**مجله ایمنی زیستی**

**دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹**

**ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی**

# موفقیت‌های ویرایش ژنومی با فناوری CRISPR/Cas9 در برنج

**پیمان شریفی**

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

peyman.sharifi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۴، تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۶

صفحه ۲۲-۱

## چکیده

برنج (*Oryza sativa* L) منبع اصلی غذای بخش زیادی از مردم جهان است. در دهه‌های اخیر، پیشرفت‌های فوق‌العاده‌ای در توسعه واریته‌های جدید برنج با استفاده از روش‌های به‌نژادی سنتی، جهش‌زایی و مولکولی صورت گرفته است. ایستائی بهبود عملکرد دانه برنج در دهه اخیر، به‌دلیل ظهور آفات و پاتوژن‌های گیاهی، تغییرات آب و هوایی و سایر مسائل زیست محیطی گزارش شده است. سیستم CRISPR/Cas9 از همه توانایی‌های ویرایش ژنوم همچون از کار انداختن، ترمیم کردن، جدا کردن و فعال‌سازی بیان ژن‌ها بهره می‌گیرد. پژوهشگران با ویرایش ژن‌های کنترل‌کننده صفاتی همچون تعداد خوشه در بوته، تعداد دانه در خوشه، وزن دانه، تاریخ رسیدگی، محتوی آمیلوز، دمای ژلاتینه‌شدن، طول و عرض دانه و همچنین مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و ژن‌های سنتزکننده هورمون‌های گیاهی به موفقیت‌های چشمگیری در به‌نژادی برنج دست یافته‌اند. تغییر مسیر پژوهش‌ها به سوی بهره‌گیری از سیستم‌های CRISPR/Cas9 برای جهش‌زایی هدفمند، می‌تواند یک روش امیدوارکننده برای غلبه بر محدودیت‌ها و موانع به‌نژادی برنج باشد. در این مقاله، به‌کارگیری سیستم ویرایش CRISPR/Cas9 و پیشرفت‌ها در برنج بحث شده است. به‌نظر می‌رسد CRISPR/Cas9 و ابزارهای ویرایش ژنوم همراه با آن، انقلابی در به‌نژادی برنج پدیدار کنند که برای برآورده کردن خواست‌ها و تأمین نیاز برنج برای نسل‌های آینده بسیار مهم باشد.

**واژه‌های کلیدی**: به‌نژادی، تراریخته، تغذیه گیاهی، کیفیت دانه، مقاومت به تنش‌ها، مهندسی ژنتیک، QTL.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

## مقدمه

بشر برای رسیدن به فناوری‌های نوین به‌نژادی گیاهی، مراحل گزینش در طبیعت، اصلاح سنتی، هیبریداسیون، جهش‌زایی، اصلاح به کمک نشانگرها و تولید تراریخته‌ها (۱) را پشت سر گذارده است تا به جدیدترین فناوری مهندسی ژنتیک در عصر حاضر یعنی ویرایش ژنوم دست یابد (۲). بهره‌گیری هدفمند از روش‌های مهندسی ژنتیک، سبب بهبود صفات گیاهان زراعی در فاصله زمانی کوتاه‌تر نسبت به روند اصلاح سنتی می‌شود (۳). بنابراین، ابزارهای ژنتیک معکوس، سرعت به‌نژادی را از طریق اصلاح هدفمند ژنوم افزایش می‌دهد. در این راهبرد جدید، از تغییرات ژنومی با استفاده از فناوری‌های ویرایش ژنوم (Genome editing technologies (GETs)) مانند تناوب‌های کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)) / پروتئین ۹ مرتبط با CRISPR (CRISPR-associated protein 9) به اختصار، CRISPR-Cas9، برای ژنتیک معکوس بهره گرفته می‌شود (۴). کمپلکس کریسپر (CRISPR-Cas9)، بخشی از دی.ان.ای باکتری است که دربرگیرنده تناوب‌های کوتاهِ توالی‌های بنیادین است و نوعی سیستم ایمنی در باکتری‌هاست (۵) که آن‌ها را به شناسایی و تجزیه دی.ان.ای تزریقی از طریق ویروس‌ها (به‌عنوان یک دی.ان.ای بیگانه) توانا می‌سازد (۶). بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به‌نام Cas9 است که توانایی جستجو، برش‌زدن و سرانجام از هم‌پاشیدن دی.ان.ای ویروس را دارد. با کشف این سیستم، دانشمندان به‌طور دقیقی قادر به خاموش کردن (Knock-out) یا واردکردن (Knock-in) هر ژنی در هر نقطه‌ای از ژنوم موجودات شدند (۷). این فناوری امکان بریدن بخشی از دی.ان.ای و اتصال دوباره انتهاهای بریده‌شده را فراهم می‌آورد که در نتیجه آن ژن رمزکننده صفت نامطلوب حذف می‌شود، یا یک عملیات تعمیری بر روی آن اجرا می‌شود و ژن معیوب تبدیل به ژن سالم می‌شود (۸). از مزیت‌های این فناوری کریسپر نسبت به تراریخته نیاز نداشتن به گنجاندن مواد ژنتیکی خارجی در سلول



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

موجود زنده، توانایی کار کردن بر روی صفات کمّی و پلی‌ژن (همچون مهندسی ژن‌های درگیر در عملکرد)، ایمنی بیشتر، نسبتاً کم‌هزینه و سریع‌تر بودن، دارای دقت و درجه کنترل بیشتر بر نتایج است (۴). در ادامه بخش‌های این مقاله، به‌کارگیری سیستم ویرایش CRISPR/Cas9 و پیشرفت‌های بدست آمده از آن در برنج بحث شده است.

## مروری بر سازوکار سیستم CRISPR/Cas9 و روش ویرایش ژنوم با آن

سیستم CRISPR/Cas برای نخستین بار در سال ۱۹۷۸ در ژنوم باکتری *Escherichia coli* به‌عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در برابر هجوم باکتریوفاژها و ورود دی.ان.ای خارجی مانند پلاسمیدها به درون سلول باکتری شناسایی شد و به‌دنبال آن در سال ۲۰۰۰ میلادی خانواده‌های ژنی CRISPR در تمام پروکاریوت‌ها شناسایی شدند (۹). این سیستم دربرگیرنده دو ناحیه ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های نوکلئازی Cas و مکان ژنی آرایه‌های CRISPR حاوی توالی‌های تکراری (Repeat sequence) و توالی‌های فاصله‌دهنده (Spacer sequence) بین آن‌ها است. طول توالی‌های تکراری در حدود ۲۵-۵۰ جفت باز و به تعداد بیش از ۲۴۹ عدد و ناحیه فاصله‌دهنده محتوی توالی‌های غیرتکراری در حدود ۲۶-۷۲ جفت باز است. همچنین توالی رهبر به طول تقریبی ۵۰۰-۲۰۰ جفت باز از توالی‌های غنی از AT تشکیل شده است، که به‌عنوان یک توالی پیشبر برای نسخه‌برداری آرایه‌های مکان ژنی CRISPR ضروری است. ژن‌های وابسته به کریسپر به تعداد ۴ عدد (Cas 1-4) در نزدیک ناحیه آرایه‌های CRISPR قرار گرفته‌اند که رمزکننده پروتئین‌های ضروری جهت القای پاسخ ایمنی توسط باکتری در برابر حمله ویروس هستند (۱۰).

در شکل ۱ مراحل ویرایش ژنوم با CRISPR/Cas9 نشان داده شده است. در این سیستم، دی.ان.ای خارجی با دو جزء Cas9 و RNA تک راهنما (Single guide RNA (sgRNA)) برش داده می‌شود. Cas9، یک دی.ان.ای آندونوکلئاز است که می‌تواند از باکتری‌های مختلفی همچون *Brevibacillus*



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

*Staphylococcus aureus*، *laterosporus*، *Streptococcus pyogenes*، *Streptococcus thermophilus* و *Streptococcus pyogenes* جداسازی شود. دومین HNH، رشته مکمل CRISPR RNA (crRNA) را برش می‌دهد، درحالی‌که دومین شبه RucV، رشته متضاد دی.ان.ای دو رشته را می‌شکافد. sgRNA، یک آر.ان.ا با طول حدود ۱۰۰ نوکلئوتید است. انتهای ′۵ آن، دارای توالی ۲۰ نوکلئوتیدی است که به‌عنوان توالی راهنما برای شناسایی توالی هدف همراه با توالی موتیف مجاور protospacer (PAM) عمل می‌کند، که اغلب NGG (N، هر نوکلئوتیدی؛ G، گوانین) است. ساختار حلقه در انتهای ′۳ sgRNA می‌تواند توالی هدف را توسط دنباله راهنما محکم نگاه دارد و یک کمپلکس را با Cas9 تشکیل دهد، که دی.ان.ای دو رشته را برش می‌دهد و شکاف دو رشته‌ای (Double-strand break (DSB)) را در این مکان تشکیل می‌دهد. هنگامی‌که DSB ایجاد می‌شود، مکانیسم‌های تعمیر دی.ان.ای شامل NHEJ (Honhomologous end-joining (NHEJ)) یا HDR (Homology-directed repair (HDR)) راه انداخته می‌شوند. در بیشتر مواقع، معمولاً یک DSB با NHEJ ترمیم می‌شود و روشی ساده برای ایجاد عدم تطابق و درج/حذف ژن (indel) است و منجر به ناک اوت شدن ژن می‌شود. این درحالی است که در سازوکار HDR که توسط نوترکیبی همولوگ موضعی انجام می‌شود، توالی جدید به این ناحیه برش یافته اضافه می‌شود. هنگامی‌که یک الگوی (Oligo-template) موجود باشد، HDR باعث جایگزینی ژن خاص یا وارد کردن دی.ان.ای خارجی می‌شود (۴).

## مثال‌هایی از کاربرد سیستم کریسپر در برنج

### بهبود عملکرد دانه و دیگر ویژگی‌های زراعی برنج

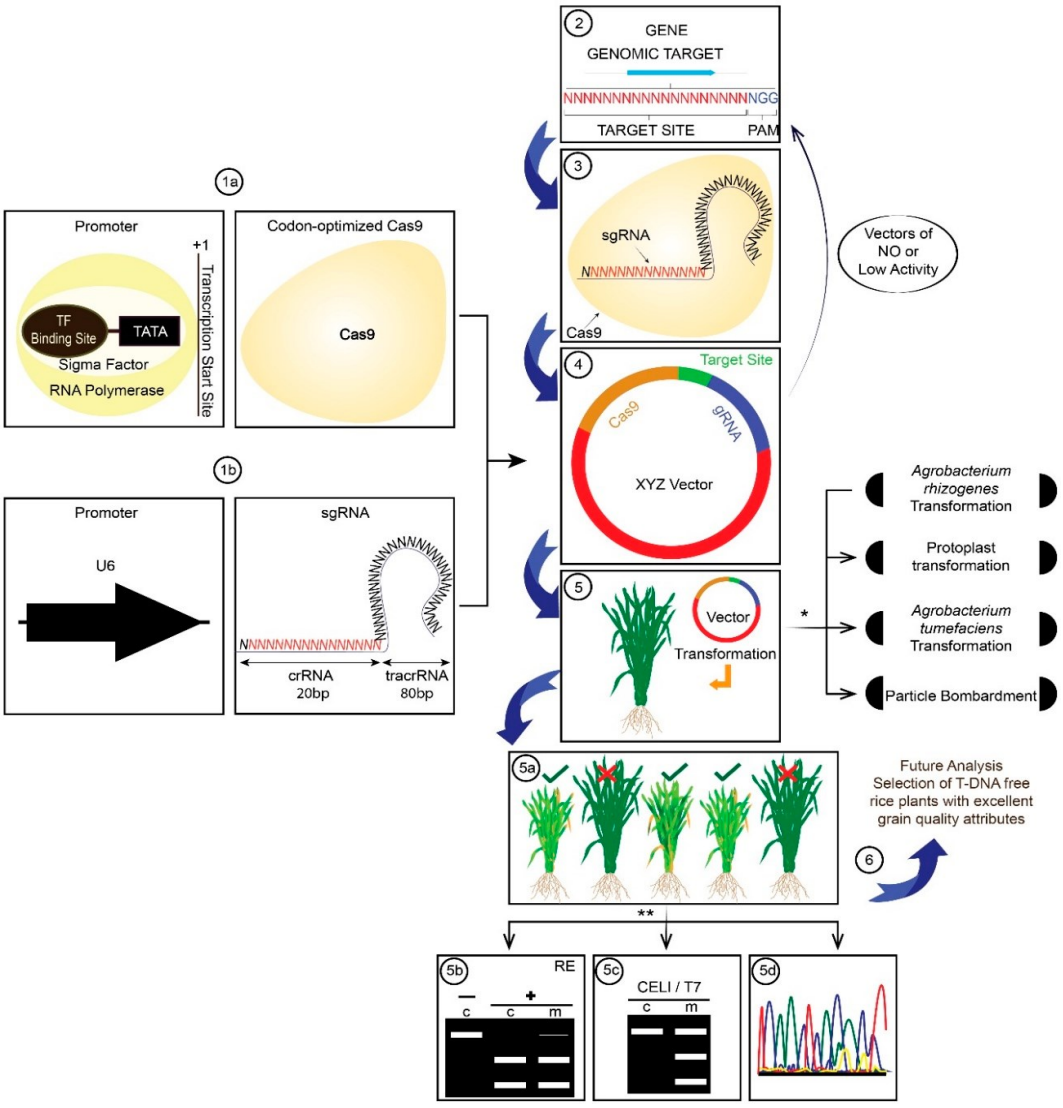
عملکرد به‌طور عمده توسط سه مؤلفه اصلی تعداد خوشه در بوته، تعداد دانه در خوشه و وزن دانه تعیین‌می‌شود (۱۱). ناک‌اوت کردن ژن‌هایی همچون GS3، IPA1، DEP1، GS5، GW2، Gn1a و TGW6، (۱۲،۱۳،۱۴) که تنظیم‌کننده منفی اندازه دانه، تعداد و وزن دانه هستند،



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

به‌صورت یک روش مستقیم برای بهبود متوسط عملکرد دانه برنج به‌کار گرفته شده است و منجر به فنوتیپ‌های با تعداد دانه و وزن هزار دانه افزایش یافته، خوشه‌های افراشته متراکم، اندازه دانه بزرگتر شده است. ویرایش ژنوم مولتی‌پلکس (Multiplex) به‌واسطه CRISPR/Cas9، در سه ژن اصلی درگیر در تاریخ رسیدگی (Hd2، Hd4 و Hd5) برنج به‌کار گرفته شده و تاریخ رسیدگی در لاین‌های جهش یافته کوتاه‌تر شده است (۱۵).




**شکل ۱**- فلوچارت سیستم ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

سیستم CRISPR/Cas9 از دو جزء تشکیل شده است؛ (1a) اندونوکلئاز Cas9؛ (1b) یک تک راهنما RNA (sgRNA). جزء sgRNA، دربرگیرنده یک توالی فاصله‌دهنده و در پی آن ۷۹ نوکلئوتید از یک توالی مصنوعی tracrRNA و crRNA است؛ (۲) توالی فاصله‌دهنده ۲۰ نوکلئوتید طول دارد و به‌طور اختصاصی به توالی دی.ان.ای هدف شامل یک موتیف PAM 5'-NGG-3' در انتهای '۳ متصل می‌شود، که برای ژن هدف بسیار ویژه است؛ (۳) tracrRNA و توالی crRNA یک ساختار آر.ان.ای حلقه-ساقه را تشکیل می‌دهند که به آنزیم Cas9 متصل می‌شود؛ tracrRNA به Cas9 می‌پیوندد؛ (۴) sgRNA مونتاژشده با توالی هدف و ساختار وکتور Cas9 به‌هم متصل می‌شوند؛ (۵) انتقال ساختار وکتور به برنج با روش‌های مختلف انتقال. (5a) غربال‌گری و انتخاب گیاهان جهش‌یافته برنج بر اساس تغییرات فنوتیپی؛ (5b)از دست دادن جایگاه آنزیم محدودکننده تولید یک لاین گیاه جهش‌یافته (c، شاهد؛ m، جهش‌یافته؛ RE، آنزیم محدودکننده)؛ (5c) سنجش Surveyor Assay (CEL1 و T7 اندونوکلئازهای دی.ان.ای هستند که در سنجش نقشه استفاده می‌شوند)؛ (5d) نسل بعدی توالی‌یابی. (۶) تجزیه بعدی برای به‌دست آوردن گیاهان عاری ازT-DNA و آزمایش‌های بیشتر برای اثبات تغییرات فنوتیپی ناشی از حذف ژن مورد بررسی. * تکنیک‌های مختلف برای تغییر ساختار وکتور. ** بازسازی و غربالگری گیاهان تراریخته برای وقایع ویرایش ژن (۴).

رشد و نمو نیز توسط چندین فیتوهورمون و شبکه‌های سیگنالینگ همپوشان آنها کنترل می‌شود. اسید آبسیزیک (ABA)، یک فیتوهورمون مهم است که در بازدارندگی رشد گیاهان مؤثر است و از سایر بازدارنده‌های طبیعی گیاهان قوی‌تر است و فرایندهایی مانند رکود بذرها، جوانه‌ها و نیز ریزش اندام‌ها را کنترل می‌کند و به‌طور مثبت خواب بذر و مقاومت به خشکی را نیز در گیاه تنظیم می‌کند. پروتئین‌های خانواده مقاومت به پیرابتاکتین ۱ (pyrabactin resistance 1 (PYR1))، شبه PYR1(PYR1-like (PYL)) - و اجزای تنظیمی گیرنده ABA (regulatory components of the ABA receptor (RCAR)) رسپتورهای آن هستند و آبسزیک اسید به این گیرنده‌ها چسبیده و باعث یکسری واکنش‌هایی می‌شود که به بسته‌شدن منافذ برگ‌های گیاهان می‌انجامد. پیراباکتین، یک ماده سنتتیک و از ترکیبات سولفانامید است که به‌عنوان آگونیست (ماده شیمیایی که در یک سلول با اتصال به گیرنده‌های آن سلول باعث پاسخ و واکنش آن سلول می‌شود) ABA معرفی شده است که مسیر واکنش ABA را پیش می‌برد. این گیرنده‌ها، نوعی پروتئین محلول



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

با یک دومین START محافظت‌شده هستند که می‌توانند به ABA متصل شده و مسیر پایین‌دست را راه‌اندازی کنند. بیان بیش از حد برخی از این گیرنده‌ها همچون PtPYRL1 یا PtPYRL5 با تنظیم مثبت سیگنالینگ ABA در گیاه، به‌طور معنی‌داری مقاومت به تنش‌های خشکی، اسمزی و سرما را افزایش می‌دهد (۱۶). از فناوری CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژن گروه I (PYL1–PYL6 و PYL12) و گروه II (PYL7-PYL11 و PYL13) ژن‌های PYL در برنج استفاده شده است که به افزایش رشد در برنج انجامیده است (۱۷). جهش ژن‌های گروه I (PYL1–PYL6 و PYL12) باعث افزایش رشد برنج شد و در بین آن‌ها pyl1/4/6 بیشترین رشد قوی و بهبود باروری دانه را نشان داد، در حالی‌که خواب بذر و سایر صفات زراعی تقریبا نرمال ماند (۱۷). این نتایج استراتژی ژنتیکی دیگری را برای بهبود باروری برنج ارائه می‌دهد.

**بهبود کیفیت دانه با ویرایش ژنوم**

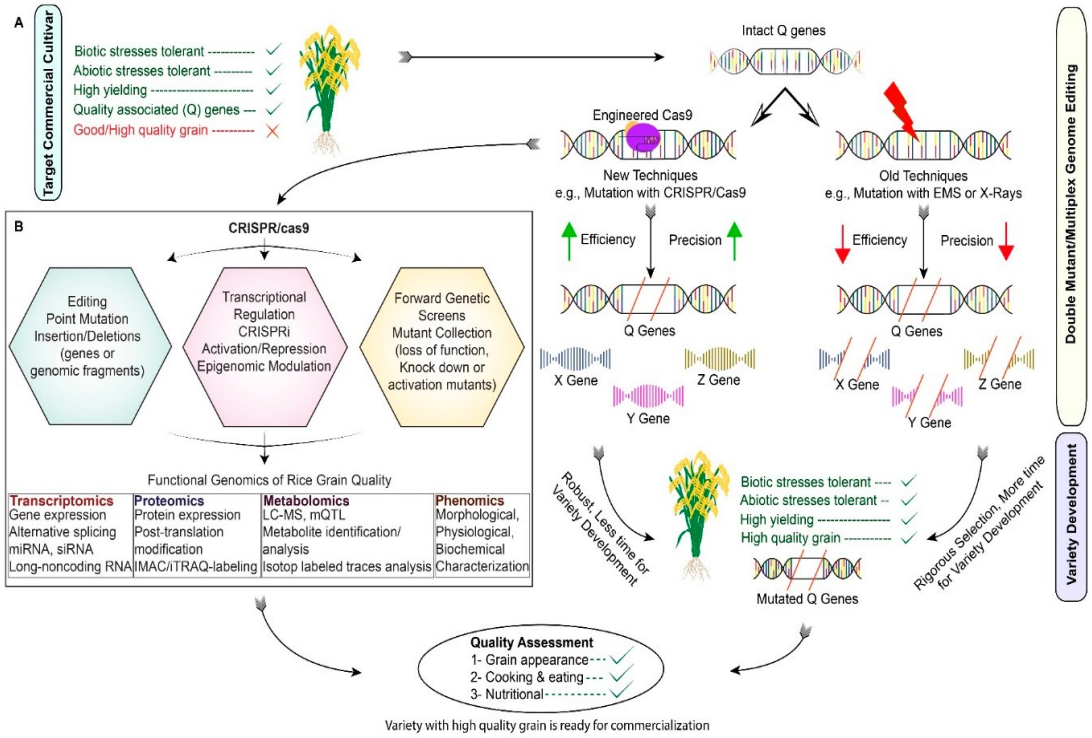
کیفیت دانه که دربرگیرنده ویژگی‌هایی همچون کیفیت پخت، کیفیت تبدیل، کیفیت ظاهری دانه، کیفیت تغذیه‌ای و عطر و طعم برنج است، به‌همراه عملکرد دانه از هدف‌های کلیدی برای به‌نژادگران برنج است که صفاتی چندژنی هستند که به‌طور همزمان تحت تأثیر عوامل بسیاری قرار دارند. به‌نژادی برای ارقام نیمه‌پاکوتاه و هیبریدها به میزان قابل‌توجهی در دستیابی به عملکرد بالا کمک کرده است، اما کاهش کیفیت دانه را نیز در پی داشته است. بهبود ویژگی‌های کیفیت دانه برنج از طریق ویرایش هدفمند ژنوم، یک رویکرد پرشتاب، پایدار و پربازده است، به‌طوری‌که ابزارهای ژنتیکی معکوس، سرعت به‌نژادی را از طریق اصلاح هدفمند ژنوم افزایش داده است (شکل ۲) (۴). گام اول استفاده از CRISPR/Cas9، کشف ژن‌های با اهمیت است. رویکردهای ژنتیک رو به جلو و ژنتیک معکوس می‌توانند برای شناسایی ژن‌های مسئول تغییر فنوتیپی به کار گرفته شوند (۱۸). دمای ژلاتینه شدن (GT) و ساختار آمیلوپکتین با یک QTL اصلی به‌نام SSIIa کنترل می‌شود که بر روی کروموزوم شش قرار دارد (۱۹). محتوی آمیلور (AC) یک صفت پیچیده است که تحت تأثیر



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

چندین ژن و همچنین محیط قرار می‌گیرد، اما ژن واکسی (Wx) بیشترین تأثیر را بر آن می‌گذارد. این ژن آنزیم Granule Bound Starch Synthase را رمزگذاری می‌کند، که مسئول سنتز آمیلوز است. ژن‌های دیگری همچون rsr1، OsBP-5، OsEBP-89، OsbZIP58 و OsMADS7 نیز بر بیان ژن Wx تأثیر می‌گذارند (۲۰). همچنین نشان داده شده است که ژن Wx، محتوی آمیلوز دانه (AC) و ژن‌های ALK/SSIIa و RSR1، دمای ژلاتینه شدن (GT) را کنترل می‌کنند (۲۱). نقش ژن‌های وابسته به بیوسنتز نشاسته SBE1، BE3، AGPlar، PUL، ISA، SSI، SSIIa، SSIII-2 و SSIV-2 در کیفیت پخت و خوراک برنج نیز گزارش شده است (۲۲).




**شکل ۲**- بهبود کیفیت دانه برنج از طریق سیستم CRISPR/Cas9.

(A) مزیت ویرایش ژن به‌واسطه CRISPR بر روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات برای توسعه واریته‌هایی با کیفیت دانه بالا. (B) مروری بر کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 در ژنومیکس کارکردی بهبود کیفیت دانه برنج. سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند برای ویرایش ژنوم (با معرفی موتاسیون‌های نقطه‌ای، درج یا حذف)، تنظیم رونویسی (به‌وسیله تداخل CRISPR (CRISPRi)، فعال کردن،



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

سرکوبی یا تلفیق اپی‌ژنتیک) یا غربال‌های ژنتیکی رو به جلو (با مغلوب ساختن یا فعال کردن موتانت‌ها با استفاده از کتابخانه‌های sgRNA) برای درک پایه مولکولی کیفیت دانه برنج به کار گرفته شود که می‌تواند به ایجاد گیاهانی با کیفیت دانه بالا بینجامد (۴).

در جدول ۱ برخی از پژوهش‌های انجام شده برای بهبود ژنتیکی کیفیت و ویژگی‌های دیگری از برنج با فناوری CRISPR/Cas9 نشان داده شده است. ویرایش ژن‌هایی همچون GW، GS، TGW، Wx، ISA، FLO2، PHO1، NAS و غیره و تبدیل آن‌ها به ژن‌های مغلوب، بهبود عملکرد دانه برنج را در پی داشته است (۴).

**جدول ۱**- برخی از ژن‌های ویرایش‌شده در برنج با سیستم CRISPR-Cas9 (۴).

| ویژگی | ژن هدف‌گذری شده | نسخه **Cas9** | پیشبر **Cas9** | پیشبر **sgRNA** | روش تراریزش |
|---|---|---|---|---|---|
| بهبود کیفیت | Waxy | N/A | 35S | OsU6 | تراریزش به‌واسطه آگروباکتریوم |
| | SBE1, SBEIIb | کدون بهینه شده Cas9 | ZmUbi | OsU3 | |
| | ISA1 | کدون بهینه شده برنج | 35S | OsU6 | |
| | OsPDS, OsBADH2, Oso2g23823, OsMPK2 | کدون بهینه شده برنج | 2 x 35S | OsU3 | |
| | OsCYP97A4, OsDSM2, OsCCD4a, OsCCD4b, and OsCCD7 | کدون بهینه شده برنج | 35S | OsU3 | |
| | OsNramp5 | کدون بهینه شده برنج | CaMV35S | | |
| بهبود عملکرد | Gn1a, DEP1, GS3, IPA1 | کدون بهینه شده Cas9 | OsUbi | OsU6a | تراریزش به‌واسطه آگروباکتریوم |
| | GLW2 | کدون بهینه شده گیاهی | 2 x 35S | OsU6 | |
| | GS9 | کدون بهینه شده برنج | CaMV 35S | OsU3 | |
| | GW2, GW5 and TGW6 | کدون بهینه شده Cas9 | OsUbi | OsU3, OsU6,TaU3 | |
| | TMS5 | کدون بهینه شده Cas9 | OsU3/U6 | OsU3/U6 | |
| مقاومت به بیماری‌ها | OsERF922 | کدون بهینه شده Cas9 | CaMV 35S | OsU6 | تراریزش به‌واسطه آگروباکتریوم |
| | Bsrk1 | کدون بهینه شده برنج | 35S | OsU6 | |
| | ALS | کدون بهینه شده برنج | 2 xP35S | OsU6 | |
| | OsAnn3 | کدون بهینه شده Cas9 | CaMV35S | OsU6 | |

حذف اگزون‌های هفت (۲۳) یا دو (۲۴) ژن BADH2، واقع در کروموزوم هشت، سطح ۲-استیل-۱-پیرولین (AP۲) را در برنج معطر افزایش داده است. در پژوهشی،



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

حذف ژن Wx با فناوری CRISPR/Cas9 در دو لاین برنج ژاپونیکا، Huaidao 5 (HD5) و Suken 118 (SK118)، با هدف معرفی واریته‌های برگزیده برنج چسبنده انجام شده و با موفقیت دو واریته برنج چسبنده با این فناوری توسعه داده شده‌اند (۲۵).

هیبریدهای برنج ایندیکا با محتوی آمیلوز بالا سفت هستند و در هنگام پختن خشک می‌شوند. پژوهش‌هایی برای کاهش میزان آمیلوز دانه با فناوری ویرایش ژنوم نیز انجام شده است. به‌طوری‌که ویرایش ژن‌های Wx و Badh2 با CRISPR/Cas9 به کاهش محتوی آمیلوز انجامید (۲۶). ایزوآمیلاز ۱ (ISA1) به‌عنوان یک آنزیم شاخه‌شکن (Debranching) نقش مهمی در سنتز آمیلوپکتین دارد. در مطالعه‌ای، سیستم CRISPR/Cas9، برای ویرایش ژن ISA1 از طریق تراریزش به‌واسطه آگروباکتریوم به‌کار برده شد و نتایج نشان داد که ویرایش ژن ISA1 بر تولید نشاسته و توسعه آندوسپرم تأثیر گذاشته و پیامدهای بالقوه‌ای برای اصلاح کیفیت برنج داشت (۲۷).

یکی از کارها در زمینه به‌نژادی برای بهبود ویژگی‌های کیفیت تغذیه‌ای برنج، تولید برنج طلایی با فناوری تراریزش ژن‌های بیگانه است. بتاکاروتن که پیش‌ماده ویتامین A است، در برنج نمی‌تواند تولید شود، از این‌رو، برنج طلایی با معرفی دو ژن Phytoene synthase (psy) و phytoene desaturase از گل نرگس (Narcissus pseudonarcissus) به برنج پدید آورده شد (۲۸). اما این انتقال ژن با محدودیت‌هایی همچون زمان‌بر بودن، دربرداشتن دی.ان.ای بیگانه، نیاز به اصلاح ژنوم خارج از هدف (Off-target genome modifications)، وابسته بودن صفت مطلوب با ویژگی‌های نامطلوب و بازدهی پایین روش‌های تراریخته همراه بود. پژوهشگران کوشیده‌اند که با فناوری CRISPR/Cas9 بر این مشکل‌ها چیره شوند. این سیستم، برای ناک اوت کردن پنج ژن فروکاهنده کاروتنوئید (Carotenoid catabolic) (OsCYP97A4، OsDSM2، OsCCD4a، OsCCD4b و OsCCD7) و افزایش ذخیره بتاکاروتن در آندوسپرم برنج به‌کار گرفته شد (۲۹).



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

**استفاده از تکنولوژی ویرایش ژنوم با کریسپر در مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی**

حذف ژن Os8N3 در برنج، که نقش مهمی در انتقال ساکارز در مراحل اولیه پر شدن دانه برنج دارد، با سایر روش‌های به‌نژادی به جز فناوری کریسپر (همچون خاموش کردن و موتاسیون در پیشبر ژن)، به افزایش مقاومت در برابر بیماری سوختگی باکتریایی (BB) ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae (Xoo) انجامیده بود، اما گیاهان بدست‌آمده نمو غیرطبیعی دانه گرده را نیز داشتند (۳۰). از این‌رو، سیستم CRISPR/Cas9 برای از کار انداختن ژن Os8N3، برای به‌دست آوردن مقاومت بیشتر در برابر Xoo به‌کار برده شد و نتایج نشان داد که ژن ویرایش‌شده Os8N3 با CR8PR/Cas9 با موفقیت می‌تواند برای افزایش مقاومت به بیماری سوختگی باکتریایی برنج به‌کار گرفته شود، بدون اینکه ویژگی‌های دیگر آن همچون نمو غیرطبیعی دانه گرده، پر شدن معیوب دانه و دیگر ویژگی‌های زراعی گیاه تحت تأثیر قرار گیرد. همچنین ناک اوت کردن ژن OsERF922 (۳۱) و ژن Bsrk-1 (۳۲) برای کاهش زخم‌های بلاست در شرایط آلودگی گیاه برنج به‌کار گرفته شده است. ژن رمزکننده فاکتور رونویسی NAC (که نقش مهمی در تعدادی از مسیرهای متابولیکی بیولوژیکی گیاهی دارد)، با نام OsNAC041 بر جوانه‌زنی بذور تحت تنش شوری و تحمل به شوری تأثیر می‌گذارد. از روش CRISPR/Cas9 برای به‌دست آوردن موتانت osnac041 با ارتفاع گیاه بالاتر از نوع وحشی و افزایش حساسیت به شوری استفاده شد (۱). با جهش‌زایی با واسطه CRISPR/Cas9، موتانت‌هایی برای تولید دانه‌های برنج ایمن برای مصرف انسان در خاک‌های با آلودگی کادمیوم تولید شده است (۳۳). همچنین از کار انداختن ژن انتقال‌دهنده OsNramp5 به توسعه لاین‌های هیبرید با انباشتگی پایین کادمیوم در ریشه‌ها، ساقه‌ها و دانه‌ها شد (۳۴). یکی از آنزیم‌های اصلی مسئول مقاومت به علف‌کش‌ها ALS1 است و نتایج نشان داد که روش کریسپر Homology-Directed Repair (HDR) در ویرایش این ژن موفق‌آمیز بود (۳۵). همچنین فاکتور نسخه‌برداری TIFY1b و



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

ژن OsAnn3 در برنج با CRISPR/Cas9 ویرایش شد که سبب بهبود مقاومت به سرما در گیاهان جهش‌یافته شد (۴).

**استفاده از فناوری کریسپر در تولید لاین‌های نرعقیم برای توسعه واریته‌های هیبرید**

کاربرد فناوری ویراش ژنوم با کریسپر سبب افزایش چشمگیر در تولید لاین‌های نر عقیم هسته‌ای دو منظوره (Dual-purpose nuclear-sterile) شده است که برای اصلاح به روش تولید هیبرید دولاینی بسیار حیاتی است. در پژوهشی، وکتور بیان pC1300-2x35S :: Cas9-sgRNAPTGMS2-1 برای ویرایش ژن نر باروری PTGMS2-1 در دو گونه برنج با سیستم CRISPR/Cas9 ساخته شد و در نسل T1 ، لاین‌های نر عقیم ژنی حساس به دما/فتوپریود عاری از نشانگر P/TGMS (Marker-free photoperiod-/thermo-sensitive genic male-sterile (P/TGMS)) به‌دست آمد (۳۶). در پژوهشی دیگر، نر عقیم ژنتیکی حساس به حرارت (TGMS)، با به‌کارگیری فناوری ویرایش ژن CRISPR/Cas9 برای اصلاح ژن TMS5 القا شد و جهش‌یافته TGMS، فاقد هر دی.ان.ای انتقالی (T-DNA) باقیمانده تولید شدند که در دمای زیر مطلوب (۲۲ درجه سانتی‌گراد) رشد کردند، گرده‌ی زنده تولید و با موفقیت از طریق خودلقاحی دانه تولید کردند، اما در دماهای ۲۴ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد، گرده آن‌ها عقیم بود و هیچ دانه‌ای شکل نگرفت. هیبریدهای F1 به‌دست‌آمده از تلاقی‌های بین این لاین‌ها و لاین‌های بازگرداننده باروری نسبت به هر دو لاین والدینی بهتر بودند (۳۷). در پژوهشی دیگر، با سیستم CRISPR/Cas9، 11 لاین TGMS تراریخته با کاربردهای بالقوه در اصلاح هیبرید ایجاد شد (۳۲).

**از کار انداختن سازه‌های ویرایشگر در گیاهان ویرایش‌شده**

یکی از تلاش‌هایی که به‌تازگی پژوهشگران در زمینه بهره‌گیری از فناوری کریسپر آغاز کرده‌اند، از بین‌بردن سازه‌های ویرایشگر همچون CRISPR/Cas9 است که پیش‌نیاز ارزیابی پایداری ژنتیکی و تجاری‌سازی گیاهان ویرایش‌شده است.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

حذف تراژن‌های CRISPR/Cas9 با روش‌های کلاسیک به‌نژادی همچون تفکیک ژنتیکی و تلاقی‌برگشتی کاری سخت و وقت‌گیر است. اولین تلاش‌ها در این راه به معرفی فناوری کشنده تراژن CRISPR به نام TKC (Transgene killer CRISPR (TKC)) انجامید که در آن، از یک جفت ژن خودکشی با پیشبر CaMV35S استفاده شد که باعث از بین رفتن خود به خودی تراژن‌ها بدون ایجاد خطر بر کارایی ویرایش ژن هدف می‌شد (۳۸).

فناوری TKC، جداسازی گیاهان ویرایش‌شده با CRISPR را که تراژن‌های دیگر (سازه‌های ویرایشگر) را نداشته باشند، در یک نسل امکان‌پذیر می‌کند و به پیشرفت‌ها در زمینه پدیدآوری گیاه ویرایش‌شده را تا حد زیادی شتاب می‌دهد. در پژوهشی دیگر، پیشبر CaMV35S در وکتور TKC با دو پیشبر برنج جایگزین شد تا ژن‌های خودکشی را تحریک کنند و مزایایی نسبت به وکتور TKC قبلی از جمله انعطاف‌پذیری بیشتر داشت (شکل ۳) (۳۹).

**استفاده از سازوکارهای دیگر در فناوری کریسپر**

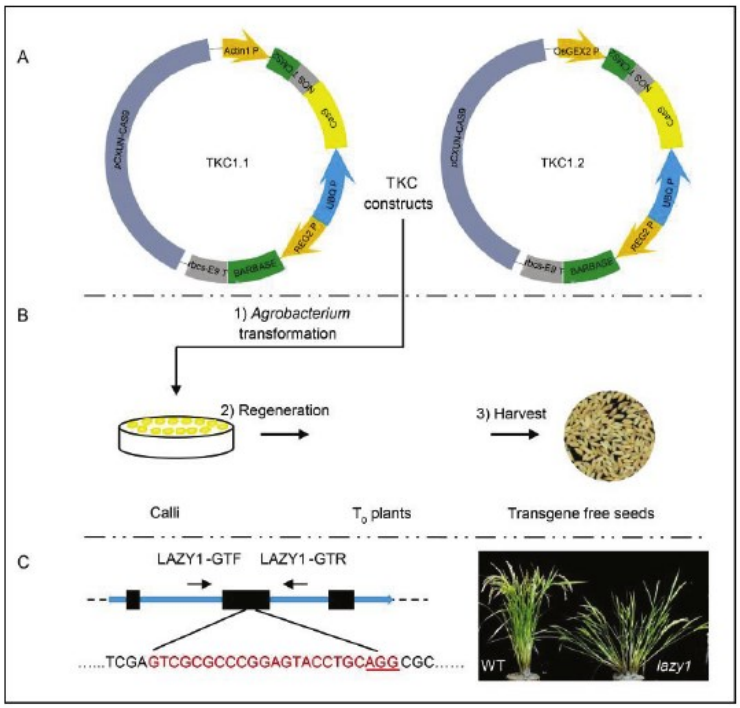
علاوه‌بر CRISPR/Cas9، رویکردهای جدید از جمله سیستم CRISPR/Cpf1 از Prevotella و 1 Francisella به‌عنوان ابزارهای ویرایش ژنومی کارآمدتر و دقیق‌تر پیشنهاد شده‌اند که ممکن است اصلاح گیاه را شتاب دهند (۴۰). پروتئین Cpf1 نسخه کوچک‌تر و ساده‌تری از Cas9، از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است که دارای فعالیت ویرایشی با اختصاصیت اندونوکلئازی بالاتری نسبت به Cas9 است و اثرات خارج از هدف آن به‌ویژه در سلول‌های انسان قابل چشم‌پوشی است. کوچکی اندازه این پروتئین انتقال آن را به درون سلول‌ها و بافت‌ها آسان‌تر کرده است و برخلاف CRISPR/Cas9 که به PAM غنی از گوانین ('5-NGG-3') در انتهای '4 نیاز دارد، CRISPR/Cpf1 به یک PAM غنی از تیمین ('5-TTTN-3' یا'5-TTN-3') در انتهای '5 نیاز دارد که با آن بازده برش بیشتر می‌شود. پروتئین Cas9 نیازمند دو مولکول (crRNA و tracrRNA) و Cpf1



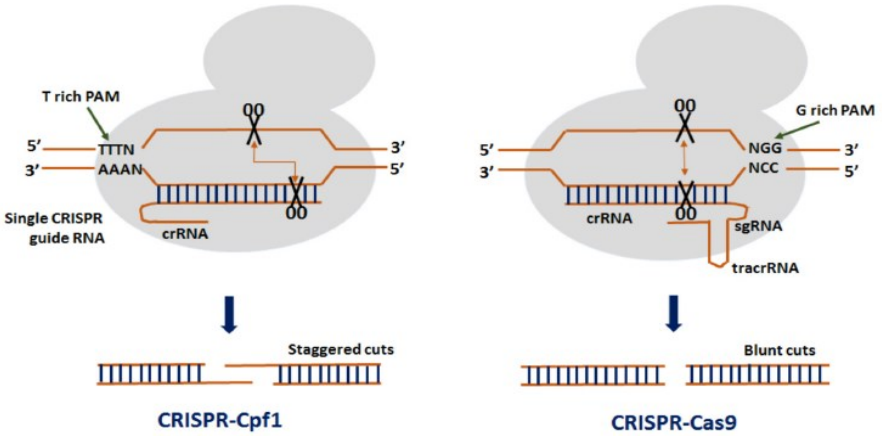
[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

نیازمند یک مولکول آر.ان.ا (crRNA) برای برش دی.ان.ا است (شکل ۴) (۴۱).




**شکل ۳**- وکتورهای کشنده تراژن (TKC). جداسازی گیاهان برنج بدون تراژن ویرایش‌شده با CRISPR/Cas9 را در یک نسل امکان‌پذیر می‌سازد (۳۹).




**شکل ۴**- مقایسه بین CRISPR از Prevotella و Francisella 1(Cpf1) و CRISPR/Cas9 (۴۱).

در این سیستم، کمپلکس Cpf1-crRNA بدون نیاز به tracrRNA ببرد. بدین لحاظ، می‌تواند به‌طور کارآمدی دی.ان.ای هدف را یک crRNA از ۴۰ تا ۴۵ نوکلئوتید



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

دربرگیرنده توالی تکراری و فاصله‌دار برای آسان‌کردن ویرایش ژن در مقایسه با حداقل ۱۰۰ نوکلئوتید sgRNA در سیستم CRISPR/Cas9 کافی است. در سیستم CRISPR–Cas9، دومین‌های نوکلئازی RuvC و HNH هر دو رشته دی.ان.ای را در جایگاه یکسانی برش می‌دهند که منجر به ایجاد انتهای صاف می‌شود؛ در حالی‌که Cpf1 یک دومین RuvC و یک دومین نوکلئاز دارد که دو رشته دی.ان.ای را به‌ترتیب در ۲۳ و ۱۷ جفت باز در فرودست توالی PAM می‌برند و یک انتهای چسبنده در bp۵ فراهم می‌آورند (۴۲). همچنین جایگاه برش و جایگاه شناسایی در Cas9 نزدیک به هم اما در Cpf1، در فاصله دورتری از هم قرار دارند (۴۳). یک ابزار ویرایشگر پایه آدنین بهینه‌سازی شده با کدون-برنج با نام ABE-nCas9 نیز ایجاد شده است که جهش نقطه‌ای AT به GC را در مکان پلی‌مورفیسم تک نوکلئوزیدی ایجاد می‌کند و می‌تواند به‌طور موثر به ویرایش پایه آدنین در ژنوم برنج کمک کند (۴۴).

در جدول ۲ لیستی از ژن‌های هدف ویرایش‌شده با ابزارهای ویرایش ژنومی مختلف از جمله کریسپر در برنج نشان داده شده است.

**جدول ۲**- لیستی از ژن‌های هدف ویرایش‌شده با ابزارهای ویرایش ژنومی در برنج (۴۱)

| ویژگی | ژن هدف‌گذاری‌شده | استراتژی ویرایش ژنوم | کارکردهای مولکولی |
|---|---|---|---|
| بهبود عملکرد و کیفیت | LOX3 | TALENs | افزایش ذخیره‌سازی |
| | GW2, GW5, TGW6 | CRISPR/Cas 9 | بهبود وزن دانه |
| | Hd2, Hd4, Hd5 | CRISPR/Cas 9 | زودرسیدگی |
| | CSA | CRISPR/Cas 9 | لاین‌های نر عقیم کنترل‌شده با فتوپریود |
| | Gn1a, DEP1, GS3, IPA1 | CRISPR/Cas 9 | بهبود تعداد دانه، معماری خوشه، اندازه دانه و معماری گیاه |
| | CCD7 | CRISPR/Cas 9 | افزایش تعداد پنجه |
| | PYLs | CRISPR/Cas 9 | بهبود رشد و باروری |
| | OsBADH2 | TALENs | افزایش عطر و طعم |
| | BADH2 | CRISPR/Cas 9 | افزایش عطر و طعم |
| بهبود کیفیت تغذیه‌ای | OsNRAMP5 | CRISPR/Cas 9 | محتوی کادمیوم پایین |
| | SBEIIb and SBEI | CRISPR/Cas 9 | تولید برنج آمیلوز بالا |



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | OsPDS, OsSBEIIb | ویرایش باز | بهبود تغذیه‌ای |
| مقاومت به تنش‌های زیستی | OsSWEET13 | TALENs | تقویت مقاومت سوختگی باکتریایی |
| | OsSWEET13 | TALENs | تقویت مقاومت سوختگی باکتریایی |
| | OsSWEET13 | TALENs | تقویت مقاومت سوختگی باکتریایی |
| | Os09g29100 | TALENs | تقویت مقاومت به نوارهای باکتریایی برگ |
| | OsERF922 | CRISPR/Cas 9 | تقویت مقاومت به بلاست |
| مقاومت به تنش‌های غیرزیستی | BEL | CRISPR/Cas 9 | مقاومت به علف‌کش |
| | OsEPSPS | CRISPR/Cas 9 | مقاومت به گلیفوزات |
| | OsALS | TALENs | مقاومت به علف‌کش |
| | ALS | CRISPR/Cas 9 | مقاومت به علف‌کش |
| | C287 | ویرایش باز | مقاومت به علف‌کش |
| | Os SAPK2 | CRISPR/Cas 9 | مقاومت به خشکی |
| تراکم روزنه‌ای | OsEPFL9 | CRISPR/Cas 9 و CRISPR/Cpf1 | تنظیم تراکم روزنه برگ |
| کارایی مصرف نیتروژن | NRT1.1B | ویرایش باز | تقویت کارایی مصرف نیتروژن |
| پیری و مرگ | OsCDC48 | ویرایش باز | تنظیم پیری و مرگ |

## نتیجه‌گیری

در حال حاضر، سیستم CRISPR/Cas9 از همه توانایی‌های ویرایش ژنوم همچون از کار انداختن، ترمیم کردن، جدا کردن و فعال‌سازی بیان ژن‌ها برای بهبود ویژگی‌های کیفی، عملکرد، اجزای آن، رشد، بهره‌گیری از منابع غذایی و همچنین رویارویی با تنش‌های زیستی و غیر زیستی استفاده می‌کند. این سیستم دارای پتانسیل بهره‌برداری نشده‌ای است که یک جعبه ابزار ژنتیکی در حال گسترش را برای زیست‌شناسان گیاهی برای بررسی ژنومیکس کارکردی تشکیل داده است و یک کمک‌کننده برای به‌نژادگران برای ادغام و دست‌ورزی ژن‌های مهم در ژنوم محصولات مهم است. توانایی هدف قراردادن چندین ژن از طریق استراتژی‌های ویرایش ژنوم می‌تواند پژوهش‌های مهندسی صفات پیچیده چندژنی همچون عملکرد، اجزای عملکرد، رشد، کیفیت دانه و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی برنج را آسان کند. تغییر سریع مسیر پژوهش‌ها به سوی استفاده از سیستم‌های CRISPR/Cas9 برای جهش‌زایی هدفمند می‌تواند یک روش امیدوارکننده برای چیرگی بر موانع به‌زراعی برنج با کیفیت



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

بهبودیافته باشد. فناوری‌های ویرایش ژن، به‌ویژه سیستم CRISPR/Cas9، به دلیل توانایی در ایجاد جهش در اهداف موردنظر در ژنوم با دقت، کارآیی و سادگی بیشتر، اهمیت زیادی در پژوهش‌های گیاهان در سال‌های اخیر پیدا کرده‌اند. با این وجود، این فناوری با چالش‌هایی همراه است. یکی از این چالش‌ها، افزایش کارایی ویرایش ژن است. چالش دیگر این است که موفقیت در برنج اصلاح شده و سایر محصولات زراعی در ابتدای کار است و بیشتر کارهای گزارش شده ویرایش ژنوم، تنها اثبات مفهوم در محیط‌های محدود است. به هر حال فناوری ویرایش ژنوم می‌تواند گیاهانی را اصلاح کند که تفاوتی با گیاهان ایجاد شده با روش‌های معمولی به‌نژادی نداشته باشند. به‌نظر می‌رسد CRISPR/Cas9 و ابزارهای ویرایش ژنوم همراه با آن، انقلابی در بهبود برنج ایجاد کنند که برای برآورده کردن خواست‌ها و تأمین نیاز برنج برای نسل‌های آینده بسیار مهم باشد.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

## References فهرست منابع

1. Wang B., Zhong Z., Zhang H., Wang X., Liu B., Yang L., Han X., Yu D., Zheng X., Wang C., Song W., Chen C. and Zhang Y. (2019). Targeted mutagenesis of NAC transcription factor gene, OsNAC041, leading to salt. Rice Science. 26(2) , 98-108.

2. James C. (2010). Global status of commercialized biotech/GM crops: ISAAA Brief No.42. ISAAA: Ithaca, NY.

3. Ren J., Hu X., Wang K. and Wang C. (2019). Development and application of CRISPR/Cas system in rice. Rice Science. 26(2), 69-76.

4. Fiaz S., Ahmad S.,. Noor M.A., Wang X.., Younas A., Riaz A., Riaz A. and Ali F. (2019). Applications of the CRISPR/Cas9 system for rice grain quality improvement: perspectives and opportunities. International Journal of Molecular Sciences. 20, 1-18.

5. Xie K., Minkenberg B. and Yang Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 112, 3570–3575.

6. Kwon C.T., Heo J., Lemmon Z.H., Capua Y., Hutton S.F., Eck J.V., Park S.J. and Lippman Z.B. (2019). Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture. Nature Biotechnology. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0361-2.

7. Johnson A.A., Kyriacou B., Callahan D.L., Carruthers L., Stangoulis J., Lombi E. and Tester M. (2011). Constitutive overexpression of the OsNAS gene family reveals single-gene strategies for effective iron-and zinc-biofortification of rice endosperm. PLoS ONE. 6, e24476.

8. Rollie C., Schneider S., Brinkmann A.S., Bolt E.L. and White M.F. (2015). Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. E life. 4: e08716.

9. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Soria E. and Juez G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Molecular Microbiology. 36(1), 244-246.

10. Kim H. and Kim J.S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nature Reviews Genetics. 15(5), 321- 334.

11. Xing Y. and Zhang Q. (2010). Genetic and molecular bases of rice yield. Annual Review of Plant Biology. 61, 421–442. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112209.

12. Li M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G. and Li H. (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. Frontiers in Plant Science. 7,377. doi: 10.3389/fpls.2016.00377.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

13. Shen L., Li J., Fu Y., Wang J., Hua Y., Jiao X., Yan C. and Wang K. (2017). Orientation improvement of grain length and grain number in rice by using CRISPR/Cas9 system. Chinese Journl of Rice Science. 31, 223–231.

14. Shen L., Wang C., Fu Y., Wang J., Liu Q., Zhang X., Yan C., Qian Q. and Wang K. (2018). QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. Journal of Integrative Plant Biology. 60, 89–93.

15. Li X., Zhou W., Ren Y., Tian X., Lv T. and Wang Z. (2017). High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Journal of Genetics and Genomics. 44, 175–178. doi: 10.1016/j.jgg.2017.02.001.

16. Yu J., Ge H., Wang X., Tang R., Wang Y., Zhao F., Lan W., Luan S. and Yang L. (2017). Overexpression of pyrabactin resistance-like abscisic acid receptors enhances drought, osmotic, and cold tolerance in transgenic poplars. Frontiers in Plant Science. 8:1752. doi: 10.3389/fpls.2017.01752.

17. Miao C., Xiao L., Hua K., Zoua C., Zhao Y. and Bressanb R.A. (2018). Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115, 6058–6063. doi: 10.1073/ pnas.1804774115.

18. Lau W.C., Rafii M.Y., Ismail M.R., Puteh A., Latif M.A. and Ramli A. (2015). Review of functional markers for improving cooking, eating, and the nutritional qualities of rice. Frontiers in Plant Science. 6, 832. 23.

19. Lapitan V.C., Redoña E.D., Abe T. and Brar D.S. (2009). Mapping of quantitative trait loci using a doubled-haploid population from the cross of Indica and Japonica cultivars of rice. Crop Science. 49, 1620–1628.

20. Wambugu P., Ndjiondjop M.N., Furtado A. and Henry R. (2018). Sequencing of bulks of segregants allows dissection of genetic control of amylose content in rice. Plant Biotechnology Journal. 16, 100–110.

21. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H. and Lin Y. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular Plant. 8, 1274–1284.

22. Tian Z., Qian Q., Liu Q., Yan M., Liu X., Yan C., Liu G., Gao Z., Tang S. and Zeng D. (2009). Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 106, 21760–21765 .

23. Bradbury L.M., Fitzgerald T.L., Henry R.J. and Jin Q. (2005). Waters, D.L. The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal 3, 363–370.

24. Shi W., Yang Y., Chen S. and Xu M. (2008). Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Mollecular Breeding. 22, 185–192.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

25. Fei Y., Yang J., Wang F., Fan F., Li W., Wang J., Xu Y., Zhu J. and Zhong W. (2019). Production of two elite glutinous rice varieties by editing WxGene. Rice Science. 26(2), 118-124. 9.

26. Shao G., Xie L., Jiao G., Wei X., Sheng Z., Tang S. and Hu P. (2017). CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene Badh2 in rice. Chinese. Journl of Rice Science. 31, 216–222. doi: 10.16819/j.1001-7216.2017.6098.

27. Chao S., Cai Y., Feng B., Jiao G., Sheng Z., Luo J., Tang S., Wang J., Hu P. and Wei X. (2019). Editing of rice isoamylase gene ISA1 provides insights into its function in starch formation. Rice Science. 26(2), 77-87.

28. Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L. and Silverstone A.L. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nat. Biotechnol. 23, 482.

29. Yang X., Chen L. and Yu W. (2017). Knocking out of carotenoid catabolic genes in rice fails to boost carotenoid accumulation, but reveals a mutation in strigolactone biosynthesis. Plant Cell Reports. 36, 1533–1545.

30. Yang B., Sugio A. and White F.F. (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 103(27):10503–10508. https://doi.org/10.1073/pnas.0604088103.

31. Wang F., Wang C., Liu P., Lei C., Hao W., Gao Y., Liu Y.G. and Zhao K. (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. PLoS ONE. 11, e0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027.

32. Zhou X., Liao H., Chern M., Yin J., Chen Y., Wang J., Zhu X., Chen Z., Yuan C. and Zhao W. (2018). Loss of function of a rice TPR-domain RNA-binding protein confers broad-spectrum disease resistance. National Academy of Sciences USA. 115, 3174–3179.

33. Liu S., Jiang J., Liu Y., Meng J., Xu S., Tan Y., Li Y., Shu Q. and Huang J. (2019). Characterization and evaluation of OsLCT1 and OsNramp5 mutants generated through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis for breeding low Cd rice. Rice Science. 26(2), 88-97. 33.

34. Tang L., Mao B., Li Y., Lv Q., Zhang L., Chen C., He H., Wang W., Zeng X. and Shao Y. (2017). Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. Sci. Rep. 7, 14438. doi: 10.1038/nplants.

35. Sun Y., Zhang X., Wu C., He Y., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y. and Xia L. (2016). Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. Molecular Plant. 9, 628–631. doi: 10.1016/j.molp.2016.01.001.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

36. Shen L., Dong G., Zhang Y., Hu G., Zhang Q., Hu G., Xu B., Ren D., Hu J., Zhu L., Gao Z., Zhang G., Guo L., Zeng D. and Qian Q. (2019). Rapid creation of new photoperiod-/thermo-sensitive genic male-sterile rice materials by CRISPR/Cas9 system. Rice Science. 26(2): 129-132.

37. Li Q., Zhang D., Chen M., Liang W., Wei J. and Qi Y. (2016). Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. Journal of Genetics and Genomics. 43, 415–419. doi: 10.1016/j.jgg. 2016.04.011.

38. He Y.B., Zhu M., Wang L.H., Wu J.H., Wang Q.Y., Wang R.C. and Zhao Y.D. (2018). Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. Mol Plant. 11(9): 1210-1213.

39. He Y., Zhu M., Wang L., Wu J., Wang Q., Wang R. and Zhao Y. (2019). Improvements of TKC technology accelerate isolation of transgene-free CRISPR/Cas9-edited rice plants. Rice Science. 26(2), 109-117.

40. Khatodia S., Bhatotia K., Passricha N., Khurana S.M.P. and Tuteja N. (2016). The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. Frontiers in Plant Science.

41. Dong D., Ren K., Qiu X., Zheng J., Guo M. and Guan X. (2016). The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. Nature. 532(7600), 522-526.

42. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S. and Essletzbichler P. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell. 163, 759–771. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

43. Fonfara I., Richter H., Bratovič M., Le Rhun A. and Charpentier E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature. 532, 517-521.

44. Li H., Qin R., Liu X., Liao S., Xu R., Yang J. and Wei P. (2019). CRISPR/Cas9-mediated adenine base editing in rice genome. Rice Science. 26(2), 125-128.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]

# Success of Genomic Editing with CRISPR / Cas9 Technology in Rice

**Peyman Sharifi**

Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

peyman.sharifi@gmail.com

## Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is the major food source for the most of people of the world. In the last few decades, the classical, mutational and molecular breeding approaches have caused enormous increase in rice productivity with the development of novel rice varieties. Stagnation in rice yield has been reported in recent decade because of emergence of pests and phyto pathogens, climate change, and other environmental issues. The CRISPR/Cas9 system has all genome editing capabilities, e.g., knock-in, knockout, knockdown, and expression activation. Researchers have been successful in editing genes controlling traits such as number of panicles per plant, number of seeds per panicle, grain weight, rice maturity, plant hormone synthesizing genes, amylose content, gelatinization temperature, grain length and width, as well as resistance to abiotic and biotic stresses. The shift of research toward the utilization of CRISPR/Cas9 systems for targeted mutagenesis could be a promising approach for overcoming the barriers to breeding of improved rice. In this review, the progress in rice by employing the CRISPR/Cas9 editing system and its famous applications have been discussed. It is seemed that the CRISPR/Cas9 and associated genome editing tools have taken in a revolutionary change in rice improvement which is very important for meeting the demands and ensuring the requirement of rice for future generations.

**Keywords**: Breeding, Transgenic, Plant Nutrition, Grain Quality, Stress Resistance, Genetic Engineering, QTL.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-06-14 ]

[ DOR: 20.1001.1.27170632.1399.13.1.2.2 ]