مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در برهمکنش گیاه و بیمارگر

نوع مقاله: مروری

مریم قرمزی‌نژاد[۱]، فاطمه شهریاری[۲*]، اشکان عالی محمدی[۱]

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

۲- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

hahryari@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

صفحه ۷۲-۴۷

چکیده

فناوری ویرایش هدفمند ژنوم در حال تبدیل شدن به یکی از مهم‌ترین ابزارهای ژنتیکی است و به‌طور گسترده‌ای در آسیب شناسی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر، کریسپر (تکرارهای پالیندرومیک کوتاه فاصله‌دار خوشه‌ای به‌طور منظم) و پروتئین‌های مرتبط با آن که در سیستم ایمنی پروکاریوت‌ها کشف شده است به دلیل سادگی، کارایی بالا و تطبیق‌پذیری، با موفقیت در ابزارهای مختلف ویرایش ژنوم مورد استفاده است. سیستم CRISPR/Cas، با اصلاح هدفمند، دقیق و قوی ژنوم، راه را به سوی روش‌های جدید بهبود مقاومت ژنتیکی گیاهان در برابر بیماری‌های گیاهی هموار کرده است. در این بررسی، مروری کلی بر سیستم CRISPR/Cas9، ابزارهای مشتق شده و کاربردهای آنها در بیماری‌شناسی گیاهی ارائه شده است. همچنین ایجاد مقاومت در در میزبان برابر عوامل بیماریزای باکتریایی، قارچی و ویروسی با استفاده از ابزارهای مبتنی‌بر CRISPR/Cas9 شرح داده شده و محدودیت‌های این سیستم، مقررات محصولات ویرایش شده با آن و آینده این فناوری مورد بحث قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: فاکتورهای حساسیت گیاه، مقاومت مهندسی شده، ویرایش ژنوم، CRISPR/Cas9.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

مقدمه

محصولات زراعی مستعد آلودگی با طیف گسترده‌ای از عوامل بیماریزا (قارچ‌ها، باکتری‌ها، اوومیست‌ها، ویروس‌ها و نماتدها) هستند که می‌توانند سبب خسارت اقتصادی شدید شوند. بنابراین، توسعه مقاومت گیاهان نقش کلیدی در تولید محصول برای تامین نیازهای جمعیت جهانی دارد. درک مکانیسم‌های مولکولی برهمکنش میزبان–بیمارگر، به‌ویژه شناسایی موضوع‌های اصلی مربوط به واکنش‌های دفاعی در گیاهان، فرصت مناسبی برای ایجاد مقاومت گسترده و پایدار در بسیاری از محصولات فراهم می‌کند (Nejat et al. 2017; Dong and Ronald. 2019). مهندسی ژنوم می‌تواند تغییرات پایدار، دائمی و وراثتی در کد ژنتیکی ایجاد کند. حذف عملکرد ژن از طریق جهش و اضافه کردن عملکرد از طریق ژرم‌پلاسم، منابع مهمی برای مطالعات نقش ژن و بهبود ساختار ژنتیکی گیاه برای تولید محصول بهتر است (Borisjuk et al. 2019). اصلاح برخی از ویژگی‌های گیاه مانند عملکرد، بهبود رشد و ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی و امکان تبادل بین گونه‌ای ژن(ها)، مهندسی ژنوم را به ابزاری ارزشمند برای توسعه گیاهان مقاوم در برابر بیمارگرها تبدیل کرده است (Dominguez et al. 2016; Yin and Qiu. 2019).

ویرایش دی.ان.ا در مکان‌های خاص ژنوم به‌طور طبیعی توسط نوترکیبی همولوگ به ندرت اتفاق می‌افتد. اما به دلیل نرخ وقوع کم و وجود ساختارهای بزرگ و پیچیده دی.ان.ا، کاربرد آن به‌عنوان یک استراتژی ویرایش ژنوم (genome editing) محدود است. در جستجوی یک روش کاربردی‌تر برای ویرایش ژنوم، مگانوکلئازها، نوکلئازهای انگشت روی (ZFN: zinc finger nuclease) و نوکلئازهای بر اساس افکتورهای شبه فعال‌کننده رونویسی (TALENs: transcription activator-like effector nucleases) معرفی شدند که حاوی دومین‌های متصل‌شونده به دی.ان.ا و اندونوکلئازهای برشی بوده و می‌توانند دی.ان.ا هدف را به صورت اختصاصی برش دهند (Gaj et al. 2016).

با پیشرفت مهندسی ژنوم و کشف سیستم CRISPR/cas، این تکنیک به دلیل دقت بالا و اختصاصیت بر پایه آر.ان.ا (بر خلاف ZFN و TALEN که اختصاصیت بر پایه پروتئین دارند)، به ابزاری مطلوب در ویراش ژنوم تبدیل شد. در مقایسه با ZFN و TALEN که نیازمند مهندسی کامل آنزیم‌ها هستند، برای برنامه ریزی CRISPR/Cas، ترمیم ساده آر.ان.ا سبب هدف‌گیری هر توالی مدنظر می‌شود. همچنین اندازه بزرگ ZFN و TALEN باعث می‌شود این تکنیک‌ها برای ویرایش چندین مکان ژنی مناسب

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

نباشند (زیرا برای تشخیص رشته‌های مکمل دی.اِن.اِ و ایجاد برش‌های دورشته‌ای نیاز به یک جفت پروتئین دارد). از دیگر مزیت‌های تکنولوژی CRISPR/Cas نسبت به ZFNها و TALEN ها قابلیت این روش در برش دی.اِن.اِ بدون توجه به وضعیت اپی‌ژنتیکی آن است (Malzahn et al. 2017).

سیستم CRISPR/Cas

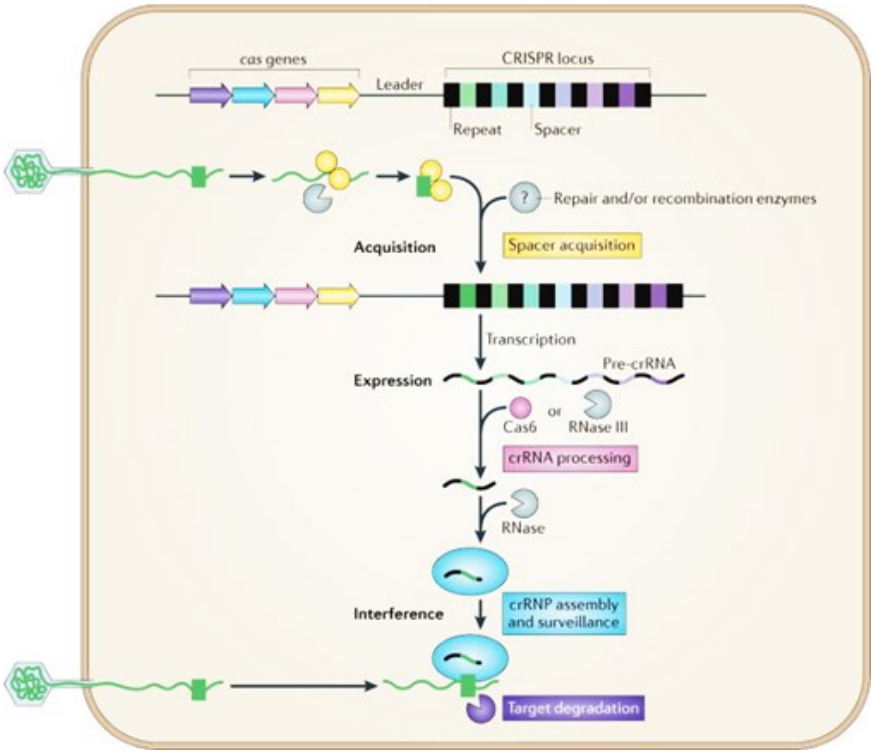
در سال ۱۹۸۷ میلادی در حین بررسی ژن مسئول تبدیل آلکالین فسفاتاز در باکتری *Escherichia coli*، الگوی عجیبی از توالی‌های تکراری با توالی‌های فاصله‌انداز در هم آمیخته به‌طور تصادفی کلون شد که در نهایت سبب کشف کریسپرها شد (Makarova and Koonin. 2007). سیستم کریسپر به‌عنوان مکانیسم ویژه ترمیم دی.اِن.اِ در آرکی‌ها (*Archaea*) و باکتری‌های گرمادوست (thermophilic bacteria) شناخته شده است. در بررسی‌های بعدی پژوهشگران دریافتند که توالی‌های فاصله‌انداز موجود در این سیستم با توالی‌هایی در ویروس‌ها، باکتریوفاژها و پلاسمیدها مشابه هستند. بنابراین باکتری‌هایی که دارای توالی‌های فاصله‌انداز همولوگ ویروس‌ها باشند، توسط آنها آلوده نمی‌شوند، به این معنی که این توالی‌ها در سیستم ایمنی پروکاریوتی نقش دارند (Ishino et al. 2018). یک سیستم کریسپر شامل دو بخش ژن‌های cas و لوکوس کریسپر است (Zaidi et al. 2020) (شکل ۱). در طبیعت، CRISPR/Cas سیستم دفاعی پروکاریوتی (آرکی‌ها یا باکتری‌ها) مبتنی‌بر آر.اِن.اِ است. با ورود ژنوم به داخل باکتری، پروتئین‌های cas با دریافت توالی‌هایی از پلاسمیدهای مهاجم و ادغام یا ورود این قطعات در لوکوس کریسپر، به‌عنوان توالی‌های فاصله‌انداز که بین توالی‌های تکراری یکسان قرار می‌گیرند، عمل می‌کند. کریسپر آر.اِن.ای‌های پیش‌ساز (pre-crRNA) از این لوکوس‌ها رونویسی می‌شوند و پس از تبدیل به کریسپر آر.اِن.اِ (crRNA)، با پروتئین(های) اندونوکلئاز Cas مرتبط شده و پلاسمید یا دی.اِن.ای ویروسی مهاجم دارای توالی مکمل را شناسایی و برش می‌دهد. این قطعات اکتسابی، حافظه مولکولی از ورود قبلی پلاسمید و ویروس را فراهم کرده و سبب بروز مصونیت در برابر تهاجمات مکرر آنها می‌شود (شکل ۱) (Kalinina et al. 2020; Zaidi et al. 2020).

اجزای اصلی ماشین CRISPR/Cas طبیعی از نظر ترکیب پروتئین و crRNA، ساختمان، معماری و ساختار جایگاه ژنوم و سازوکارهایی برای فعالیت و زیست‌زایی crRNA به‌طور قابل ملاحظه‌ای متنوع هستند. بنابراین این مشخصات نشان‌دهنده طبقه‌بندی پیچیده این سیستم در دو گروه اصلی و شش تیپ (نوع) است که هر کدام به چندین زیر مجموعه (حداقل ۲۹ زیرمجموعه)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

تقسیم می‌شوند (Makarova et al. 2015; Koonin et al. 2017).

برای مثال، سیستم‌های گروه یک (متشکل از انواع I، III و IV) از مجموعه افکتورهای چند زیر واحدی استفاده می‌کنند، در حالی‌که سیستم‌های گروه دو (انواع II، V و VI) از یک پروتئین تک/چند دامنه‌ای استفاده می‌کنند. سیستم‌های گروه دو به دلیل سادگی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و به‌طور معمول برای ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Koonin et al. 2017; Ji et al. 2019) (جدول ۱). سیستم نوع II گروه دو (CRISPR/Cas9) باکتری *Streptococcus pyogenes* اولین و گسترده‌ترین ابزار مورد استفاده در ویرایش ژنوم است که سبب انقلابی در ویرایش ژنوم شد و سازوکار آن به‌طور کامل مشخص شده است که در ادامه به تشریح ساختار، اجزا و سازوکار آن خواهیم پرداخت (Jinek et al. 2012; Koonin et al. 2017; Langner et al. 2018).



شکل ۱- سیستم CRISPR/Cas. ایمنی اکتسابی توسط سیستم‌های CRISPR/Cas به واسطه‌ی CRISPR RNAها (crRNAs) و پروتئین‌های Cas، است. ژن‌های cas بر اساس عملکرد در چهار رنگ در شکل مشخص شده است: دریافت فاصله‌انداز (زرد)، پردازش crRNA (صورتی)، مونتاژ crRNA و نظارت بر آن (آبی)، و تخریب توالی هدف (بنفش). مرحله اول به‌عنوان دریافت فاصله‌انداز شناخته می‌شود. مرحله دوم تشکیل pre crRNA و تبدیل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

آن به crRNAهای کوچک است. در نهایت crRNAهای بالغ به همراه پروتئین‌های Cas، کمپلکس crRNP را تشکیل می‌دهند و سرانجام crRNP همراه با نوکلئازهای Cas توالی هدف را برش می‌دهد (Van et al. 2014).

جدول ۱- ویژگی‌های انواع سیستم‌های CRISPR/Cas دخیل در تعاملات گیاه و بیمارگر (Gosavi et al. 2020).

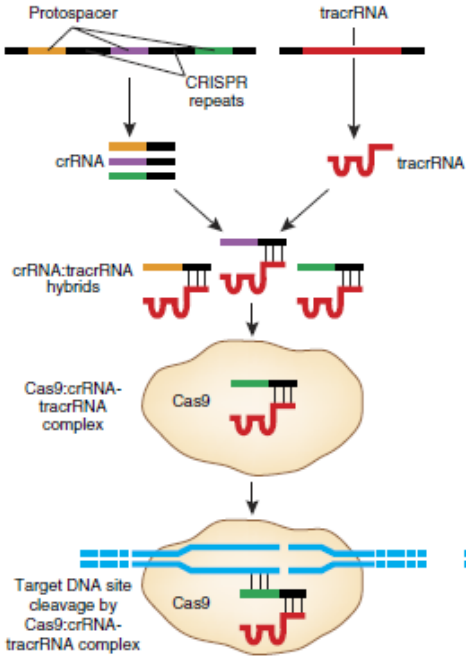
سیستم CRISPR	Cas9	Cas13	Cas12b	Cas12a	Cas14
نوع و گروه	نوعII گروه دو	نوعVI گروه دو	نوعV گروه دو	نوعV گروه دو	نوعV گروه دو
پردازش crRNA	خیر	بله	خیر	بله	بله
tracrRNA	بله	خیر	بله	خیر	بله
PAM/PFS	3′, G-rich	3′,non-G PFS	5′, T-rich	5′, T-rich	Independent-PAM
دومین نوکلئازی	RuvC, HNH	HPEN	RuvC	RuvC	RuvC
پیش‌ماده	dsDNA	RNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA

سیستم CRISPR/Cas9

این سیستم شامل آرایه کریسپر و نوکلئاز Cas9 است. آرایه کریسپر توالی با تکرارهای ۵۰-۲۵ جفت بازی است که به وسیله فاصله‌اندازهای خاصی با طول‌های مشابه از یکدیگر جدا می‌شوند. پروتئین نوکلئاز Cas9 مرتبط با کریسپر است که به فرآیندهای تخریب دی.اِن.اِ خارجی کمک می‌کند. ایمنی ایجاد شده با سیستم‌های CRISPR-Cas به واسطه‌ی CRISPR RNAها (crRNAs) و پروتئین‌های Cas (مجموعه‌ای از ریبونوکلئوپروتئین و کریسپر (crRNP))، در سه مرحله صورت می‌گیرد. مرحله اول به‌عنوان دریافت فاصله‌انداز شناخته می‌شود و به دنبال ورود یک ماده ژنتیکی مهاجم (مثلا ژنوم ویروسی) رخ می‌دهد. با قطعه قطعه شدن دی.اِن.اِ مهاجم، یک پروتواسپیسر (protospacer) جدید انتخاب و پردازش شده و به‌عنوان فاصله‌انداز جدید در انتهای پیشرو آرایه کریسپر تلفیق می‌شود. در مرحله دوم، بیان یا رونویسی از لوکوس کریسپر انجام می‌شود و سپس pre crRNA توسط ریبونوکلئازهای خانه‌داری (RNase III) و یا ریبونوکلئازهای مرتبط با کریسپر به crRNAهای کوچک تبدیل می‌شود. بلوغ crRNA به‌واسطهء tracrRNA (trans-activating crRNA) است که به‌طور جداگانه از لوکوس ژنومی در بالادست لوکوس کریسپر رونویسی می‌شود. جفت بازهای tracrRNA با توالی‌های تکراری کریسپر آر.اِن.اِ پیش‌ساز (precrRNA)، نواحی dsRNA (آر.اِن.اِی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

دو رشته‌ای) ایجاد می‌کند، کـه توسـط RNase III برای تولید crRNA برش داده می‌شود (در انتهـای '5 خود توسط آنزیم‌های ناشناخته بریده می‌شوند) (شکل ۲). پروتئین‌های Cas همراه با crRNA های بالغ کمپلکس crRNP را تشکیل می‌دهند. سرانجام crRNP، دی.ان.ای مهـــاجم را بـــه‌عنوان اســـید نوکلئیک مکمل خوانش می‌کند و پس از شناسایی دقیق، توالی هدف توسط نوکلئازهـای Cas بـرش داده می‌شـود (Jiang and Doudna 2017; Jemal et al. 2022).



شکل ۲- سیستم‌های CRISPR/Cas9 طبیعی در سیستم‌های طبیعی، توالی دی.ان.ای خارجی در آرایه کریسپر ادغام شده و crRNAهای دارای مناطق «پروتواسپیسر» مکمل سایت دی.ان.ای خارجی تولید می‌شوند. سپس crRNAها با tracrRNAها، هیبرید می‌شوند و این جفت آر.ان.ای با نوکلئاز Cas9 کمپلکس c rRNA/tracrRNA/Cas9 را تشکیل می‌دهند. این کمپلکس دی.ان.ای‌های خارجی حاوی توالی‌های پروتواسپیسر را تشخیص داده و برش می‌دهند (Sander and Joung. 2014).

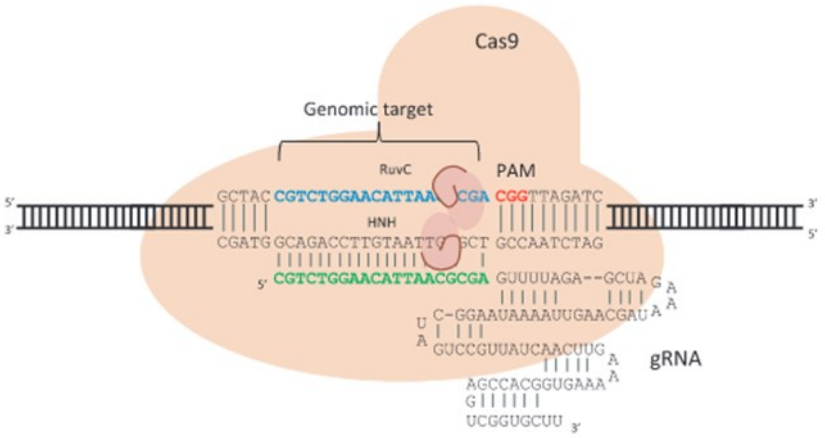
پروتئین‌های Cas9 شـامل دو دومـین نوکلئـازی HNH و RuvC است که بعد از اتصـال بـه ناحیـه هـــدف، HNH، رشـــته دی.ان.ا مکمـــل crRNA و RuvC رشته مخالف را می‌شکند که منجر به یـک شکستگی دو رشته‌ای در دی.ان.ای مهاجم (ناحیه هدف) می‌شود (Jinek et al. 2012; Cong et al. 2013).

پروتئین‌های Cas9 جایگاه‌هـای مختلـف PAM (protospacer adjacent motif) را تشـــخیص می‌دهند (به رنگ قرمز در شکل ۳). به‌عنوان مثال، پرکاربردترین Cas9 (SpCas9) در *S. pyogenes* با یک تـوالی PAM بـه صـورت '5'-NGC-3 تعامـل دارد (Anders et al. 2016; Khatodia et al. 2014). این برهمکنش، سبب تسهیل در باز شـدن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

رشته دی.اِن.ای هدف، تشکیل هیبرید آر.اِن.ا-دی.اِن.ا و برش دی.اِن.ا می‌شود. حضور PAM برای اتصال اولیه دی.اِن.ا ضروری است و بدون آن، حتی شناسایی توالی‌های هدف که کاملاً مکمل توالی gRNA هستند توسط Cas9 امکان‌پذیر نخواهد بود (Sternberg et al. 2014).

شناسایی سازوکار CRISPR/Cas9 باعث کاربرد این فناوری در ویرایش محتوای ژنوم موجودات شده است که با استفاده از آر.اِن.ا اندونوکلئازهای هدایت شده مبتنی‌بر کریسپر (RGEN: RNA-guided endonuclease) انجام می‌شود این RGENهای مشتق شده از سیستم CRISPR/Cas نوع II، به‌طور موثر در انواع ویرایش ژنوم مانند خاموشی ژن، جایگزینی ژن، ویرایش ژن‌ها، شناسایی عملکرد ژن و تنظیم فرآیند نسخه‌برداری به کار گرفته شده‌اند (shalem et al. 2015).



شکل ۳- ویرایش هدفمند ژنوم به‌واسطه اندونوکلئاز Cas9 هدایت شده توسط آر.ان.ا. اندونوکلئاز Cas9 توسط یک مولکول آر.ان.ای راهنمای منفرد (gRNA) حاوی یک توالی فاصله‌انداز ۲۰ نوکلئوتیدی (سبز رنگ) به سمت توالی دی.اِن.ا هدف به نام پرتواسپیسر (آبی رنگ) هدایت می‌شود. توالی موتیف مرتبط با پروتو اسپیسر (PAM) (قرمز رنگ) یک پیش نیاز برای اتصال و برش است و در بالادست پروتواسپیسر قرار دارد. Cas9 دارای دو حوزه نوکلئازی RuvC و HNH است که هر کدام یک رشته از دی.اِن.ا دو رشته‌ای (به رنگ صورتی تیره) را برش می‌دهند (Mahfouz et al. 2014).

ویرایش ژنوم میزبان و بیمارگر با CRISPR/Cas9

تکنیک‌های کارآمد ویرایش ژنوم، به‌ویژه CRISPR/Cas9، دارای کاربردهای احتمالی فراوانی است که می‌تواند در برابر عوامل بیمارگر گیاهی مورد بررسی قرار گیرد. توانایی اصلاح ژنوم بیمارگر و میزبان امکان ارائه فنوتیپ‌های مطلوب را برای اهداف متعدد فراهم می‌کند (Zhang et al. 2018). در مقایسه با روش‌های مرسوم دستکاری ژنوم، ابزارهای CRISPR/Cas9 کارآمدتر و در مواردی بسیار ساده‌تر هستند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

علاوه‌بر این، در بستر آزمایشگاه پتانسیل بالایی در بررسی عملکرد ژن در سطح کل ژنوم عوامل بیمارگر گیاهی دارند (Gosavi et al. 2020). پژوهشگران به منظور سهولت استفاده در ویرایش ژنوم، یک آر.ان.ا نوترکیب (مصنوعی) منفرد به نام «آر.ان.ا راهنمای منفرد» (sgRNA) طراحی کردند که از ادغام crRNA و tracrRNA تشکیل شده و تمامی اجزای ضروری آنها را دارد (Jinek et al. 2012). یک sgRNA از طریق توالی داربستی موجود در tracrRNA و توالی فاصله‌انداز تقریباً ۲۰ نوکلئوتیدی اختصاصی crRNA (طراحی شده با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک) به پروتئین Cas متصل شده و ژنوم مورد نظر را برای ترمیم مشخص می‌کند. کمپلکس sgRNA/Cas9 پس از استقرار در سلول یوکاریوت‌ها، برش دو رشته‌ای در محل دی.ان.ا هدف ایجاد می‌کند (تقریباً سه-چهار نوکلئوتید بالاتر از موتیف .(PAM سپس از طریق مسیر ترمیمی همولوگ (HDR: homology directed repair) یا مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر همولوگ (NHEJ: non-homologous end joining) فرآیند ترمیم دی.ان.ای سلولی شروع می‌شود (Cong et al. 2013; Khatodia et al. 2014). انتقال توالی‌های همولوگ به همراه Cas9 و sgRNA به سلول سبب بروز HDR می‌شود که می‌توان از آن برای ترمیم سایت هدف (مانند جهش نقطه‌ای) یا درج ژن‌های خارجی موردنظر مابین الگوی دی.ان.ای دهنده (donor) استفاده کرد. در مقابل مسیر ترمیمی NHEJ به الگوی همولوگ نیاز ندارد، اما مستعد خطا است و به‌طور معمول منجر به درج یا حذف نوکلئوتیدهای کوچک (indels) می‌شود. کارآمدترین مکانیسم ترمیم، مسیر NHEJ است و اغلب چارچوب خوانش باز (ORF) را در ناحیه برش خورده از بین می‌برد و از این رو باعث غیرفعال شدن ژن هدف می‌شود. این استراتژی سیستم CRISPR/Cas9 در بیماری شناسی گیاهی برای هدف قرار دادن ژن‌های حساسیت یا ژنوم‌های ویروسی مورد استفاده قرار گرفته است. ایجاد اختلال در یک ژن حساسیت می‌تواند طیف وسیعی از مقاومت به بیماری را در چندین گونه مهم گیاهی ایجاد کند (Cong et al. 2013; Das et al. 2019).

علاوه‌بر ایجاد جهش‌های مدنظر از طریق فناوری CRISPR/Cas9، امکان بروز جهش‌های ناخواسته خارج از هدف نیز وجود دارد که ممکن است سبب بی‌ثباتی ژنومی شده و عملکرد طبیعی ژن‌ها را مختل کند. برای کاهش وقوع جهش‌های بالقوه خارج از هدف توسط Cas9، یک نوع Cas9n یا nickase که در اسید آمینه شماره ۱۰ جهش یافته است، تولید شده است (Tang and Fu. 2018). این Cas9n می‌تواند به جای برش دو رشته‌ای، برش‌های تک رشته‌ای را ایجاد کند و از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

آنجایی‌که برش‌ها به‌طور معمول با دقت بالا ترمیم می‌شوند، Cas9n به‌طور قابل توجهی ویرایش اختصاصی ژن را افزایش می‌دهد (Ran et al. 2013).

انتقال اجزای CRISPR/CAS9 به سلول گیاهی

مجموعه CRISPR/Cas9 را می‌توان به اشکال مختلف برای انتقال به سلول‌های گیاهی آماده کرد: (۱) دی.اِن.ای پلاسمیدی که پروتئین Cas و sgRNA را کد می‌کند، (۲) یک Cas mRNA (در گیاه به Cas ترجمه می‌شود) که با یک sgRNA جداگانه ارائه می‌شود و (۳) کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئین (ribonucleoprotein) (متشکل از پروتئین Cas و sgRNA). روش‌های فعلی برای انتقال اجزای CRISPR/Cas به سلول‌های گیاهی شامل انتقال ژن با واسطه *اگروباکتریوم*، انتقال پروتوپلاستی، انتقال به واسطه حامل ویروس گیاهی، انتقال با تفنگ ژنی (biolistic gun) و استفاده از بسترهای نانوذرات است (Ran et al. 2017).

کاربرد سیستم‌های CRISPR/Cas9 در بهبود مقاومت گیاه در برابر ویروس‌های بیمارگر گیاهی

سیستم‌های CRISPR/Cas9 به دو روش برای بهبود مقاومت گیاه در برابر ویروس‌های بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. دریک روش سیستم‌های CRISPR/Cas9 جهش‌های هدفمند در ژن‌های اختصاصی گیاه میزبان ایجاد می‌کنند تا به این وسیله امکان تکثیر موفقیت‌آمیز ویروس و انتشار آن در گیاه مختل شود. در روش دیگر سیستم‌های CRISPR/Cas9 ممکن است طوری مهندسی شوند که به صورت اختصاصی ژنوم‌های ویروسی را مورد هدف قرار دهند. برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس‌های دی.اِن.اِ دار (به‌طور عمده ویروس‌های دی.اِن.اِ دار تک رشته‌ای)، بخش‌های مختلف ژنوم ویروس مورد هدف قرار گرفته‌اند. برای آر.ان.ای ویروس‌های آر.اِن.اِ دار، به‌طور عمده فاکتورهای حساسیت میزبان و به‌تازگی ژنوم ویروس‌های آر.اِن.اِ دار (مانند Cas9 برگرفته از *Franciscella novicida*) مورد هدف قرار گرفته‌اند (Das et al. 2019; Kalinina et al. 2020).

هدف‌گیری مستقیم ویروس‌های گیاهی با CRISPR/Cas9 روی ویروس‌های خانواده *Geminiviridae* انجام شده است. اولین آزمایش‌ها برای ایجاد مقاومت با واسطه CRISPR روی ویروس پیچیدگی شدید چغندر (BSCTV) و ویروس کوتولگی زرد لوبیا (BeYDV) در گیاهان *Nicotiana benthamiana* و *Arabidopsis thaliana* انجام شده است (Baltes et al. 2015).

اثرات سوء یا ناخواسته‌ی سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم *Geminivirus*ها مشاهده شده است (Ali et al. 2016). جهش در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

توالی‌های رمزکننده ویروس زرد پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (TYLCV)، ویروس موزاییک پیچک (MeMV) و ویروس پیچیدگی برگ پنبه (CLCuKoV)، منجر به تولید ویروس‌های جهش یافته جدیدی شد که توانایی فرار از CRISPR/Cas9 را داشته و به تکثیر و گسترش سیستمیک خود ادامه می‌دادند. بنابراین، این سیستم ویرایش ژنوم ممکن است منجر به ایجاد و انتشار انواع ویروس‌های تازه ظهوریافته در محیط شود. به همین دلیل توالی‌های غیر رمزکننده ویروسی ممکن است هدف بهتری برای دستیابی به مقاومت با واسطه CRISPR/Cas9 باشند (Kalinina et al. 2020). سیستم CRISPR/Cas9 برای ویروس موزاییک گل کلم (CaMV)، که یک *Pararetrovirus* حاوی دی.اِن.اِ دو رشته‌ای است استفاده شده است. بررسی‌ها نشان داد بیان تراریخته Cas 9 همراه با sgRNA های متعددی که ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس *CaMV* را مورد هدف قرار می‌دهند، مقاومت قابل توجهی در برابر این ویروس ایجاد می‌کند. با این وجود، برخی از سویه‌های جهش‌یافته ویروس ردیابی شدند که توانایی فرار از این سیستم را داشته و در برگ‌های آلوده به صورت سیستمیک گسترش پیدا کردند (Liu et al. 2018).

برخی از *Pararetrovirus*ها مانند ویروس نواری موز (BSV)، ممکن است دی.اِن.اِ خود را در ژنوم گیاه میزبان ادغام کنند و فرم درون‌زای ویروس (eBSV) را تشکیل دهند که می‌تواند تحت تنش فعال شود. بنابراین، برای حذف ویروس بیماریزا از ژنوم میزبان، در طی یک پژوهش، گیاهان موز تراریخته‌ای تولید کردند که Cas9 و sgRNA را بیان کرده و مناطق رمزکننده ژنوم eBSV را هدف قرار دادند. گیاهان تراریخته حاصل جهش‌هایی را در مکان‌های مورد نظر ایجاد کردند که ظرفیت رمزگذاری بالقوه eBSV را مختل کرده و در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته شاهد، در برابر فعال‌سازی مجدد ویروس نهفته، تحت تنش آبی مقاوم بودند (Tripathi et al. 2019). در اولین مطالعه‌ی بررسی مقاومت با واسطه CRISPR/Cas9 در برابر ویروس‌های آر.ان.اِدار گیاهی، سازه‌ی FnCas9 و sgRNA در گیاهان تراریخته *N. benthamiana* و *A. thaliana* بیان شدند که مناطق مختلفی در ژنوم ویروس موزائیک توتون (TMV) و ویروس موزاییک خیار (CMV) را مورد هدف قرار دادند. در گیاهان تراریخته به‌طور قابل توجهی تجمع هر دو ویروس (۴۰ تا ۸۰ درصد) نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت (Zhang et al. 2018).

اندونوکلئازهای Cas که به‌طور مستقیم آر.اِن.اِ ویروسی را مورد هدف قرار می‌دهند (مانند FnCas9)، ابزار بالقوه قدرتمندی برای مهندسی مقاومت به ویروس‌های آر.اِن.اِ دار گیاهی هستند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

با اینحال، چنین رویکردهای ضد ویروسی نیازمند بیان دائمی جزء Cas است که در حال حاضر تنها در گیاهان تراریخته به دست می‌آید و گیاهان تراریخته نیز تحت قوانین سخت‌گیرانه GMO (موجودات اصلاح شده ژنتیکی) قرار دارند، غلبه بر این محدودیت‌های نظارتی چالشی برای پژوهش‌های آینده خواهد بود (Kalinina et al. 2020).

ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای قارچی با ویرایش ژن‌های حساسیت میزبان

در برهمکنش افکتورهای بیمارگر قارچی با پروتئین مقاومت (R) گیاه، به‌طور معمول پاسخ دفاعی گیاه از نوع ETI (effector triggered immunity) ایجاد می‌شود. در گذشته ورود ژن مقاومت به گیاهان در دسترس‌ترین و امیدوارکننده‌ترین روش دستیابی به مقاومت بود. اما به دلیل ویژگی‌های خاص گونه بیمارگر، این روش پایداری و دوام چندانی نداشت (Idnurm et al. 2017). علاوه‌بر این، انعطاف‌پذیری ژنتیکی قارچ‌ها و ایجاد جهش در ژن *avr* مربوطه باعث ایجاد اختلال در مقاومت با واسطه ژن *R* گیاه می‌شود (Joshi et al. 2010). بنابراین، مقاومت ناپایدار ناشی از ژن *R* به راحتی شکسته می‌شود. با اینحال، اصلاح ژن‌های حساسیت میزبان (ژن‌های هدف، گیرنده‌های دخیل در توسعه بیماری) می‌تواند یک رویکرد عملی و جایگزین برای بهبود مقاومت باشد. همچنین، مختل کردن برخی از عملکردهای ژن حساسیت با ایجاد جهش در آن، تأثیر چندانی بر سلامت کلی گیاه و فرآیند نمو ندارد. بنابراین، مقاومت در برابر چندین بیمارگر قارچی با هدف گیری ژن‌های حساسیت میزبان با استفاده از ابزارهای CRISPR/Cas حاصل شد (Tyagi et al. 2021).

ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR/Cas9 با موفقیت در طیف وسیعی از گونه های قارچی از جمله *Magnaporthe oryzae*، *Alternaria alternata*، *Leptosphaeria maculans*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium graminearum*، *Fusarium fujikuroi*، *Fusarium proliferatum*، *Sporisorium scitamineum*، *Ustilaginoidea virens*، *Ustilago maydis* و *Ustilago tricophora* انجام شده است. در قارچ‌ها، بیان پایدار یا گذرا Cas9 و sgRNA با انتقال به واسطه *اگروباکتریوم*، الکتروپوریشن و انتقال زیستی انجام می‌شود. از طرف دیگر، می توان مجموعه ریبونوکلئوپروتئین Cas9/sgRNA را در شرایط آزمایشگاهی مونتاژ و به‌طور مستقیم در *M. oryzae* و *F. oxysporum* استفاده کرد. همچنین با این سیستم ویرایش ژنوم در اوومیست‌هایی مانند *Phtyophthora sojae*، *P. capsici*، *P. palmivora* و *P. litchii* انجام شده است. به‌عنوان مثال، ویرایش ژنوم با حضور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

یا بدون حضور دی.اِن.اِ دهنده برای دستکاری ژنتیکی *P. sojae* از طریق انتقال پروتوپلاستی با پلی اتیلن گلایکول ایجاد شد. علاوه‌بر این با استفاده از این سیستم ژن *PcAvh1* (مسئول تولید افکتور RXLR) در *P. capsici* خاموش شد. در این مطالعه، تلقیح موتانت‌های ژن *PcAvh1* در *N. benthamiana* نشان داد که *PcAvh1* برای پرآزاری *P. capsici* مورد نیاز است (Tyagi et al. 2021).

شروع فرآیند آلودگی قارچی با ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی همراه است که باعث سست شدن یا تخریب دیواره سلولی گیاه و امکان ورود بیمارگر به میزبان می‌شود. در واکنش به این حمله، گیاهان بازدارنده‌های این آنزیم‌ها را ترشح کرده و با مکانیسم‌های دیگر، مانند تولید کالوز برای تقویت دیواره سلولی، یک لایه دفاعی اضافه ایجاد می‌کنند (Imam et al. 2016). بازدارنده‌های آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی یا ژن‌های دخیل در رسوب کالوز می‌توانند یک هدف بالقوه برای ویرایش ژنوم در ایجاد مقاومت در برابر قارچ‌ها باشند. ژن مقاومت به سفیدک پودری (PMR4)، ارتولوگ ژن *SlPMR4*، که در رسوب کالوز (PRR: pattern recognition receptors) نقش دارد، با استفاده از CRISPR/Cas9 برای دستکاری ژنتیکی گیاهان و بهبود مقاومت در برابر بیمارگر سفیدک پودری *Oidium neolycopersici* مورد هدف قرار گرفت. به‌طور جالبی غیر فعال شدن ژن *PMR4* با جهش معکوس، سبب افزایش سطح اسید سالیسیلیک و فعال شدن پاسخ فوق حساسیت در گیاه در برهمکنش با بیمارگر شده و در نهایت سبب بروز مقاومت شد. بنابراین، گیاهان مهندسی شده ژنتیکی با توانایی بازدارندگی آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی یا توانایی بیان بیش از حد PRRها را دارند و یا گیاهان دستکاری شده در ژن‌های حساسیت می‌توانند مقاومت پایدار و بهبودیافته‌ای در برابر عوامل بیماریزا ارائه دهند (Imam et al. 2016).

ویرایش لوکوس حساسیت *MLO* که پروتئین غشایی (PRR) را کد می‌کند، باعث ایجاد مقاومت در میزبان شده است (Kusch and Panstruga. 2017). در پژوهشی، ژن *MLO* در سه محصول گوجه‌فرنگی، گندم و انگور با استفاده از CRISPR/Cas9 برای ایجاد مقاومت در برابر بیماری سفیدک پودری ویرایش شد. هموآل‌های MLO در گیاه گندم (TaMLO-A1، TaMLO-B1، TaMLO-D1) توسط CRISPR/Cas9 جهش یافت. گیاهان جهش‌یافته در TaMLO-A1 مقاومت در برابر *Blumeria graminis* f. sp. tritici، نشان دادند (Wang et al.2014). به‌طور مشابه، ژن *VvMLO7* انگور نیز در کشت پروتوپلاست با استفاده از کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین (RNP/CRISPR-Cas9) جهش یافت. در این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

روش، باززایی گیاهان از پروتوپلاست‌های ویرایش شده با CRISPR/Cas9 انجام نشد، اما مقاومت قارچی بهبودیافته را در کشت پروتوپلاست گزارش کردند. به همین ترتیب ژن *SlMlo1* در گوجه‌فرنگی برای ایجاد مقاومت در برابر *O. neolycopersici* عامل سفیدک پودری با CRISPR/Cas9 ویرایش شد. لوکوس *SlMlo1* با استفاده از دو آر.ان.ا راهنما مورد هدف قرار گرفت که منجر به حذف ۴۸ جفت باز در گیاهان گوجه‌فرنگی شد. گونه گیاهی غیرتراریخته جدید توسط نویسندگان"Tomelo" نامگذاری شد و مقاومت کاملی در برابر *O. neolycopersici* در گوجه‌فرنگی، ایجاد کرد. علاوه‌بر این، هیچ گزارشی از جهش "خارج از هدف" پس از تعیین توالی کل ژنوم در خارج از منطقه موردنظر وجود نداشت، که قدرت فناوری CRISPR/Cas9 را در توسعه سریع مقاومت در برابر بیماری نشان می‌دهد (Nekrasov et al. 2017).

در گیاه برنج، ژن‌های حساسیت مانند فاکتور ۹۲۲ پاسخ به اتیلن (ERF922) و ژن‌های افزایش مقاومت به بیماری (EDR1)، که به ترتیب در پیام‌رسانی اتیلن و مقاومت در برابر عوامل بیماریزا نقش دارند، برای مهندسی ژنتیکی گیاهان و بهبود ویژگی‌های آنها مورد هدف قرار گرفتند (Huibers et al. 2013). در برنج، OsERF922 و OsSEC3A با CRISPR/Cas9 اصلاح شد و مقاومت کاملی در برابر بیمارگر عامل بلاست (*M. oryzae*) بدون ایجاد اختلال در الگوی رشد معمول گیاه مشاهده شد (Ma et al. 2018; Wang et al. 2016). در مطالعه دیگری مشخص شد جهش‌های خنثی Ossec3a سطوح اسید سالیسیلیک را همراه با تنظیم مثبت ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و پیام‌دهی سالیسیلیک اسید بهبود می‌بخشند. اگرچه این تغییر ژنتیکی منجر به ایجاد گیاهان کوتوله در مقایسه با جهش‌یافته‌های نوع وحشی شد، اما در برابر بیمارگر قارچی مقاومت نشان داد (Ma et al. 2018). همچنین جهش در ژن حساسیت (*Taedr1*) (ارتولوگ EDR) گندم منجر به بهبود مقاومت در برابر عامل سفیدک پودری، *Erysiphe cichoracearum* شد. اصلاح ژنتیکی این ژن تأثیر کمی روی رشد گیاه گذاشت، اما مشخص شد که طیف گسترده‌ای از مقاومت در برابر باکتری‌ها، اوومیست‌ها و سایر عوامل بیماریزا دارد (Zhang et al. 2017). فاکتور رونویسی WRKY که به‌طور فعال در مکانیسم‌های دفاعی PTI (PAMP-triggered immunity) و ETI نقش دارند یکی از ژن‌های ضروری دستیابی به مقاومت هستند. ویرایش فاکتور رونویسی WRKY در انگور VvWRKY52 مقاومت در برابر *Botrytis cinerea* را نشان داد. در این مطالعه، در گیاهان حاوی یک و دو آلل جهش‌یافته، تفاوت قابل توجهی در فنوتیپ گیاه در مقایسه با گیاهان نوع وحشی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

مشاهده نشد. این بررسی بیشتر توانایی ابزارهای CRISPR-Cas9 را در تغییر ژنوم گیاهان چوبی نشان داد (Wang et al. 2018).

مقاومت در برابر بیمارگرهای باکتریایی با ویرایش ژن‌های حساسیت میزبان

باکتری‌ها به دلیل تنوع بالا، همه‌جازی بودن و سرعت تکثیر بالا، نقش حیاتی (مفید یا مضر) در بیوسیستم ایفا می‌کنند (Yin and Qiu. 2019) و باعث بیماری‌های گیاهی متعددی می‌شوند. طبیعت با ایجاد تغییرات مداوم و انتقال افقی ژن به آنها کمک می‌کند تا در برابر ترکیبات ضدباکتریایی مقاومت کرده و آلودگی را گسترش دهند (Vale et al. 2001; Zeng et al. 2010). به‌طور کلی، باکتری‌ها یا از طریق منافذ گیاه مانند روزنه، استیگما و غیره، یا زخم‌های مکانیکی و یا با ترشح مولکول‌های فعال زیستی وارد سلول می‌شوند (Zeng et al. 2010). سیستم دفاعی گیاهان این پیام‌ها را تشخیص داده و به صورت مناسب برای مبارزه با بیمارگر واکنش نشان می‌دهد. با این حال، بیمارگرهای موفق از آبشار پیامی پیچیده ای استفاده می‌کنند و بسیاری از ژن‌های گیاه میزبان، از جمله برخی از ژن‌های حساسیت نیز در این امر نقش دارند، که به بیمارگرها در مغلوب کردن ایمنی گیاه و شروع آلودگی کمک می‌کنند (Dong and Ronald. 2019; Dominguez et al. 2016; Das et al. 2019). همانطوری‌که ذکر شد، ژن حساسیت ممکن است دوام بیشتری داشته باشد، بنابراین این ژن‌ها اهداف بالقوه‌ای برای دستیابی مقاومت به بیماری‌های باکتریایی از طریق ویرایش ژنوم هستند. با اینحال، پیشرفت زیادی در تولید واریته های مقاوم به بیماری‌های باکتریایی وجود ندارد. به نظر می‌رسد دلیل آن، پیچیدگی ژنتیکی گیاهان و تکامل مستمر باکتری‌ها برای دور زدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه است. مطالعات کمتری در مورد سیستم CRISP/Cas9 برای تولید گیاهان مقاوم در برابر بیمارگرهای باکتریایی نسبت به عوامل بیماریزای گیاهی قارچی و ویروسی انجام شده است (Tyagi et al. 2020).

اولین ویرایش ژنوم با راندمان بالا در *E. coli* گزارش شد (Jiang et al. 2013) و سپس کاربرد فناوری CRISPR/cas در سایر گونه‌های باکتریایی مانند *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Streptomyces* و *Corynebacterium* گسترش یافت (Liu et al. 2019). به‌طور مثال ویرایش ژن با کارایی بالا (تا ۱۰۰ درصد) به صورت حذف ژن، درج ژن و جایگزینی ژن توسط CRISPR/Cas9 در *Pseudomonas putida* KT2440 انجام شده است (Aparicio et al. 2018; Sun et al. 2018).

ایجاد جهش با سیستم CRISPR/Cas9 در پروموتر ژن حساسیت *CsLOB1* که هدف TAL

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

افکتورهای باکتری *Xanthomonas citri* pv. citri است، درجه بالایی از مقاومت در برابر بیماری شانکر مرکبات ایجاد کرد. در این پژوهش ابتدا ناحیه EBE (efector binding element) *PthA4* (EBEPthA4) واقع در پروموتر CsLOB1 ویرایش شد و نتایج نشان داد که بدون تأثیر بر فنوتیپ گیاه علائم بیماری کاهش یافت و هیچ جهش خارج از هدفی ایجاد نشد (Jia et al. 2016; Peng et al. 2017).

آلودگی با *Pseudomonas syringae* pv. tomato بیان *DMR6* (ژن مقاومت در برابر سفیدک داخلی) را افزایش می‌دهد که پروتئین حاصل تنظیم کننده منفی ایمنی گیاه است و به گسترش بیماری کمک می‌کند (Langner et al. 2018; Zeilmaker et al. 2015). حذف SlDMR6-1 (ارتولوگ آن در گوجه‌فرنگی) با CRISPR/Cas9، مقاومت گیاهان گوجه‌فرنگی را در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزا مانند *P. syringae* pv. tomato و *P. capsici* بهبود بخشید و تأثیر منفی بر سلامت گیاه نداشت (Paula de Toledo Thomazella et al. 2016). همچنین ایجاد جهش در ژن *DMR6* با استفاده از CRISPR/Cas9 در گیاه *A. thaliana* نتایج مشابهی نشان داد. این اصلاح ژنوم، سطح سالیسیلیک اسید (SA) را افزایش داده و سبب بروز مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزای گیاهی شد. نتایج بدست آمده از چنین مطالعاتی ایده استفاده از مهندسی ژنتیک را برای حذف یا درج ژن(های) خاص تقویت کرده و مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزای گیاهی را تقویت می‌کند (Zeilmaker et al. 2015).

ایجاد جهش در ژن حساسیت *OsSWEET13* میزبان که در انتقال ساکارز در طول بیماریزایی نقش دارد، سبب بروز مقاومت در برابر بیماری بلایت باکتریایی برنج (*Xanthomonas. oryzae* pv. oryzae) شد (Zhou et al. 2014). بیان *OsSWEET13* توسط افکتور پروتئین PthXo2 باکتری *X. oryzae* سبب افزایش حساسیت میزبان می‌شود. حذف این ژن در برنج از طریق جهش خنثی، مقاومت بهتری در برابر باکتری عامل بلایت برنج ایجاد کرد (Zhou et al. 2015).

به‌طور مشابه توسط سیستم مذکور با جهش در ارتولوگ ZIM-domain-2 Jasmonate در گوجه‌فرنگی (SlJAZ2)، گیاهان مقاوم در برابر *P. syringae* pv. tomato ایجاد شد. باکتری *P. syringae* پس از مواجهه با گیاه میزبان، توکسین کروناتین ترشح می‌کند، که توسط گیرنده AtJAZ2 (co-receptor) دریافت شده و منجر به باز شدن روزنه، حمله باکتری به گیاه و بروز بیماری می‌شوند. جهش در JAZ2 مانع باز شدن روزنه‌ها و سبب بروز مقاومت در برابر لکه باکتریایی می‌شود (Ortigosa et al. 2019). به‌طور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

کلی، مقاومت در برابر عوامل بیماریزای بیوتروف باعث ایجاد حساسیت به عوامل بیماریزای نکروتروف و بالعکس می‌شود. جالب است که در این مورد، پیام‌های مربوط به سیستم دفاعی اسید جاسمونیک (JA) خارج از روزنه باقی می‌ماند، بنابراین هیچ تاثیری بر سیستم دفاعی سالیسیلیک اسید ندارد. پس گیاهان جهش‌یافته Sljaz21jas تحت تأثیر بیمارگر نکروتروف *B. cinerea*، عامل کپک خاکستری گوجه‌فرنگی، قرار نگرفتند (Gimenez Ibanez et al. 2017). باکتری *Erwinia amylovora* افکتور پروتئینی به نام DspE تولید می‌کند، بر همکنش این پروتئین با پروتئین‌های شبه گیرنده کینازی حاصل از ژن‌ها *DIPM* 1, 2, 3, 4 (DspE-interacting proteins of Malus) سبب حساسیت گیاه به بیماری آتشک می‌شود (Das et al. 2019; Gimenez Ibanez et al. 2017). ویرایش ژن‌های *DIPM* 1, 2, 3, 4 با استفاده از CRISPR/Cas9 سبب ایجاد مقاومت در برابر آتشک شد (Malnoy et al. 2016). نتایج مطالعات نشان داد که استفاده از CRISPR/Cas9 و ویرایش ژن حساسیت نه تنها برای ایجاد مقاومت در محصولاتی با دوره رویشی کوتاه، بلکه درختان نیز بسیار مفید است (Tyagi et al. 2020).

مطالعات انجام گرفته پتانسیل ژن‌های حساسیت را در ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری زا نشان می‌دهد. به‌طور کلی، ژن‌های حساسیت در طبیعت حفظ می‌شوند و کشف یک ژن می‌تواند ژن‌های بیشتری را در بین یا درون گونه‌های گیاهی تشخیص دهد. مقاومت به دست آمده به‌وسیله تغییر در میزان حساسیت، در افزایش ایمنی محصول نقش بسزایی دارد، زیرا آلل خاصی که حساسیت به یک بیمارگر را ایجاد می‌کند، ممکن است در برابر بیمارگر دیگر مقاومت نشان دهد (McGrann et al. 2014). در مجموع، مطالعات نشان دهنده اهمیت تاثیر ژن حساسیت میزبان بر ژن *R* برای توسعه مقاومت در برابر عوامل بیمارگر و ضرورت یافتن ژن‌های حساسیت جدید هستند که می‌تواند در آینده مورد بهره‌برداری قرار گیرد با اینحال، مشکلات جانبی ایجاد شده با ویرایش یا جهش ژن حساسیت باید در نظر گرفته شود. همانطور که در بالا ذکر شد، ژن حساسیت با رشد و نمو گیاه ارتباط تنگاتنگی دارد و می‌تواند چندگانه اثر (اثرات پلئوتروپیک) باشد (Ma et al. 2018). بنابراین، هنگام انجام ویرایش ژن(ها) در گیاهان این مسائل نیز باید مورد توجه قرار گیرند. اگرچه در تعدادی از مطالعات آزمایشگاهی گزارش شده است که دستکاری ژنتیکی این ژن‌ها هیچ تاثیر منفی بر رشد و نمو گیاهان ندارد (Makarova et al. 2015; Pavan et al. 2010)، اما همچنان نیاز است که دوام و کاربرد این گیاهان در سطح مزرعه مشخص شود (Tyagi et al. 2020).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

فراتر از ویرایش کلاسیک ژنوم

برنامه‌های جدید ویرایش ژنوم، از جمله انواع Cas9 تغییر یافته، مانند Cas9 غیرفعال از نظر کاتالیتیکی (dead Cas9)، Cas9 متصل به آر.ان.اِ (RCas9)، و پروتئین‌های ترکیبی Cas9 به شدت افزایش یافته است که فرصت‌های مناسبی را در علوم گیاهی ایجاد کرده است (Li et al. 2017; Schaeffer et al. 2016; Shimatani et al. 2017; Zong et al. 2017). پروتئین dCas9 شکل تغییریافته از Cas9 است که با جهش در هر دو دومین نوکلئولیتیک RuvC و HNH به دست می‌آید. این پروتئین با اتصال به توالی‌های پروموتر یا ادغام با دومین‌های فعال‌کننده یا سرکوب‌کننده رونویسی، بیان ژن‌های خاص را القا یا سرکوب می‌کند (Li et al. 2017; Piatek et al. 2015). به‌طور مشابه، RCas9 که اتصال و برش آر.ان.اِ را انجام می‌دهد، می‌تواند خاموشی پس از رونویسی با واسطه Cas9 را در توالی خاصی فعال کند (Nelles et al. 2015; O'Connell et al. 2014). دامنه کاربردهای RCas9 فراتر از خاموش کردن است.

کاربردهای CRISPR/Cas9 در آینده می‌تواند شامل اتصال dead RCas9 به نشانگرهای فلورسنت برای بررسی الگوهای بیان ژن فضایی-زمانی در طول آلودگی با بیمارگر یا حتی موقعیت‌یابی mRNA در بافت زنده گیاه باشد (Nelles et al. 2016). یک dead RCas9 همچنین می‌تواند با کتابخانه‌ای از آر.ان.ای‌های راهنما ترکیب شود تا رونوشت‌های خاصی را ارتقا بخشد. بعلاوه dCas9 با کاوشگرهای فلورسنت برای نشان دار کردن دی.ان.اِ در بافت (*in situ*)، مورد استفاده قرار گرفته است که ترکیب پروتئین‌های فلورسنت، تصویر زنده‌ای از دینامیک کروموزومی را در بافت امکان‌پذیر می‌سازد (Deng et al. 2015; Langner et al. 2018). تلفیق انواع Cas9 برای تصویربرداری از سلول زنده درک ما را از واکنش‌های گیاه میزبان در طول تهاجم بیمارگر افزایش می‌دهد (Langner et al. 2018).

علاوه‌بر این، dCas9 را می‌توان با دومین‌های پروتئینی فعال از نظر آنزیمی ادغام کرد. یکی از اولین پروتئین‌های ترکیبی، Cas9 -سیتیدین دآمیناز بود که ویرایش هدفمند باز، یعنی تبدیل سیتوزین به تیمین را ممکن می‌سازد (Komor et al. 2016). در ادامه، این سیستم با ترکیب نیکازها (nCas9) و مهارکننده‌های یوراسیل گلیکوزیلاز در یک واحد رونویسی با سیتیدین دآمینازها برای افزایش کارایی ویرایش بازها بهبود یافته است که نیکازها با ایجاد برش در یک رشته دی.ان.اِ شانس موتاسیون‌های ناخواسته را کاهش می‌دهند و همچنین بازدارنده‌های یوراسیل گلیکوزیلاز به سیستیدین دآمیناز اجازه تبدیل سیتوزین به

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

یوراسیل با کارایی بالا را می‌دهند (Lu et al. 2017). قدرت این سیستم برای کاربرد در تحقیقات گیاهی با ویرایش کارآمد بازها در برنج، گندم و ذرت نشان داده شده است. با افزایش اطلاعات در مورد ژن‌های حساسیت یا ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های گیرنده‌ی محرک سیستم ایمنی، امکان ویرایش بازهای خاص در ژنوم گیاهان جهت ایجاد آلل‌های مقاومت جدید یا شبیه به آلل‌های مقاومت طبیعی در اصلاح نباتات به وجود خواهد آمد (Zong et al. 2017).

محدودیت سیستم CRISPR/Cas9 در ایجاد مقاومت در گیاهان

در طول چندین دهه، پتانسیل سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی و افزایش مقاومت در برابر تعدادی از عوامل بیماریزای گیاهی نشان داده شده است (Liu et al. 2017). اما این سیستم دارای دو محدودیت اصلی است که شامل تکامل عوامل بیماریزا و تغییرات ژنومی است که مقاومت موجود در گیاهان را از بین می‌برند و محدودیت عمده بعدی این سیستم جهش خارج از هدف بیان شده است (Tyagi et al. 2020).

اگرچه حذف ژن حساسیت از میزبان آسان است و می‌توان با ایجاد یک یا دو جهش به آن دست یافت و همچنین این جهش‌ها نسبت به جهش ژن R دوام بیشتری دارند. (زیرا برای مبارزه با سیستم دفاعی گیاه، بیمارگر ممکن است فشار انتخابی پایینی را تحمل کند) (Pavan et al. 2010). اما این احتمال وجود دارد که حذف ژن حساسیت، بر سلامت و روند رشد گیاه تأثیر بگذارد و به عامل بیماریزا در ایجاد آلودگی کمک کند. این جهش‌ها ممکن است کشنده نباشند، اما می‌توانند سبب اثرات چندگانه مانند کوتاهی، کمبود مواد مغذی و سرکوب ژن‌های دخیل در فرایندهای رونویسی شوند (Ahmad et al. 2020; Pavan et al. 2010). برای مقابله با این چالش‌ها، باید واریانت‌های جدید ژن حساسیت طراحی شده و وارد گیاه شوند، یا از تکنیک ویرایش بازها استفاده کرد، همچنین می‌توان پروموتر اختصاصی ژن‌ها/آلل‌های مورد نظر را هدف قرار داد (Rodríguez Lea et al. 2017; Bastet et al. 2018).

با این حال، چندین مطالعه نشان داده است که حتی پس از حذف یا جهش در فاکتور شروع ترجمه، رشد گیاه تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد، اما برای تأیید آن به شواهد تجربی بیشتری نیاز است. دیگر محدودیت این سیستم، جهش خارج از هدف است که یک تغییر ناخواسته یا غیراختصاصی است که به صورت جهش نقطه‌ای، درج و جابجایی پس از ویرایش ژنوم رخ می‌دهد. این جهش‌های نامطلوب می‌توانند بر کارایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

سیستم تأثیر بگذارند یا عملکرد و ساختار ژن را تغییر داده و ممکن است بر اساس ماهیت، جهش سلول را تحت تاثیر قرار دهد (Pyott et al. 2016).

جهش خارج از هدف با استفاده از ابزارهای محاسباتی یا مهندسی مجدد مولفه‌های کریسپر مانند پروتئین‌های Cas، gRNA و غیره قابل بررسی است. چندین ابزار بیوانفورماتیکی مانند CasOFFinder و CCTop، Guideseq، HTGTS، BLESS، Digenome-seq و DISCOVER نیز برای کاهش جهش خارج از هدف استفاده می‌شود. امروزه پژوهشگران از مدل‌های ماشینی مانند Bowtie یا Elevation، مدل رگرسیون خطی و مدل تصادفی فورست (random forrest model) برای به حداقل رساندن جهش خارج از هدف و بهبود کارایی سیستم کریسپر استفاده می‌کنند. اگرچه این مدل‌ها در موارد متعددی موثر واقع شدند، اما مشخص شد که فقط در مورد هدف خاصی که برای آن طراحی شده‌اند، کارآمد هستند (Hahn et al. 2019).

از سوی دیگر، پژوهشگران پروتئین Cas9 را برای به حداقل رساندن جهش‌های خارج از هدف مهندسی مجدد کردند. چندین نوع Cas9 از جمله eSpCas9، HF-Cas9، HyperCas و SniperCas9 برای بهبود کارایی این پروتئین‌ها طراحی شده‌اند (Ahmad et al. 2020).

مسائل اخلاقی در محصولات ویرایش شده با CRISPR

بسیاری از مطالعات کارایی سیستم CRISPR/Cas9 در توسعه مقاومت به بیماری را در گیاهان حاوی ژن خارجی گزارش کردند. گزارشی از ویرایش ژنوم گیاه گوجه‌فرنگی، توسط کریسپر منتشر شد که بر اساس بیان مداوم cas9، پروتئین پوششی ویروس و ژن‌های ریپلیکاز مورد هدف قرار می‌گیرد (Macovei et al. 2018; Pyott et al. 2016). این گیاهان تراریخته به صورت قابل توجهی میزان ویروس کمی داشتند و تا نسل سوم پایدار بودند. با این حال، استفاده از چنین محصولاتی که به‌طور مداوم بیان کننده نوکلئاز هستند در گروه موجودات تراریخته (GMO) قرار می‌گیرند که در چندین کشور پذیرفته نشده است. به دلیل بالا بودن احتمال جهش خارج از هدف، مطلوب است که روش‌های عاری از ژن خارجی (transgene-free) ایجاد شود که از مقررات GMO پیروی کنند. انتظار می‌رود که استفاده از سیستم‌های CRISPR/Cas9 عاری از دی.ان.ا مانند RNP بتواند بر این محدودیت غلبه کند (Tyagi et al. 2020).

فرهنگ‌های مختلف، شرایط محیطی، علایق کشاورزان و فعالان صنعت کشاورزی، محیط زیست و سازمان‌ها باعث می‌شوند که دولت‌های سراسر جهان واکنش‌های متفاوتی نسبت به این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

محصولات نشان دهند. اگرچه محصولات اصلاح شده با کریسپر با فنوتیپ‌های بهبودیافته در حال کشت و فروش در چند کشور مانند ایالات متحده آمریکا و کانادا هستند، اما هنوز جهان در تلاش است تا دریابد آیا محصولات کریسپر باید به‌عنوان GMO تحت نظارت باشند یا خیر. ایالات متحده و کانادا محصولات ویرایش شده با کریسپر را جزء GMO نمی‌دانند و کشت و فروش آن بدون برچسب GMO امکان‌پذیر است. طبق مقررات وزارت کشاورزی ایالات متحده (USDA)، محصولات ویرایش شده CRISPR/Cas9 را می‌توان بدون نظارت کشت و به فروش رساند. برخی از محصولات اصلاح شده CRISPR/Cas9 که از مقررات GMO معاف شده اند عبارتند از قارچ دکمه‌ای سفید که در آن حذف ژن پلی فنول اکسیداز (PPO) مانع قهوه‌ای شدن قارچ می‌شود، حذف ژن *Wx1* در ذرت مومی، ویرایش ژنوم چمن green bristle grass جهت تاخیر در زمان گلدهی، ویرایش ژنوم کاملینا برای بهبود مقدار روغن و سویا جهت مقاومت نسبت به تنش خشکی (Wang et al. 2016; Waltz et al. 2018).

نتیجه‌گیری

مطالعاتی که تا اینجا انجام شده است پتانسیل ژن‌های حساسیت (*S*) و سیستم CRISPR-Cas9 را در ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماریزای باکتریایی، قارچی و ویروسی نشان می‌دهد. این سیستم چند بعدی افق ما را در زمینه مهندسی ژنوم گسترش داده و ما را قادر می‌سازد تا اسرار مولکولی منحصر به فرد و پیچیده‌ای را درون سیستم زنده کشف کنیم. با این وجود، چالش‌هایی وجود دارد که باید برطرف شود. اما ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیمارگر گیاهی با استفاده از ویرایش ژنوم توسط کریسپر می‌تواند رویکردی امیدوارکننده برای غلبه بر موانع تولید و توسعه باشد. رویکردهای مختلف اومیکس، مانند ترنسکریپتومیک، پروتئومیک و متابولومیک باید برای کشف مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مطالعات برهمکنش‌های گیاه و بیمارگر مورد استفاده قرار گیرد (Patterson et al. 2019). پژوهشگران متابولومیک را با سایر رویکردهای اومیکس ترکیب کردند تا نمای جامعی از فرایندهای سلولی را در زمینه فیزیولوژیکی به‌دست آورند (Bao et al. 2020). به‌عنوان مثال، تجزیه و تحلیل متابولیسم‌های هیپوکوتیل سویا و میوه توت در پاسخ به آلودگی با *Phtyophthora sojae* و *Ciboria shiraiana* (Zhu et al. 2018; Castro Moretti et al. 2020) انجام شد و راه را برای تحقیقات آینده عوامل تعیین‌کننده متابولیک حیاتی در مطالعات بیماری‌زایی گیاه هموار کرد. انتظار می‌رود که در آینده توسعه سیستم کریسپر همراه با تکنیک‌های دیگر (GE/omics) باعث ایجاد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

گونه‌های گیاهی مقاوم در برابر بیماری‌ها و انواع تنش‌های محیطی شود که نتیجه آن تأمین غذای کافی برای جامعه است. محصولات اصلاح شده توسط کریسپر که قبلاً توسعه یافته و در انتظار عبور از موانع قانونی هستند نیز ممکن است مورد استقبال قرار گیرند و سایر محصولات با ویژگی‌های مطلوب‌تر مانند بهبود عملکرد، خواص دارویی (به شکل واکسن خوراکی) توسعه داده شوند. فناوری CRISPR/Cas9 به‌عنوان یک ابزار قدرتمند ویرایش و تنظیم ژن، در حال حاضر در حال شتاب بخشیدن به حوزه‌های علم کشاورزی و توسعه کشاورزی پایدار است و دانشمندان معتقدند که کاربرد گسترده آن در تحقیقات زیست‌شناسی گیاهی و میکروبی به‌طور قابل‌توجهی دانش ما را از زیست‌شناسی و مقاومت به بیماری در سال‌های آینده افزایش خواهد داد.

فهرست منابع

References

Ahmad S, Wei X, Sheng Z, Hu P, Tang S. 2020. CRISPR/Cas9 for development of disease resistance in plants: recent progress, limitations and future prospects. Briefings in Functional Genomics. 19(1): 26-39.

Ali Z, Abul Faraj A, Li L, Ghosh N, Piatek M, Mahjoub A, Aouida M, Piatek A, Baltes NJ, Voytas DF, Dinesh Kumar S. 2015. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. Molecular Plant. 8(8):1288-1291.

Anders C, Bargsten K, Jinek M. 2016. Structural plasticity of PAM recognition by engineered variants of the RNA-guided endonuclease Cas9. Molecular cell. 61(6): 895-902.

Aparicio T, de Lorenzo V, Martínez García E. 2018. CRISPR/Cas9-based counterselection boosts recombineering efficiency in *Pseudomonas putida*. Biotechnology Journal. 13(5):1700161.

Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. 2014. DNA replicons for plant genome engineering. The Plant Cell. 26(1):151-163.

Bao L, Gao H, Zheng Z, Zhao X, Zhang M, Jiao F, Su C, Qian Y. 2020. Integrated transcriptomic and un-targeted metabolomics analysis reveals mulberry fruit (*Morus atropurpurea*) in response to sclerotiniose pathogen *Ciboria shiraiana* infection. International Journal of Molecular Sciences. 21(5):1789.

Bastet A, Lederer B, Giovinazzo N, Arnoux X, German Retana S, Reinbold C, Brault V, Garcia D, Djennane S, Gersch S, Lemaire O. 2018. Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants. Plant Biotechnology Journal. 16(9):1569-1581.

Borisjuk N, Kishchenko O, Eliby S, Schramm C, Anderson P, Jatayev S, Kurishbayev A, Shavrukov Y. 2019. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. BioMed Research International. 10. 6216304. doi: 10.1155/2019/6216304.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Castro Moretti FR, Gentzel IN, Mackey D, Alonso AP. 2020. Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions. Metabolites. 10(2): 52. doi: 10.3390/metabo10020052

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339(6121): 819-823.

Das A, Sharma N, Prasad M. 2019. CRISPR/Cas9: a novel weapon in the arsenal to combat plant diseases. Frontiers in Plant Science. 9: 2008. doi: 10.3389/fpls.2018.02008

Deng W, Shi X, Tjian R, Lionnet T, Singer RH. 2015. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated *in situ* labeling of genomic loci in fixed cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112(38): 11870-11875.

Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. 2016. beyond editing: repurposing CRISPR/Cas9 for precision genome regulation and interrogation. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 17(1): 5-15.

Dong OX, Ronald PC. 2019. Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. Plant Physiology. 180(1):26-38.

Gaj T, Sirk SJ, Shui SL, Liu J. 2016. Genome-editing technologies: principles and applications. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 8(12): a023754. doi: 10.1101/cshperspect.a023754.

Gimenez Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, García Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V, Solano R. 2017. JAZ 2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. New Phytologist. 213(3): 1378-1392.

Gosavi G, Yan F, Ren B, Kuang Y, Yan D, Zhou X, Zhou H. 2020. Applications of CRISPR technology in studying plant-pathogen interactions: overview and perspective. Phytopathology Research 2(1):1-9.

Hahn F, Nekrasov V. 2019. CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? Plant Cell Reports. 38(4):437-441.

Hilton IB, D'ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. Nature Biotechnology. 33(5): 510-517.

Huibers RP, Loonen AE, Gao D, Van den Ackerveken G, Visser RG, Bai Y. 2013. Powdery mildew resistance in tomato by impairment of SlPMR4 and SlDMR1. PLoS One. 8(6): 67467. doi: 10.1371/journal.pone.0067467.

Idnurm A, Urquhart AS, Vummadi DR, Chang S, Van de Wouw AP, López Ruiz FJ. 2017. Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. Fungal Biology and Biotechnology. 4(1):1-12.

Imam J, Singh PK, Shukla P. 2016. Plant microbe interactions in post genomic era: perspectives and applications. Frontiers in Microbiology. 7:1488. doi: 10.3389/fmicb.2016.01488.

Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. 2018. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. Journal of Bacteriology. 200(7):e00580-17.

Jemal M, Aschale N, TEBJE A. 2022. Application of crispr for plant genome editing: A review. International Journal of Novel Research in Life Sciences. 9(2):84-103.

Ji X, Wang D, Gao C. 2019. CRISPR editing-mediated antiviral immunity: a versatile source of resistance to combat plant virus infections. Science China Life sciences. 62(9): 1246-1249.

Jia H, Orbovic V, Jones JB, Wang N. 2016. Modification of the *PthA4* effector binding elements in type I CsLOB1 promoter using Cas9/sg RNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4: dCs LOB 1.3 infection. Plant Biotechnology Journal. 14(5):1291-1301.

Jiang F, Doudna JA. 2017. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. Annual Review of Biophysics. 46:505-529.

Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology. 31(3): 233-239.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337(6096): 816-821.

Joshi RK, Nayak S. 2010. Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 5(3): 51-60.

Kalinina NO, Khromov A, Love AJ, Taliansky ME. 2020. CRISPR applications in plant virology: virus resistance and beyond. Phytopathology. 110(1): 18-28.

Khatodia S, Kharb P, Batra P, Chowdhury VK. 2014. Development and characterization of transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants with cry1Ac gene using tissue culture independent protocol. International Journal of Advanced Research. 2(8):323-331.

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 533(7603): 420-424.

Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Current Opinion in Microbiology. 37: 67-78.

Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. 2018. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nature Biotechnology. 36(8): 765-771.

Langner T, Kamoun S, Belhaj K. 2018. CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. Annual Review of Phytopathology. 56: 479-512.

Li Z, Zhang D, Xiong X, Yan B, Xie W, Sheen J, Li JF. 2017. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. Nature Plants. 3(12): 930-936.

Liu D, Huang C, Guo J, Zhang P, Chen T, Wang Z, Zhao X, 2019. Development and characterization of a CRISPR/Cas9n-based multiplex genome editing system for *Bacillus subtilis*. Biotechnology for Biofuels. 12(1): 1-17.

Liu H, Soyars CL, 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(3):e00047. doi: 10.1002/pld3.47.

Liu L, Li X, Wang J, Wang M, Chen P, Yin M, Li J, Sheng G, Wang Y. 2017. Two distant catalytic sites are responsible for C2c2 RNase activities. Cell. 168(1-2): 121-134.

Lu Y, Zhu JK. 2017. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. Molecular Plant. 10(3):523-525.

Ma J, Chen J, Wang M, Ren Y, Wang S, Lei C, Cheng Z. 2018. Disruption of OsSEC3A increases the content of salicylic acid and induces plant defense responses in rice. Journal of Experimental Botany. 69(5):1051-1064.

Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet Loedin I, Čermák 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(11):1918-1927.

Mahfouz MM, Piatek A, Stewart Jr CN. 2014. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. Plant Biotechnology Journal. 12(8):1006-1014.

Makarova KS, Koonin EV. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology 189(4): 1199-1208.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology. 13(11): 722-736.

Malnoy M, Viola R, Jung MH, Koo OJ, Kim S, Kim JS, Velasco R, Nagamangala Kanchiswamy C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Frontiers in Plant Science. 7:1904. doi: 10.3389/fpls.2016.01904.

Malzahn A, Lowder L, Qi Y. 2017. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. Cell & Bioscience. 7(1):1-8.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

McGrann GR, Stavrinides A, Russell J, Corbitt MM, Booth A, Chartrain L, Thomas WT, Brown JK. 2014. A trade off between *mlo* resistance to powdery mildew and increased susceptibility of barley to a newly important disease, Ramularia leaf spot. Journal of Experimental Botany. 65(4): 1025-1037.

Nejat N, Rookes J, Mantri NL, Cahill DM. 2017. Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. Critical Reviews in Biotechnology. 37(2):229-237.

Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports. 7(1): 1-6.

Nelles DA, Fang MY, Aigner S, Yeo GW. 2015. Applications of Cas9 as an RNA-programmed RNA-binding protein. BioEssays. 37(7): 732-739.

Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, Xu JL, Markmiller SJ, Doudna JA, Yeo GW. 2016. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. Cell. 165(2): 488-496.

O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. 2014. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. Nature. 516(7530): 263-266.

Ortigosa A, Gimenez Ibanez S, Leonhardt N, Solano R. 2019. Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *Sl JAZ 2*. Plant Biotechnology Journal. 17(3):665-673.

Patterson EL, Saski C, Küpper A, Beffa R, Gaines TA. 2019. Omics potential in herbicide-resistant weed management. Plants. 8(12): 607-621.

Paula de Toledo Thomazella D, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz B. (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 118(27).

Pavan S, Jacobsen E, Visser RG, Bai Y. 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. Molecular Breeding. 25: 1-12.

Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. Plant Biotechnology Journal. 15(12):1509-1519.

Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al Shareef S, Aouida M, Mahfouz MM, 2015. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. Plant Biotechnology Journal, 13(4):578-589.

Pyott DE, Sheehan E, Molnar A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. Molecular Plant Pathology. 17(8): 1276-1288.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 154(6): 1380-1389.

Ran Y Liang Z, Gao C, 2017. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. Science China Life Sciences. 60: 490-505.

Rodríguez Leal D, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB. 2017. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. Cell. 171(2): 470-480.

Sander JD, Joung, JK. 2014. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. Nature Biotechnology. 32(4): 347–355.

Schaeffer SM, Nakata PA. 2016. The expanding footprint of CRISPR/Cas9 in the plant sciences. Plant Cell Reports. 35(7): 1451-1468.

Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR–Cas9. Nature Reviews Genetics. 16(5): 299-311.

Shams-bakhsh M, Falahi-Charkhabi N, Rahimian H. 2018. Transcription activator-like effectors (TALEs) role in plant response to *Xanthomonas*. Journal of Agricultural Biotechnology. 10(3): 87-110. (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. Nature Biotechnology. 35(5): 441-443.

Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature. 507(7490): 62-67.

Sun J, Wang Q, Jiang Y, Wen Z, Yang L, Wu J, Yang S. 2018. Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system. Microbial Cell Factories. 17: 1-17.

Tang Y, Fu Y. 2018. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. Cell and Bioscience. 8(1):1-13.

Tripathi JN, Ntui VO, Ron M, Muiruri SK, 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(1):46-56.

Tyagi S, Kumar R, Das A, Won SY, Shukla P. 2020. CRISPR-Cas9 system: a genome-editing tool with endless possibilities. Journal of Biotechnology. 319: 36-53.

Tyagi S, Kumar R, Kumar V, Won SY, Shukla P. 2021. Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. GM Crops and Food. 12(1): 125-144.

VALE FXR, Parlevliet JE, ZAMBOLIM L. 2001. Concepts in plant disease resistance. Fitopatologia Brasileira. 26: 577-589.

Van Der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology. 12(7):479-92.

Waltz E, 2018. CRISPR-edited plants reach market in record time. Nature biotechnology. 36(1):6-8.

Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K. 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. PloS One. 11(4):e 0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027.

Wang X, Tu M, Wang D, Liu J, Li Y, Li Z, Wang Y, Wang X. 2018. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. Plant Biotechnology Journal. 16(4):844-855.

Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nature Biotechnology. 32(9): 947-951.

Yin K, Qiu JL. 2019. Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 374(1767):20180322. doi: 10.1098/rstb.2018.0322.

Zaidi SSEA, Mahas A, Vanderschuren H, Mahfouz MM. 2020. Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. Genome Biology. 21(1): 1-19.

Zeilmaker T, Ludwig NR, Elberse J, Seidl MF, Berke L, Van Doorn A, Schuurink RC, Snel B, Van den Ackerveken G. 2015. DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR 6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. The Plant Journal. 81(2): 210-222.

Zeng W, Melotto M, He SY. 2010. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. Current Opinion in Biotechnology. 21(5): 599-603.

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(8):1415-1423.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D. 2017. Simultaneous modification of three homoeologs of Ta EDR 1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. The Plant Journal. 91(4): 714-724.

Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. Nucleic Acids Research. 42(17):10903-10914.

Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu BO, Eom JS, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. The Plant Journal. 82(4): 632-643.

Zhu L, Zhou Y, Li X, Zhao J, Guo N, Xing H. 2018. Metabolomics analysis of soybean hypocotyls in response to *Phytophthora sojae* infection. Frontiers in Plant Science. 9:1530. doi: 10.3389/fpls.2018.01530

Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nature Biotechnology. 35(5): 438-440.

Application of CRISPR/Cas9 System in Plant-Pathogen Interaction

Maryam Ghermezi Nejad[1], Fatemeh Shahryari[2*], Ashkan Aali Mohammadi[1]

1- Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

shahryari@znu.ac.ir

Abstract

Targeted genome editing technology is becoming one of the most important genetic tools widely used in plant pathology. In recent years, CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) and CRISPR-related proteins discovered in prokaryotes immune systems have been successfully used in various genome editing tools due to their simplicity, high efficiency, and versatility. The CRISPR/Cas system, with targeted, precise, and strong genome modification, has improved the crop and paved the way for new methods of improving the genetic resistance of plants against plant diseases. This review provides an overview of the CRISPR/Cas9 system, derived tools, and their applications in plant pathology. Also, the creation of resistance against bacterial, fungal, and viral pathogens in the host using CRISPR/Cas-based tools is described and the limitations of the CRISPR-Cas9 system, the regulation of products edited with CRISPR-Cas9, and the future of this technology are discussed.

Keywords: CRISPR/Cas9, Engineering Resistance, Genome Editing, Plant Susceptibility Factors.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]