مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۹۳-۲۸۱

10.61186/gebsj.12.2.281

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 12, Number 2, Pages: 281-293

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

تنوع سیستم های CRISPR/Cas در جنس لوکونوستوک

CRISPR/Cas Systems Diversity in *Leuconostoc* Genus

سارا غفاریان[۱*]، بهمن پناهی[۲]
Sara Ghaffarian[1]*, Bahman Panahi[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲- گروه ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

1. Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2. Department of Genomics, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
s.ghaffarian@azruniv.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴)
Received: 2023/08/2 | Accepted: 2024/02/13 | Published: 2024/03/14

چکیده

عفونت بوسیله باکتریوفاژها یکی از چالش‌های مهم کاربرد باکتری‌های مختلف در صنایع می‌باشد. یکی از سیستم‌های ضد ویروسی ذاتی در باکتری‌ها سیستم CRISPR/Cas می‌باشد و تعیین ویژگی این سیستم‌ها در باکتری‌ها می‌تواند در فرمولاسیون و بکارگیری این باکتری‌ها نقش کمک کننده‌ای داشته باشد. بر این اساس و به منظور شناسایی سیستم CRISPR/Cas در باکتری‌های جنس *لوکونوستوک*، توالی ژنوم کامل ۱۸ گونه شناسایی شده‌ی این جنس مورد کاوش قرار گرفت و اطلاعات سیستم CRISPR/Cas آن‌ها بر اساس الگوریتم‌های مبتنی بر همولوژی بررسی گردید. در مرحله بعد ویژگی‌های مربوط به ساختارهای کونفورماسیونی و پایداری سیستم‌های شناسایی شده بر اساس انرژی آزاد تعیین، جایگاه شناسایی فاژها (PAM) با استفاده از رویکردهای مبتنی بر BLAST شناسایی، و در نهایت روابط خویشاوندی این سیستم‌ها بر اساس توالی آمینواسیدی پروتئین‌های همراه مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده از مجموع ۱۸ گونه ثبت شده برای این جنس در NCBI، ۹ گونه دارای سیستم CRISPR/Cas کامل بودند. نتایج مربوط به تعیین نوع سیستم CRISPR/Cas، نشان داد که غیر از یک مورد، همه سویه‌ها حاوی سیستم نوع II-A می‌باشند. تعداد توالی‌های تکراری در این سیستم‌ها بین ٤ تا ۱۰۱ عدد و طول متوسط توالی‌های فاصله دهنده بین ۲۸ تا ۳۰ نوکلوئوتید متغییر بودند. در مجموع ۹ نوع توالی PAM در انتهای ´۳ و ۹ نوع توالی PAM در انتهای ´۵ این سیستم‌ها شناسایی شد. بر اساس نتایج آنالیز خویشاوندی، این سیستم‌ها در دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. به نظر می‌رسد سیستم CRISPR/Cas نوع II-A فعال‌ترین سیستم بر علیه DNA مهاجم خارجی و عفونت‌های باکتریوفاژی در باکتری‌های جنس *لوکونوستوک* باشد.

واژه‌های کلیدی

لوکونوستوک،
CRISPR،
تنوع،
رابطه خویشاوندی،
ساختار

Ghaffarian S, Panahi B. CRISPR/Cas Systems Diversity in Leuconostoc Genus. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2) :281-293. Doi: 10.61186/gebsj.12.2.281
URL: http://gebsj.ir/article-1-467-fa.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Bacteriophage infections are one of the key challenges in the use of various bacteria in industries. CRISPR-Cas systems are part of the bacterial immune system against viral infections and determining the characteristics of these systems can be beneficial for the formulation and use of these bacteria. To investigate the CRISPR/Cas system in the *Leuconostoc* genus, the complete genome sequences of 18 reported species of this genus were explored and their CRISPR/Cas system information was analyzed using homology-based algorithms. Then, the characteristics of the conformational structure and stability of recognized systems were determined based on MFE values, phage recognition sites were identified using BLAST approaches, and the evolutionary relationships of these systems were analyzed based on amino acid sequence of associated proteins. Based on the obtained results, 9 of 18 reported species for this genus contain whole CRISPR/Cas system. CRISPR/Cas type analysis confirmed that except for one case, all strains contained the type II-A system. In these systems, the number of repeats and average length of spacers varied from 4 to 101 and 28 to 30 nucleotides, respectively. Nine types of PAM sequences were identified at the 3´ and 5´ ends of these systems. Based on relationship analysis, the studied system was divided into two main groups. Subtype II-A appears to be the most active system against foreign DNA and phages in the *Leuconostoc* genus.

Key words: Leuconostoc, CRISPR, Diversity, Relationship, Structure.

مقدمه

جنس *لوکونوستوک* (*Leuconostoc*)متعلق به گروه sensu stricto از باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB: Lactic Acid Bacteria) هستند که مهم‌ترین ویژگی آن‌ها تولید لاکتیک اسید از تخمیر کربوهیدارت‌ها است. *لوکونوستوک* ناجورتخمیر است و گلوکز را از مسیر پنتوزفسفات و فسفوکتولاز تخمیر و تولید اتانول‌دی-لاکتات و CO2 می‌کند. همچنین زمانیکه کوآنزیم احیا شده NADH توسط گیرنده‌های الکترون نظیر فروکتوز یا اکسیژن همراه با NADH دوباره اکسید شود، استات تولید می‌کند (Lonvaud-Funel, 1999). گونه‌های جنس *لوکونوستوک* کوکوس‌های بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز منفی (Zheng et al., 2020)، گرم مثبت، غیر اسپورزا و غیرمتحرک هستند. غیر از تعداد معدودی از گونه‌ها با منشا کلینیکی، غیر بیماری‌زا محسوب می-شوند. از دیگر خصوصیات این جنس می‌توان به تولید دکستران اشاره کرد (Kim et al., 1995).

در حال حاضر جنس *لوکونوستوک* حداقل دارای ۲۰ گونه و زیرگونه شناخته شده است، که اغلب از مواد گیاهی، محصولات لبنی، گوشت و انواع محصولات غذایی تخمیری جداسازی شده-اند (Chen et al., 2020; Joen et al., 2017). ژنوم *لوکونوستوک* شامل ۲۰۳۸۳۹۶ جفت باز و با آرایش دایره‌ای است. این ژنوم ۲۰۰۵ پروتئین مختلف را رمز می‌کند و به ٥٤ درصد آن‌ها عملکردهای بیولوژیکی نسبت داده شده است. ژنوم این باکتری‌ها دارای ۳۷ تا ٤٠ درصد GC است. از آنجائیکه *لوکونوستوک* یک باکتری اسیدلاکتیک است این ژنوم تمامی آنزیم‌های موجود در مسیر ٦-فسفوگلوکونات فسفوکتولاز را رمز می‌کند (Breidt, 2004). اعضای سویه‌های جنس *لوکونوستوک* به دلیل قابلیت تولید اسیدلاکتیک و دی‌استیل اغلب در تولید غذاهای تخمیری کاربرد دارند. در محصولات شیر و گوشت تخمیر شده دی‌استیل مسئول طعم کره است و در سایر محصولات تخمیری به خوش طعم بودن غذا کمک می‌کند (Cogan and Jordan, 1994). بر اساس مطالعات مبتنی بر توالی 16S rRNA، *لوکونوستوک* شامل ۳ گروه تکاملی مجزای *Leuc. sensustricto*، *Leuc. parameseteroides* و *Leuc. oenos* می‌باشد (Martinez-Murcia et al., 1991 ; Martinez-Murcia et al., 1991 ; Murcia and Collins, 1990 ; Yang, and Woese, 1989).

آلودگی سلول‌های باکتریایی توسط فاژها مساله مهمی در کاربرد آن‌ها است، زیرا فاژها با به کار گرفتن سیستم تکثیر باکتری میزبان

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

باعث کاهش تعداد باکتری‌های زنده و در نتیجه کاهش بازدهی کشت می‌شوند (Rostampour et al., 2022). تکامل توالی‌های CRISPR به همراه ژن‌های مرتبط با CRISPR (Cas) یک مکانیسم دفاعی تطبیقی در مقابل فاژها ایجاد می‌کند (panahi et al., 2022).

اجزا تشکیل دهنده سیستم CRISPR شامل یک اندونوکلئاز (Cas9)، یک tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) و یک آرایه CRISPR RNA پیشرو، حاوی توالی‌های راهنمای نوکلئاز (فاصله دهنده) که توسط تکرارهای مستقیم مشابه از هم جدا شده‌اند، می‌باشد (Sultan et al., 2022). به محض حمله فاژ، قطعه‌ای از DNA فاژ بین تکرارهای حفاظت شده آرایه CRISPR ادغام می‌شود (Marraffini and Sontheimer, 2010). سپس کل آرایه CRISPR به یک رونوشت RNA منفرد رونویسی شده و در مرحله بیان به کمک پروتئین‌های Cas به یک واحد تداخلی پردازش می‌شود (Makarova et al., 2011). در نهایت، رونوشت بالغ با نام crRNAs (CRISPR RNAs) برای هدایت مجموعه پروتئین‌های Cas جهت برش DNA فاژ در یک توالی اختصاصی به محض وقوع عفونت مجدد به کار گرفته می‌شود (Van der Oost et al., 2009). پروتئین‌های Cas به واسطه‌ی وجود توالی‌های مجاور پروتواسپیسر (PAM: Protospacer Adjacent Motif) قادر به شناسایی توالی‌های هدف بر روی DNA خارجی هستند (Crawley et al., 2018). در مرحله نهایی فرآیند تطبیقی سیستم CRISPR دوبلکس تشکیل شده در مرحله قبل با Cas9 تعامل کرده، DNA حاضر را برای یک توالی PAM بررسی می‌کند، به پروتواسپیسر متصل شده و آن را برش می‌دهد (Riesenberg et al., 2022).

سیستم‌های CRISPR به دو دسته، نوع ٦ و زیرنوع ٣٣ تقسیم می‌شوند (Koonin et al., 2017). دسته ١ که شامل انواع ١، ٣ و ٤ می باشد، تداخل توسط مجموعه‌ای بزرگ (مجموعه پروتئین Cascade) پیوسته با CRISPR متشکل از پروتئین‌های Cas چندگانه با نام Cas3 (گاهی آمیخته با Cas2)، Cas5-Cas8، Cas10، و Cas11 با ترکیبات متفاوت بسته به نوع و زیر نوع انجام می‌شود (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2020; Khan et al., 2022). پروتئین‌های Cas ذکر شده یک واحد مداخله‌کننده که در شناسایی توالی هدف و برش اسیدهای نوکلئوئیک در سیستم CRISPR درگیر است تشکیل می‌دهند (Makarova et al., 2020). در مقابل در سیستم‌های دسته ٢، شامل انواع ٢، ٥ و ٦، واحد مداخله‌کننده توسط یک پروتئین منفرد بزرگCas9 ، Cas12 یا Cas13 ایجاد می‌شود. بر اساس گزارشات موجود Cas2 همچنین یک ژن کلیدی در مرحله سازگاری است (Makarova et al., 2020). شناسایی منشا توالی‌های فاصله دهنده، که توالی **پروتواسپیسر** نامیده می‌شوند، می‌تواند مکانیسم برهمکنش میزبان–شکار را در محیط‌های مختلف حاوی فاژ و عناصر DNA مهاجم آشکار کند (Levin et al., 2013).

مطالعات بسیاری وجود و تنوع سیستم‌های CRISPR-Cas را در باکتری‌های مختلف مثل *Streptococcus thermophilus* (Horvath et al., 2008)، *Sulfolobus islandicus* (Held et al., 2010)، *Pseudomonas aeruginosa* (van Belkum et al., 2015)، *Bifidobacterium longum* (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017)، *Staphylococcusi* (Rossi et al., 2017)، *Lactobacillus curvatus*، *Lactobacillus graminis*، *Lactobacillus sakei* و *Lactobacillus Fuchuensis* (Ilıkkan, 2021)، و *Lactobacillus casei* (Yang et al., 2023) مورد مطالعه قرار داده‌اند.

توسعه فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید و دسترسی به ژنوم باکتری‌های مختلف امکان بررسی حضور و تنوع سیستم‌های CRISPR-Cas را فراهم کرده است. تلاش‌های زیادی با هدف بررسی و شناسایی سیستم‌های CRISPR-Cas با هدف شناسایی پتانسیل سیستم‌های شناسایی شده در تعیین ژنوتیپ و توسعه کاربردهای CRISPR در حال انجام است. همچنین چالش‌های فنی زیادی برای تولید یک ابزار CRISPR بی‌نقص وجود دارد. بررسی و تحلیل بیوانفورماتیک سیستم CRISPR در میکرواورگانیسم‌ها به منظور ارزیابی تکامل و ایمنی در برابر عوامل بیگانه، برای صنایع مختلف از اهمیت بالایی برخوردار است (Makarova et al., 2011; Crawley et al., 2018). با توجه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

به ارزش و اهمیت باکتری‌های پروبیوتیک در صنایع مختلف، این سویه‌ها به صورت روز افزون شناسایی و بکار برده می‌شوند. با این وجود، آلودگی با انواع فاژها چالش جدی در این زمینه است و درک توانمندی ذاتی مقابله این سویه‌ها در مقابل انواع فاژها می‌تواند اطلاعات با ارزشی در این رابطه ارائه داده و از هدر رفت هزینه و زمان در استفاده از این سویه‌های مفید و کلیدی باشد (Lonvaud-Funel, 1999). باتوجه به این‌که قبلا مطالعه‌ای در زمینه‌ی شناسایی، تنوع و تکامل در این جنس انجام نشده است، در این مطالعه تنوع، وجود، و تکامل سیستم CRISPR-Cas در سویه‌های جنس *لوکونوستوک* به منظور درک مکانیسم‌های دفاعی تطبیقی در مقابل فاژها با استفاده از رویکرد مبتنی بر ژنومیکس انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده و شناسایی سیستم CRISPR-Cas

توالی ژنوم ۱۸ گونه شناسایی شده‌ی جنس *لوکونوستوک* شامل ۲ سویه از گونه *Leuc. rapi*، ۳۹ سویه از گونه *Leuc. pseudomesenteroides*، ۱۲۵ سویه از گونه *Leuc. mesenteroides*، ٤٠ سویه از گونه *Leuc. lactis*، ۵ سویه از گونه *Leuc. inhae*، ۳۱ سویه از گونه *L. gelidum* subsp. *gasicomitatum* ، ۲۰ سویه از گونه *Leuc. gelidum*، ٤ سویه از گونه *Leuc. falkenberg*، ۱۹ سویه از گونه *Leuc. carnosum*، ٤ سویه از گونه *Leuc. fallax*، ۱ سویه از گونه *Leuc. litichii*، ۱ سویه از گونه *Leuc. miyukkimchii*، ۱ سویه از گونه *Leuc. garlicum*، ۲ سویه از گونه *Leuc. holzapfelii*، ۳ سویه از گونه *Leuc. citreum*، ۲ سویه از گونه *Leuc. kimchii*، ۱ سویه از گونه *Leuc. palmae* و ۷ سویه از گونه *Leuc. suionicum* از پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ جمع‌آوری شد.

با بارگذاری توالی ژنوم با فرمت FASTA در سایت CRISPRone (https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/) اطلاعاتی در مورد توالی‌های CRISPR/Cas شامل تعداد توالی-های CRISPR موجود در ژنوم، کامل یا ناقص بودن آن‌ها از نظر حضور پروتئین‌های Cas، تعداد و انواع پروتئین‌های Cas، جهت و نوع CRISPR، تعداد تکرارها و طول متوسط آن‌ها، توالی، طول و تعداد انواع Spacerها، و توالی پروتئین‌های Cas مورد مطالعه قرار گرفت.

پیش بینی ساختار ثانویه RNA

به منظور پیش‌بینی ساختار ثانویه تکرارها، در توالی حفاظت شده تکرارها ، نوکلئوتیدهای T را با U جایگزین شده و ساختار ثانویه RNA توسط سرور RNAfold (Gruber et al., 2008) (http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold)، با استفاده از الگوریتم حداقل انرژی آزاد (MFE: Minimum Free Energy) و پارامترهای پیش‌فرض پیش‌بینی شد. عملکرد این سرور برای محاسبه‌ی احتمالات جفت باز و تاخوردگی RNA مبتنی بر اجرای تابع Partition است (Hofacker et al., 2023).

تجزیه توالی های مجاور Protospacer (PAM)

شناسایی پروتواسپیسرها با استفاده از الگوریتم های مبتنی بر شباهت و BLAST انجام گردید. پروتواسپیسرهایی با بیش از ۸۵٪ تشابه و عدم تطابق کمتر از ۳ مد نظر قرار گرفتند. برای تعیین توالی‌های PAM، نواحی ۱۰ نوکلئوتیدی مجاور دو انتهای ۳´ و ۵´ توالی‌های پروتواسپیسر هم‌ردیف شدند. پس از شناسایی توالی‌های PAM، توالی‌های شناسایی شده با استفاده از WebLogo (Crooks et al., 2004) (https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) نمایه‌سازی شدند.

تجزیه روابط خویشاوندی

به‌منظور درک روابط تکاملی بین سیستم‌های شناسایی شده در گونه‌های باکتری لکونوستوک، توالی‌های آمینواسیدی پروتئین همراه Cas1 جداسازی و بعد از پردازش توالی‌ها، همردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clastal X انجام گرفت و در مرحله بعد با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining فاصله ژنتیکی بین پروتئین‌های Cas1 در سیستم‌های شناسایی شده ارزیابی شد. در نهایت، فواصل ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱ به صورت درخت فیلوژنتیکی رسم و ارائه شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

نتایج و بحث

سیستم CRISPR-Cas در ژنوم جنس *لوکونوستوک*

حضور و ویژگی‌های سیستم‌های CRISPR/Cas در جنس‌های مختلف باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این مطالعه با هدف بررسی خصوصیات و تنوع سیستم CRISPR/Cas در تمامی گونه‌ها و سویه‌های مربوط به آن‌ها در جنس *لوکونوستوک* انجام شد. از مجموع ۱۸ گونه ثبت شده برای این جنس در NCBI، ۹ گونه شامل *Leuc. falla*، *Leuc. iltichii*، *Leuc. miyukkimchii*، *Leuc.garlicum*، *Leuc. holzapfelii*، *Leuc. citreum*، *Leuc. kimchii*، *Leuc. palmae* و *Leuc. suionicum* فاقد سیستم CRISPR/Cas کامل بودند. در ۹ گونه دیگر مورد مطالعه اغلب سویه‌ها دارای سیستم CRISPR/Cas کامل (توالی CRISPR بعلاوه توالی تکراری) و تعداد کمتری فاقد سیستم CRISPR/Cas کامل بودند. گونه‌های دارای سیستم CRISPR/Cas کامل شامل ۲ سویه از گونه *Leuc. rapi*، ۳۲ سویه از گونه *Leuc. pseudomesenteroides*، ۱ سویه از گونه *Leuc. mesenteroides*، ۸ سویه از گونه *Leuc. lactis*، ۱ سویه از گونه *Leuc. inhae*، ۱ سویه از گونه *Leuc. gelidum* subsp. *Gasicomitatum* ، ۱۵ سویه از گونه *Leuc. gelidum*، ۲ سویه از گونه *Leuc. falkenberg*، ۲ سویه از گونه *Leuc. carnosum* بودند. ۸ گونه‌ی دارای سیستم CRISPR/Cas کامل غیر از *Leuc. mesenteroides*، در مجموع دارای ٦٤ سویه بودند که ٥٦ سویه دارای سیستم‌های CRISPR/Cas کامل بودند. بطوریکه در هر سویه یک سیستم CRISPR/Cas شناسایی شد و ۸۷/۵ درصد آن-ها کامل بودند (جدول ۱). از ۱۲۵ سویه‌ی جنس *L. mesenteroides*، فقط یک سویه دارای سیستم CRISPR/Cas کامل بود. با احتساب سویه‌های این گونه ۳۰/۱٦ درصد سویه‌ها دارای CRISPR/Cas کامل بودند.

نرخ حضور CRISPR در سویه‌های *Lactobacillus brevis*، ۲۷ درصد (Panahi et al., 2022)، در *Lactobacillus casei* ۳۹ درصد (Yang et al., 2020)، در *Clostridium perfrings* ۵۳/۱۵ درصد (Long et al., 2019)، و در مجموع باکتری‌ها ٤٥ درصد (Grissa et al., 2007) گزارش شده است. بر این اساس نرخ حضور CRISPR در جنس *لوکونوستوک* بالاتر از متوسط سایر باکتری‌ها بود. همچنین در تمامی مطالعات اشاره شده تعداد سیستم‌های CRISPR کامل در برخی سویه‌ها بیش از یک و حتی تا ٦ مورد بود اما در جنس مورد مطالعه در هر سویه یک CRISPR شناسایی شد.

سیستم‌های CRISPR-Cas کامل بر مبنای نوع پروتئین‌های Cas در زیرنوع‌های مختلفی قرار می‌گیرند. تمامی سویه‌های مورد مطالعه‌ی دارای سیستم CRISPR-Cas کامل در زیرنوع II-A قرار گرفتند. **تنوع سیستم CRISPR/Cas در گونه‌های جنس *لوکونوستوک***

نوع سیستم CRISPR در عمده سویه‌های جنس *لوکونوستوک* از زیرنوع II-A بود. به صورت استثنا، سویه LMGH83 از گونه‌ی *Leuc. pseudomesenteroides*، حاوی سیستم نوع II-C بود. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، سیستم‌های CRISR زیرنوع II-A پروتئین‌های Cas9، Cas1، Cas2 وCsn2 را رمز می‌کنند (شکل ۱). تعداد ژن‌های Cas به ازای هر CRISPR از ٤ تا ۷ عدد با میانگین ٤/۸۲ و اغلب ٥ ژن بود. پناهی و همکاران (2022) CRISPRهای شناسایی شده در *Leuc. brevis* را در ۳ زیر گروه II-A، II-C، و I-E قرار دادند. همچنین در مطالعه‌ی انجام شده بر روی *C. perfrings* توسط Long و همکاران (2019)، CRISPRهای شناسایی شده در ٤ زیرنوع I-B، III-D، II-A و II-C قرار گرفتند. با وجود فراوانی نسبتا بیشتر تعداد CRISPRهای شناسایی شده، تنوع انواع CRISPR در این جنس بسیار کمتر بود.

تعداد تکرارها در سیستم‌های کامل، در انواع سویه‌های مورد مطالعه تنوع بسیار زیادی نشان داد. این توالی ها از نظر تعداد بین ٤ تا ۱۰۱ عدد متغییر بود. همچنین طول متوسط تکرارها ۳۲/۸ بود. بطور متوسط طویل‌ترین توالی تکراری در سیستم CRISPR/Cas مربوط به گونه‌های جنس *لوکونوستوک* در گونه-ی *Leuc. pseudomesenteroides* با میانگین ۳٦/۰٤ و کوتاهترین طول متوسط در *Leuc. lactis* با میانگین ۲۹/٤٦ مشاهده شد (شکل ۲، A).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

طول متوسط توالی‌های فاصله دهنده ۳۰/۰۲۸ و پرتکرارترین طول ۳۰ بود. حداقل و حداکثر طول توالی های فاصله دهنده به ترتیب ۲۳ و ۳۲ بود. حداقل و حداکثر تعداد توالی های فاصله دهنده به ازای هر CRISPR متعلق به سویه BIOML-A1 از *Leuc. lactis* به ترتیب به تعداد ٤ و ۱۰۰ عدد بود. در مجموع کل گونه‌های مورد مطالعه تعداد متوسط توالی‌های فاصله دهنده برابر با ۲۱/۱٦ بود.

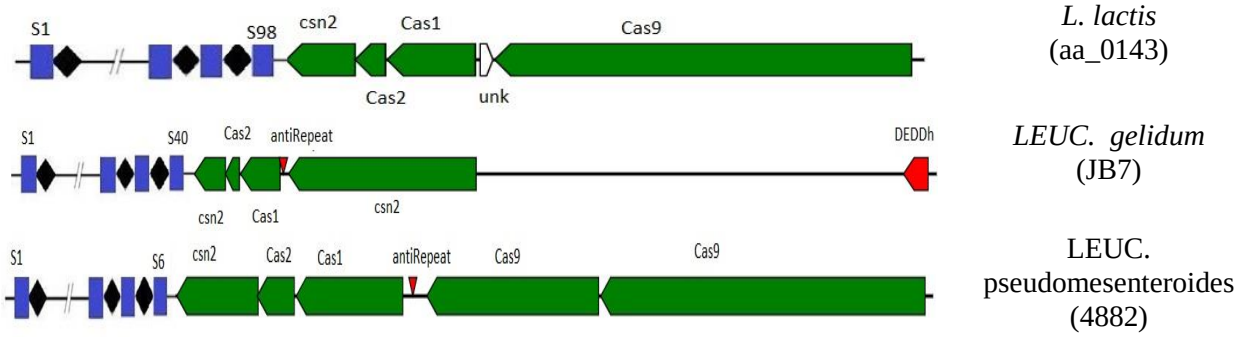
جدول ۱- سیستم‌های CRISPR/Cas کامل در گونه‌ها و سویه‌های جنس *لوکونوستوک*

Table 1. Complete CRISPR/Cas systems in *Leuconostoc* specious and strains.

Species	strains	CRISPR/Cas type	Type	Direction	Cas Gene Number	Repeat Number	Spacer
L. inhae	DSM 15101	Complete	II-A	Positive	4	9	S1-S8
L. gelidum subsp. Gasicomitatum	A.21.4	Complete	II-A	Positive	4	13	S1-S12
L. mesenteroides	DPC 7261	Complete	II-A	Negative	5	8	S1-S7
L. mesenteroides	DPC 7261 (1)	Complete	II-A	Negative	4	8	S1-S7
L. rapi	DSM 27776	Complete	II-A	Positive	6	42	S1-S41
	DSM 27776 contig4(2)	Complete	II-A	Negative	5	42	S1-S41
L. falkenberg	C	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	LMG 10779	Complete	II-A	Positive	5	5	S1-S4
L. carnosum	WC0324	Complete	II-A	Positive	5	12	S1-S11
	WC0319	Complete	II-A	Negative	5	17	S1-S16
L. lactis	BIOML-A1	Complete	II-A	Positive	4	101	s1-s100
	aa_0143	Complete	II-A	Negative	4	99	s1-s98
	CCK940	Complete	II-A	Negative	4	22	s1-s21
	KACC 91922	Complete	II-A	Positive	5	20	s1-s19
	MSK.22.137	Complete	II-A	Negative	4	7	s1-s6
	MSK.22.141	Complete	II-A	Negative	4	7	s1-s6
	UBA5566	Complete	II-A	Positive	6	4	S1-S4
	SBC001	Complete	II-A	Positive	4	26	s1-s25
L. gelidum	C220d	Complete	II-A	Negative	4	33	S1-S23
	AMKR21	Complete	II-A	Negative	5	49	S1-S48
	DSM 19375 contig1	Complete	II-A	Negative	4	21	S3-S22
	Ebr1-8	Complete	II-A	Positive	4	27	S1-S26
	HS9	Complete	II-A	Negative	5	61	s1-s60
	JB7	Complete	II-A	Negative	5	41	S1-S40
	JPBL22	Complete	II-A	Positive	5	66	S1-S65
	KAPA3-9	Complete	II-A	Negative	5	36	S1-S35
	KCTC 3527	Complete	II-A	Positive	4	30	S1-S29
	kg1-2	Complete	II-A	Negative	5	48	S1-S47
	LS4	Complete	II-A	Positive	5	48	S1-S47
	NBRC 113246	Complete	II-A	Positive	4	30	S1-S29
	PB4d	Complete	II-A	Positive	4	22	s1-s21
	PLK1c	Complete	II-A	Negative	5	62	s1-s61
	POKY4-4	Complete	II-A	Positive	5	56	S1-S55
	TMW 2.1618	Complete	II-A	Positive	5	13	S1-S13
L.pseudomesenteroides	1159	Complete	II-A	Positive	7	7	S1-S6
	4882	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	LMGH278	Complete	II-A	Negative	5	6	S1-S5
	AMBR10	Complete	II-A	Negative	4	6	S1-S5
	BM2	Complete	II-A	Negative	5	8	S1-S7
	FDAARGOS_1004	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	HPK01	Complete	II-A	Positive	5	6	S1-S5
	LMGCF06	Complete	II-A	Positive	5	6	S1-S5
	LMGCF08	Complete	II-A	Positive	5	6	S1-S5
	LMGCF15	Complete	II-A	Positive	5	6	S1-S5
	LMGH61	Complete	II-A	Negative	5	6	S1-S5
	LMGH83	Complete	II-C	Negative	5	6	S1-S5
	LMGH97	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	LMGTW1	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	LMGTW3	Complete	II-A	Positive	5	4	S1-S3
	LMGTW6	Complete	II-A	Positive	5	4	S1-S3
	LMGTW8	Complete	II-A	Positive	5	7	S1-S6
	LN02	Complete	II-A	Positive	5	4	S1-S3
	LN12	Complete	II-A	Positive	5	5	S1-S4
	MGBC116435	Complete	II-A	Negative	4	10	S1-S9
	PS12	Complete	II-A	Positive	5	8	S1-S7
	UBA11295	Complete	II-A	Negative	7	7	S1-S6

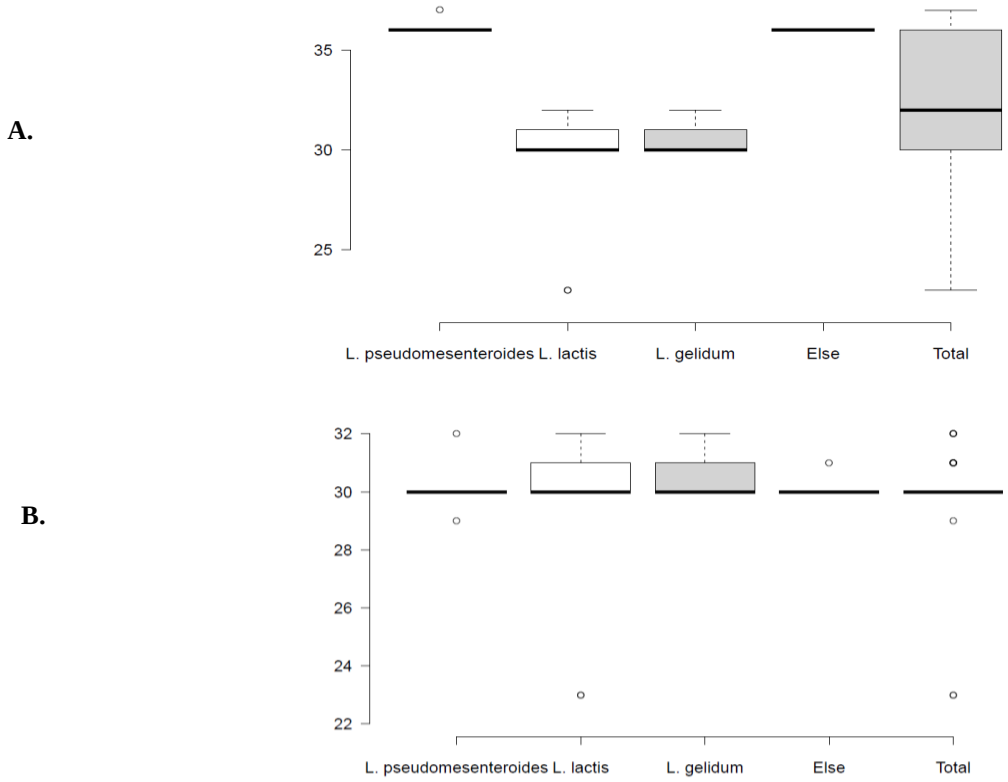
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

متوسط تعداد توالی‌های فاصله دهنده در سیستم‌های CRISPR کامل ۲۱/۱۶ بود. در گونه‌ی *Leuc. pseudomesenteroides* تعداد متوسط توالی‌های فاصله دهنده به ازای هر سیستم CRISPR ۲۲/۵ توالی‌های فاصله دهنده در هر لوکوس، با کمترین تعداد ٤ و بیشترین تعداد ۹ بود. گونه‌ی *Leuc. lactis* در هر لوکوس بطور متوسط دارای ۳٤/۸۷ فاصله دهنده با دامنه‌ی ۱۰۰-٤ بود. تعداد متوسط توالی‌های فاصله دهنده در CRISPRهای *Leuc. gelidum* ۳۸/۸۱ عدد در هر لوکوس بود. کمترین و بیشترین تعداد توالی‌های فاصله دهنده به ترتیب ۱۳ و ٦٥ بودند (شکل ۲، B).



شکل ۱- شکل شماتیک آرایه CRISPR/Cas کامل متعلق به زیرنوع II-A شناسایی شده در جنس لکونوستوک

Fig 1. Schematic diagram of complete CRISPR-Cas array in II-A sub type



شکل ۲- A) توزیع طول تکرار به نوکلئوتید برای هر سیستم CRISPR/Cas ; B) توزیع تعداد فاصله دهنده برای هر سیستم CRISPR/Cas

Fig 2. A. Distribution of the repeat length, in nucleotides for each CRISPR-Cas subtype; B. Distribution of spacer numbers for each CRISPR-Cas.

در تحقیقات بررسی شده زیرنوع I-A در *Bifidobacterium* (Briner at al., 2015, Yang et al., 2020) و زیرنوع I-B/Tneap در *clostridium perfringens* (long et al., 2019) فعال‌ترین سیستم در برابر مهاجمان خارجی DNA معرفی شدند. پناهی و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

همکاران (2022)، با توجه به شواهد موجود در مورد اندازه و وقوع زیرگروه II-A، به این نتیجه رسیدند که احتمالا زیرنوع II-A فعال‌ترین جایگاه ژنوم در گونه *L. brevis* است. در این مطالعه با توجه به عدم وجود تنوع مناسب در انواع سیستم‌های CRISPR، می‌توانیم زیرگروه II-A را به عنوان جایگاه فعال ژنوم در جنس *لوکونوستوک* معرفی کنیم.

تجزیه ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم

تجزیه ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم بینشی در مورد سیستم CRISPR/Cas در سویه‌های *لوکونوستوک* فراهم می‌کند. در شکل شماره ۳ ساختارمربوط به یک سویه از هر گونه نشان داده شده است. با توجه به ساختارهای پیش‌بینی شده در شکل ۳، جایگاه‌های CRISPR پیوسته با توالی‌های تکراری مستقیم ژن‌های Cas در گونه‌های مختلف جنس *لوکونوستوک* تنوع قابل ملاحظه‌ای نشان دادند. ساختارهای فاقد یا دارای ساقه کوتاه، کمترین انرژی آزاد را داشتند. بر اساس پارامترهای پیش فرض سیستم، نواحی قرمز و سبز به ترتیب نشان دهنده‌ی احتمال بالا و پایین conformation در هر ساختار هستند. اثبات شده است ساختارهایی با محتوای GC بیشتر و ساقه طویل‌تر پایدارتر از ساختارهایی با محتوای GC کمتر و طول کوتاه‌تر هستند (yang et al., 2020).

با توجه به ساختارهای پیش‌بینی شده در شکل ۳، جایگاه CRISPR پیوسته با Casهای زیرنوع II-A تنوع بسیار بالایی دارد. همچنین بر اساس ساختارهای پیش‌بینی شده پایداری ساختارهایی با طول بیشتر ساقه بیشتر (انرژی ازاد بیشتر منفی) و بر عکس پایداری ساختارهای فاقد ساقه، که بازهای جفت شده ندارند کمتر است (MFE کمتر منفی). بطوریکه MFE مربوط به MGBC116435 از *Leuc. pseudomesenteroides* صفر است. با در نظر گرفتن حفاظت شدگی و پایداری، ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده جایگاه کریسسپر پیوسته با Casهای زیرنوع II-A و II-C کوتاه‌ترین ساقه را با کمترین MFE داشت (Panahi et al., 2022).

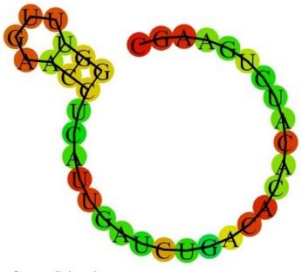
تجزیه موتیف مجاور پروتواسپیسر

توالی‌های PAM از عناصر حیاتی عملکری در سیستم‌های CRISPR/Cas هستند. نشان داده شده است که این توالی‌ها توسط پروتئین‌های Cas برای اتصال به فاژها و دیگر مهاجمان خارجی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mojica et al., 2009). توالی‌های PAM شناسایی شده بر اساس تمامی فاژها و پلاسمیدهای شناسایی شده، برای تمامی گونه‌های مورد مطالعه در دو انتهای ´۳ و ´۵ در شکل ٤ نشان داده شده است.

در مجموع ۹ نوع توالی PAM در انتهای ´۳ و ۹ نوع توالی PAM در انتهای ´۵ شناسایی شد. در ۳ گونه‌ی *Leuc. inhae*، *Leuc. falkenberg* و *Leuc. mesenteroides* توالی PAM شناسایی نشد. در انتهای ´۵ و ´۳ گونه‌ها *Leuc. gelidum* به ترتیب ۵ و ۹ نوع توالی PAM مشاهده شد که بیشترین تنوع در بین کل گونه‌ها بود. در مجموع سویه‌های گونه‌ی *Leuc. carnosum* فقط یک نوع توالی PAM در انتهای ´۵ شناسایی شد که کمترین تنوع مشاهده شده بود. در گونه‌ی*Leuc. gelidum* در دو انتهای ´۵ و ´۳ به ترتیب ۲ و ٤، دو نوع PAM در انتهای ´۳ در گونه‌ی *Leuc. rapi*، ۵ نوع PAM در هر کدام از دو انتهای ´۵ و ´۳ در گونه‌ی *L. lactis*، و به ترتیب ۲ و ۷ نوع توالی PAM در دو انتهای ´۵ و ´۳ گونه‌ی *Leuc. pseudomesentroides* شناسایی شد.

پناهی و همکاران (2022) در مطالعه‌ی *Leuc. bravis* ۲ نوع توالی PAM در انتهای ´۵ و ۵ نوع توالی در انتهای ´۳ گزارش کردند. در مقایسه با جنس *لوکونوستوک* که CRISPRهای شناسایی شده آن همگی از زیرنوع II-A قرار گرفتند، CRISPRهای شناسایی شده در سویه‌های مورد مطالعه در پژوهش پناهی و همکاران در ۳ زیرنوع مختلف قرار داشتند. تنوع انواع PAM در *لوکونوستوک* بیشتر بوده و بنظر می‌رسد مستقل از زیرروه CRISPR است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]



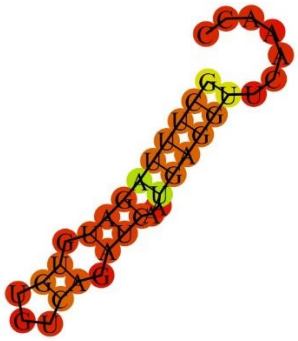
(WC0319) *Leuc. carnosum*

-1.30 kcal/mol

Leuc. pseudomesenteroides

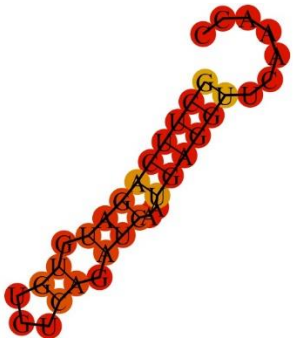
(MGBC116435)

0.00 kcal/mol



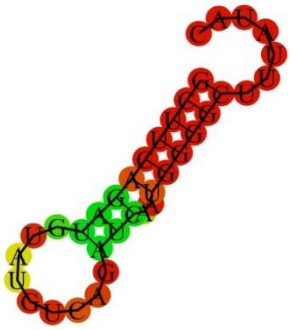
Leuc. rapi (DSM 27776)

-4.70 kcal/mol



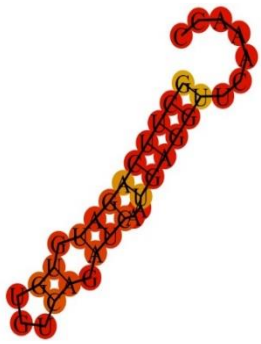
***Leuc. inhae* (DSM 15101)**

-7.18 kcal/mol



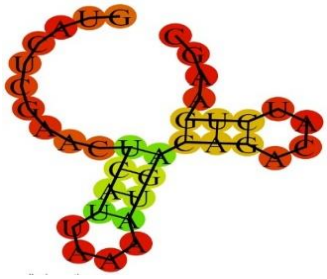
***Leuc. falkenberg* (LMG 10779)**

-6.10 kcal/mol



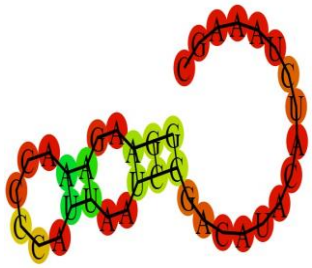
***Leuc. gelidum* (TMW 2.1618)**

-6.90 kcal/mol



Leuc. lactis (aa_0143)

-1.60 kcal/mol



***Leuc. mesenteroides* (DPC 7261)**

-1.40 kcal/mol

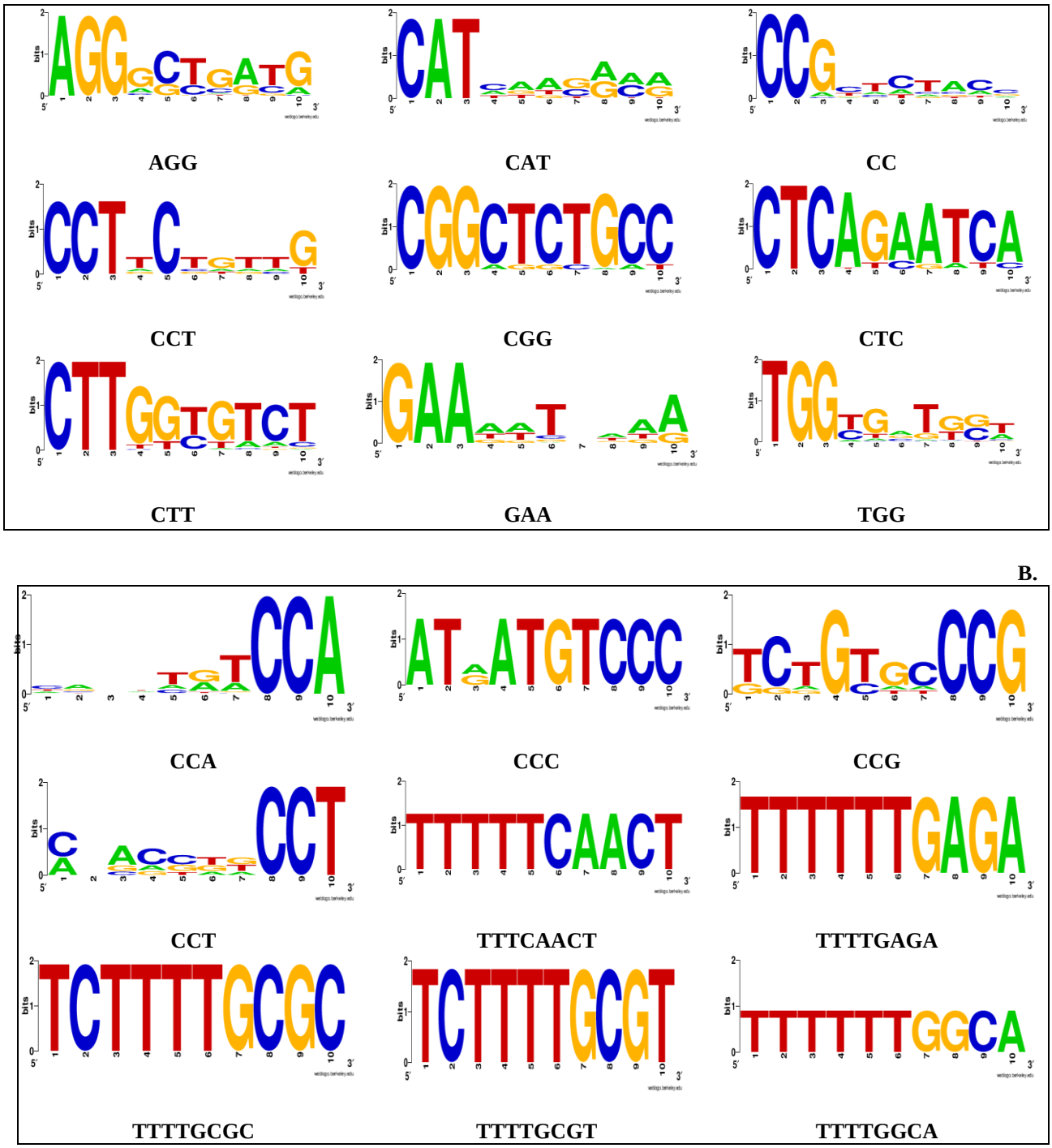
شکل ۳- پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی تکراری مستقیم حفاظت شده و مقادیر MFE مربوطه

Fig 3. The prediction of consensus direct repeat secondary structure and corresponding MFE values.

A.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

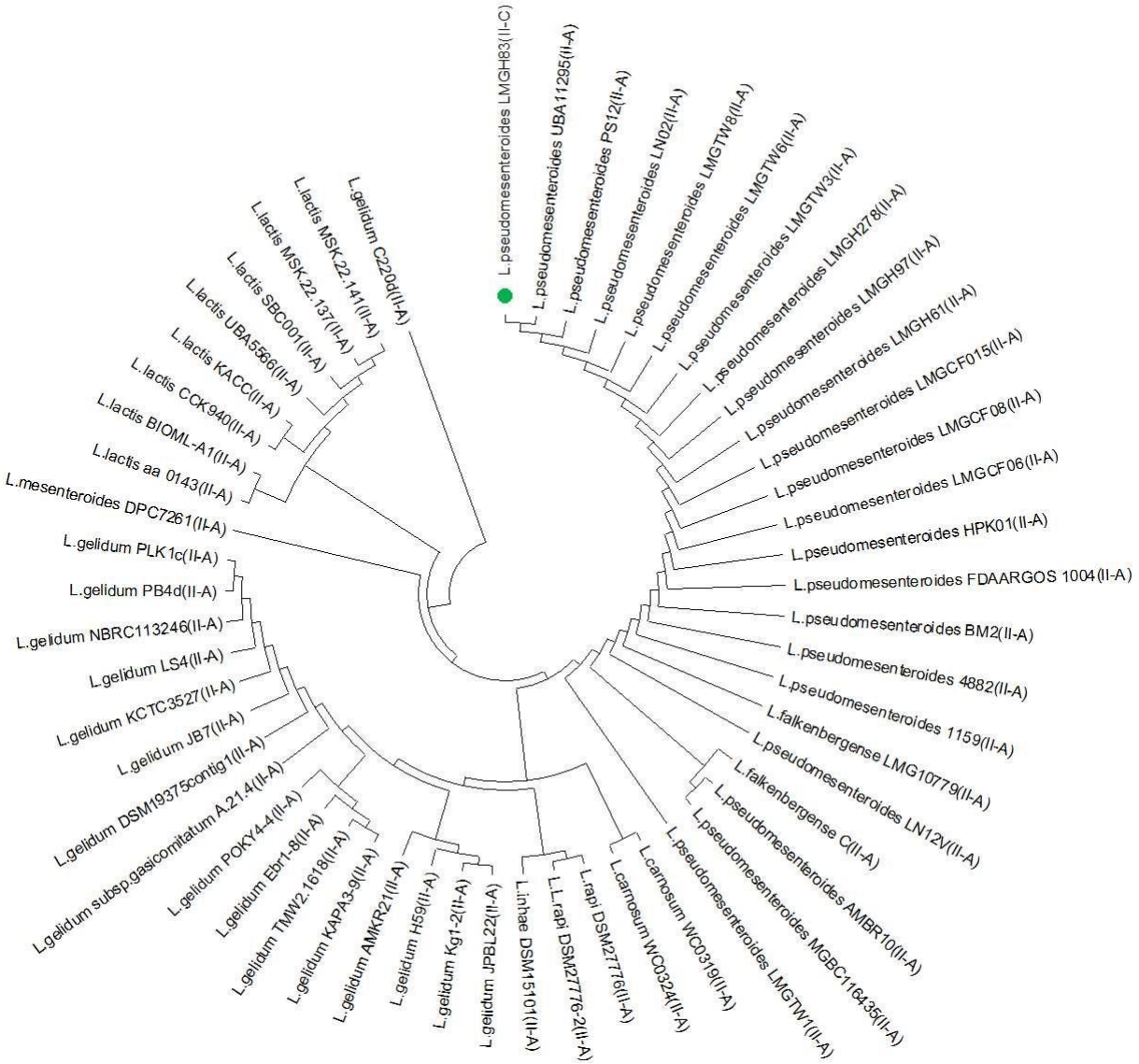


شکل ٤- توالی‌های PAM پیش‌بینی شده در گونه‌ها و سویه‌های جنس *لوکونوستوک* در انتهای A. ´۳ و B. ´ ۵ (ارتفاع هر حرف نشان دهنده‌ی حفاظت‌شدگی نوکلئوتید در موقعیت است).

Fig 4. Predicted PAMs motifs in *Leuconostoc* specious and strains at: A. 3´ end and B. 5´ end (The height of each letter represents the conservation of that nucleotide at each position).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]



شکل ۵- درخت فیلوژنی بر مبنای توالی آمینواسیدی پروتئین‌های Cas1.

Fig 5. Phylogeny tree based on Cas1 amino acid sequence.

برای کسب اطلاعات در مورد سطح حفاظت شدگی و واگرایی سویه‌ها هم‌ترازی چندگانه و تجزیه فیلوژنی بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای Cas1 انجام شد. در درخت فیلوژنی حاصل ۲ خوشه اصلی وجود داشت. بطوریکه سویه C220d از ***Leuc. gelidum*** به تنهایی در خوشه‌ای جدا سایر سویه‌های مورد مطالعه قرار گرفت. در خوشه اصلی دوم مجموع سویه‌های ***Leuc. lactis*** با هم در یک زیرشاخه مستقل و سایر سویه‌های مورد مطالعه در زیر شاخه‌ی دوم که خود شامل دو زیر گروه اصلی بود قرار گرفتند (شکل ۵).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان دهنده تنوع نسبتا پایین سیستم‌های CRISPR/Cas در جنس *لوکونوستوک* با داشتن یک زیرنوع از انواع سیستم‌های CRISPR/Cas بود. با این حال نتایج مطالعه حاضر اهمیت سیستم کریسپر نوع II-A را در تکامل و ایجاد

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

سیستم های ضد فاژی موثر در این جنس از باکتری‌های آشکار کرد. بین گونه‌های مورد مطالعه در تعداد و توالی فاصله دهنده و توالی‌های تکراری، همچنین ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم و توالی‌های PAM تنوع بالایی مشاهده شد. این پژوهش بینشی عمیق از تنوع و عملکرد سیستم CRISPR/Cas در جنس لونوستوک ارائه می‌کند و اطلاعات پایه‌ای با ارزشی را برای مطالعات آینده فراهم می کند.

منابع

Breidt, F. (2004). A Genomic Study of *Leuconostoc mesenteroides* and the Molecular Ecology of Sauerkraut Fermentations. Journal of Food Science, 69(1), 30-32. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb17874.x

Chen, Y.S., Wang, L.T., Wu, Y.C., Mori, K., Tamura, T., Chang, C.H., et al. (2020). *Leuconostoc* litchii sp. nov, a novel lactic acid bacterium isolated from lychee. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(3), 1585–1590. doi: 10.1099/ijsem.0.003938

Cogan, T.M. & Jordan, K.N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria. Journal of Dairy Science 77(9):2704-2717. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77213-1

Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., et al. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. Nucleic Acids Research, 46 (W1), 246-251. doi: 10.1093/nar/gky425

Crawley, A.B., Henriksen, E.D., Stout, E., Brandt, K. & Barrangou, R. (2018). Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli. Scientific Reports, 8, 1-12. doi: 10.1038/s41598-018-29746-3

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M. & Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. Genome Research, 14 (6), 1188-1190. doi: 10.1101/ gr.849004

Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC Bioinformatics 8:172. doi: 10.1186/1471-2105-8-172

Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R. & Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. Nucleic Acids Research, 36, 70-74. doi: 10.1093/nar/gkn188

Held, N.L., Herrera, A., Cadillo-Quiroz, H. and Whitaker, R.J. (2010). CRISPR associated diversity within a population of *Sulfolobus islandicus*. PLoS One, 5, e12988. doi: 10.1371/journal.pone.0012988

Hidalgo-Cantabrana, C., Crawley, A.B., Sanchez, B. and Barrangou, R. (2017). Characterization and Exploitation of CRISPR Loci in Bifidobacterium longum. Frontiers in Microbiology, 8, 1851. doi: 10.3389/fmicb.2017.01851

Hofacker, I.L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. Nucleic Acids Research, 31, 3429-3431. doi: 10.1093/nar/gkg599

Horvath, P., Romero, D.A., Coûté-Monvoisin, A.C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., et al. (2008). Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. Journal of Bacteriology, 190(4), 1401-1412. doi: 10.1128/jb.01415-07

Ilıkkan, Ö.K. (2021). CRISPR-Cas systems and anti-repeat sequences of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus fuchuensis*, and *Lactobacillus sakei* genomes. Microbiology Socity of Korea, 57(1), 12–22. doi: 10.7845/kjm.2021.0093

Jeon, H.H., Kim, K.H., Chun, B.H., Ryu, B.H., Han, N.S. & Jeon, C.O. (2017). A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. jonggajibkimchii subsp. nov. And reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. suionicum (GU et al., 2012) as Leuconostoc *suionicum* sp. nov. Based on complete genome sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(7), 2225-2230. doi: 10.1099/ijsem.0.001930

Khan, Z., Alim, Z., Khan, A.A, Sattar, T., Zeshan, A., Saboor, T., et al. (2022). History and Classification of CRISPR/Cas System. In A. Ahmad, S.H. Khan, & Z. Khan (Ed.). The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing (pp. 29-52). Singapore: Springer. doi: 10.1007/978-981-16-6305-5_2

Kim, D. & Robyt, J.F. (1995). Production, selection and characteristic of mutants of *leuconostoc mesenteroides* b-742 constitutive for dextran. Enzyme and microbial Technology, 17(8), 689-95. doi: 10.1016/0141-0229(94)90086-8

Koonin, E.V. & Makarova, K.S. (2013). CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. RNA biology, 10(5), 679-686. doi: 10.4161/rna.24022

Koonin, E.V., Makarova, K.S. & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Current Opinion in Microbiology, 37, 67-78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008

Levin, B.R., Moineau, S., Bushman, M. & Barrangou, R. (2013). The population and evolutionary dynamics of phage and bacteria with CRISPR–mediated immunity. PLoS Genetics, 9(3), e1003312. doi: 10.1371/journal.pgen.1003312

Long, J., Xu, Y., Ou, L., Yang, H., Xi, Y., Chen, S., et al. (2019). Diversity of CRISPR-Cas system in Clostridium perfringen. Molecular Genetics and Genomics, 294, 1263-1275. doi: 10.1007/s00438-019-01579-3

Lonvaud funnel, A. (1999). *Leuconostoc*. In C.A. Batt & R.K. Robinson (Ed.). Encyclopedia of Food Microbiology (pp. 455-465). Amsterdam, Elsevier: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00416-X

Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., et al. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 9(6), 467-477. doi: 10.1038/nrmicro2577

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]

Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J., et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology, 18(2), 67-83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x

Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nature Reviews Genetics, 11(3), 181–190. doi: 10.1038/nrg2749

Martinez-Murcia, A.I. & Collins, M.D. (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiology Letters, 70(1), 73-83. doi: 10.1016/0378-1097(90)90106-z

Martinez-Murcia, A., Harland, N.M. & Collins, M.D. (1991). A phylogenetic analysis of an atypical *leuconostoc*: description of *Leuconostoc fal/ax* spp. nov. FEMS Microbiology Letters, 66(1), 55-59. doi: 10.1016/0378-1097(91)90420-f

Panahi, b., Majidi, M. & Hejazi, M.A. (2022). Genome Mining Approach Reveals the Occurrence and Diversity Pattern of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Systems in *Lactobacillus brevis* Strains. Frontiers in Microbiology, 13, 911706. doi: 10.3389/fmicb.2022.911706

Riesenberg, S., Helmbrecht, N., Kanis, P., Maricic, T. & Pääbo, S. (2022). Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. Nature Communications, 13(1), 1-8. doi: 10.1038/s41467-022-28137-7

Rossi, C.C., Souza-Silva, T., Araújo-Alves, A.V. & Giambiagi-deMarval, M. (2017). CRISPR-Cas systems features and the gene-reservoir role of *coagulasenegative Staphylococci*. Frontiers in Microbiology, 8, 1545. doi: 10.3389/fmicb.2017.01545

Rostampour, M., Masoomi, R., Nami, Y. & Panahi, B. (2022). A Review of Anti-Phage Systems in Lactic Acid Bacteria. Journal of BioSafety 15(2): 37-54. doi: 20.1001.1.27170632.1401.15.2.8.4 [In persian]

Sultan, Q., Ashraf, S., Munir, A., Khan, S.H., Munawar, N., Abd-Elsalam, K.A. & Ahmad, A. (2022). Beyond Genome Editing: CRISPR Approaches. In: A. Ahmad, S. Habibullah Khan & Z. Khan (Ed.). The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing (pp. 187-218). Singapore: Springer. doi: 10.1007/978-981-16-6305-5

Van Belkum, A., Soriaga, L.B., LaFave, M.C., Akella, S., Veyrieras, J.B., Barbu, E.M., et al. (2015). Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa. mBio, 6(6), e01796-15. doi: 0.1128/mBio.01796-15

Van der Oost, J., Jore, M.M., Westra, E.R., Lundgren, M. & Brouns, S.J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. Trends in Biochemical Sciences, 34(8), 401-407. doi: 10.1016/j.tibs.2009.05.002

Yang, D. & Woese, C.R. (1989). Phylogenetic structure of the "*Leuconostocs*": an interesting case of a rapidly evolving organism. Systematic and Applied Microbiology, 12(2), 145-149. doi: 10.1016/S0723-2020(89)80005-0

Yang, L., Li, W., Ujiroghene, O.J., Yang, Y., Lu, J., Zhang, S, et al. (2020). Occurrence and Diversity of CRISPR Loci in *Lactobacillus casei* Group. Frontiers in Microbiology, 11: 624. doi: 10.3389/fmicb.2020.00624 Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70(4), 2782-2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.12.2.281]