئازهای موثر مانند فعال‌کننده‌های رونویسی (TALENs) برای دستکاری میزبان و دی.ان.ای ویروسی در گیاهان استفاده شده است. مقاومت با واسطه ZFN و TALEN در برابر چندین ویروس ژنی، از جمله ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCCNV) و ویروس پیچیدگی ساقه‌ی توتون (TbCSV)، با هدف قرار دادن ناحیه‌ی مربوط به همانندسازی در ژنوم ویروسی گزارش شده است (Chen et al. 2014).

سیستم‌های CRISPR/Cas در مقایسه با سایر فناوری‌های ویرایش دی.ان.ای از جمله ZFN وTALEN دارای مزایای بیشتری در دستکاری هدفمند هستند. بنابراین به‌سرعت در مهندسی ضدویروسی در گیاهان امیدواری بیشتری ایجاد می‌کنند. سازه‌های CRISPR/Cas با آر.ان.ای‌های زیرژنومی راهنما (sgRNA) منطقه مرتبط با همانندسازی ویروس یا منطقه بین ژنی (IR) را در *جمینی‌ویروس‌ها* (*Gemeniviruses*) مورد هدف قرار می‌دهند. این تداخل نتایج بسیار مثبت و امیدوارکننده‌ای در کاهش آلودگی و مقاومت گیاه در برابر ویروس پیچیدگی شدید چغندر قند (BSCTV)، ویروس پیچیدگی مولتان برگ پنبه (CLCuMuV) و ویروس کوتولگی زرد لوبیا (BeYDV) به‌ترتیب در گیاهان تراریخته *Nicotiana benthamiana* و *Arabidopsis thaliana* حاصل کرده است (Baltes et al. 2015; Ji et al. 2015; Yin et al. 2019).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

هدف قرار دادن ژنوم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) با آر.ان.ای راهنمای Cas9 در قاب‌های خوانشی مربوط به پروتئین پوششی (CP) و قاب خواندنی مربوط به همانندسازی ویروس (Rep) منجر به تداخل موثر در همانندسازی ویروس شده که همراه با تجمع کم ژنوم ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TYLCV) در گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته و گیاهان *N. benthamiana* ثابت شده است (Tashkandi et al. 2018). sgRNAهایی که ساختار ساقه و حلقه‌ی ویروس را مورد هدف قرار می‌دهند در مقایسه با sgRNAهایی که بر CP و منطقه مرتبط با همانندسازی در ناحیه IR تاثیر دارند، اثربخشی موثرتری در جمینی*ویروس*های تک‌بخشی از قبیل ویروس پیچیدگی کوخران پنبه (CLCuKoV) در مقایسه با جمینی*ویروس*های دو بخشی نشان می‌دهند. این اثرات در جمینی*ویروس*هایی مثل ویروس موزاییک مریما merremia mosaic virus (MeMV) و سویه‌های مختلف شدید و خفیف TYLCV نشان داده شده است (Ali et al. 2015).

این یافته‌ها نشان می‌دهد که مقاومت به‌واسطه‌ی CRISPR/Cas9 با توجه به تاثیر این سیستم روی قاب‌های خواندنی به‌مخصوص IR از تکثیر سیستمیک جمینی*ویروس*ها جلوگیری می‌کند. بنابراین، استفاده از CRISPR/Cas9 توسط یک sgRNA منفرد راهنما با هدف قرار دادن توالی حلقه ساقه (منشا همانندسازی در منطقه بین ژنی) در ویروس TYLCV، نیز می‌تواند در طیف وسیعی از گیاهان نسبت به ویروس‌های دیگر از جمله جمینی*ویروس*های تک‌بخشی مانند BCTV و جمینی*ویروس*های دو بخشی مانند MeMV مقاومت ایجاد کند (Kis et al. 2019; Tripathi et al. 2019).

با توسعه سریع فناوری‌های مبتنی‌بر سیستم CRISPR/Cas9، نمونه‌های موفق‌تر و مقاومت امیدوارکننده در مقابله با جمینی*ویروس*های گیاهی نشان داده شد. به‌عنوان مثال، یک سیستم CRISPR/Cas9 با sgRNAهای راهنما، با هدف قرار دادن پروتئین حرکتی (MP) و منطقه CP، به ترتیب مقاومت در برابر ویروس کوتولگی گندم (WDV) یا ویروس کوتولگی موز (BSV) ایجاد کرده است (Kis et al. 2019; Tripathi et al. 2019). این روش می‌تواند راه‌های جدیدی برای مقاومت پنبه در برابر بیماری پیچیدگی برگ پنبه (CLCuD)، که یک بیماری ویروسی محدودکننده اصلی برای تولید پنبه در سراسر جهان است، را فراهم کند (Uniyal et al. 2019).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

موفقیت‌هایی در مورد گیاهان تراریخته مهندسی‌شده توسط سیستم‌های CRISPR/Cas9 مقاوم در برابر بیماری‌های ویروسی، به یک پتانسیل و استراتژی مشابه قوی در برابر سایر ویروس‌ها با ژنوم ssDNA مانند ویروس برگ دسته‌ای موز (banana buchy top virus, BBTV) که بیماری شدیدی روی موز ایجاد و منجر به خسارت شدید به کل صنعت موز در جنوب چین می‌شود، شده است (Rao et al. 2017). علاوه‌بر این، به‌تازگی از ایمنی به واسطه‌ی CRISPR/Cas9 برای دفاع از گیاهان در برابر ویروس‌های گیاهی با ژنوم dsDNA گیاهی استفاده شده است. در گیاه تراریخته *A. thaliana* به‌طور همزمان هر دو پروتئین Cas9 و sgRNA با هدف قرار دادن منطقه پروتئین پوششی ویروس (CP) موزاییک گل کلم (cauliflower mosaic virus) از خانواده Caulimoviridae مقاومت موثری در برابر این ویروس ایجاد می‌کنند (Liu et al. 2018).

مقاومت با واسطه CRISPR/Cas در برابر ویروس‌های آر.ان.ای‌دار گیاهی

به‌تازگی، برخی ازآر.ان.ای‌ها با هدف‌گیری پروتئین‌های مرتبط با CRISPR از قبیل Cas9 مشتق‌شده از (FnCas9) *Francisella novicida* و Cas13a (قبلا C2c2 نامیده می‌شد) در رابطه با *Leptotrichia shahii* یافت شده‌اند (Price et al. 2015; Shmakov et al. 2015).

در میان آنها، LshCas13a اولین ارتولوگ از Cas13 است که کاربرد سیستم‌های CRISPR/Cas را از دی.ان.اِ به آر.ان.اِ گسترش داد (Abudayyeh et al. 2016). پروتئین LshCas13a همراه با protospacer می‌توانند برای تخریب mRNAهای خاص در باکتری‌ها عمل کنند (Abudayyeh et al. 2017).

این سیستم به ویروس‌شناسان یک سیستم CRISPR/Cas جایگزین برای مبارزه با ویروس‌های آر.ان.ای‌دار بیماری‌زا ارائه می‌دهد. بنابراین، با هدف قرار دادن ژنوم آنها از طریق سیستم CRISPR/Cas با این نوع پروتئین‌های موثر Cas جدید می‌توان به‌طور مستقیم ویروس‌های آر.ان.ای‌دار را تخریب کرد. پروتئین FnCas9 به‌همراه یک gRNA با هدف قرار دادن rgRNA می‌تواند یک ویروس آر.ان.ای تک‌رشته‌ای (ssRNA) مربوط به ویروس هپاتیت C (HCV) را در سلول‌های پستانداران مورد هدف قرار دهد و منجر به مهار تولید پروتئین ویروسی شود (Price et al. 2015). یک نسخه از FnCas9 به‌همراه rgRNA توانسته است ویروس‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

ssRNA مرتبط با گیاهان را مورد هدف قرار دهد. این مورد برای به‌دست آوردن مقاومت ویروسی در برابر ویروس موزاییک خیار (CMV) و ویروس موزاییک توتون(TMV) ، به‌ترتیب در گیاهان تراریخته *N. benthamiana* و *A. thaliana* مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مثبتی به دست آمده است (Zhang et al. 2018).

یک نوع سیستم CRISPR/Cas با هدف‌گیری آر.ان.ای‌های دیگری با استفاده از کلاس نوع ۲ به نام VI-A CRISPR/Cas (LshCas13a)، برای تجزیه ویروس‌های ssRNA در گیاهان مشخص و برنامه‌ریزی شده است. همانطورکه انتظار می‌رفت، LshCas13a با کمک یک sgRNA توانست توالی آر.ان.ای‌های ویروسی را مورد هدف قرار دهد. ایجاد تغییرات سریع و موثر بر روی ویروس موزاییک شلغم (turnip mosaic virus, TuMV) نشان داد که در این سیستم، sgRNA توسط یک پیشبر مرتبط با ویروس قهوه‌ای شدن نخود (pea early browning virus, PEBV) که در ناقلی مبتنی‌بر ویروس جغجغه توتون (tobacoo rattle virus, TRV) هدایت می‌شد در گیاهان تراریخته *N. benthamiana* و *A. thaliana* منجربه اختلال در سنتز ویروس شد (Aman et al. 2018a,b). سازه‌ی LshCas13a b به‌طور مشابه، باعث مقاومت در برابر TMV، ویروس موزاییک رگه‌دار برنج (rice stripe mosaic virus , RSMV) و ویروس کوتولگی رگه سیاه برنج (southern rice black-streaked dwarf virus , SRBSDV) در توتون تراریخته و برنج شد و به‌طور اختصاصی با هدف قرار دادن آر.ان.ای ویروسی از تکثیر ویروس ممانعت کرد (Zhang et al. 2019a). در پژوهشی دیگر، با هدف قرار دادن توالی‌های رمزکننده P3، NIb و CP در ویروس Y سیب زمینی (Potato vitus Y, PVY) ، با سیستم CRISPR/Cas13a تداخل در همانندسازی ویروس ایجاد و آلودگی PVY مهار شد (Zhan et al. 2019). یک پروتئین جدید به نام Cas13 از *Ruminococcus flavefaciens* شناسایی و در کلاس Cas13d (CasRx) طبقه‌بندی شده است. این عامل Cas13d حاوی دو منطقه اتصال به نوکلئوتیدهای یوکاریوتی و پروکاریوتی (HEPN) بوده و همچنین دارای فعالیت RNase برای هدف قرار دادن ssRNA است (Konermann et al. 2018).

محققان دریافتند که Cas13d دارای مزایای زیادی نسبت به Cas13a، Cas13b یا سایر انواع Cas13 است و در هنگام استفاده از آن برای تداخل در آلودگی TuMV با هدف قرار دادن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

GFP، CP یا منطقه HC-Pro در ژنوم TuMV-GFP بسیار موثرتر عمل می‌کند (Mahas et al. 2019). سیستم تداخل آر.ان.ای با واسطه Cas13d در سلول‌های پستانداران نیز برای مبارزه با *کروناویروس* جدید SARS-CoV-2 و همچنین آنفلوانزا نتایج موثری داشته است (Abbott et al. 2020).

مقاومت سیستم Crisper/Cas در مقابل ویروس‌های گیاهی و هدف قرار دادن عوامل میزبانی

ویروس‌های گیاهی عوامل ترجمه سلول میزبان را نه تنها برای ترجمه آر.ان.ای‌های ویروسی خود بلکه برای تسهیل سایر فرایندهای آلودگی به کار می‌گیرند. بنابراین عوامل میزبانی مربوط به ترجمه در ابتدا به‌عنوان عوامل پیش‌روی ویروسی شناسایی شده‌اند. سپس عوامل دیگر از جمله تکثیر، حرکت و ژن‌های مرتبط با متابولیسم، شناسایی و برای کنترل بیماری‌های ویروسی در گیاهان مورد بهره‌برداری قرار گرفتند. مقاومت مغلوب توسط یک جهش در ژن مغلوب، که یک عامل میزبانی برای گسترش آلودگی ویروسی در چرخه حیاتی ویروس مهم است، ایجاد می‌شود. بنابراین، برای ایجاد یک جهش ژنی مغلوب هدفمند توسط سیستم CRISPR/Cas مناسب است (Hashimoto et al. 2016).

فاکتورهای آغازین ترجمه یوکاریوتی از جمله eIF4E، eIF4G و ایزوفرم‌های آنها یعنی eIF (iso) 4E و eIF (iso) 4G، ژن‌های مقاومت مغلوبی هستند که به‌طور گسترده برای فرآیندهای مرتبط با ترجمه پروتئین‌های آر.ان.ای ویروس در چندین گونه گیاه مختلف مورد استفاده قرار گرفته و موثر بودند (Wang, 2015; Hashimoto et al. 2016). نتایج بررسی‌ها نشان داده است که CRISPR/Cas9 ویرایش‌شده مقاومت کاملی در برابر ویروس موزاییک زرد کدو سبز (ZYMV)، ویروس موزاییک لکه حلقوی پاپایا (papaya ring spot virus- w, PRSV-W) و ویروس زردی رگبرگ خیار (cucumber vein yellowing virus, CVYV) با تداخل در سیستم‌های ترجمه یوکاریوتی ایجاد کرده است (Chandrasekaran et al. 2016).

همچنین، یک آلل جدید برنج به نام eIF4G توسط CRISPR/Cas9 مورد هدف قرار گرفت و باعث مقاومت برنج در برابر ویروس تانگروی (tungro) کروی (rice tungro spherical virus, RTSV) برنج شد (Macovei et al. 2018). جهش القایی در CRISPR/Cas9 با تداخل eIF (iso) 4E در گیاهان کاساوا و *A. thaliana* به‌ترتیب مقاومت کامل در برابر ویروس رگه قهوه‌ای کاساوا

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

(cassava brown streak virus, CBSV) و TuMV-GFP ایجاد کرد. کاساوا برخی از پروتئین‌های جایگزین مانند eIF4E را کد می‌کند که شامل پروتئین‌های اتصال‌دهنده کلاهک (nCBP-1 و nCBP-2) هستند. هنگامی‌که CRISPR/SpCas9 برای هدف قرار دادن nCBP-1 یا nCBP-2 در گیاهان کاساوا استفاده شد، گیاهان جهش‌یافته در برابر CBSV از خود مقاومت نشان دادند (Gomez et al. 2019).

به‌تازگی، ویرایشگر جدیدی به نام CRISPR-Cas9n-cytidine نیز در مهندسی ضدویروسی مورد استفاده قرار گرفته است که می تواند آلل حساسیت در *Arabidopsis* به نام eIF4E1 را با ایجاد یکسری جهش دقیق و آلل مقاوم، به گیاهان مقاوم در برابر ویروس زرد شبدر (clover infection yellow vein virus, CIYVV) تبدیل کند (Bastet et al. 2019).

همچنین یک پروتئین میزبانی به نام PBS1 در سویا که باعث عملکرد موثر NIa پروتئین مربوط به ویروس موزاییک سویا (soybean mosaic virus, SMV) می‌شود، توسط سیستم CRISPR/Cas مورد هدف قرار گرفت که می‌تواند برای تولید منابع سویای مقاوم در برابر SMV استفاده شود. با اینحال، در حال حاضر استراتژی‌های ضدویروسی به‌طور عمده بر روی eIF4s و همولوگ‌های آنها متمرکز هست. بنابراین، برای دستیابی به منابع ژنتیکی موثر در برابر بسیاری دیگر از ویروس‌های گیاهی با اهمیت اقتصادی، باید ژن‌های حساسیت بیشتری از میزبان شناسایی شوند (Helm et al. 2019).

اگرچه بسیاری از ژن‌های غالب مقاومت در برابر ویروس‌های گیاهی شناسایی شده‌اند، اما اغلب از نظر ژنتیکی با صفات نامطلوب نظیر عملکرد کم، عطر و طعم ضعیف، اندازه کوچک و حتی ناهنجاری رشدی در گیاهان مرتبط هستند. بنابراین، ژن‌های مقاومتی در مهندسی ضدویروس با ارزش نیستند. به همین ترتیب، بسیاری از ژن‌های حساسیت میزبانی که درگیر آلودگی ویروسی هستند نیز روی زنده‌ماندن گیاه تأثیر می‌گذارند. به‌عنوان مثال، جهش در ژن *Arabidopsis* ssi2 که منجر به تجمع مقادیر زیادی از هورمون سالیسیلیک اسید می‌شود، مقاومت در برابر CMV را ایجاد می‌کند، اما گیاه فنوتیپ رشد غیرطبیعی را نشان می‌دهد (Sekine et al. 2004).

برخی از عوامل میزبانی امیدوارکننده وجود دارند که تلاش برای اصلاح گیاهان در برابر ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی را مخصوصا

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

اعضای دو خانواده Geminiviridae و Potyviridae که تقریبا نیمی از ویروس‌های گیاهی را که تا به امروز توصیف شده اند شامل می‌شوند، بیشتر می‌کنند. این بیماری‌زاهای ویرانگر در محصولات مهم اقتصادی بر اساس عملکردشان در میزبان طبقه‌بندی می‌شوند. تنظیم‌کننده‌های منفی دفاعی گیاهان، مانند rgs-CaM باعث خاموش شدن آر.ان.اِ از طریق سرکوب سطح رونویسی RDR6 و تخریب پروتئین SGS3 از طریق اتوفاژی می‌شوند (Li et al. 2018). پروتئین زیپ لوسین ۱ (homeodomain (HAT1) و ژن‌های وابسته به آن یعنی *HAT2* و *HAT3* با جهش، باعث افزایش حساسیت به آلودگی CMV با تجمع مقادیر بالای SA و اسید جاسمونیک (JA) می‌شوند (Zou et al. 2016).

استفاده از عوامل حساس مرتبط با چرخه‌ی تکثیر ویروس شامل هدف‌گیری پروتئین‌های دخیل در ترجمه و حرکت ویروس یا سایر چرخه‌های زندگی *توبامو‌ویروس‌ها* (*Tobamoviruses*) مانند پروتئین TOM1 و همولوگ‌های آن، نتایج مفیدی در پی داشته است (Yamanaka et al. 2000). پروتئین‌های eEF1A و eEF4s در ترجمه *پوتی‌ویروس‌ها* (*Potyviruses*) درگیر هستند. پروتئین PCaP1 یک پروتئین اتصال‌دهنده کاتیونی مرتبط با غشای پلاسمایی اغلب ویروس‌ها محسوب می‌شود. پروتئین پوششی ویروس سیب‌زمینی A (potato virus A, PVA) توسط پروتئین میزبانی CK2 سلولی فسفریله می‌شود و CP فسفریله‌شده با پروتئین یوبی‌کوئیتین لیگاز که برای تکثیر PVA و تجمع CP مورد نیاز است، تعامل دارد (Lõhmus et al. 2017).

منابع ژنتیکی مغلوب فوق را می‌توان با یک سیستم CRISPR/Cas9 یا با استفاده از وکتورهای ویروسی برای رساندن sgRNAها و یا پروتئین‌های Cas برای تقویت سریع و قوی sgRNAها و یا پروتئین‌های Cas در طی آلودگی ویروس، استفاده کرد. علاوه‌بر این، سیستم CRISPR/Cas9 مبتنی‌بر ناقل ویروسی قادر به تولید گیاهانی با صفات مورد نظر بدون دخالت رویه‌های کشت بافتی پُر زحمت و زمان‌بر است. به‌عنوان مثال، سیستم CRISPR/Cas9 مبتنی‌بر ویروس‌های دی.ان.ای‌دار شامل BeYDV، WDV و ویروس‌های آر.ان.ای‌دار شامل TRV، PEBV، TMV، BYNV و ویروس موزاییک نواری جو، هدف‌گذاری کارآمد ژن را نشان داده است (Wang, 2015).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

نتیجه‌گیری

گسترش تکنیک‌های مولکولی نقش محوری در پیشگیری و کنترل ویروس‌های گیاهی بیماری‌زا دارند و ظهور و توسعه فناوری‌های CRISPR/Cas تولید و دستیابی به منابع مقاومتی جدید را سرعت می‌بخشد. توسعه و درک سیستم‌های CRISPR/Cas9 و اکتشاف و شناسایی عملکرد ژن‌های مقاومت مغلوب توسط این سیستم‌ها یک روش مهم در پیشگیری و کنترل بیماری‌های ویروسی است.

هدف قرار دادن، تخریب یا دخالت در ژنوم‌های ویروسی با عوامل میزبانی کمک‌کننده به تکثیر و انتشار ویروس، ممکن است خطرات تکامل ویروس را افزایش دهد. با اینحال، ویرایش ژن‌های مقاومت مغلوب یک چشم‌انداز امیدوارکننده در گیاهان مقاوم در برابر ویروس‌های گیاهی خواهد داشت. به‌علاوه، ژن‌های حساسیت میزبان برای ناقلین حشرات می‌توانند از اهداف مهم سیستم‌های CRISPR/Cas برای جلوگیری از انتشار ویروس باشند. نکته قابل توجه این است که استفاده از سیستم‌های CRISPR/Cas تازه توسعه‌یافته برای دفاع ضدویروسی گیاهان نیز مفید است. به‌عنوان مثال، فعال‌سازی رونویسی بسیاری از ژن‌های مقاومت غالب گیاه توسط CRISPR-Act2.0 باعث افزایش ایمنی گیاه با ایجاد طیف وسیعی از انواع مقاومت در برابر انواع مختلف بیماری‌زاها می‌شود.

فناوری‌های CRISPR چندگانه که در آنها gRNAهای متعدد یا پروتئین‌های Cas به‌طور همزمان بیان می‌شوند، دامنه و کارایی ویرایش ژنتیکی و تنظیم رونویسی را بسیار افزایش داده‌اند. با این حال، استفاده از فناوری CRISPR چندمنظوره برای کنترل ویروس‌های گیاهی به‌طور عمده به‌دلیل پیچیدگی دستکاری آزمایشی و محدودیت‌های تبادل ژنتیکی چندین پروتئین Cas به‌طور همزمان به یک گیاه، هنوز در ابتدای راه است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

References فهرست منابع

Abbott T, Dhamdhere G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS.. 2020. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. Cell. 181: 865–876.

Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature. 550: 280-284.

Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DBT, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 353: aaf5573.

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

Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M. 2018a. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. Genome Biology. 19:1.

Aman R, Mahas A, Butt H, Aljedaani F, Mahfouz M. 2018b. Engineering RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in Arabidopsis. Viruses. 10:732.

Baltes N, Hummel A, Konecna E, Cegan R, Bruns A, Bisaro D, Voytas DF. 2015. Conferring resistance to *Geminiviruses* with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. Nature Plants. 1:15145.

Bastet A, Zafirov D, Giovinazzo N, Guyon-Debast A, Nogué F, Robaglia C, Gallois JL. 2019. Mimicking natural polymorphism in eIF4E by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to *Potyviruses*. Plant Biotechnology Journal. 17: 1736–1750.

Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular Plant Pathology. 17: 1140-1153.

Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annual Review of Plant Biology. 70: 667–697.

Chen W, Qian Y, Wu X, Sun Y, Wu X, Cheng X. 2014. Inhibiting replication of begomoviruses using artificial zinc finger nucleases that target viral-conserved nucleotide motif. Virus Genes. 48: 494-501.

Gomez M, Lin Z, Moll T, Chauhan R, Hayden L, Renninger K, Beyene G, Taylor NJ, Carrington JC, Staskawicz BJ, Bart RS. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. Plant Biotechnology Journal. 17: 421-434.

Hashimoto M, Neriya Y, Yamaji Y, Namba S. 2016. Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. Frontiers in Microbiology. 7:1695.

Helm M, Qi M, Sarkar S, Yu H, Whitham S, Innes R. 2019. Engineering a decoy substrate in soybean to enable recognition of the Soybean mosaic virus NIa protease. Molecular Plant-Microbe Interactions. 32: 760-769.

Ji X, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, Gao C. 2015. Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. Nature Plants. 1:15144.

Jiang F, Doudna JA. 2017. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. Annu. Rev. Biophys. 46: 505–29.

Kalinina NO, Khromov A, Love AJ, Taliansky ME. 2019. CRISPR applications in plant virology: virus resistance and byond. Phytopathology. 110: 18-28.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

Kis A, Hamar É, Tholt G, Bán R, Havelda Z. 2019. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnology Journal. 17: 1004-1006.

Konermann S, Lotfy P, Brideau N, Oki J, Shokhirev M, Hsu P. 2018. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. Cell 173: 665-676.e14.

Li F, Liu W, Zhou X. 2019. Pivoting plant immunity from theory to the field Science China Life Sciences. 62: 1539-1542.

Li F, Yang X, Bisaro D, Zhou X. 2018. The βC1 protein of *Geminivirus*-betasatellite complexes: a target and repressor of host defenses. Molecular Plant. 11: 1424-1426.

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.

Lõhmus A, Hafrén A, Mäkinen K. 2017. Coat protein regulation by CK2, CPIP, HSP70, and CHIP is required for potato virus a replication and coat protein accumulation. Journal of Virology. 91: e01316.

Lowder L, Zhou J, Zhang Y, Malzahn A, Zhong Z, Hsieh T, Voytas DF, Zhang Y, Qi Y. 2018. Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act systems. Molecular Plant. 11: 245-256.

Lozano-Durán R, Rosas-Díaz T, Luna AP, Bejarano ER. 2011. Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. PLoS One. 6: e22383.

Macovei A, Sevilla, NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Cermak T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P. 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to rice tungro spherical virus. Plant Biotechnology Journal. 16: 1918-1927.

Mahas A, Aman R, Mahfouz M. 2019. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. Genome Biology. 20:263.

McCarty NS, Graham AE, Studená L, Ledesma-Amaro R. 2020. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. Nature Communications. 11: 1281.

Mehta D, Stürchler A, Anjanappa R, Zaidi S, Hirsch-Hoffmann M, Gruissem W, Vanderschuren H. 2019. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant *Geminiviruses*. Genome Biology. 20: 80.

Rao X, Wu Z, Zhou L, Sun J, Li H. 2017. Genetic diversity of banana bunchy top virus isolates from China. Acta. Virol. 61: 217–222.

Price A, Sampson T, Ratner H, Grakoui A, Weiss D. 2015. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112: 6164–6169.

Sastry SK, Zitter TA. 2014. Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics, in Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics, Vol. 2. Epidemiology and Management, (Dordrecht: Springer). 149–480.

Sekine K, Nandi A, Ishihara T, Hase S, Ikegami M, Shah J, Takahashi H. 2004. Enhanced resistance to cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 mutant is mediated via an SA-independent mechanism Molecular Plant-Microbe Interactions. 17: 623–632.

Shmakov S, Abudayyeh O, Makarova K, Wolf Y, Gootenberg J, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. 2015. Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems. Molecuar Cell. 60: 385–397.

Tashkandi M, Ali Z, Aljedaani F, Shami A, Mahfouz MM. 2018. Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. Plant Signaling and Behavior. 13: e1525996.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

T**ripathi J, Ntui V, Ron M, Muiruri S, Britt A, Tripathi L. 2019.** CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. Communications Biology. 2: 46.

Uniyal AP, Yadav SK, Kumar V. 2019. The CRISPR-Cas9, genome editing approach: a promising tool for drafting defense strategy against begomoviruses including cotton leaf curl viruses. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 28: 21-132.

Wang A. 2015. Dissecting the molecular network of virus-plant interactions: the complex roles of host factors. Annual Review of Phytopathology. 53: 45-66.

Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M. 2000. TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a *Tobamovirus*, encodes a putative transmembrane protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97: 10107-10112.

Yin K, Han T, Xie K, Zhao J, Song J, Liu Y. 2019. Engineer complete resistance to cotton leaf curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*. Phytopathology Research. 1: 9.

Zhan X, Zhang F, Zhong Z, Chen R, Wang Y, Chang L, Bock R, Nie B, Zhang J. 2019. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. Plant Biotechnology Journal. 17: 1814-1822.

Zhang T, Zheng Q, Yi X, An H, Zhao Y, Ma S, Zhou G. 2018. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. Plant Biotechnology Journal. 16: 1415-1423.

Zou L, Deng X, Han X, Tan W, Zhu L, Xi D, Zhang DW, Lin HH. 2016. Role of transcription factor HAT1 in modulating *Arabidopsis thaliana* response to cucumber mosaic virus. Plant and Cell Physiology. 57: 1879-1889.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]

Control of Plant Pathogenic Viruses with CRISPR/Cas System

Saeedeh Dehghanpour Farashah[1], Mehrdad Salehzadeh[2*], Ahmad Ashrafi[3]

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2- PhD Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3- MsC of Plant Pathology, Department of Agriculture, The universityof Malekan Azad, Iran.

mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract

Plant diseases caused by viruses are a serious threat to the world's agricultural production, and anti-virus engineering, initiated by molecular biotechnology, is an effective strategy for preventing and controlling plant-borne viruses. Recent advances in targeted DNA or RNA editing with a short palindromic replication system or CRISPR-related are attractive tools that can be used to protect plants. In this review, the development of CRISPR/Cas systems is surved and their programs in controlling various plant viruses by targeting viral sequences or susceptibility genes in the host are mentioned. In addition, it introduces some potentially recessive resistance genes that can be used to improve plants against viruses, and emphasizes the importance of recessive gene-based antiviral modification for producing plants free of virus and growth deficiency. In addition, the challenges and opportunities of using CRISPR/Cas techniques in the prevention and control of plant viruses are discussed.

Keywords: Palindromic, Plant Viruses, Resistance Genes, Targeted Editing.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.4.1.7]