مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۷۴-۲۶۶

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2

DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2
2023

http://gebsj.ir/

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

ویرایش ژنومی گیاه سیب زمینی با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9

Potato Genome Editing Using CRISPR Technologies

عصمت اشعار قدیم، مقصود پژوهنده*، محمد احمدآبادی
Esmat Ashaar-Ghadim, Maghsoud Pazhouhandeh*, Mohammad Ahmadabadi

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
Biotechnology Department, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author, Email : نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی *
pazhouhandeh@gmail.com
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹)

چکیده

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L) (2n=4x=48)، یک محصول هتروزیگوت و پلی‌پلوئید است که بعد از برنج، گندم و ذرت، مهمترین محصول غذایی جهان شناخته می‌شود. با روند کنونی افزایش جمعیت جهانی، عقیده بر این است که این گیاه می‌تواند یک محصول حیاتی برای تامین نیازهای غذایی این جمعیت رو به رشد باشد. اگرچه روش‌های سنتی اصلاحی، باعث بهبود عملکرد این گیاه شده است، بااین‌حال وراثت تتراژومی، تحقیق و اصلاح سیب‌زمینی از طریق دورگ‌گیری سنتی را پیچیده می‌کند. با استفاده از ویرایش ژنوم اختصاصی، یک یا چند صفت می‌تواند به واریته‌های تجاری اضافه شود، در نتیجه از دورگ‌گیری جلوگیری می‌شود. در سال-های اخیر، ابزارهای مدرن مانند سیستم کریسپر با ارایه فناوری‌های جدید، ساده و در عین‌حال قدرتمند، به دانشمندان در تسریع روند اصلاحی گیاهان مختلف کمک شایانی کرده است. با پیشرفت‌های صورت گرفته، الحاق، بیان یا خاموش‌سازی ژن‌های مهم، برای بهبود تولید سیب-زمینی و صفات کیفی، در گونه‌های فعلی مورد استفاده قرار گرفته است. در این میان، اطلاعات توالی ژنوم به‌همراه روش‌های معتبر ترانسفورماسیون ژنتیکی و باززایی، سیب‌زمینی را به‌عنوان یک کاندیدای قوی مهندسی ژنتیک تبدیل کرده است. هدف از این مقاله، بررسی تحقیقات صورت گرفته در گیاه سیب‌زمینی با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 جهت بهبود صفات و افزایش بهره‌وری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

سیستم CRISPR-Cas9،
سیب‌زمینی،
ویرایش ژن
مهندسی ژنتیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

Potato (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48), is a tetraploid and heterozygous crop. This plant is the world's most important food crop after rice, wheat and corn. According to the current pressure of increasing population, potato is believed to be a vital crop to meet the food need of the growing population. Although conventional breeding approaches have improved potato yield, tetrasomic inheritance makes potato research and breeding difficult through traditional crossbreeding. By specific applications of genome editing, one or a few traits can be added to a commercial variety, hence crossbreeding method can be avoided. In recent years, genome editing via the CRISPR-Cas9 system, by providing simple and robust new technologies, has helped plant scientists to accelerate different plant breeding processes. With advances being made, the insertion, expression or silencing of economically important genes is being used to improve potato production and the quality traits of current potato varieties. Furthermore, genome sequence information coupled with established genetic transformation and regeneration procedures make potato a strong candidate for genetic engineering. The purpose of this article, is to review the researches done on potato using the CRISPR-Cas9 system, in order to improve traits and increase crop productivity.

Keywords: CRISPR-Cas9 system, Potato, Gene editing, Genetic Engineering.

مقدمه

گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) (2n=4x=48)، متعلق به خانواده‌ی بزرگ Solanaceae، دارای حدود ۹۸ جنس، ۲۷۰۰ گونه و ۱۰۰۰ کولتیوار است (Sarbesh Das Dangol *et al*., 2019). این ماده‌ی غذایی از ارزش غذایی بالایی برخوردار بوده و در هر هکتار، بازده انرژی بالایی نیز دارد (Ellis *et al*., 1998)، به‌طوری که تولید سالانه جهانی آن حدود ۳۷٤,٥ میلیون تن می‌باشد (Sarbesh Das Dangol *et al*., 2019). این گیاه یکی از محصولات هتروزیگوت و پلی‌پلوئید است که پس از گندم، برنج و ذرت، چهارمین محصول مهم غذایی محسوب می‌شود (Devaux *et al*., 2014; Hameed *et al*., 2018). با توجه به این‌که افزایش جمعیت تا سال ۲۰۵۰، بالغ بر ۹,۷ بیلیون نفر تخمین زده شده است، در آینده این گیاه یکی از منابع با اهمیت غذایی برای تامین نیاز غذایی این جمعیت جهانی رو به رشد خواهد بود (Caliskan *et al*., 2010; Jacobs *et al*., 2011; FAO 2013).

بااین‌حال، تغییرات جهانی آب و هوا، ایجاد پاتوژن‌های جدید و نیاز به بهبود کیفیت و انبارداری این گیاه، برای ایجاد کولتیوارهای جدید با خصوصیات اصلاح شده، ضروی است (Khromov *et al*., 2018). از نظر اصلاح گیاهی، سیب‌زمینی دارای مزایا و درعین‌حال محدودیت‌هایی می‌باشد. از بزرگترین مزایای این گیاه این است که تکثیر رویشی، نیاز به تکثیر از طریق بذر حقیقی برای تولید گیاهان هموژن را مرتفع می‌سازد (Kennedy, 2008). اما اگرچه روش‌های سنتی اصلاحی، باعث بهبود عملکرد گیاه سیب‌زمینی شده است، درعین‌حال، تتراپلوئیدی، یکی از مهمترین موانع تکثیر صفات مورد نظر در نتاج بوده، تحقیق و اصلاح آن‌را از طریق دورگ‌گیری سنتی پیچیده می‌کند (Muthoni *et al*. 2015). با استفاده از ویرایش ژنوم اختصاصی، یک یا چند صفت می‌تواند به واریته‌های تجاری اضافه شود، در نتیجه از دورگ‌گیری جلوگیری می‌شود.

با وجود گسترش تکنولوژی‌های مختلفِ دستکاری DNA، شامل موتاسیون شیمیایی و پرتوتابی، جایگزینی ژن به‌واسطه DNA ریکامبیناز، سیستم‌های ZFN (Zinc-finger nucleases) و TALEN (Transcriptional activator-like effector nuclease)، بااین‌حال هزینه‌ی بالا، کاربر بودن و زمان‌بری، از مهمترین معایب این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

روش‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر، کشف سیستم CRISPR/Cas (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR-associated proteins)، به‌عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های سیستم ایمنی تطابق‌پذیر پروکاریوتی و تبدیل آن به یک ابزار ویرایش DNA قوی، بطور کامل بحث دستکاری ژن را تغییر داده است (Urnov, *et al*., 2005; Bedell *et al*., 2012).

نتایج

سیستم CRISPR/Cas، یکی از مهمترین مکانیسم‌های سیستم ایمنی تطابق‌پذیر پروکاریوتی برعلیه ویروس‌ها است که در بیشتر آرکیاها و بسیاری از باکتری‌ها یافت شده و بر اساس اصل تشخیص خودی از غیرخودی عمل می‌کند (Amitai, Sorek 2016). این سیستم، شامل نوکلئاز Cas و دو جزء RNA، یک جزء crRNA (Crispr RNA) با قابلیت برنامه‌ریزی و یک جزء ثابت tracrRNA (Trans-activating crRNA) می‌باشد. مکانیسم عمل این سیستم به این صورت است که زمانی که سلول باکتریایی، برای اولین‌بار در معرض تهاجم باکتریوفاژ، پلاسمیدها یا دیگر عناصر ژنتیکی متحرک (MGEs: Mobile genetic elements) قرار می‌گیرد (Mir *et al*., 2018)، ژن Cas این DNA (معمولا DNA، گاهی RNA و به‌ندرت هر دو را) را به‌عنوان قطعه خارجی شناسایی کرده، آن‌را به قطعات کوچک شکسته و یک قطعه از ژنوم آن‌را در ناحیه‌ی spacer مربوط به CRISPR کروموزوم میزبان، به‌عنوان یک spacer جدید، الحاق می‌کند (Amitai, Sorek. 2016). متعاقبا آرایه‌ی CRISPR، برای تولید crRNA و یک tracrRNA مکمل، رونویسی شده و تولید یک ساختار RNA دورشته‌ای می‌کند که پروتئین‌های Cas را برای برش DNA خارجی در آلودگی‌های بعدی با همان فاژ، بکار می‌گیرد (Datsenko *et al*., 2012; Jinek *et al*., 2012).

در سال ۲۰۱۲، محققین واریانت جدیدی از Cas9 را ایجاد کردند که از یک رشته‌ی RNA تک رشته‌ای، به‌عنوان جایگزین crRNA و tracrRNA، به نام sgRNA (Single guide RNA) استفاده می‌کند. sgRNA شامل یک توالی مکمل ناحیه‌ای از DNA است که هدف تغییر می‌باشد (Jinek *et al*., 2012). از آن زمان، تلاش زیادی توسط گروه‌های مختلف محققین برای توسعه این روش صورت گرفته است. درحال حاضر، پروتئین Cas9 به‌میزان زیادی به‌عنوان ابزار مهندسی ژنوم، برای القاء شکست هدفمند در DNA دورشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. این شکست می‌تواند باعث غیرفعال‌سازی ژن، یا معرفی ژن‌های هترولوگ، از طریق نوترکیبی غیر هومولوگ (NHEJ: Non-homologous end joining) و نوترکیبی هومولوگ (HDR: Homology-directed recombination) در بسیاری از ارگانیسم‌های مدل آزمایشگاهی شود. در کنار پروتئین‌های ZFN و TALEN، پروتئین Cas9 به یک ابزار غالب در زمینه ویرایش ژنوم تبدیل شده است. به‌دلیل اختصاصیت هدف Cas9 به guide RNA:DNA و عدم تغییر خود پروتئین (مانند TALENها و Zinc-fingerها)، مهندسی Cas9 برای DNA جدید هدف، آسان‌تر است (Mali *et al*., 2013). علاوه براین، سیستم CRISPR/Cas قادر به افزودن صفات مطلوب و حذف صفات ناخواسته در یک رویداد واحد می‌باشد. این تکنیک باعث افزایش تولید گیاهان تغییر یافته‌ی ژنتیکی transgene-free شده و در نتیجه در رفع نگرانی‌های نظارتی در مورد گیاهان تراریخته می‌تواند موثر باشد. چرا که به‌دلیل این‌که بیشتر ویرایش‌ها تنها در چند نوکلئوتید صورت می‌گیرد، خطر تغییر ژنوم از طریق تکنولوژی ویرایش، به‌میزان قابل‌توجهی کمتر است (Voytas *et al*., 2014). تنها در طول ۵ سال گذشته، تکنیک ویرایش ژنوم CRISPR، برای مهندسی بیش از ۲۰۰ گونه مهره‌دار، بی‌مهره، گونه‌های گیاهی و میکروبی، مورد استفاده قرار گرفته است (Farboud *et al*., 2018). از سال ۲۰۱۳ ، سیستم CRISPR-Cas9 برای بین موقت و/یا پایدار در چندین گونه‌گیاهی بکار گرفته شده است. از گیاهان مورد مطالعه در طی این چند سال می‌توان به ذرت، گندم، برنج، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، خیار، قارچ و گریپ‌فروت اشاره کرد که برای اصلاح صفات مختلفی مانند افزایش تعداد و اندازه‌ی دانه، افزایش وزن دانه و محتوی پروتئینی، افزایش محتوی آمیلوز و آمیلوپکتین، تسریع زمان برداشت، مقاومت به بیماری‌های مختلفی مانند بلاست، سفیدک پودری، شانکر مرکبات، بلایت باکتریایی، مقاومت به علف‌کش‌ها و ... با استفاده از این تکنیک ویرایش ژنومی شده‌اند(Li *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2018; Sun *et al*., 2017; Andersson *et al*., 2017; Zhou *et al*., 2015; Nekrasov *et al*., 2017; Peng *et al*., 2017; Jia *et al*., 2017; Soyk *et al*.,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

2017; Endo *et al*., 2016; Sun *et al*., 2016; Li *et al*., 2016; Butt *et al*., 2017).

به‌تازگی، سیستم CRISPR-Cas9 برای القاء جهش‌زایی هدفمند در گیاه سیب‌زمینی با استفاده از چندین روش انتقال، بکار گرفته شده است (Van Eck, 2018).

تحقیقات صورت گرفته با هدف خاموش‌سازی ژن‌های مختلف در گیاه سیب‌زمینی بر مبنای سیستم CRISPR-Cas9

تاکنون تحقیقات محدودی با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 برروی گیاه سیب‌زمینی انجام پذیرفته است. اولین تحقیقات توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت. در این تحقیق اگزون ۲ مربوط به ژن *StIAA2* (کد کننده‌ی پروتئین Aux/IAA) در گیاه سیب‌زمینی دیپلوئید مورد هدف قرار گرفت. براساس نتایج این تحقیق، سیستم CRISPR-Cas9 قادر به تولید موتانت پایدار در گیاهان ترانس‌ژنیک سیب‌زمینی می‌باشد. علاوه براین، در گیاهان نسل T1، دو موتانت هموزیگوت مونوآللی با حذف ۲ و ۱۸ باز، و یک موتانت بی‌آللی، یک آلل با حذف ۱۸ باز و یک آلل با حذف کوچک دو آللی نیز حاصل شد (Wang *et al*., 2015).

Butler و همکاران در سال ۲۰۱۵، از ترانسفورماسیون سیستم CRISPR-Cas9 به‌واسطه‌ی *آگروباکتریوم* برای هدف قرار دادن ژن *Acetolactate synthase 1* (*ALS*) در کالوس‌های گیاه سیب‌زمینی دیپلوئید X914-10 و تتراپلوئید Desiree استفاده کردند. در دیپلوئیدها از ٤ کاندیدا، ۳ مورد حاوی حداقل دو موتاسیون در یک لوکوس *ALS*، و در تتراپلوئیدها، از ۵ کاندیدا، ٤ مورد حامل تنها یک موتاسیون واحد بودند. با انجام خودگشنی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید، ۳۷–۱۹ درصد نتاج عاری از توالی Cas9 بودند و میزان موتاسیون هدف در آن‌ها ۱۰۰–۸۷ درصد گزارش شد (Butler *et al*.,2015).

Andersson و همکاران در سال ۲۰۱۷، سه ناحیه‌ی مختلف، دو جایگاه در اگزون ۸ و یک جایگاه در اگزون ۹ مربوط به ژن *granule-bound starch synthase* (*GBSS*) را با هدف خاموش-سازی هر چهار آلل این ژن در سیب‌زمینی تتراپلوئید Kuras، اجرا کردند. خاموشی آنزیم GBSS باعث تغییر سنتز آمیلوز و در نتیجه افزایش میزان آمیلوپکتین/ آمیلوز شده و در نتیجه خصوصیات نشاسته تولیدی را تغییر می‌دهد. در این تحقیق برای جلوگیری از کراسینگ‌های بعدی، از ترنسفکشن موقت DNA پلاسمیدی به-واسطه‌ی PEG در پروتوپلاست استفاده شد. ۱۲–۲ درصد از گیاهان باززا شده، حاوی حداقل یک آلل موتانت و ۲ درصد لاین-ها در هر ٤ آلل دارای موتانت در ژن *GBSS* بودند. بیشتر موتانت‌ها حاوی ایندل‌های کوچک ۱۰–۱ جفت بازی بودند. بااین‌حال، ۱۰ درصد از لاین‌های مورد بررسی، شامل الحاقاتی از DNA وکتوری، با طول ۲۳٦–۳٤ جفت باز، بودند (Andersson *et al*., 2107).

در تحقیقی دیگر Andersson و همکاران در سال ۲۰۱۸، از تکنولوژی ویرایش ژنوم DNA-free، کمپلکس CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex (RNP)، برای هدف قرار دادن اگزون ۹ ژن *StGBSS* استفاده کردند. در این روش، پروتئین Cas9 و gRNA هدف، از طریق رونویسی in vitro (IVT-RNP) یا سنتز شده (cr-RNP)، به‌صورت in vitro سرهم‌بندی شد. در روش crRNA با استفاده از ترانسفورماسیون پروتوپلاست توسط PEG ٤۰ درصد و ۲۵ درصد، به ترتیب حدود ۹ درصد و ۱ درصد، حداقل یک آلل موتانت بدون هیچ‌گونه ادغام ترانس‌ژن حاصل شد. با استفاده از IVT-RNP، موتاژنز تا ۲۵ درصد افزایش یافت، بااین-حال، بیش از ۸۰ درصد از گیاهان باززا شده، در جایگاه برش، حاوی الحاقاتی از پلاسمید (با وجود تیمار رونوشت‌های sgRNA با DNAse I) یا DNA کروموزمی بودند، که این میزان مشابه استفاده از انتقال DNA است. این امر تاکیدی بر ضرورت حذف DNA الگو، در انتهای واکنش رونویسی in vitro می‌باشد. در گیاهان باززا شده، با استفاده از ترانسفورم توسط PEG ٤۰ درصد، دو لاین موتانت در همه‌ی ٤ آلل و بدون هیچ DNA الحاقی ناخواسته، یکی با استفاده از روش crRNA و یکی IVT-RNP، شناسایی شد. بنابراین ۳–۲ درصد از گیاهان باززا شده، بدون هیچ فعالیت آنزیمی بودند (Andersson *et al*., 2018).

Nakayasu و همکاران در سال ۲۰۱۸، از ۹ عدد sgRNA مختلف برای هدف قرار دادن خاموش‌سازی ژن *St16DOX* در گیاهان سیب‌زمینی تتراپلوئید Mayqueen، با استفاده از ترانسفورم به واسطه‌ی *A. rhizogenes* و سیستم کشت ریشه‌های مویی، استفاده کردند. این ژن کدکننده‌ی 16α-hydroxylase است که در بیوسنتز

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

گلیکوآلکالوئیدهای استروئیدی(SGA: Steroidal glycoalkaloids) درگیر می‌باشد. آلکالوئیدهای استروئیدی و اشکال گلیکوزیله‌ی آن-ها، ترکیبات حاوی نیتروژن با طعم تلخ هستند که برای انسان و بسیاری از موجودات سمی می‌باشند (Heftmann, 1983) بنابراین کنترل محتوای آن در گیاه سیب‌زمینی، یکی از اهداف اصلاحی مهم می‌باشد. در این تحقیق ۲ لاین حاوی چندین موتاسیون در جایگاه-های مختلف و حذف قطعات کروموزومی در ژن *St16Dox* و در نتیجه تولید لاین‌های عاری از SGA در ریشه‌های مویی بودند (Nakayasu *et al*., 2018).

Khromov و همکاران در سال ۲۰۱۸، فعالیت in vitro مربوط به sgRNAهای هدف مختلف ژن(PDS) *phytoene desaturase* که در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها عمل می‌کند و یک ژن *coilin* که در مقاومت گیاهان نقش دارد را، مقایسه کردند. به‌دلیل بی‌رنگ شدن در عدم حضور ژن PDS، فنوتیپ ظاهری خاموش‌سازی این ژن، شناسایی و آنالیز ویرایش ژنوم گیاهان موتانت را آسان‌تر می‌کند. همچنین خاموش‌سازی ژن *coilin*، که در مسیر ایجاد مقاومت به پاتوژن‌ها و بهبود مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارد، بسیار مورد توجه است. براساس نتایج این تحقیق، اگرچه ٦ نوکلئوتید نزدیک به ناحیه‌ی '3 توالی PAM، بطور مستقیم با نوکلئاز Cas9 تعامل دارد، بااین‌حال، ساختار اولیه و ترکیب آن هیچ نقش اساسی در اختصاصیت تعامل و فعالیت کمپلکس Cas9-sgRNA نشان نمی‌دهد. نوکلئوتیدهای جفت نشده‌ی DNA هدف با sgRNA، بسته به موقعیتِ عدم تطابق می‌توانند در in vitro، باعث تحریک یا سرکوب فعالیت این کمپلکس شوند.

Kusano و همکاران در سال ۲۰۱۸، از سیستم افزایش ترجمه‌ی dMac3 در انتهای UTR′5 مربوط به mRNA ژن *OsMac3*، به-همراه چند gRNA برای هدف‌گیری ژن *GBSSI* استفاده کردند. با استفاده از این سیستم، فراوانی موتانت القا شده توسط سیستم CRISPR-Cas9 در ژن *GBSSI* به میزان زیادی افزایش یافت. بطوری‌که میزان ترانسفورم‌های حاوی هر چهار آلل موتانت، به حدود ۲۵ درصد رسید. گیاهان موتانت، حاوی میزان آمیلوز کمتری در غده‌ها بودند.

جدول ۱- تحقیقات انجام شده با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 بر روی گیاه سیب‌زمینی

Table 1. List of the researches done on potato using CRISPR-Cas9

ژن هدف	شیوه ترانسفورم	کارآیی	رفرنس
اگزون 2 ژن *StIAA2*	*آگروباکتریوم*	موتانت هموزیگوت مونوآللی و بی‌آللی در نسل T1	Wang et al. (2015)
Acetolactate synthase 1 (*StALS*)	ترانسفورم T-DNA به‌واسطه *آگروباکترویوم* و T-DNA جیمنی ویروس تغییر یافته	موتانت هدف ۱۰۰=۸۷ درصدی در ایونت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید	Butler et al. (2015)
اگزون 8 و 9 ژن *Granule-bound starch synthase* (*GBSS*)	ترانسفورم پروتوپلاست به‌واسطه‌ی PEG	۲ درصد موتاسیون در هر ٤ آلل گیاهان باززا شده	Andersson et al. (2017)
اگزون 9 ژن stGBSS	RNP	۹ درصد موتانت بدون ادغام ترانسژن	Andersson et al. (2018)
St16DOX	الکتروپوریشن *آگروباکترویوم* رایزوژنز	تولید لاین‌های عاری از SGA	Nakayasu et al. (2018)
ژن‌های*Phytoene desaturase* و *coilin*	مطالعه‌ی in vitro بدون انتقال به گیاه	سرکوب و تحریک فعالیت کمپلکس Cas9-sgRNA، توسط نوکلئوتیدهای جفت نشده بین DNA و sgRNA	Khromov et al. (2018)
ژن *Granule-bound starch synthase I (GBSSI)*	*آگروباکترویوم* EHA 105	۲۵ درصد موتانت در هر ٤ آلل	Kusano et al. (2018)
St16DOX	RNP با استفاده از ترانسفکشن لیزر ژنوم به‌واسطه‌ی ذرات طلا		Londenberg et al., (2020)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

Londenberg و همکاران در سال ۲۰۲۰، برای کاهش اثرات سمی گلیکوآلکالوئیدهای آلفاسولانین در گیاه سیب‌زمینی، از سیستم انتقال CRISPR-Cas9 RNP به پروتوپلاست با استفاده از ترانسفکشن لیزر ژنوم به‌واسطه‌ی ذرات طلا، استفاده کردند. در این روش، از یک لیزر Nd:YAG برای تشدید پلاسمون سطحی (SRP: surface plasmon resonance) نانوذرات طلای متصل به غشا استفاده می‌شود. جذب شدید نور لیزر، باعث افزایش دما، بخار شدن محیط اطراف و تشکیل حباب شده و در نتیجه نفوذپذیری گذرا در غشای سلول ایجاد می‌شود. در این تحقیق، برای تسهیل اتصال نانوذرات، ترکیبی از لکتین اتصال به غشای سلولی و یک مولکول لینکر مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌های بکار رفته برای انتقال سیستم CRISPR-Cas9 به سلول‌های گیاه سیب‌زمینی

تاکنون سیستم‌های ترانسفورم مختلفی مانند الکتروپوریشن، پلی-اتیلن گلیکول (PEG)، اگروانفیلتراسیون، فورال دیپ به‌واسطه‌ی آگروباکترویوم، بیولستیک، ترانزیت پپتیدها و وکتورهای ویروسی، برای انتقال عناصر CRISPR-Cas9 در سلول‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Yin *et al*., 2015; Ma *et al*., 2016; Sattar *et al*., 2017). در ترانسفورم به‌واسطه‌ی آگروباکترویوم، ترانسژن CRISPR-Cas در T-DNA، به سلول معرفی شده، دورن ژنوم ادغام شده و ساختار ژنتیکی آن‌را تغییر می‌دهد. برای به‌دست آوردن لاین‌های موتانت T2 transgene-free، طی نسل‌های T0 تا T2، جداسازی ژنتیکی صورت می‌پذیرد (Ricroch *et al*., 2017). بااین‌حل این روش برای گیاهان سیب‌زمینی تتراپلوئید سازگار نیست. با توجه به هتروزیگوتی شدید و همچنین وراثت تترازومی گیاه سیب‌زمینی، سیستمی که باعث معرفی موقت عناصر CRISPR-Cas9 برای ایجاد گیاهان ناک‌اوت شود، بدون این‌که هیچ DNA خارجی در گیاهان بازرا شده باقی بماند، بهترین شیوه اصلاح این گیاهان است (Arora and Narula 2017).

ویرایش DNA free گیاهان توسط RNP یکی از این عرصه‌های نوظهور است که در سال ۲۰۱۵ ایجاد شد. مطالعات نشان داده است که سیستم ویرایش بواسطه‌ی RNPها، به‌جای پلاسمیدهایی که این اجزاء را رمزگذاری می‌کنند، جایگزین مناسبی برای استفاده از DNA می‌باشد (Cho *et al*., 2013, Kim *et al*., 2014, Woo *et al*. 2015, Liang *et al*., 2017). در ویرایش ژنوم با RNPها، اجزاء پروتئین Cas9 (یا Cas12) و sgRNA سنتزی از قبل سرهم‌بندی شده و تولید RNP شده، سپس به پروتوپلاست‌ها انتقال داده می-شوند. در نتیجه از بسیاری از مشکلات ناشی از انتقال مبتنی بر اسیدنوکلئیک جلوگیری می‌شود (Nadakuduti *et al*., 2018). این روش انتقال RNP DNA-free، ازاین‌نظر برای اصلاح گیاهان ارزشمند است که محصولات اصلاح شده، احتمالا خارج از مقررات GMO قرار می‌گیرند و در نتیجه کاربردهای این فن‌آوری، با سطح پذیرش جهانی بیشتری گسترش می‌یابد (Malnoy *et al*., 2016). به‌طوری‌که وزارت کشاورزی آمریکا (USDA: US (Department of Agriculture، در صورتی که گیاه عاری از آگروباکتریوم، هر ماده ترانسژنیک یا هرگونه ماده ژنتیکی خارجی باشد، هیچ‌گونه مقررات GMO برای گیاهان دارای جهش‌زایی هدفمندِ ایجاد شده توسط مکانیسم‌های خودترمیمی ندارد. بنابراین احتمال زیادی وجود دارد که CRISPR/Cas9 RNPها از قوانین GMO فعلی معاف شده (Waltz, 2012; Ledford, 2013; Jones, 2015) و نگرانی عمومی در مورد ایمنی زیستی کاهش یابد (Zaman *et al*., 2018). علاوه براین، در حال‌حاضر، پروتئین Cas9 خالص شده، در دسترس و به نسبت ارزان بوده و gRNA با استفاده از رونویسی in vitro یا سنتز توسط شرکت‌ها، به‌آسانی تهیه می-شود. در گیاه سیب‌زمینی، این هدف با بیان موقت کمپلکس CRISPR/Cas9 RNP با استفاده از انتقال به‌واسطه‌ی PEG در پرتوپلاست (Andersson *et al*., 2017)، و ترانسفکشن لیزر ژنوم به‌واسطه‌ی ذرات طلا (Londenberg *et al*., 2020) حاصل شده است.

نتیجه گیری کلی

گیاه سیب‌زمینی یکی از محصولات تتراپلوئید و بسیار هتروزیگوت است که به‌عنوان چهارمین محصول مهم غذایی محسوب می‌شود (Devaux *et al*., 2014). این ماده‌ی غذایی از ارزش غذایی بالایی برخوردار بوده و در هر هکتار، بازده انرژی بالایی نیز دارد (Ellis *et al*., 1998). همین عامل باعث شده است

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

که برای تولید محصولاتی با ژنوتیپ یکسان، تکثیر آن به‌صورت کلونی صورت گیرد. باتوجه به در دسترس بودن توالی کامل ژنوم و نتایج تحقیقات صورت گرفته توسط ویرایش ژنوم مبتنی برCRISPR-Cas ، این سیستم پتانسیل امیدوارکننده‌ای برای سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاح گیاه سیب‌زمینی، تولید محصولات با توانایی بالقوه‌ی مقاومت در برابر تنش‌های بیوتیکی (ویروسی، قارچی و باکتریایی)، غیرزنده و بهبود کیفیت غذایی باز کرده است. از سوی دیگر، با ظهور نسخه‌های جدید و پیشرفت‌های صورت گرفته در این سیستم در طول چند سال اخیر و توسعه کاربرد استفاده از RNPها، احتمال ادغام توالی DNA مشتق شده از پلاسمید، یا DNA خارجی در ژنوم سلول میزبان از بین رفته و در نتیجه گیاهان باززایی شده از پروتوپلاست‌ها، بدون ادغام هیچ DNA خارجی می‌باشند (Nadakuduti *et al.*, 2018). در نتیجه، این روش انتقال RNP DNA-free، ازاین‌نظر برای اصلاح گیاهان ارزشمند است که محصولات اصلاح شده، احتمالا خارج از مقررات GMO قرار می‌گیرند و در نتیجه کاربردهای این فن‌آوری، با سطح پذیرش جهانی بیشتری گسترش می‌یابد (Malnoy *et al.*, 2016).

سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و صندوق حمایت از پژوهشگران (شماره ۹۹۰۲۳۸۰۸) معاونت علمی فناوری ریاست جمهوری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Amitai G, and Sorek R. 2016. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. Nat. Rev. Microbiol. 14: 67–76.

Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Ft AS, Samuelsson M, Hofvander P. 2017. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep 36:117–128.

Andersson M, Turesson H, Olsson N, Ft A, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M, Hofvander P. 2018. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. Physiol Plant 164: 378–384.

Arora L, and Narula A. 2017. Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. Front Plant Sci 8:1932.

Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG 2nd, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC. 2012. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature. 491: 114-118.

Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, Douches DS. 2015. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. PLoS ONE 10(12):e0144591.

Butt H, Eid A, Ali Z, Atia MA, Mokhtar MM, Hassan N, Lee CM, Bao G, Mahfouz MM. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. Frontiers in plant science, 8: 1441.

Caliskan ME, Onaran H, Arioglu H. 2010. Overview of the Turkish potato sector: challenges, achievements and expectations. Potato Research, 53(4):255–266.

Cho SW, Lee J, Carroll D, Kim JS, Lee J. 2013. Heritable Gene Knockout in Caenorhabditis elegans by Direct Injection of Cas9-sgRNA Ribonucleoproteins. Genetics 195: 1177-1180.

Dangol SD, Barakate A, Stephens J, Çalıskan ME, and Bakhsh A. 2019. Genome editing of potato using CRISPR technologies: current development and future prospective. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 139(2): 403-416.

Datsenko KA, Pougach K, Tikhonov A, Wanner BL, Severinov K, Semenova E. 2012. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. Nature Commun. 3: 945.

Devaux A, Kromann P, Ortiz O. 2014. Potatoes for sustainable global food security. Potato Research, 57(3-4): 185-199.

Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, Duffus CM, Lynn A, Morrison IM, Prentice RD, Swanston JS, Tiller SA. 1998. Starch production and industrial use. Journal of the Science of Food and Agriculture, 77(3): 289-311.

Endo M, Mikami M, Toki S. 2016. Biallelic gene targeting in rice. Plant physiology, 170(2): 667-677

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

FAO. **2013**. Food and Agricultural Organization of the United Nations Database. on https://www.fao.org.

Farboud B, Jarvis E, Roth TL, Shin J, Corn JE, Marson A, Meyer BJ, Patel NH, Hochstrasser ML. 2018. Enhanced Genome Editing with Cas9 Ribonucleoprotein in Diverse Cells and Organisms. Journal of Visualized Experiments, 135:57350.

Hameed A, Zaidi SS, Shakir S, Mansoor S. 2018. Applications of new breeding technologies for potato improvement. Front Plant Sciences, 9:925.

Heftmann E. 1983. Biogenesis of steroids in Solanaceae. Phytochemistry, 22(9), 1843-1860.

Jacobs MMJ, Smulders MJM, Van den Berg RG, Vosman B. 2011. What's in a name; genetic structure in *Solanum* section *Petota* studied using population-genetic tools. BMC Evol Biol 11:42.

Jia H, Xu J, Orbović V, Zhang Y, Wang N. 2017. Editing citrus genome via SaCas9/sgRNA system. Frontiers in Plant Science, 8: 2135.

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, 337:816-821.

Jones HD. 2015. Regulatory uncertainty over genome editing. Nature Plants, 1:14011.

Kennedy GG. 2008. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. In: Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (eds) Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer, Amsterdam, pp 1–26.

Khromov AV, Gushchin VA, Timberbaev VI, Kalinina NO, Taliansky ME, Makarov VV. **2018.** Guide RNA design for CRISPR/Cas9-mediated potato genome editing. Dokl Biochem Biophys, 479(1): 90–94.

Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res 24: 1012-1019.

Kusano H, Ohnuma M, Mutsuro-Aoki H, Asahi T, Ichinosawa D, Onodera H. 2018. Establishment of a modified CRISPR/ Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato. Sci Rep 8:13753.

Ledford H. **2013.** US regulation misse some GM crops. Nature, 500: 389–390.

Li L, Hu S, Chen X. 2018. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. Biomaterials, 171: 207-218.

Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Com 8: 14261.

Londenberg A, Bartels FM, Quaye JK, Boch J, Ripken T, and Heinemann D. 2020. April. Targeted genome editing in potato protoplast via optical delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. In *Nanophotonics VIII* (). International Society for Optics and Photonics. 11345: 1134527p.

Ma X, Chen ZhuQ, Liu YG. 2016. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. Mol Plant 9: 961–974.

Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. RNA-Guided human genome engineering *via* Cas9. Science 339: 823-826.

Malnoy M, Viola R, Jung MH, Koo OJ, Kim S, Kim JS, Velasco R, Nagamangala KC. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Frontiers in plant science, 7: 1904.

Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. 2018. Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. ACS chemical biology, 13(2): 357-365.

Muthoni J, Kabira J, Shimelis H, Melis R. 2015. Tetrasomic inheritance in cultivated potato and implications in conventional breeding. Aust J Crop Sci, 9: 185–190.

Nadakuduti SS, Buell CR, Voytas DF, Starker CG, Douches DS. 2018. Genome editing for crop improvement–applications in clonally propagated polyploids with a focus on potato (Solanum tuberosum L.). Frontiers in Plant Science, 9: 1607.

Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, Osakabe K, Osakabe Y. 2018. Generation of α-solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. Plant Physiol Biochem, 131: 70–77.

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): 482.

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 Cs LOB 1 promoter in citrus. Plant biotechnology journal, 15(12): 1509-1519.

Ricroch A, Clairand P, Harwood W. 2017. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. Emerg Top Life Sci, 1: 169–182.

Sattar MN, Iqbal Z, Tahir MN, Shahid MS, Khurshid M, Al-Khateeb AA, Al-Khateeb SA. **2017.**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]

CRISPR/Cas9: a practical approach in date palm genome editing. Front Plant Sci, 8:1469.

Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Van Eck J, Jiménez-Gómez, JM, Lippman ZB. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. Nature Genetics, 49(1): 162.

Sun K, Wolters AMA, Vossen JH, Rouwet ME, Loonen AE, Jacobsen Visser RG, Bai Y. 2016. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. Transgenic research, 25(5): 731-742.

Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y, Xia L. 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. Frontiers in plant science, 8: 298.

Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435: 646-651

Van Eck J. 2018. Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. Current opinion in biotechnology, 49: 35-41.

Voytas DF. 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. Annual review of plant biology, 64: 327-350.

Waltz E. 2012. Tiptoeing around transgenics. Nature Biotechnol. 30: 215–217.

Wang S, Zhang S, Wang W, Xiong X, Meng F, Cui X. 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. Plant Cell Rep 34: 1473–1476.

Woo JW, Kim J, Il Kwon S, Corvalan C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nature Biotech 33: 1162-U1156.

Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AYL, Liu Y. 2015. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. Sci Rep 5:14926.

Zaman QU, Li C, Cheng H, Hu Q. 2019. Genome editing opens a new era of genetic improvement in polyploid crops. The Crop Journal, 7(2): 141-150.

Zhang Y, Li D, Zhang D, Zhao X, Cao X, Dong L, Liu J, Chen K, Zhang H, Gao C, Wang D. 2018. Analysis of the functions of Ta GW 2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. The Plant Journal, 94(5): 857-866.

Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2]