

Вирустық ауруларға қарсы өсімдіктердің бағытталған модуляциясы үшін CRISPR/Cas геномды өңдеу технологиясының заманауи тәсілдері

Аңдатпа. Қазіргі таңда халық санының өсуімен азық-түлік қауіпсіздігі маңызды мәселеге айналды: 800 миллионнан астам адам аштықтан зардап шегеді және миллиондаған адамдар қауіп-қатерге ұшырайды. Дүниежүзілік ауыл шаруашылығы үнемі ауылшаруашылық дақылдарының өнімділігін шектейтін әр түрлі биотикалық және абиотикалық факторлардың әсерінде болады. Саңырауқұлақтар, бактериялар, вирустар, жәндіктер мен паразиттік өсімдіктер болып табылатын биотикалық стресстер егіннің қатты ысырабын тудыруы мүмкін. Өсімдік пен вирус арасындағы молекулалық әрекеттесулер қожайын өсімдіктің антивирустық қорғаныш жүйесі мен интерференцияны өтудің провирустық механизмі туралы түсінік алудың негізгі модельдерінің бірі болып табылады. Осы мақалада тұрақтылық гендерінің негізгі класстары, РНК-интерференция мен бактериялар мен архейлердің РНК-жанамаланған адаптивті иммундық жүйесі - CRISPR/Cas қарастырылған. Соңғы зерттеулер өсімдіктердегі антивирустық тұрақтылықты иемденуде CRISPR/Cas жүйесінің маңызды рөлін көрсетуде.

Осы мақалада вирус-өсімдік әрекеттесуін реттеуінде практикалық қолданысты мүмкін ететін өсімдіктер биотехнологиясының соңғы жетістіктеріне назар аударылған.

Түйін сөздер: өсімдіктердің иммунитеті, төзімділік, өсімдіктер вирустары, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas13.

DOI: 10.32523/2616-7034-2021-136-3-64-85

Кіріспе

Фитопатогендер дүниежүзінде өнім сапасы мен шығымдылығын күрт төмендетіп, ауылшаруашылық дақылдарының өндірісіне айтарлықтай зиян келтіреді. Саңырауқұлақ пен бактериалық патогендерге қарағанда (15%), вирустардан шығындар тек 3-7%, дегенмен өсімдіктердің вирустық ауруларының таралуы жылына 60-80 миллиард АҚШ долларына жететін экономикалық шығындарға әкелуі мүмкін [1]. Қазіргі уақытта әлемде химиялық пестицидтер немесе вирустарды тасымалдайтын насекомдардан қорғайтын физикалық кедергілер қолданылуда [2]. Алайда, вирустық аурулардың таралуымен туындаған эпидемиологиялық факторлар, вирустардың қарқын эволюциясы мен вирустық векторлар миграциясының тұрақты динамикасы қазіргі таңда өсімдіктердің вирустық ауруларымен күресудің тиімді, әрі ұзақ мерзімді стратегиялардың жоқтығына әкеледі [3].

Вирустарға тұрақты өсімдіктердің сорттарын өндіріске енгізу вирустық аурулардан пайда болған шығындарды төмендетудің экономикалық ең тиімді әдістерінің бірі болып табылады. Ғаламдық азық-түлік қауіпсіздік қатерінің жағдайы вирустарға төзімді және жоғары тиімді ауылшаруашылық дақылдарының сорттарын жасау талап етеді. Дәстүрлі вирустарға қарсы әдістемелік стратегиялар ауылшаруашылық дақылдарының сапасын жақсартады, дегенмен олар материалдық және жұмыс жағынан айтарлықтай көп шектеулер келтіреді. Өсімдіктер мен вирустар әрекеттестігінің молекулалық және биохимиялық механизмдерін егжей-тегжейлі зерттеу, сонымен қатар заманауи биотехнологияның дамуы өсімдіктердің вирустарға қарсы тиімді иммундық төзімділікті ынталандырудың жаңа болашағын ашты.

Өсімдік-вирус әрекеттестігінің механизмдері.

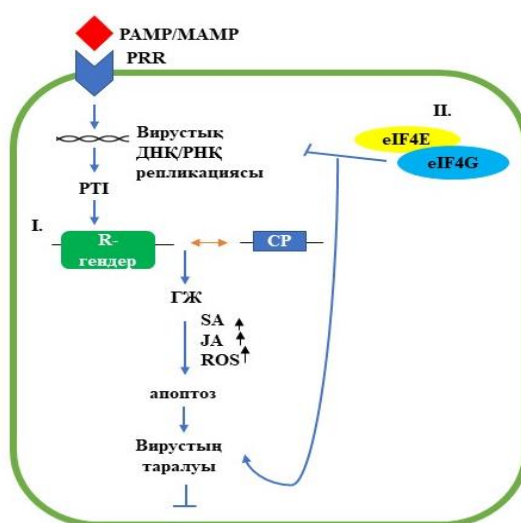
1985 жылы патогендермен туындаған төзімділік (pathogen derived resistance, PDR)

теориясы алғаш рет ұсынылған. Өсімдік клеткаларында фитопатогеннің генетикалық элементтерінің экспрессиясы вирустық патогенге төзімділікті қалыптастыратыны негізгі идеясы болып табылады [4]. Кейін вирустық гендерді трансформациялау арқылы, өсімдіктерде вирустарға қарсы бағдарлы төзімділікті жасау үшін зерттеулер жүргізілді, бұл вирусқа төзімді ауылшаруашылық дақылдардың коммерциялық нарығының сәтті дамуына әкелді [5].

Вирустардың сәтті зақымдауына өсімдіктердің көпсатылы механизмдерінің жүйесін жеңіп шығу қажет. Осы механизмдердің кейбірі әмбебап және бұл туа біткен иммундық жүйе көптеген вирустарға әсер етеді. Белгілі бір вирустар үшін басқа да тұрақтылық гендерінің активациясы сияқты арнайы механизмдер бар. Фитовирустардың барлық өсімдіктерді зақымдай алмауының себебі әмбебап қарсы тұрушылық төзімділік механизмімен байланысты (NHR) [6]. NHR механизмі мен патоген тану әдісіне қарай екі негізгі типке бөлуге болады. Бірінші типке организмге патогеннің енуіне жол бермейтін негізгі қорғаныштық механизмі жатады. Бұл типке жасуша қабырғасының қалыңдауы мен әр түрлі екінші реттік метаболиттердің биосинтезін жатқызуга болады. NHR екінші типі жергілікті некроздың индукциясымен және патогеннің бірінші тұрақтылық типін өткеннен соң активацияланады [7]. Ары қарай патоген белгілі бір құрылымдар немесе патогенмен байланысты ақуыздармен анықталынады. Микроорганизмдер (MAMP) /патогендермен (PAMP) байланысты молекулалық паттерннің анықталуы фитопатогендердің консервативті құрылымдарын анықтайтын өсімдіктердің плазматикалық мембраналарындағы паттернді анықтайтын рецепторлар (PRR) арқылы жүзеге асырылады [8]. Вирустар NHR бірінші типін өте алмағандықтан, механикалық инокуляция немесе насекомдар, нематодалар мен саңырауқұлақтар сияқты тасымалдаушы векторлар арқылы жасуша қабырғасының физикалық барьерін өте алатын қасиетке ие.

Фитовирустардың анықталуы өсімдіктердің апопластында өтпейді, дегенмен Корнег және басқалары фитопатогендердің танылуында рецептор-тәрізді киназалардың (RLK) қатысуы мүмкін екенін көрсетті [9].

Фитовирустар өсімдіктерде арнайы төзімділік гендері сияқты қорғаныштықтың тағы бір деңгейімен кездесуі мүмкін. Бұл гендер тек туыстас вирустарға ғана әсер етеді. Тұрақтылық гендері екі класқа жіктеледі: NB-LRR типінен тұратын доминантты гендер мен жартылай тұрақтылықтың рецессивті гендері (Сурет 1). *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) қарсы қызанақтан клоңдалған *Ty-1* тұрақтылық генінің сипаттамасы доминантты гендердің мысалы болып табылады. *Ty-1* гені бар қызанақ өсімдіктері TYLCV инокуляциядан соң, өсімдік жасушаларында вирустың төмен титрлары болғанымен, фенотиптік белгілерді көрсетпейді [10].



1 сурет. Доминантты және рецессивті гендердің қабылдағыштығының негізіндегі вирусқа қарсы стратегиялар

I. Авируленттілік факторы (CP) мен R генінің өнімі арасындағы әрекеттесуіндегі доминантты тұрақтылық өсімдікке вирус енген соң, бірнеше күнде әсер етеді. ГЖ-пен байланысты феномен вирустық патогенді инфекцияланған және көрші клеткаларда шектейді.

II. вирустың цикліне қажет қожайын факторларының (eIF4E/4G) болмауымен сәйкес рецессивті тұрақтылық өсімдіктің барлық колонизациясы кезінде қабылдамаушы, пассивті, әрі тиімді төзімділікті көрсетеді. Бұндай тұрақтылық белігі бір клеткалық фактордың қажеттілігі бар кездегі зақымдануға төзімділікті қамтамасыз етеді.

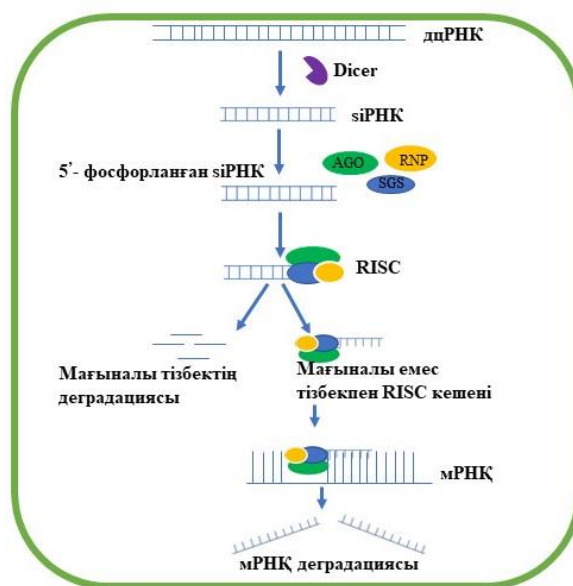
Доминантты R-гендер гиперсезімтал жауапты (hypersensitive response, HR), немесе экстремальды жауапты (extremal response, ER) индукциялайды. Бұл екі жауап инфекцияланған жасушаларға бағдарланған өсімдіктердегі бағдарламаланған жасушалық өлім реакциясын қамтып, патогеннің жүйелі таралуына жол бермейді. Бұл реакция салицил (SA) және жасмон (JA) қышқылдары, натрий оксиді (NO), этилен, оттегінің белсенді формалары (ROS), Ca²⁺ иондарының синтезі және патогенезбен байланысты PRP-гендер экспрессиясының активациясын қамтиды. Бірақ, SA, ROS және Ca²⁺ вирус табиғаты бар патогендерге қарсы тұрақтылықтың биохимиялық механизмдерінде қатысатыны анықталды [11]. Гиперсезімталдық жауап тұрақтылық жауабының бөлімі ретінде саналған, бірақ қазіргі R ақуызының сигналдарды тарату зерттеулері бойынша, HR және тұрақтылық жеке физиологиялық жолдар екені белгілі болды [12]. Өсімдіктердегі вирустарға қатысты тұрақтылығында анықталған доминантты гендер өсімдіктердің жағымсыз фенотиптік белгілерімен байланысты. Мысалы, *A. thaliana* өсімдігінде SA жоғары деңгейін жинақтайтын ssi2 мутанты CMV-ге тұрақтылықты бергенімен, аномальды ергежейлікті көрсетеді [13]. Демек, өсімдіктердің осындай тұрақтылық гендерінің өсімдіктердің антивирустық инженериясында құндылығы жоқ.

Рецессивті тұрақтылық қожайын өсімдіктің қабылдағыштық факторларымен жанамаланған [14]. Өсімдіктердің вирустары тек өзінің вирустық РНҚ трансляциясына емес, сонымен қатар басқа инфекциялау процестерін жеңілдету үшін қожайын жасушасының трансляция факторларын ертеді, соған байланысты қожайын өсімдіктің трансляциямен байланысты факторлары провирусты факторлар ретінде анықталынады. Тұрақтылықтың рецессивті гендері негізінен трансляция инициациясының факторлары eIF4E/eIF4G туысын кодтайды және өсімдіктердің потивирустар тұқымдасының таралуын ингибирлеу үшін қолданылды [15]. 4E/4G трансляцияға қажет вирустық транскриптердің кәп-құрылымымен байланысады. Потивирустардың құрылымында кәп-құрылым болмағандықтан, бірақ кәпке тәуелсіз VPg ақуызы транскриптерді трансляцияға ашық етеді. Сондықтан трансляция үшін eIF4E/eIF4G пен кәп-тәрізді құрылымдардың әрекеттесуінің талабы қожайын организмді таңдаудың қатаң сұрыпталуының барын көрсетеді. Тұрақтылықтың рецессивті S-гендері доминантты R-гендерге қарағанда, патогендерге жоғары тұрақтылықты қамтамасыз етеді, дегенмен бұл гендер қожайын геномынан бөлінген кезде плейотропты әсерді көрсете алады [16].

Ауылшаруашылық дақылдарда TYLCV және басқа да вирустармен күресте рецессивті геномды мутациялардың тактикасы мен тұрақтылық гендерінің енгізілуі қолданылады [10,17]. Алайда, рецессивті тұрақтылық негізіндегі потивирустар мен оның туыстас вирустарына қарсы стратегиялар eIF4 пен оның гомологтарының қолданылуына тәуелді. Сондықтан басқа да экономикалық маңызды өсімдіктер вирустарына қарсы тиімді генетикалық ресурстарды алу үшін, қожайын организмнің қабылдағыштық гендерін көп түрлерін анықтап, қолдану қажет.

Жасуша ішілік вирустық РНҚ молекулаларының супрессиясы вирустардың шабуылына алғашқы туа біткен жауаптың бірі болып табылады. Өсімдіктердегі РНҚ сайленсингінің механизмі алғаш рет 1990 жылы анықталды [18]. Бұл механизм РНҚ-интерференция деп те аталынады және ол экзогенді екі тізбекті РНҚ молекулалары бар болған кезде активацияланады да, транскриптердің трансляциясын немесе олардың сиквенс-спецификалық гидролизін индуцирлейді. РНҚ-интерференцияға Dicer-like (DCL), Argonautes (AGO), РНҚ-тәуелді РНҚ-полимераза (RDR) және гендердің супрессорлары сияқты ақуыздар (SGS) мағыналы емес

РНҚ-ның жойылуы мен оның деградациясымен немесе гистондар мен ДНҚ модификаторлардың тартылуы арқылы экзогенді гендер экспрессиясының тежелуіндегі реттік сатыларға қатысып, мақсатты гендердің транскрипциясын ингибирлейді [19–21]. Екі тізбекті РНҚ-жанамаланған сайленсинг өсімдіктердің дамуы мен өсуіндегі регуляторлық рөлден басқа, қожайын өсімдіктің вирусқа қарсы қорғаныштық механизмі де бола алады (Сурет 2) [20]. Вирустарға төзімді трансгенді өсімдіктерді құрастыруда әр түрлі РНҚ-бастаушылардың негізінде әдістемелер жасалынды [22]. Қазіргі кезде фитовирустармен күресуде РНҚ сайленсингі технологиясы 60 экономикалық маңызды өсімдіктердің вирустарына қарсы, атап айтқанда *Paraya ringspot virus* (PRSV) [23], *Plum pox virus* (PPV) [24–26], *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) [27,28], *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) [29] және т.б. сәтті қолданылды.



2 сурет. РНҚ-жанамаланған гендер сайленсингі

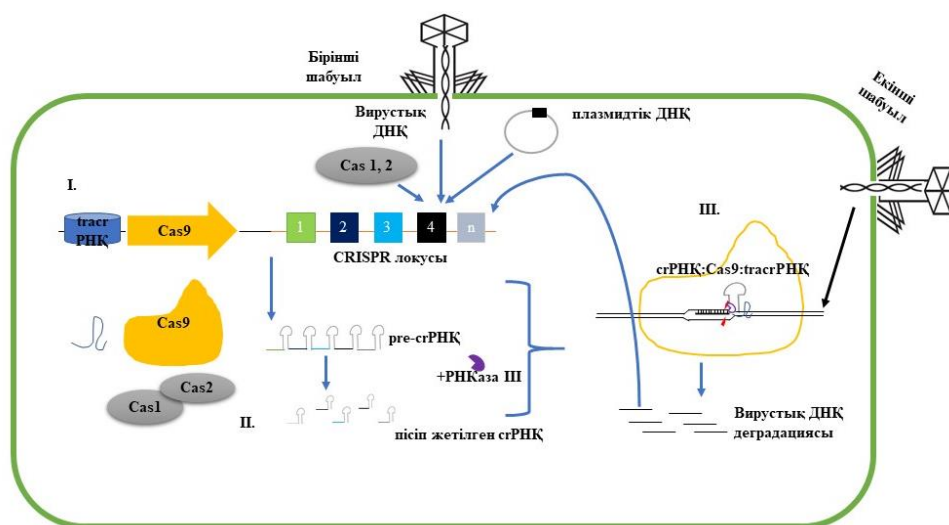
РНҚ-интерференция инициация фазасынан басталады; Dicer экзогенді екі тізбекті РНҚ-ны ыдыратады, соның нәтижесінде қысқа интерференциялаушы РНҚ молекулалары - (small interfering RNAs (siRNAs)) пайда болады. Кейін орындау сатысы басталады: siРНҚ индукцияланған РНҚ сайленсингінің кешені сайленсинга (RNA-induced silencing complex, RISC) деп аталынатын ақуызды комплекспен байланысады, бұл siРНҚ-ның мағыналы тізбегінің деградациясына әкеледі, ал мағыналы емес тізбегі мРНҚ-нысанының комплементарлы тізбегімен байланысады да, мақсатты РНҚ-ның танылуы мен оның гидролизіне әкеліп, гендер сайленсингін қамтамасыз етеді.

Аталған мысалдардың барлығы өсімдіктердің генетикалық трансформация әдістері арқылы алынған. Қоғамдық үрейді алдын алу үшін, өсімдіктердің вирусына қарсы РНҚ сайленсингін іске қосатын жалаңаш екі тізбекті РНҚ-ны экзогенді қолдануды қосатын әдістер жасалынды [30–32]. 2017 жылы Mitter және т.б. [33] тасымалдаушы ретінде көпқабатты нанопарағы бар екі тізбекті РНҚ тасымалдаудың жаңа әдісін жасап, темекі өсімдіктерінде *Cucumber mosaic virus* (CMV) қарсы тұрақтылықты іске асырды.

Осылайша, РНҚ-интерференция негізіндегі технологияларды қолдану вирусқа қарсы тұрақтылықтың дәстүрлі селекциясында туындайтын шектеулерден шыға алатын жоғары мүмкіндікке ие: тек вирус реттілігінің ақпараты керек (геном реттілігі туралы аз ақпараты бар дақылдарға); генетикалық будандастыру мен сегрегацияланған ұрпақты (көбею уақытын азайту) алудың қажеті жоқ; екі тізбекті РНҚ-ны экзогенді қолдану арқылы РНҚ сайленсингін индукциялау (вирустық пандемиялар кезінде).

Өсімдіктердің вирустары ко-эволюция нәтижесінде РНҚ-интерференцияға қарсы шараларды ойлап тапты. Осындай ең тиімді құбылыстардың бірі вирустармен РНҚ-интерференциясының ақуыз-супрессорларын кодтауы болып табылады [7,34]. Өсімдіктердегі РНҚ сайленсинг механизмін басумен қатар, супрессорлық ақуыздар DICER және RISC белсенділіктерінің ингибирленуін, екі тізбекті РНҚ/siРНҚ секвестрациясы мен AGO ақуыздарының тұрақсыздануы сияқты стратегияларды да қолдана алады [35–37]. Ақуыз-супрессорлардың ең жақсы зерттелгені мөлшері 19 қДа болатын *Tomato Bushy Stunt Virus*-ның (TBSV) P19 ақуызы [38,39]. P19 ақуызының мөлшерге тәуелді әсерлері *N. Benthamiana* мен *Vigna unguiculata* өсімдіктерін вирустық мутанттарын инокуляциялау арқылы зерттелінген. Вирустық РНҚ-ның жинақталуы мен РНҚ-интерференцияның реакциясы GFP ақуызының экспрессиясын визуализациялау мен siРНҚ/P19 кешенінің түзілуін анықтау арқылы зерттелінген [40,41].

Вирустық ауруларға төзімді өсімдіктерді жасаудың жаңа, тез дамып келе жатқан бағыттарының бірі геномды өңдеу технологиясы болып табылады. РНҚ-интерференция сияқты, кластерлі жиі қиылысатын локустардың қысқа палиндромды қайталамалары (CRISPR) мен CRISPR-бірлескен Cas-ақуыздар вирустар мен бактериялар мен архейлердің басқа мобильді генетикалық элементтеріне қарсы жүре пайда болған иммунитетті қалыптастырады. Бұл CRISPR реттіліктері бактериялардың иммундық жүйесінің бір бөлігі болып, шамамен 40% бактериальды геномдар мен 70% архейлердің секвенирленген түрлерінде эндогенді бейімдеуші иммунитетті қамтамасыз етеді [42,43]. Осындай фагтар мен плазмидалар туралы «иммундық жад» CRISPR массивінде қысқа спейсерлік реттіліктер түрінде сақталады. Бұл реттіліктер қайталамалар арасында интеркалицяланып, CRISPR/Cas иммунитетінің нысанасын анықтайды. Локус оперондардағы спейсер-қайталама матрицасымен қоса, CRISPR-бірлескен Cas-гендерінен тұрады. Клеткаға фагтың жаңа енуі кезінде, спейсер-қайталама матрицасы ұзын пре-CRISPR-РНҚ (пре-crРНҚ) түрінде қайталанып, кейін транскрипт кішкентай бағыттаушы crРНҚ молекулалары түрінде жеке спейсер-қайталама бірліктерге трансформацияланады. Осы молекулалар, нуклеотидтердің комплементарлығы негізінде, РНҚ-басқарылатын Cas-нуклеазаларды бөгде нуклеин қышқылдарын ыдыратуға бағыттайды. Осылайша, CRISPR жүйесі вирустық немесе плазмидтік ДНҚ-нысанасын сиквенске арнайылығы бойынша ыдыратып, инфекцияны тоқтатады. РНҚ-интерференция сияқты, CRISPR/Cas жүйесінің ерекшелігі мақсатты ДНҚ фрагментіне комплементарлы нысанаға нуклеазаны тиімді бағыттайтын crРНҚ молекулаларының арнайылығына негізделген (Сурет 3).



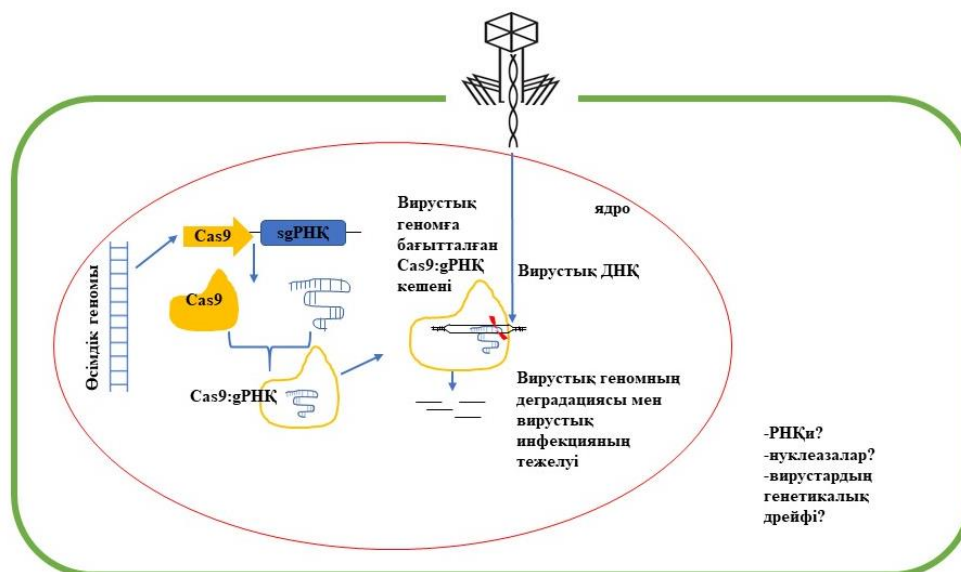
3 сурет. Бактериялық клеткаларындағы бейімдеуші иммунитет - CRISPR/Cas жүйесі

CRISPR спейсері интеграциясының бірінші сатысы: патогеннің бірінші басып кіруі кезінде, бөгде ДНҚ-ның жаңа реттіліктері ұсталып, қожайынның CRISPR локусына жаңа спейсерлер түрінде кірістіріледі. Осы сатыда Cas1 және Cas2 спейсер түзілуіне қатысады. Екінші сгРНҚ процессінгі сатысы: сгРНҚ басында CRISPR массивінің басым бөлігін қамтитын ұзын бір транскрипт ретінде транскрипцияланады. Кейін осы транскрипт Cas ақуыздарымен ыдырап, жетілген сгРНҚ түзіп транскрипцияланады. Үшінші сгРНҚ-жанамааланған интерференция: келесі инфекциялар кезінде CRISPR/Cas жүйесі енген вирустық геномның комплементарлы реттілігімен байланысу үшін, эндонуклеазаны немесе рибонуклеазаны бағыттап, нәтижесінде мақсатты геномды ыдыратады немесе кеседі.

Өсімдік клеткаларындағы CRISPR/Cas-жанамааланған тұрақтылық.

Қазіргі кезде CRISPR жүйесі екі класқа, алты подтипке классификацияланады [44,45]. Осы кластардың негізгі айырмашылығы мақсатты реттіліктің эффекторлы ыдырау табиғаты болып табылады. Бактериялар мен архейлерде табылған бірінші класс (I, III, IV типтері) мультисуббірліктік эффекторлы кешендерді түзу үшін, бірнеше Cas-ақуыздары мен сгРНҚ қолданады. Екінші класс (II, V, VI типтері) бір көпдоменді ақуызды қолданып, негізінен тек бактерияларда кездеседі [46]. Ең жақсы зерттелген CRISPR/Cas9 жүйесі екінші класс, тип II жататын инвазивті молекулаларға қарсы бағытталған *Streptococcus pyogenes*-тің иммунды механизмінен бөлініп алынған [47]. Cas9 ақуызынан, қысқа РНҚ - trасРНҚ мен сгРНҚ молекулаларынан тұратын бұл кешен *in vivo* жағдайында клеткаға енген плазмидтік немесе вирустық ДНҚ-ны кесе ыдырата алады. Ыдырау мотив деп аталынатын протоспейсермен шектескен қысқа нуклеотидтік реттіліктің (PAM) барына тәуелді [48].

Соңғы жылдары CRISPR/Cas9 механизмі эукариоттық вирустармен, әсіресе вирустық геномға әсер ету арқылы өсімдіктердің ДНҚ-вирустарының зақымдануына қарсы күресте қолданылды [49,50]. Әдеттегідей, өсімдіктердің вирустарымен күресінде CRISPR/Cas технологиясының негізгі екі стратегиясы пайдаланылады. Солардың бірі инвазивті вирустардың репликациясы мен инфекциялануын басу үшін вирустық геномның деградациясына тура бағыттау болып табылады. Екіншісі – өсімдіктердің иммунитетін жоғарылату мен вирустық инвазияны тежеу мақсатында вирустық инфекция немесе вирустың өмірлік циклына қажет қожайынның қабылдаушылық факторларымен манипуляция жасау (Сурет 4).



Сурет 4. Өсімдік клеткаларындағы CRISPR/Cas9-жанамааланған вирустық кірісу

Өсімдіктердің ДНҚ-вирустары өсімдік клеткаларына енген соң, вирустар ядрода өзінің геномын репликациялайды. CRISPR/Cas9 механизмінің gPHҚ мен Cas9 сияқты компоненттері өсімдік геномында экспрессияланып, Cas9:sgPHҚ кешенін түзеді. Cas9:sgPHҚ кешені комплементарлы нысана сайттарында вирустық екі тізбекті ДНҚ-ға бағытталған. Бұл кешен екі тізбекті ажыраудың (DSB) пайда болуы арқылы вирустық геномды ыдыратады. Бұл DSB ұштардың гомологты емес қосылуы (NHEJ) арқылы қайта қалпына келе алады. DSB түзілуі вирустық геномның деградациясына да әкеле алады.

Осы технология модельді өсімдіктерден басқа, арпа да қолданылып, *Wheat dwarf virus* (WDV) вирусына жоғары тиімді тұрақтылықты берді [51]. Осы механизмнің ерекшелігі эукариоттық вирустардың CRISPR иммундық қорғанышына қарсы тұру қабілеттілігінің жоқтығы болып табылады. Алайда, CRISPR/Cas9 жүйесінің шектеушілік сипаттамасына бұл жүйенің тек екі тізбекті ДНҚ-ны ыдырата алуы, яғни тек ДНҚ-вирустарына бағытталуы жатады [52].

Ең айқын ДНҚ-геномды вирустардың өкілдері *Geminiviridae* мен *Caulimoviridae* тұқымдастарына жатады. Олардың, сәйкесінше, 485 түрі бір тізбекті ДНҚ мен 85 түрі екі тізбекті ДНҚ құрамды болып табылады. Демек, агроөнеркәсіптегі қауіптілікті алдын-алу мақсатында геминивирустар мен кулимовирустардың ДНҚ-на қарсы технологияларды жасауға бағытталған зерттеулер үлкен қызығушылық танытуда. Манипуляцияда артықшылықтары бар CRISPR/Cas технологиясы өсімдіктердің антивирустық инженериясында тез танымал болды. Осылай *N. benthamiana* мен *A. thaliana* сияқты модельді өсімдіктерде *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) вирустарына қарсы резистенттілік орнатылды. Жоғарыда айтылып кеткен вирустардың ДНҚ интерференциясының тиімділігіне дара гидтік РНҚ бар CRISPR/Cas құрылымдары жасалынды. Бұндай құрылымдар, сәйкесінше, инверттелген қайталамаларға (inverted repeats, IR), репликация мен трансляциямен байланысты сайттарға (RBS, домаланған сақина типі бойынша репликация үшін қажет Рер-тің үш мотиві) және fsGFP бағытталған [53–55]. Алайда, Ali және т.б. қызанақ пен *N. Benthamiana* өсімдік клеткаларындағы вирустық титрлердің деңгейін салыстыра отырып, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) вирусының репликазасы мен капсидті ақуызына бағытталған гидтік РНҚ-ға қарағанда, екінші реттік құрылымға бағытталған гидтік РНҚ-лар *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKoV), *Merremia mosaic virus* (MeMV) сияқты геминивирустардың одан да тиімді сайленсингін көрсететінін анықтады [56] [57]. Бұл деректер геминивирустардың IR емес оқудың ашық рамкасындағы (ORF) CRISPR/Cas9-индуцирленген варианттары репликация мен жүйелі қозғалуға қабілеттілігін, яғни CRISPR/Cas9 механизмінен қорғана алатынын көрсетті.

CRISPR гендерінің транзистентті экспрессиясы бастаушысы болып табылатын, бағыттаушы РНҚ бар CRISPR/Cas9 құрылымдарын тасымалдауға арналған әр түрлі жүйелерді қолдану, өсімдік клеткаларындағы трансгендерге қарсы қорғаныштық механизмдерінің іске қосылуына әкелуі мүмкін. Өсімдіктердегі РНҚи қорғаныштық механизмінің жұмыс істеуі геномды өңдеу мезанизміне әсер ете алады. Мао және т.б. *Arabidopsis* өсімдіктерінде AP1 мен TT4 гендерін өңдеуде CRISPR/Cas9 тиімділігін TBSV вирусының P19 супрессор-ақуызының коэкспрессиясы арқылы РНҚи басу жолымен жоғарылатуға болатынын көрсетті [58].

Эукариоттық вирустардың эволюция процесі прокариоттық Cas9 бар кезде өтпеген, демек, бұл оларда Cas9 нуклеазалардан қорғаныштық табиғи механизмдері қалыптаспағанын айтады. Бірақ, Ali және т.б. [59] кейбір геминивирустар CRISPR/Cas9 процесінен құтыла алатын қасиеті бар вирустық мутанттарды түзей алатынын көрсетті (Кесте 1).

CRISPR/Cas механизмі туралы ақпараттың даумына байланысты *in vivo* жағдайында басқа да бактериалды РНҚ штамдарынан Cas ақуыздарының түрлі итерациясы бөлініп алынды. 2013 жылы *Francisella novicida*-дан бөлініп алынған Cas9 ақуызының нұсқасы (FnCas9) РНҚ реттіліктеріне бағдарлай алатыны анықталды [60]. Бұл геномды өңдеу технологиясын қолдану арқылы РНҚ-вирустарға қарсы бағытталған тұрақтылықты орнату әдістемелерін жасауға

мүмкіндік берді. Price және т.б. CRISPR/FnCas9 жүйесін гепатома клеткалық линияларында бір тізбекті оң РНҚ бар гепатит С вирусының геномына қарсы бағыттаған. Гепатит С вирусы геномының 5/- немесе 3/-трансляцияланбайтын аймақтарына бағытталған FnCas9, sgРНҚ кешендерінің транзистентті экспрессиясы бақылау өсімдігіне қарағанда, вирусты ақуыздың экспрессиясының 50-60%-ға төмендегеніне әкелді [60]. Кейін FnCas9 өсімдіктердің РНҚ вирустарына да бағытталып, сәтті бағдарламаланған болатын. Бұл жүйе CMV және TMV вирустарына бейімдендірілді. Арнайы sgРНҚ реттілігімен басқарылған CRISPR/FnCas9 жүйесі вирустың РНҚ-на бағытталып, өсімдіктерде оның зақымдауын 40-80%-ға төмендететіні көрсетілді [61]. Вирустың ингибирленуі FnCas9 арқылы гидролиздің қабілеттілігі емес, мақсатты РНҚ-ның байланысуымен жүретінін айтқан жөн.

Кесте 1

Өсімдіктердің вирустарына қарсы CRISPR / Cas9 жүйесін қолдану

Cas9	Өсімдік	Вирус	Мақсатты реттілік	Сілтемелер
SpCas9	<i>Cassava</i> <i>N. benthamiana</i>	ACMV	ACMV genome	[62]
SpCas9	<i>S. lycopersicum</i> <i>N. benthamiana</i>	TYLCV	TYLCV genome	[57]
SpCas9	<i>Arabidopsis</i>	TBSV	AP1, TT4	[58]
FnCas9	<i>N. benthamiana</i>	CMV	CMV genome	[61]
FnCas9	<i>Arabidopsis</i>	TMV	TMV genome	[61]
Cas9	rice	RTSV	eIF4G	[63]
Cas9	<i>N. benthamiana</i>	MeMV	IR, CP, Rep	[56]
Cas9	<i>N. benthamiana</i>	BeYDV	LIR, Rep/RepA	[54]
Cas9	<i>N. benthamiana</i>	BSCTV	BSCTV genome	[53]
Cas9	<i>Arabidopsis</i>	BSCTV	BSCTV genome	[53]
Cas9	<i>Arabidopsis</i>	potyvirus	eIF9(iso)4E	[64]
Cas9	<i>Cucumis sativus</i>	CVYV	eIF4E	[65]
Cas9	<i>Cucumis sativus</i>	PRSMV-W	eIF4E	[65]

Қысқартулар: ACMV - *African cassava mosaic virus*; TYLCV - *Tomato yellow leaf curl virus*; TBSV - *Tomato bushy stunt virus*; CMV- *Cucumber mosaic virus*; TMV- *Tobacco mosaic virus*; RTSV- *Rice tungro spherical virus*; MeMV- *Merremia mosaic virus*; BeYDV- *Bean yellow dwarf virus*; BSCTV- *Beet severe curly top virus*; CVYV- *Cucumber vein yellowing virus*; PRSMV-W - *Papaya ring spot mosaic virus-W*; AP1 - *apetala1*; TT4 - *transparent testa glabra4*; eIF4G, eIF9(iso)4E, eIF4E - translation initiation host factors, IR – intergenic region; CP – capsid protein; Rep – replication-associated protein; LIR – long intergenic region.

Геномды өңдеу технологиясының функционалды тиімділігіне қарамастан, вирустар CRISPR/Cas9 жүйесіне қарсы тұра алады. Өсімдіктерде тұрақты вирустық резистенттілікті модульдеу үшін, осы табиғи тұрақтылықтың шекаралары мен жиілігін анықтау өте маңызды. Сонымен қатар, CRISPR/Cas9 жүйесі арқылы вирустық геномға бағытталу екі тізбекті ажырауға әкеледі. Берілген ақаулар қателіктерге бейім ұштардың гомологты емес қосылуы (NHEJ) арқылы қалпына келеді. Осылайша, репарацияның бұл механизмі CRISPR/Cas9 тану механизмін өте алатын вирустық нұсқалардың генерациясына әкелуі мүмкін. Бұл PAM мен спейсер реттіліктерімен қоса, Cas9 белсенділігіне қажет маңызды реттіліктеріне сәйкес РНҚ реттіліктерінде мүмкін мутацияларға байланысты. Вирустар эволюцияның жоғары

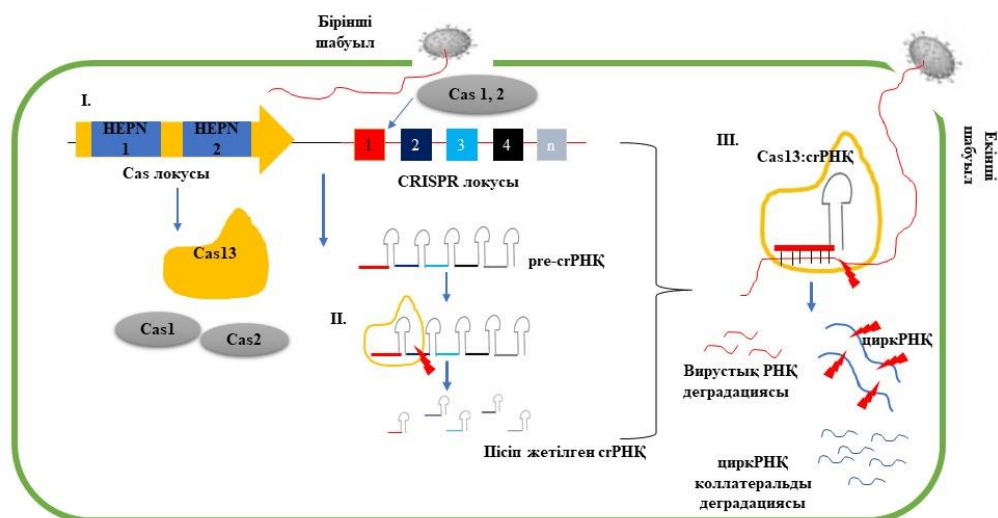
жылдамдығына ие болғандықтан, және CRISPR/Cas9 PAM қасында спейсердің бастапқы ретгіліктеріндегі сәйкессіздіктерге жол бермегендіктен, осы аймақтағы кез келген мутация CRISPR/Cas9 механизмінің вирусқа бағытталу қасиетін шектеп немесе тіпті жояды. Бұл сәйкесінше геномды өңдеу процестерін өте алатын вирустық нұсқалардың пайда болуына әкеледі.

A. thaliana өсімдігінде CRISPR/Cas9 жүйесін қолдану кезінде геномды өңдеу жүйесін пайдалануда айтарлықтай шектеулер бере алатын сиквенс-спецификалық емес эффектілер белгілі [66]. Сонымен қатар, sgРНК-ғы екі тізбекті РНК домендерінің екінші реттік құрылымдарының бар болуы, sgРНК мөлшерін төмендете алатын siРНК генерациясына әкеліп келеді. Бұл мүмкіндікті CRISPR/Cas9-дың мақсатты ретгіліктерін жасау кезінде қарастыру керек. Осылайша, NGS негізіндегі жаңа платформаларды, атап айтқанда Perturb-Seq (CRISPR-Seq) [67], Guide-Seq [68] dCas9-бен иммунопреципитацияны [69], потенциалды мақсатты емес эффектілерді болжау мақсатында қолдануға болады. Cas-ақуыздарының жұмысының оптимальды ақуызына әсер ететін қосымша талаптарының біріне жоғары температура жатады. *A. thaliana* өсімдігінде қайтамалы жоғары температуралы өңдеулер Cas9 тиімділігінің шұғыл жоғарылауына әкеледі [70]. Дәл солай, *A. thaliana* (29 °C) мен жүгеріде (28 °C) Cas12a тиімді өңделуіне температуралық өңдеулер тиімді әсер етеді [71].

Қазіргі кезде Cas ақуыздарының жаңа нұсқалары белсенді іздестірілуде. Бұл вирустардың тез эволюциясы салдарынан CRISPR/Cas гендерді өңдеу механизмінен өте алуына байланысты ең күрделі мәселелерге көңіл бөлу мақсатында платформаларды жасауға мүмкіндік береді. Осылайша, геномды өңдеу технологиясы, әсіресе РНК-құрамды вирустарға бағытталған технологияларды жасау өзекті мәселелердің бірі болып табылады. Өсімдіктерді зақымдайтын вирустардың 70%-ы осы класқа жататынын айтқан жөн.

Қазіргі таңда екінші класқа жататын Cas жүйесінің жаңа типтері ашылды. Оларға Cas12 деп те аталынатын Cpf1 ақуызы жатады [72]. Кейін эукариоттық клеткаларда жоғары белсенділікті көрсететін Cpf1-дің екі ортологы (Cas12b, Cas12c) анықталды [73]. Cas12 ақуыздары RuvC-сияқты доменнің бар болуына байланысты CRISPR/Cas жүйесінің екінші класының VI-B типіне жатқызылды. Cas12 ақуызы tracrРНК-ны қажет етпейді және бір тізбекті РНК-мен басқарылады. Бұл жаңалық гендік инженерияның дамуына маңызды. Себебі Cas9 ақуызымен туындаған тұйық ажырауларға қарағанда, сатылы ажыраудың генерациясы мен әр түрлі PAM-дың қажеттілігі орасан манипуляциялар үшін құралдардың жиынтығын кеңейтеді.

2015 жылы Smakov пен басқалары [74] биоинформатикалық анализдің көмегімен C2c2 (Cas13) деп аталған Cas-ақуыздарының екінші класының жаңа типін болжамдады (Сурет 5). Берілген типте прокариоттар мен жоғары эукариоттардың нуклеотид байланыстырушы екі домені (HEPN) бар. HEPN тек РНКазалық белсенділікпен байланысты, ал пре-crРНК процессингі helical-1 (REC) N-ұшты доменінде өтеді [75]. Бұның барлығы Cas13 нуклазасының бір тізбекті РНК-ны арнайы ыдырата алатын жеке эффекторлы РНК-мен басқарылатын мақсатты ақуыз ретінде жұмыс жасай алатынын көрсетеді. HEPN доменіндегі, әсіресе гистидин мен аргининнің каталитикалық қалдықтарындағы мутациялар Cas13 ақуызының ыдырату белсенділігін ингибирлеп, Cas13a (deadCas13a) ферментінің каталитикалық белсенді емес версиясына әкеледі.



Сурет 5. Клеткалардағы CRISPR/Cas13-жанамаланған антивирустық механизм

Бірінші этап: бейімделу. Екінші этап: пісіп жетілу. Үшінші этап: CRISPR/Cas13-жанамаланған интерференция. Cas13a:crRNA кешені туыстас протоспейсері бар РНҚ-нысананы таныған соң, онымен комплементарлы байланысып ыдыратады. Мақсатты реттілік протоспейсермен фланкриленген сайтпен (PFS) байланысып тұру қажет. PFS мақсатты протоспейсердің 3'-үшінде орналасады. Алайда Cas13a:crRNA байланысуы Cas13a ақуызының ретсіз РНҚазды белсенділігін активирлейді. Бұл комплементарлы негіздік жұпқа қарамай, кез келген циркуляцияланған РНҚ-ның ыдырауына әкеледі.

Cas13a 22-28 нт тұратын өзінің crRNA-сын PFS бар кезде (A, U, C нуклеотидтері) ыдыратады. Бірақ Cas9-ға қарағанда, Cas13a *in vitro* коллатеральды белсенділікке ие. Бұл crRNA-мен гомологиясы мен PFS барын есепке алмай, циркуляцияланған РНҚ-дың гидролизіне әкеледі.

Cas13a ферментінің спецификалық емес РНҚазды белсенділігі вирустың шабуылын тани алатын табиғи қорғаныштық механизмі ретінде вирустық инфекцияны тежейді. Осы қорғаныштық механизм клеткалардың бағдарламаланған апоптозын туындатады. Еркін циркуляцияланған РНҚ-дың спецификалық емес деградациясы *in vitro* жағдайында тек прокариоттық организмдерге тән, ал эукариоттық клеткаларда мұндай құбылыс байқалмаған [76,77]. Арнайы РНҚ-ны геномды өңдеу жағынан Cas13 ақуызының коллатеральды белсенділігі кемшілік болып көрінгенімен, Cas13 ферменттер туыстарын CRISPR/Cas негізіндегі диагностикалауды жасаудың мықты құралы ретінде пайдалануға мүмкіндік берді. Осылайша, SHERLOCK (Specific High-sensitive Enzymatic Reporter unLOCKing) диагностикалық құралының жасалуы Cas13-тың ауруларды детекциялаудың платформасы ретінде қолдану мүмкіндігін көрсетті [78,79]. Өзгертілген SHERLOCK платформасы глифосатқа тұрақты генді зерттеу мақсатында соя бұршақтарында нуклеин қышқылдарының детекциясында апробацияланған. Осылайша берілген құралды пайдаланудың маңызды потенциалы мен оның икемділігі айғақ болды [80]. Сәйкесінше Cas13 ортологтары негізіндегі берілген жүйені қысқа уақыт ішінде өсімдіктердің көптеген вирустары мен вириодтарын анықтауда қолдануға болатыны мүмкін. Осының барлығы ауылшаруашылық өнімдерінің сапасын бақылауда жаңа әдістерін жасау кезіндегі маңызды жетістіктерге әкеледі.

2018 жылы өсімдіктердің бір тізбекті РНҚ-геномды вирустардың бағдарламаланған ыдырауына бағытталған зерттеулер жүргізілді [81,82]. Күтілгендей, *N. Benthamiana* мен *A. thaliana* трансгенді өсімдіктерінде *Leptotrichia shahii* бөлініп алынған Cas13a пен вирустық РНҚ реттіліктеріне бағытталған crRNA Turnip Mosaic Virus (TuMV) вирусына қарсы тез, әрі эффективті

РНҚ-интерференцияны көрсетті. Бұл кезде *crRNҚ Tobacco Rattle Virus (TRV)* негізіндегі векторда *Pea early browning virus (PEBV)* промторымен басқарылды. Вирустық векторларды гидтік РНҚ және/немесе Cas-ақуыздарын тасымалдау үшін пайдалану, вирустық инфекция кезінде гидтік және/немесе Cas-ақуыздарының тез, әрі тиімді экспрессиясы арқасында CRISPR/Cas жүйесінің эффективтілігін айтарлықтай көтереді.

CRISPR/LshCas13a жүйесі арқылы темекі мен күріш трансгенді өсімдіктерінде TMV, *Rice stripe mosaic virus (RSMV)* пен *Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV)* вирустарына резистенттілік орнатылды [83]. *Potato virus Y (PVY)* вирусының P3, NIb- немесе CP ақуыздарының оқу рамкаларына бағытталған бұл жүйе инфекцияны тежеудің жоғары тиімділігін де көрсетті [84].

Leptotrichia wadei бактериясынан бөлініп алынған Cas13a ортологы адам клеткаларында РНҚ-ның бағытталған нокдауына қолданылды [76]. РНҚ нокдауының дәрежесі РНҚ-интерференцияға сәйкес болды, дегенмен арнайылығы жағынан CRISPR/Cas13 жүйесі РНҚ-дан айтарлықтай жоғары болды. Зерттеушілердің осы тобымен өсімдік клеткаларындағы CRISPR/LwaCas13-жанамаланған РНҚ нокдауы да жүргізілді. Экспериментте күріштік протопласттарына (*Oryza sativa*) үш әр түрлі гендер бағытталған. Өсімдіктердің протопласттары LwaCas13a ақуызымен қатар, EPSPS, НСТ мен PDS гендеріне қарсы құрастырылған үш векторлар котрансфицирленген. Трансформациядан кейін нокдаунның 50%-ы 48 сағаттан соң алынды. Бұл Cas13-тың өсімдіктердегі цитоплазмалық РНҚ пулын тез төмендетіп, редакцияланатын организмдердің кең спектры үшін жүйенің қолдану мүмкіндігін көрсетеді.

Зерттелінетін реттіліктің деректерін интеллектуалды анализдеу әдісін пайдалану арқылы РНҚ таргетингіне бағытталған HEPN домені бар тағы бір эффектор анықталды. Берілген ақуыз C2c6 (Cas13b) деп аталынды [85]. *Prevotella sp. P5-125* бактериясынан бөлініп алынған Cas13b екінші кластың VIB подтипіне жатқызылды. Эукариоттық клеткалардағы РНҚ-ның деградациясына бағытталған Cas13b-ға жүргізілген зерттеулер LwaCas13a -ға көрсетілген тұрақтылық доменіне (msfGFP) байланысты емес екенін көрсетті. Өсімдіктердегі CRISPR/Cas13b-жанамаланған манипуляциялар қазіргі кезде жоқ.

Ruminococcus flavefaciens бактериясынан бөлініп алынған Cas13d ақуызының кішкентай мөлшері болғанымен (930 а.к.), эндогенді транскрипттердің сплайсингін бақылай алады [86].

TuMV-GFP геномындағы GFP, CP немесе HC-Pro аймақтарына бағыттау арқылы TuMV инфекциясын тежеуге арналған зерттеулер кезінде, Cas13 басқа варианттарына қарағанда Cas13d үлкен артықшылықтарға ие екенін көрсетілді [87]. Сонымен қатар, Cas13d ақуызын бір уақытта екі РНҚ-вирустарына бағыттауға болатыны анықталды. Сәйкесінше, CRISPR/Cas13d жүйесін ауылшаруашылық дақылдарда табиғи және далалық жағдайларда болатын аралас вирустық шабуылдарға қарсы күресте потенциалды қолдануға болады.

Сонымен қатар, РНҚ-интерференцияның Cas13d-жанамаланған PAC-MAN (Prophylactic Antiviral CRISPR in huMAN cells) жүйесі адам өкпесінің клеткаларында коронавирусом SARS-CoV-2 коронавирусы мен грипптің А типінің вирусына қарсы күресте қолданылды [88].

Осының барлығы Cas13-тің РНҚ-ға бағытталған дәл, сенімді, әрі масштабты құралдары үшін үлкен потенциалға ие CRISPR/Cas әмбебап жүйесінің бір бөлігі ретінде қызмет ете алатынын көрсетті (Кесте 2).

Кесте 2

Өсімдіктердің вирустарына қарсы CRISPR/Cas13 жүйесін пайдалану

Cas13	микроорганизм	Өсімдік	Вирус	Мақсатты аймақ	Сілтемелер
Cas13d (CasRx)	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>N.benthamiana</i>	TuMV-GFP,	вирустық HC-Pro, CP, GFP	[89]

Cas13d (CasRx)	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>N.benthamiana</i>	PVX-GFP	PVX геномы	[89]
LshCas13a	<i>Leptotrichia shahii</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> ,	TuMV V	Вирустық HC-Pro, CP, GFP	[81]
LwaCas13a	<i>Leptotrichia wadei</i>	plant	GFP	Вирустық геном	[76]
LshCas13a	<i>Leptotrichia shahii</i>	rice	SRBS DV	SRBSDV геномы	[83]
LshCas13a	<i>Leptotrichia shahii</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L.	PVY	NIb, P3, CI, CP вирустық ақуыздары	[84]

Қысқартулар: TuMV- *Turnip mosaic virus*; GFP - green fluorescent protein; PVX - *Potato virus X*; SRBSDV - *Southern rice black-streaked dwarf virus*; PVY - *Potato virus Y*; HC-Pro - helper component proteinase; CP – capsid protein; NIb - RNA-dependent RNA polymerase; P3 - potyviral membrane protein; CI - protein forms the laminate cytoplasmic inclusion bodies.

Вирустық ақуыздармен әрекеттесін өсімдіктердің әр түрлі факторлары CRISPR/Cas жүйесімен мақсатты геномды өңдеуде анықталуы мүмкін. Берілген зерттеулер молекулярлы-динамикалық зерттеулерді қолдану арқылы сандық биологияда үлкен потенциалға ие. Демек, бұл тез дамидын вирустарға қарсы кең спектрындағы әдістерді әзірлеудің тұрақтылығын қамтамасыз етеді. Қазіргі таңда көптеген вирустарға қарсы өсімдіктердің тұрақтылығын орнату жөніндегі зерттеулерде өсімдіктердің потенциалды факторлардың төрт тобы болашағы зор нысаналар ретінде көрсетілген. Оларға келесі факторлар жатады: трансляцияға қатысатын рецессивті гендер - eEF1A мен eEF4; транскрипцияның негативті реттеушілері - rgs-CaM; ақуыздардың посттрансляциялық модификацияларында қатысатын ферменттер - NAT2 и NAT3, SK4-1, NsAK протеинкиназалары, убиквитин лигаза; геминивирустармен зақымдануды тежеу үшін фенилпропаноидтар метаболизмі мен екінші реттік клетка қабырғасының синтезін тежейтін - 4-кумарат, КоА-лигаза1, 4CL1, Bearskin2B, BRN2 [90].

Қорытынды

Гендік инженерия мен вирустарға тұрақты өсімдіктердің жаңа түрлерін жасау азық-түлік қауіпсіздігін жоғарылату мен тағамдық өнімдерді өнімдерді көтері мақсатында үлкен мүмкіндіктерді ашуда. РНҚ-интерференцияға қарағанда, Cas13 цитоплазмалық транскриптермен шектелмей, Cas13 ақуызының NLS сигналымен қосылуы арқылы кодталмайтын ядролық транскриптерге бағытталуы мүмкін. CRISPR/Cas13 жүйесі дара немесе көптік вирустық инфекцияларға қарсы өсімдіктердің иммунитетін жасау мақсатында революционды технология болып табылады. Бұл платформа гендер функциясының толық геномды зерттеулері, өсімдіктер транскриптомына қарсы РНҚ ноқдауны механизмі мен диагностикалық құралы ретінде қолданылуы мүмкін. Соңғы зерттеулер бойынша ДНҚ-вирустар Cas9 бар кезде дами алатындығы анықталғандықтан, өсімдіктерде CRISPR/Cas13 механизмі бар кезде РНҚ-вирустардың қашуы мен дамуына зерттеулер жүргізу қажет.

Қазіргі таңда CRISPR массивтерінде вирустық реттіліктерінің дағдылануы толығымен зерттелмеген. CRISPR/Cas жүйесінің құралдарымен толық жабдықталған эукариоттық клеткаларда спейсерлердің пайда болу мүмкіндігін зерттеу қызығушылық тудыруы мүмкін. Вирустардың кең спектрына тұрақтылықтың итеративті дамуын орнату мүмкіндігі сияқты вирустарға қарсы резистенттілікті жасауға потенциалды қолданысқа ие болуы мүмкін. Сонымен

қатар, эукариоттар геномына сайт-спецификалық ДНҚ интеграциялаудың потенциалы мен түсінігін қамтамасыз етіп, өсімдіктердің геномды инженериясының қосымша мүмкіндіктерін ашады.

Сонымен қатар, геномды редакциялаудың заманауи көзқарастары ауыл шаруашылығына маңызды дақылдарда вирустарға қарсы тұрақты, әрі кең резистенттілікке әкеледі, ал бұл нәтижесінде коммерцияландыруға жол ашады. Демек, CRISPR технологиясын қолдану вирустарға қарсы ауылшаруашылық дақылдарды жақсартудың эффективті және жалпы қолданылатын әдіспен қамтамасыз етеді. Вирустарға қарсы CRISPR/Cas-жанамаланған тұрақтылық бір уақытта бір немесе бірнеше вирусқа қарсы орнатылған геном реттіліктері бар өсімдіктің кез келген түрінде дамытылуы мүмкін. Бұл технология өсімдіктер мен патогендер арасындағы әрекеттестілікті зерттеп, вирустардың кең спектріне мықты резистенттілікті орнатудағы жаңа мүмкіндіктерді ашты.

Қаржыландыру. Осы жұмыс № AP09258746 «Өсімдіктерге вирусқа қарсы төзімділікті күшейту мақсатында вирустық ақуыз көмегімен CRISPR/Cas13 жүйесінің реттелуі» ҚР БҒМ жобасы шеңберінде жүргізілді.

Әдебиеттер тізімі

1. Oerke E.C., Dehne H.W. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection // *Crop Protection*. -2004. - V.23, PP.275–285.
2. Khan M.A.U., Shahid A.A., Rao A.Q., et al. Molecular and Biochemical Characterization of Cotton Epicuticular Wax in Defense Against Cotton Leaf Curl Disease // *Iran J Biotechnol*. -2015. - V.13(4):3-9. doi:10.15171/ijb.1234.
3. Zaidi S.S.A., Tashkandi M., Mansoor S., Mahfouz M.M. Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance. // *Front. Plant Sci*. -2016. V.7.
4. Sanford J.C., and Johnston S.A. 'The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome // *Journal of Theoretical Biology*. -1985. -V.113.2. PP. 395-405.
5. Wilson T.M. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. -1993.-V. 90. -PP. 3134–3141.
6. Um, B., Swaroopa Rani T., & Podile A.R. Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants // *Journal of Plant Physiology*. -2011. -V.168(18). -PP. 2141–2152. doi:10.1016/j.jplph.2011.09.005.
7. Baruah A., Sivalingam P.N., Fatima U., & Senthil-Kumar M. Non-host resistance to plant viruses: what do we know? // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. -2020. -V.101506. doi:10.1016/j.pmp.2020.101506.
8. Jones J., Dangl J. The plant immune system // *Nature*. -2006. -V. 444. -PP. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
9. Kørner C.J., Klauser D., Niehl A., et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses // *Mol Plant Microbe Interact*. -2013. -V. 26(11). -PP. 1271-1280. doi:10.1094/MPMI-06-13-0179-R.
10. Verlaan M.G. et al. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases // *PLoS Genet*. – 2013. – V. 9. – №. 3.
11. Carr J. P., Lewsey M.G., & Palukaitis P. Signaling in Induced Resistance. *Advances in Virus Research*. -2010. -PP. 57–121. doi:10.1016/s0065-3527(10)76003-6.
12. Bai S. et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance // *PLoS Pathog*. – 2012. – V. 8. – №. 6.

13. Sekine K.T. et al. Enhanced resistance to Cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 mutant is mediated via an SA-independent mechanism //Molecular plant-microbe interactions. – 2004. – V. 17. – №. 6. – PP. 623-632.
14. Carr J., Loebenstein G. Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses: Part II. – Academic Press, 2010.
15. Kang W.H. et al. Helicase domain encoded by Cucumber mosaic virus RNA1 determines systemic infection of Cmr1 in pepper //PLoS One. – 2012. – V. 7. – №. 8.
16. Gawehns F., Cornelissen B.J.C., Takken F.L.W. The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity //Microbial biotechnology. – 2013. – V. 6. – №. 3. – P. 223-229.
17. Kunik T. et al. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus //Bio/technology. – 1994. – V. 12. – №. 5. – PP. 500-504.
18. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans //The plant cell. – 1990. – V. 2. – №. 4. – PP. 279-289.
19. Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections //Nature Reviews Genetics. – 2005. – V. 6. – №. 3. – PP. 206-220.
20. Ding S.W. RNA-based antiviral immunity //Nature Reviews Immunology. – 2010. – V. 10. – №. 9. – PP. 632-644.
21. Ipsaro J.J., Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery //Nature structural & molecular biology. – 2015. – V. 22. – №. 1. – P. 20.
22. Duan C.G., Wang C.H., Guo H.S. Application of RNA silencing to plant disease resistance //Silence. – 2012. – V. 3. – №. 1. – PP. 1-8.
23. Bau H.J. et al. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya //Phytopathology. – 2003. – V. 93. – №. 1. – PP. 112-120.
24. Kundu J.K. et al. Role of the 25–26 nt siRNA in the resistance of transgenic *Prunus domestica* graft inoculated with plum pox virus //Virus Genes. – 2008. – V. 36. – №. 1. – PP. 215-220.
25. Sidorova T. et al. Agrobacterium-mediated transformation of Russian commercial Plum cv. “Startovaya” (*Prunus domestica* L.) with virus-derived hairpin RNA construct confers durable resistance to PPV infection in mature plants //Frontiers in plant science. – 2019. – V. 10. – P. 286. plants-08-00565-v2.pdf. (n.d.) .
26. Zhang Z.Y. et al. RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus //Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2013. – V. 113. – №. 3. – PP. 571-578.
27. Zhang Z.Y. et al. Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference //Journal of biotechnology. – 2011. – V. 153. – №. 3-4. – PP. 181-187.
28. Fuentes A. et al. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2016. – V. 29. – №. 3. – PP. 197-209.
29. Gogoi A. et al. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves //Planta. – 2017. – V. 246. – №. 6. – PP. 1233-1241.
30. Worrall E.A. et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus //Frontiers in plant science. – 2019. – V. 10. – P. 265.
31. Das P.R., Sherif S.M. Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs //Frontiers in Plant Science. – 2020. – V. 11.
32. Mitter N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses //Nature plants. – 2017. – V. 3. – №. 2. – PP. 1-10.
33. Omarov R.T., Scholthof H.B. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: an overview //Antiviral Resistance in Plants. – 2012. – PP. 39-56.
34. Mann K.S. et al. Cytorhabdovirus P protein suppresses RISC-mediated cleavage and RNA silencing amplification in planta //Virology. – 2016. – V. 490. – PP. 27-40.

35. Iki T., Tschopp M.A., Voinnet O. Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing //Rna. – 2017. – V. 23. – №. 5. – PP. 639-654.
36. Kenesi E. et al. A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC //Nucleic acids research. – 2017. – V. 45. – №. 13. – PP. 7736-7750.
37. Omarov R. et al. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs //Journal of virology. – 2006. – V. 80. – №. 6. – P. 3000-3008.
38. Burgyán J. et al. The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants //Journal of virology. – 2000. – V. 74. – №. 23. – PP. 10873-10881.
39. Shamekova M. et al. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants //Virology. – 2014. – V. 452. – PP. 159-165.
40. Qiu W., Park J.W., Scholthof H.B. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity //Molecular plant-microbe interactions. – 2002. – V. 15. – №. 3. – PP. 269-280.
41. Deveau H., Garneau J.E., Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions //Annual review of microbiology. – 2010. – V. 64. – PP. 475-493.
42. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea //Science. – 2010. – V. 327. – №. 5962. – PP. 167-170.
43. Shmakov S. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems //Nature Reviews Microbiology. – 2017. – V. 15. – №. 3. – PP. 169-182.
44. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems //Current opinion in microbiology. – 2017. – V. 37. – PP. 67-78.
45. Burstein D. et al. New CRISPR–Cas systems from uncultivated microbes //Nature. – 2017. – V. 542. – №. 7640. – PP. 237-241.
46. Jiang W., Marraffini L. A. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems //Annual review of microbiology. – 2015. – V. 69. – PP. 209-228.
47. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity //science. – 2012. – V. 337. – №. 6096. – PP. 816-821.
48. Baltes N.J. et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system //Nature Plants. – 2015. – V. 1. – №. 10. – PP. 1-4.
49. Ali Z. et al. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants //Genome biology. – 2015. – V. 16. – №. 1. – PP. 1-11.
50. Kis A. et al. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system //Plant biotechnology journal. – 2019. – V. 17. – №. 6. – PP. 1004.
51. Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 //Science. – 2014. – V. 346. – №. 6213.
52. Ji X. et al. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants //Nature Plants. – 2015. – V. 1. – №. 10. – PP. 1-4.
53. Baltes N.J. et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system //Nature Plants. – 2015. – V. 1. – №. 10. – PP. 1-4.
54. Yin K. et al. Engineer complete resistance to Cotton Leaf Curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* //Phytopathology Research. – 2019. – V. 1. – №. 1. – PP. 1-9.
55. Ali Z. et al. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion //Scientific reports. – 2016. – V. 6. – №. 1. – PP. 1-13.
56. Tashkandi M. et al. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato //Plant signaling & behavior. – 2018. – V. 13. – №. 10.

57. Mao Y. et al. Manipulating plant RNA-silencing pathways to improve the gene editing efficiency of CRISPR/Cas9 systems // *Genome biology*. – 2018. – V. 19. – №. 1. – PP. 1-15.
58. Zetsche B. et al. Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array // *Nature biotechnology*. – 2017. – V. 35. – №1. – PP. 31-34.
59. Price A.A. et al. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – №. 19. – PP. 6164-6169.
60. Zhang T. et al. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system // *Plant biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – №. 8. – PP. 1415-1423.
61. Mehta D. et al. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses // *Genome biology*. – 2019. – V. 20. – №. 1. – PP. 1-10.
62. Macovei A. et al. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus // *Plant biotechnology journal*. – 2018. – V. 16. – №. 11. – PP. 1918-1927.
63. Pyott D.E., Sheehan E., Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants // *Molecular plant pathology*. – 2016. – V. 17. – №. 8. – PP. 1276-1288.
64. Chandrasekaran J. et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology // *Molecular plant pathology*. – 2016. – V. 17. – №. 7. – PP. 1140-1153.
65. Zhang Q. et al. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and its prevention // *Plant molecular biology*. – 2018. – V. 96. – №. 4. – PP. 445-456.
66. Dixit A. et al. Perturb-Seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens // *Cell*. – 2016. – V. 167. – №. 7. – PP. 1853-1866.
67. Tsai S.Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases // *Nature biotechnology*. – 2015. – V. 33. – №. 2. – PP. 187-197.
68. Kuscu C. et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease // *Nature biotechnology*. – 2014. – V. 32. – №. 7. – PP. 677-683.
69. LeBlanc C. et al. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress // *The Plant Journal*. – 2018. – V. 93. – №. 2. – PP. 377-386.
70. Malzahn A.A. et al. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis // *BMC biology*. – 2019. – V. 17. – №. 1. – PP. 1-14.
71. Schunder E. et al. First indication for a functional CRISPR/Cas system in *Francisella tularensis* // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – V. 303. – №. 2. – PP. 51-60.
72. Kneppers J. et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 through autonomous processing of a single crRNA array.
73. Shmakov S. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems // *Nature Reviews Microbiology*. – 2017. – V. 15. – №. 3. – PP. 169-182.
74. Knott G.J. et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR–Cas13a enzyme // *Nature structural & molecular biology*. – 2017. – V. 24. – №. 10. – P. 825.
75. Abudayyeh O.O. et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13 // *Nature*. – 2017. – V. 550. – №. 7675. – PP. 280-284.
76. Cox D.B.T. et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 // *Science*. – 2017. – V. 358. – №. 6366. – PP. 1019-1027.
77. Gootenberg J.S. et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 // *Science*. – 2018. – V. 360. – №. 6387. – PP. 439-444.
78. Gootenberg J.S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science*. – 2017. – V. 356. – №. 6336. – PP. 438-442.
79. Abudayyeh O.O. et al. Nucleic acid detection of plant genes using CRISPR-Cas13 // *The CRISPR Journal*. – 2019. – V. 2. – №. 3. – PP. 165-171.

80. Aman R. et al. Engineering RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in Arabidopsis //Viruses. – 2018. – V. 10. – №. 12. – P. 732.
81. Aman R. et al. Engineering RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in Arabidopsis //Viruses. – 2018. – V. 10. – №. 12. – P. 732.
82. Zhang T. et al. Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants //Plant biotechnology journal. – 2019. – V. 17. – №. 7. – PP. 1185-1187.
83. Zhan X. et al. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting //Plant biotechnology journal. – 2019. – V. 17. – №. 9. – PP. 1814-1822.
84. Smargon A.A. et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28 //Molecular cell. – 2017. – V. 65. – №. 4. – PP. 618-630.
85. Konermann S. et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors //Cell. – 2018. – V. 173. – №. 3. – PP. 665-676.
86. Mahas A., Aman R., Mahfouz M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants //Genome biology. – 2019. – V. 20. – №. 1. – P. 1-16.
87. Abbott T. R. et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza //Cell. – 2020. – V. 181. – №. 4. – PP. 865-876.
88. Mahas A., Aman R., Mahfouz M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants //Genome biology. – 2019. – V. 20. – №. 1. – PP. 1-16.
89. Cao Y. et al. Control of plant viruses by CRISPR/Cas system-mediated adaptive immunity //Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 11.

Н. Икнат, З. Стамғалиева, А. Мадиров, С. Жангазин, Р. Омаров

Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Современные методы CRISPR/Cas геномного редактирования при модуляции в растениях, направленной на вирусные заболевания

Аннотация. В связи с быстрым ростом мирового населения продовольственная безопасность стала серьезной проблемой: более 800 миллионов человек страдают от голода, а миллионы подвергаются риску. Мировое сельское хозяйство находится под постоянным воздействием различных биотических и абиотических факторов, ограничивающих урожайность сельскохозяйственных культур. Патогены, включая грибы, бактерии, вирусы, насекомых и паразитические растения, представляют собой серьезные биотические стрессы, которые могут вызвать серьезные потери урожая. Молекулярные взаимодействия между вирусом и растением являются одной из основных моделей в понимании защитных антивирусных систем и интерференции растений. В этой статье рассмотрены основные классы генов устойчивости, РНК-интерференция и РНК-опосредованная адаптивная иммунная система бактерий и архей - CRISPR/Cas. Последние исследования указывают на то, что CRISPR/Cas система может играть значительную роль в придании антивирусной устойчивости растениям.

Обзор направлен на рассмотрение последних достижений в биотехнологии растений, которые имеют потенциальное практическое применение в регуляции взаимодействия вирус-растение.

Ключевые слова: иммунитет растений, устойчивость, вирусы растений, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas13.

N. Iksat, Z. Stangaliyeva, A. Madirov, S. Zhangazin, R. Omarov
Eurasian national university L.N. Gumilyov, Nur-Sultan, Kazakhstan

Modern methods of CRISPR/Cas genomic editing for modulation in plants aimed at viral diseases

Abstract. With the rapid growth of the world's population, food security has become a major concern, with more than 800 million people suffering from hunger and millions more at risk. World agriculture is constantly under an influence of various biotic and abiotic factors that limit productivity of agricultural crops. Pathogens, including fungi, bacteria, viruses, insects and parasitic plants, are severe biotic stresses that can cause severe crop losses. Molecular interactions between a virus and a plant are one of the main models in the understanding of antiviral defense systems and plant interference. The article discusses main classes of resistance genes, RNA interference and RNA-mediated adaptive immune system of bacteria and archaea - CRISPR/Cas. Recent studies indicate that the CRISPR/Cas system may play a significant role in conferring antiviral resistance to plants.

The article aims to review recent advances in plant biotechnology that have potential practical applications in regulating virus-plant interactions.

Keywords: plant immunity, resistance, plant viruses, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas13.

References

1. Oerke E.C., and Dehne H.W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop protection* 23.4, 275-285 (2004).
2. Khan Muhammad Azmat Ullah, et al. Molecular and biochemical characterization of cotton epicuticular wax in defense against cotton leaf curl disease. *Iranian Journal of Biotechnology* 13.4, 3 (2015).
3. Zaidi Syed Shan-e-Ali, et al. Engineering plant immunity: using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance. *Frontiers in plant science* 7, 1673 (2016).
4. Sanford J.C., and Johnston S.A. The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113.2, 395-405 (1985).
5. Wilson T. Michael. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.8, 3134-3141 (1993).
6. Uma Battepati T. Swaroopa Rani, and Appa Rao Podile. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of plant physiology* 168.18, 2141-2152 (2011).
7. Baruah Aiswarya, et al. Non-host resistance to plant viruses: What do we know? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 111, 101506 (2020).
8. Jones J.D. Dangl J L. *The plant immune system* 444.7117, 323-329.
9. Kørner Camilla Julie, et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Molecular plant-microbe interactions* 26.11, 1271-1280 (2013).
10. Verlaan Maarten G., et al. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS genetics* 9.3, e1003399, (2013).
11. Carr John P., Mathew G. Lewsey, and Peter Palukaitis. Signaling in induced resistance. *Advances in virus research* 76, 57-121 (2010).
12. Bai Shiwei, et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. *PLoS pathogens* 8.6, e1002752 (2012).

13. Sekine Ken-Taro, et al. Enhanced resistance to Cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 mutant is mediated via an SA-independent mechanism. *Molecular plant-microbe interactions* 17.6, 623-632 (2004).
14. Carr John, and Gad Loebenstein. Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses: Part II. *Academic Press* (2010).
15. Kang Won-Hee, et al. Helicase domain encoded by Cucumber mosaic virus RNA1 determines systemic infection of Cmr1 in pepper. *PLoS*. e43136 (2012).
16. Gawehns Fleur, Ben J.C. Cornelissen, and Frank L.W. Takken. The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbial biotechnology* 6.3, 223-229 (2013).
17. Kunik Talya, et al. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio/technology* 12.5, 500-504 (1994).
18. Napoli Carolyn, Christine Lemieux, and Richard Jorgensen. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The plant cell* 2.4, 279-289, (1990).
19. Voinnet Olivier. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6.3, 206-220 (2005).
20. Ding Shou-Wei. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 10.9, 632-644, (2010).
21. Ipsaro Jonathan J., and Leemor Joshua-Tor. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature structural & molecular biology* 22.1, 20-28 (2015).
22. Duan Cheng-Guo, Chun-Han Wang, and Hui-Shan Guo. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* 3.1, 1-8 (2012).
23. Bau Huey-Jiunn, et al. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93.1, 112-120 (2003).
24. Kundu Jiban Kumar, et al. Role of the 25–26 nt siRNA in the resistance of transgenic *Prunus domestica* graft inoculated with plum pox virus. *Virus genes* 36.1, 215-220 (2008).
25. Sidorova Tatiana, et al. Agrobacterium-mediated transformation of Russian commercial plum cv. "Startovaya" (*Prunus domestica* L.) with virus-derived hairpin RNA construct confers durable resistance to PPV infection in mature plants. *Frontiers in plant science* 10, 286 (2019). plants-08-00565-v2.pdf. (n.d.) .
26. Lenka Biswajit, Satya Narayan Satapathy, and Manoranjan Senapati. Engineering Plant Virus Resistance: Gene Silencing to Genome Editing. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 9.10, 3086-3096 (2020).
27. Zhang Zhi-Yong, et al. Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *Journal of biotechnology* 153.3-4, 181-187 (2011).
28. Fuentes Alejandro, et al. Field trial and molecular characterization of RNAi-transgenic tomato plants that exhibit resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29.3, 197-209 (2016).
29. Gogoi Anupam, et al. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves. *Planta* 246.6, 1233-1241 (2017).
30. Worrall Elizabeth A., et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. *Frontiers in plant science* 10, 265 (2019).
31. Das Protiva Rani, and Sherif M. Sherif. Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: Challenges and triumphs. *Frontiers in Plant Science* 11, 946 (2020).
32. Mitter Neena, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature plants* 3.2, 1-10 (2017).
33. Omarov Rustem T., and Herman B. Scholthof. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: an overview. *Antiviral Resistance in Plants*. 39-56 (2012).
34. Mann Krin S., et al. Cytorhabdovirus P protein suppresses RISC-mediated cleavage and RNA silencing amplification in planta. *Virology* 490, 27-40 (2016).

35. Iki Taichiro, Marie-Aude Tschopp, and Olivier Voinnet. Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing. *Rna* 23.5, 639-654 (2017).
36. Kenesi Erzsébet, et al. A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic acids research* 45.13, 7736-7750 (2017).
37. Omarov Rustem, et al. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *Journal of virology* 80.6, 3000-3008 (2006).
38. Burgyán József, et al. The ORF1 products of tombusviruses play a crucial role in lethal necrosis of virus-infected plants. *Journal of virology* 74.23, 10873-10881 (2000).
39. Shamekova Malika, et al. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants. *Virology* 452, 159-165 (2014).
40. Qiu Wenping, Jong-Won Park, and Herman B. Scholthof. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular plant-microbe interactions* 15.3, 269-280 (2002).
41. Deveau Hélene, Josiane E. Garneau, and Sylvain Moineau. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual review of microbiology* 64, 475-493 (2010).
42. Horvath Philippe, and Rodolphe Barrangou. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327.5962, 167-170 (2010).
43. Shmakov Sergey, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nature reviews microbiology* 15.3, 169-182 (2017).
44. Koonin Eugene V., Makarova Kira S., and Feng Zhang. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology* 37, 67-78 (2017).
45. Burstein David, et al. New CRISPR–Cas systems from uncultivated microbes. *Nature* 542.7640, 237-241 (2017).
46. Jiang Wenyan, and Luciano A. Marraffini. CRISPR-Cas: new tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. *Annual review of microbiology* 69, 209-228 (2015).
47. Jinek Martin, et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science* 337.6096, 816-821 (2012).
48. Baltes Nicholas J., et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 1.10, 1-4 (2015).
49. Ali Zahir, et al. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology* 16.1, 1-11(2015).
50. Kis, András, et al. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant biotechnology journal* 17.6, 1004 (2019).
51. Doudna Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346.6213 (2014).
52. Ji Xiang, et al. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nature Plants* 1.10, 1-4 (2015).
53. Baltes Nicholas J., et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nature Plants* 1.10, 1-4(2015).
54. Yin Kangquan, et al. Engineer complete resistance to Cotton Leaf Curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology Research* 1.1, 1-9 (2019).
55. Ali Zahir, et al. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. *Scientific reports* 6.1, 1-13 (2016).
56. Tashkandi Manal, et al. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant signaling & behavior* 13.10, e1525996 (2018).
57. Mao Yanfei, et al. Manipulating plant RNA-silencing pathways to improve the gene editing efficiency of CRISPR/Cas9 systems. *Genome biology* 19.1, 1-15(2018).

58. Zetsche B. et al. Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature biotechnology*. 35.1, 31-34 (2017).
59. Price Aryn A., et al. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.19, 6164-6169(2015).
60. Zhang Tong, et al. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant biotechnology journal* 16.8, 1415-1423 (2018).
61. Mehta Devang, et al. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome biology* 20.1, 1-10 (2019).
62. Macovei Anca, et al. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant biotechnology journal* 16.11, 1918-1927 (2018).
63. Pyott Douglas E., Emma Sheehan, and Attila Molnar. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Molecular plant pathology* 17.8, 1276-1288 (2016).
64. Chandrasekaran Jeyabharathy, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology* 17.7, 1140-1153 (2016).
65. Zhang Qiang, et al. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and its prevention. *Plant molecular biology* 96.4, 445-456 (2018).
66. Dixit Atray, et al. Perturb-Seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell* 167.7, 1853-1866 (2016).
67. Tsai Shengdar Q., et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature biotechnology* 33.2, 187-197 (2015).
68. Kuscu Cem, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature biotechnology* 32.7, 677-683 (2014).
69. LeBlanc Chantal, et al. Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress. *The Plant Journal* 93.2, 377-386 (2018).
70. Malzahn Aimee A., et al. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis. *BMC biology* 17.1, 1-14 (2019).
71. Schunder Eva, et al. First indication for a functional CRISPR/Cas system in Francisella tularensis. *International Journal of Medical Microbiology* 303.2, 51-60 (2013).
72. Schunder Eva, et al. First indication for a functional CRISPR/Cas system in Francisella tularensis. *International Journal of Medical Microbiology* 303.2, 51-60 (2013).
73. Shmakov Sergey, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nature reviews microbiology* 15.3, 169-182 (2017).
74. Knott Gavin J., et al. Guide-bound structures of an RNA-targeting A-cleaving CRISPR–Cas13a enzyme. *Nature structural & molecular biology* 24.10, 825-833 (2017).
75. Abudayyeh, Omar O., et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature* 550.7675, 280-284 (2017).
76. Cox David B.T., et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358.6366, 1019-1027 (2017).
77. Gootenberg Jonathan S., et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science* 360.6387, 439-444 (2018).
78. Gootenberg Jonathan S., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 356.6336, 438-442 (2017).
79. Abudayyeh Omar O., et al. Nucleic acid detection of plant genes using CRISPR-Cas13. *The CRISPR journal* 2.3, 165-171 (2019).
80. Aman Rashid, et al. Engineering RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in Arabidopsis. *Viruses* 10.12, 732 (2018).
81. Aman Rashid, et al. Engineering RNA virus interference via the CRISPR/Cas13 machinery in Arabidopsis. *Viruses* 10.12, 732 (2018).

82. Zhang Tong, et al. Establishing CRISPR/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants. *Plant biotechnology journal* 17.7, 1185 (2019).
83. Zhan Xiaohui, et al. Generation of virus-resistant potato plants by RNA genome targeting. *Plant biotechnology journal* 17.9, 1814-1822 (2019).
84. Smargon Aaron A., et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Molecular cell* 65.4, 618-630 (2017).
85. Konermann Silvana, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell* 173.3, 665-676 (2018).
86. Mahas Ahmed, Rashid Aman, and Magdy Mahfouz. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome biology* 20.1, 1-16 (2019).
87. Abbott Timothy R., et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. *Cell* 181.4, 865-876 (2020).
88. Mahas Ahmed, Rashid Aman, and Magdy Mahfouz. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. *Genome biology* 20.1, 1-16 (2019).
89. Cao Yongsun, et al. Control of plant viruses by CRISPR/Cas system mediated adaptive immunity. *Frontiers in Microbiology* 11, 2613 (2020).

Авторлар туралы мәлімет:

Иқсат Н. - PhD студент, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Стамғалиева З. - техника ғылымдарының магистрі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Мадиров А. - Биотехнология мамандығы бойынша бакалавр, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Жангазин С. - Биология мамандығы бойынша PhD, доцент м.а., Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Омаров Р. - PhD, профессор, биотехнология және микробиология кафедрасының меңгерушісі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Iksat N. - Ph.D. student in Biology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Stamgaliyeva Z. - Master in technical science, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Madirov A. - BSc in Biotechnology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Zhangazin S. - Ph.D. in Biology, Associate Professor, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Omarov R. - Ph.D., Professor, Head of Department Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.