



[10.61186/gebsj.12.2.281](https://doi.org/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 Panahi²

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

*Corresponding Author, Email: [پست الکترونیکی: s.ghaffarian@azruniv.ac.ir](mailto: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

واژه‌های کلیدی

لوکونوستوک،

CRISPR،

تنوع،

رابطه خویشاوندی،

ساختار

عفونت بوسيله 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 کمک‌کننده‌ای داشته باشد. بر این اساس و به منظور شناسایی سیستم CRISPR/Cas در باکتری‌های جنس *لوکونوستوک*، توالی ژنوم کامل ۱۸ گونه شناسایی شده 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 ۴ تا ۱۰۱ عدد و طول متوسط توالی‌های فاصله دهنده بین ۲۸ تا ۳۰ نوکلئوتید متغیر 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.

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](https://doi.org/10.61186/gebsj.12.2.281)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-467-fa.html>

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

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 ۵۴ درصد آن‌ها عملکردهای بیولوژیکی نسبت داده شده است. ژنوم این باکتری‌ها دارای ۳۷ تا ۴۰ درصد GC است. از آنجائیکه لوکونوستوک یک باکتری اسیدلاکتیک است این ژنوم تمامی آنزیم‌های موجود در مسیر ۶-فسفوجلوکونات فسفوکتولاز را رمز می‌کند (Bredt, 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. sensu stricto*، *Leuc. paramesenteroides* و *Leuc. oenos* می‌باشد (Martinez-; 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

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 کربوهیدرات‌ها 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 می‌شوند. 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-

(Khan et al., 2022). پروتئین های Cas ذکر شده یک واحد مداخله کننده که در شناسایی توالی هدف و برش اسیدهای نوکلئوتیک در سیستم CRISPR درگیر است تشکیل می دهند (Makarova et al., 2020). در مقابل در سیستم های دسته ۲، شامل انواع ۲، ۵ و ۶، واحد مداخله کننده توسط یک پروتئین منفرد بزرگ Cas9، Cas12 یا Cas13 ایجاد می شود. بر اساس گزارشات موجود Cas2 همچنین یک ژن کلیدی در مرحله سازگاری است (Makarova et al., 2020). شناسایی منشا توالی های فاصله دهنده، که توالی پروتواسپیسر نامیده می شوند، می تواند مکانیسم برهمکنش میزبان-شکار را در محیط های مختلف حاوی فاژ و عناصر DNA مهاجم آشکار کند (Levin et al., 2013).

مطالعات بسیاری وجود و تنوع سیستم های CRISPR-Cas را در باکتری های مختلف مثل *Streptococcus thermophilus* (Held et al., 2008)، *Sulfolobus islandicus* (Horvath et al., 2010)، *Pseudomonas aeruginosa* (van Belkum et al., 2015)، *Bifidobacterium longum* (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017)، *Staphylococci* (Rossi et al., 2017)، *Lactobacillus graminis* و *Lactobacillus curvatus* (Ilkkan, 2021) و *Lactobacillus sakei* و *Lactobacillus casei* (Yang et al., 2023) مورد مطالعه قرار داده اند.

توسعه فناوری های توالی یابی نسل جدید و دسترسی به ژنوم باکتری های مختلف امکان بررسی حضور و تنوع سیستم های CRISPR-Cas را فراهم کرده است. تلاش های زیادی با هدف بررسی و شناسایی سیستم های CRISPR-Cas با هدف شناسایی پتانسیل سیستم های شناسایی شده در تعیین ژنوتیپ و توسعه کاربردهای CRISPR در حال انجام است. همچنین چالش های فنی زیادی برای تولید یک ابزار CRISPR بی نقص وجود دارد. بررسی و تحلیل بیوانفورماتیک سیستم CRISPR در میکرواورگانیزم ها 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

باعث کاهش تعداد باکتری های زنده و در نتیجه کاهش بازدهی کشت می شوند (Rostampour et al., 2022). تکامل توالی های CRISPR به همراه ژن های مرتبط با CRISPR (Cas) یک مکانیسم دفاعی تطبیقی در مقابل فاژها ایجاد می کند (panahi et al., 2022).

اجزا تشکیل دهنده سیستم CRISPR شامل یک اندونوکلاز (Cas9)، یک tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) و یک آرایه CRISPR RNA پیشرو، حاوی توالی های راهنمای نوکلئاز (فاصله دهنده) که توسط تکرارهای مستقیم مشابه از هم جدا شده اند، می باشد (Sultan et al., 2022). به محض حمله فاژ، قطعه ای از DNA فاژ بین تکرارهای حفاظت شده آرایه CRISPR ادغام می شود (Marraffini and Sontheimer, 2010). سپس کل آرایه CRISPR به یک رونوشت RNA منفرد رونویسی شده و در مرحله بیان به کمک پروتئین های Cas به یک واحد تداخلی پردازش می شود (Makarova et al., 2011). در نهایت، رونوشت بالغ با نام crRNAs (CRISPR RNAs) برای هدایت مجموعه پروتئین های Cas جهت برش DNA فاژ در یک توالی اختصاصی به محض وقوع عفونت مجدد به کار گرفته می شود (Van der Oost et al., 2009). پروتئین های Cas به واسطه وجود توالی های مجاور پروتواسپیسر (PAM: Protospacer Adjacent Motif) قادر به شناسایی توالی های 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 می کند، به پروتواسپیسر متصل شده و آن را برش می دهد (Riesenberg et al., 2022).

سیستم های CRISPR به دو دسته، نوع ۶ و زیرنوع ۳۳ تقسیم می شوند (Koonin et al., 2017). دسته ۱ که شامل انواع ۱، ۳ و ۴ می باشد، تداخل توسط مجموعه ای بزرگ (مجموعه پروتئین Cascade) پیوسته با CRISPR متشکل از پروتئین های Cas3 (گاهی آمیخته با Cas2)، Cas5-Cas8، Cas10 و Cas11 با ترکیبات متفاوت بسته به نوع و زیر نوع انجام می شود (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2020).

حضور پروتئین های Cas، تعداد و انواع پروتئین های Cas، جهت و نوع CRISPR، تعداد تکرارها و طول متوسط آن‌ها، توالی، طول و تعداد انواع Spacerها، و توالی پروتئین های 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) ([cgi://http://rna.tbi.univie.ac.at](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold)) حدافل انرژی آزاد (MFE: Minimum Free Energy) و پارامترهای پیش‌فرض پیش‌بینی شد. عملکرد این سرور برای محاسبه 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 توالی های PAM، نواحی ۱۰ نوکلئوتیدی مجاور دو انتهای ۳' و ۵' توالی های پروتواسپیسر هم‌ردیف شدند. پس از شناسایی توالی های PAM، توالی های 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 Clustal X انجام گرفت و در مرحله بعد با استفاده از الگوریتم Neighbor Joining فاصله ژنتیکی بین پروتئین های 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.

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 رفتن هزینه و زمان در استفاده از این سویه‌های مفید و کلیدی باشد (Lonvaud-Funel, 1999). با توجه به این‌که قبلاً 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 لکونوستوک 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 لکونوستوک شامل ۲ سویه از گونه *Leuc. rapi*، ۳۹ سویه از گونه *Leuc. pseudomesenteroides*، ۱۲۵ سویه از گونه *Leuc. mesenteroides*، ۴۰ سویه از گونه *Leuc. lactis*، ۵ سویه از گونه *L. gelidum* subsp. *Leuc. inhae*، ۳۱ سویه از گونه *Leuc. gasicomitatum*، ۲۰ سویه از گونه *Leuc. gelidum*، ۴ سویه از گونه *Leuc. falkenberg*، ۱۹ سویه از گونه *Leuc. carnosum*، ۴ 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 توالی‌های CRISPR موجود در ژنوم، کامل یا ناقص بودن آن‌ها از نظر

نتایج و بحث

سیستم CRISPR-Cas در ژنوم جنس لوکونوستوک

حضور و ویژگی های سیستم های CRISPR/Cas در جنس های مختلف باکتری ها مورد مطالعه قرار گرفته اند. این مطالعه با هدف بررسی خصوصیات و تنوع سیستم CRISPR/Cas در تمامی گونه ها و سویه های مربوط به آن ها در جنس لوکونوستوک انجام شد. از مجموع ۱۸ گونه ثبت شده برای این جنس در NCBI، ۹ گونه شامل *Leuc. miyukkimchii*، *Leuc. iltichii*، *Leuc. falla*، *Leuc. Leuc. citreum*، *Leuc. holzapfelii*، *Leuc. garlicum*، *Leuc. palmae kimchii* و *Leuc. suionicum* فاقد سیستم CRISPR/Cas کامل بودند. در ۹ گونه دیگر مورد مطالعه اغلب سویه ها دارای سیستم CRISPR/Cas کامل (توالی CRISPR بعلاوه توالی تکراری) و تعداد کمتری فاقد سیستم CRISPR/Cas کامل بودند. گونه های 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.، ۱۵ سویه از گونه *Leuc. gelidum*، ۲ سویه از گونه *Leuc. falkenberg*، ۲ سویه از گونه *Leuc. carnosum* بودند. ۸ گونه ای دارای سیستم CRISPR/Cas کامل غیر از *Leuc. mesenteroides* در مجموع دارای ۶۴ سویه بودند که ۵۶ سویه دارای سیستم های 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 سویه ای جنس *L. mesenteroides* فقط یک سویه دارای سیستم CRISPR/Cas کامل بود. با احتساب سویه های این گونه ۳۰/۱۶ درصد سویه ها دارای CRISPR/Cas کامل بودند.

نرخ حضور CRISPR در سویه های *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 باکتری ها ۴۵ درصد (Grissa et al., 2007) گزارش شده است. بر این اساس نرخ

حضور CRISPR در جنس لوکونوستوک بالاتر از متوسط سایر باکتری ها بود. همچنین در تمامی مطالعات اشاره شده تعداد سیستم های CRISPR کامل در برخی سویه ها بیش از یک و حتی تا ۶ مورد بود اما در جنس مورد مطالعه در هر سویه یک CRISPR شناسایی شد.

سیستم های CRISPR-Cas کامل بر مبنای نوع پروتئین های Cas در زیرنوع های مختلفی قرار می گیرند. تمامی سویه های مورد مطالعه ای دارای سیستم CRISPR-Cas کامل در زیرنوع II-A قرار گرفتند. تنوع سیستم CRISPR/Cas در گونه های جنس لوکونوستوک

نوع سیستم CRISPR در عمده سویه های جنس لوکونوستوک از زیرنوع II-A بود. به صورت استثنا، سویه LMGH83 از گونه ای *Leuc. pseudomesenteroides* حاوی سیستم نوع II-C بود. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، سیستم های CRISPR زیرنوع II-A پروتئین های Cas1، Cas2، Cas9 و Csn2 را رمز می کنند (شکل ۱). تعداد ژن های Cas به ازای هر CRISPR از ۴ تا ۷ عدد با میانگین ۴/۸۲ و اغلب ۵ ژن بود. پناهی و همکاران (2022) CRISPR های شناسایی شده در *Leuc. brevis* را در ۳ زیر گروه II-A، II-C، I-E و قرار دادند. همچنین در مطالعه ای انجام شده بر روی *C. perfrings* توسط Long و همکاران (2019)، CRISPR های شناسایی شده در ۴ زیرنوع I-B، III-D، II-A و II-C قرار گرفتند. با وجود فراوانی نسبتاً بیشتر تعداد CRISPR های شناسایی شده، تنوع انواع CRISPR در این جنس بسیار کمتر بود.

تعداد تکرارها در سیستم های کامل، در انواع سویه های مورد مطالعه تنوع بسیار زیادی نشان داد. این توالی ها از نظر تعداد بین ۴ تا ۱۰۱ عدد متغیر بود. همچنین طول متوسط تکرارها ۳۲/۸ بود. بطور متوسط طول توالی تکراری در سیستم CRISPR/Cas مربوط به گونه های جنس لوکونوستوک در گونه-ی *Leuc. pseudomesenteroides* با میانگین ۳۶/۰۴ و کوتاه ترین طول متوسط در *Leuc. lactis* با میانگین ۲۹/۴۶ مشاهده شد (شکل ۲، A).

Leuc. lactis به ترتیب به تعداد ۴ و ۱۰۰ عدد بود. در مجموع کل گونه‌های مورد مطالعه تعداد متوسط توالی‌های فاصله دهنده برابر با ۲۱/۱۶ بود.

طول متوسط توالی‌های فاصله دهنده ۳۰/۰۲۸ و پرتکرارترین طول ۳۰ بود. حداقل و حداکثر طول توالی‌های فاصله دهنده به ترتیب ۲۳ و ۳۲ بود. حداقل و حداکثر تعداد توالی‌های فاصله دهنده به ازای هر CRISPR متعلق به سویه BIOML-A1 از

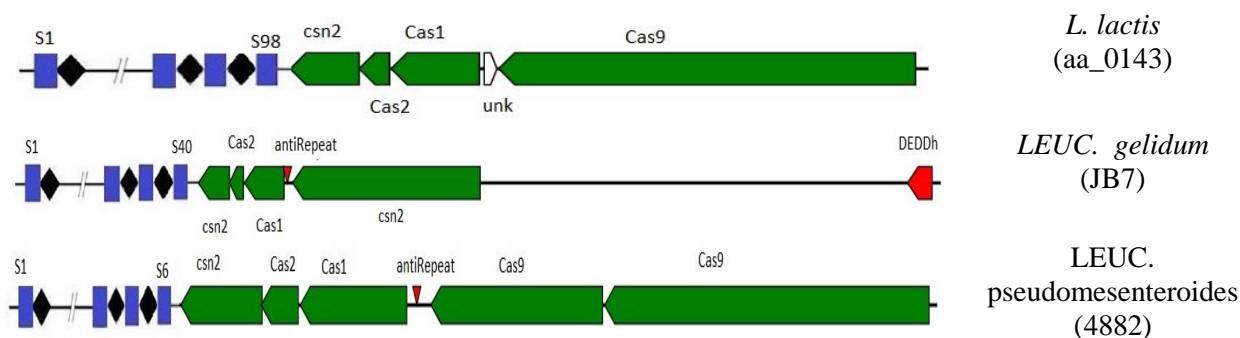
جدول ۱- سیستم‌های CRISPR/Cas کامل در گونه‌ها و سویه‌های جنس *Leuconostoc*

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

Species	strains	CRISPR/Cas type	Type	Direction	Cas Gene Number	Repeat Number	Spacer
<i>L. inhae</i>	DSM 15101	Complete	II-A	Positive	4	9	S1-S8
<i>L. gelidum subsp. Gasicomitatum</i>	A.21.4	Complete	II-A	Positive	4	13	S1-S12
<i>L. mesenteroides</i>	DPC 7261	Complete	II-A	Negative	5	8	S1-S7
<i>L. mesenteroides</i>	DPC 7261 (1)	Complete	II-A	Negative	4	8	S1-S7
<i>L. rapi</i>	DSM 27776	Complete	II-A	Positive	6	42	S1-S41
	DSM 27776 contig4(2)	Complete	II-A	Negative	5	42	S1-S41
<i>L. falckenberg</i>	C	Complete	II-A	Negative	5	7	S1-S6
	LMG 10779	Complete	II-A	Positive	5	5	S1-S4
<i>L. carnosum</i>	WC0324	Complete	II-A	Positive	5	12	S1-S11
	WC0319	Complete	II-A	Negative	5	17	S1-S16
<i>L. lactis</i>	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
<i>L. gelidum</i>	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
<i>L. pseudomesenteroides</i>	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

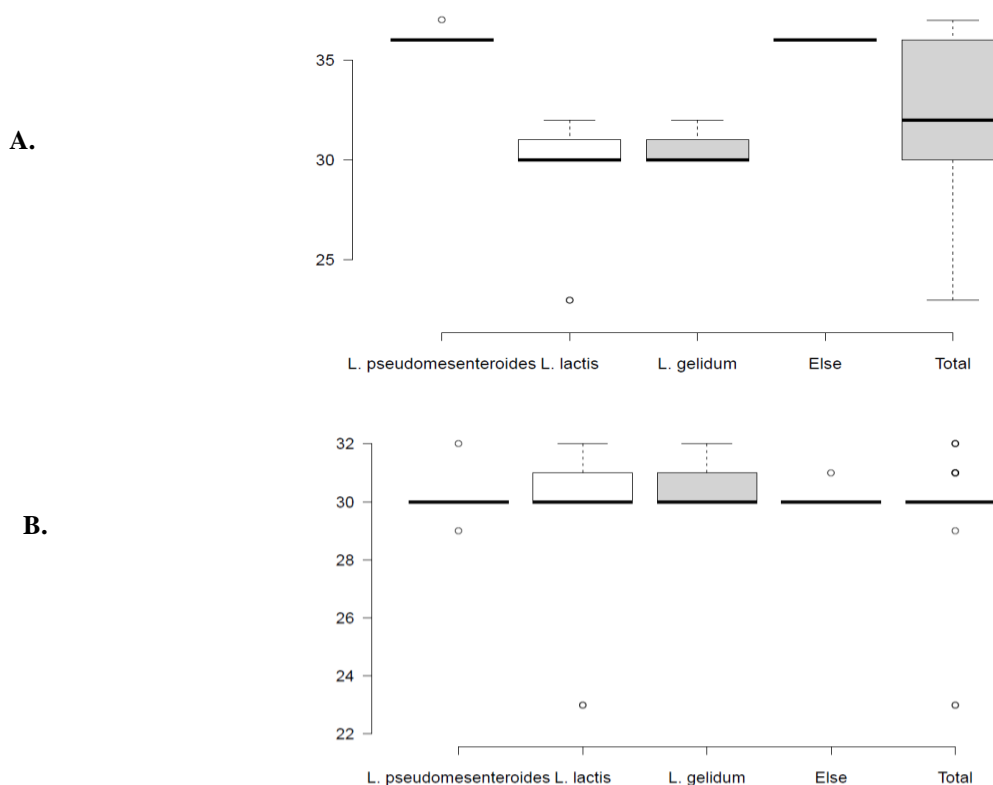
لوکوس بطور متوسط دارای ۳۴/۸۷ فاصله دهنده با دامنه‌ی ۱۰۰-۴ بود. تعداد متوسط توالی‌های فاصله دهنده در CRISPRهای *Leuc. gelidum* ۳۸/۸۱ عدد در هر لوکوس بود. کمترین و بیشترین تعداد توالی‌های فاصله دهنده به ترتیب ۱۳ و ۶۵ بودند (شکل ۲، B).

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 ۴ و بیشترین تعداد ۹ بود. گونه‌ی *Leuc. lactis* در هر



شکل ۱- شماتیک آرایه کامل CRISPR/Cas 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 *clostridium perfringens* (long et al., 2019) فعال‌ترین سیستم در برابر مهاجمان خارجی DNA معرفی شدند. پناهی و

در تحقیقات بررسی شده زیرنوع I-A در *Bifidobacterium* و زیرنوع I-B/Tneap (Briner et al., 2015, Yang et al., 2020)

تجزیه موتیف مجاور پروتواسپیسر

توالی های PAM از عناصر حیاتی عملکردی در سیستم های CRISPR/Cas هستند. نشان داده شده است که این توالی ها توسط پروتئین های Cas برای اتصال به فاژها و دیگر مهاجمان خارجی مورد استفاده قرار می گیرند (Mojica et al., 2009). توالی های PAM شناسایی شده بر اساس تمامی فاژها و پلاسمیدهای شناسایی شده، برای تمامی گونه های مورد مطالعه در دو انتهای ۳' و ۵' در شکل ۴ 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 گونه *Leuc. inhae*، *Leuc. falkenberg* و *Leuc. mesenteroides* توالی PAM شناسایی نشد. در انتهای ۵' و ۳' گونه ها *Leuc. gelidum* به ترتیب ۵ و ۹ نوع توالی PAM مشاهده شد که بیشترین تنوع در بین کل گونه ها بود. در مجموع سویه های گونه *Leuc. carnosum* فقط یک نوع توالی PAM در انتهای ۵' شناسایی شد که کمترین تنوع مشاهده شده بود. در گونه *Leuc. gelidum* در انتهای ۳' و ۵' به ترتیب ۲ و ۴، دو نوع PAM در انتهای ۳' در گونه *Leuc. rapi*، ۵ نوع PAM در هر کدام از دو انتهای ۳' و ۵' در گونه *L. lactis*، و به ترتیب ۲ و ۷ نوع توالی PAM در دو انتهای ۳' و ۵' گونه *Leuc. pseudomesentroides* شناسایی شد.

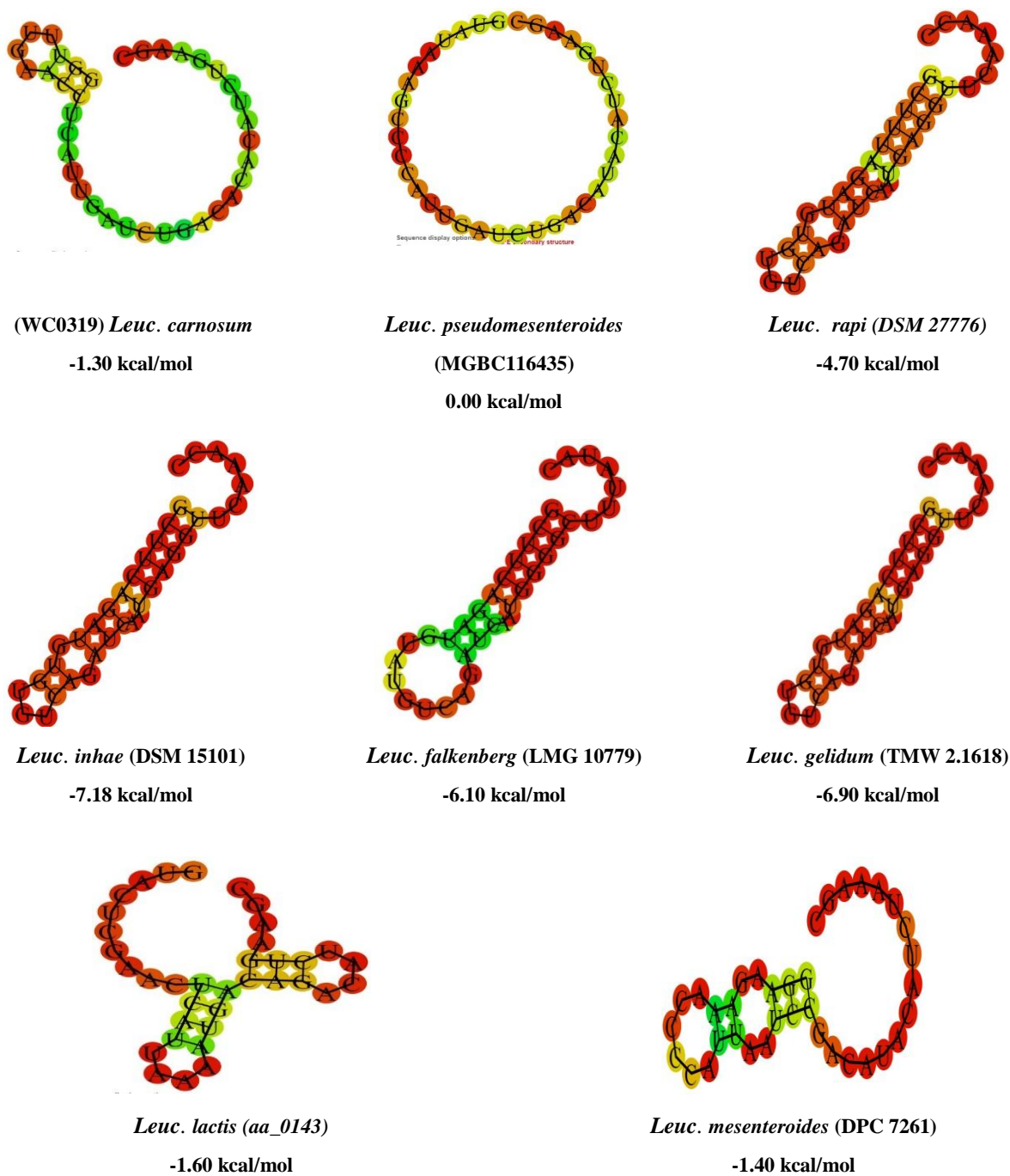
پناهی و همکاران (2022) در مطالعه *Leuc. bravis* ۲ نوع توالی PAM در انتهای ۵' و ۵ نوع توالی در انتهای ۳' گزارش کردند. در مقایسه با جنس لوکونوستوک که CRISPRهای شناسایی شده آن همگی از زیرنوع II-A قرار گرفتند، CRISPRهای شناسایی شده در سویه های مورد مطالعه در پژوهش پناهی و همکاران در ۳ زیرنوع مختلف قرار داشتند.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

همکاران (2022)، با توجه به شواهد موجود در مورد اندازه و وقوع زیرگروه II-A، به این نتیجه رسیدند که احتمالاً زیرنوع II-A فعال ترین جایگاه ژنوم در گونه *L. brevis* است. در این مطالعه با توجه به عدم وجود تنوع مناسب در انواع سیستم های CRISPR، می توانیم 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 سویه های لوکونوستوک فراهم می کند. در شکل شماره ۳ ساختار مربوط به یک سویه از هر گونه نشان داده شده است. با توجه به ساختارهای پیش بینی شده در شکل ۳، جایگاه های CRISPR پیوسته با توالی های تکراری مستقیم ژن های Cas در گونه های مختلف جنس لوکونوستوک تنوع قابل ملاحظه ای 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 دهنده احتمال بالا و پایین conformation در هر ساختار هستند. اثبات شده است ساختارهایی با محتوای GC بیشتر و ساقه طولی تر پایدارتر از ساختارهایی با محتوای GC کمتر و طول کوتاه تر هستند (yang et al., 2020).

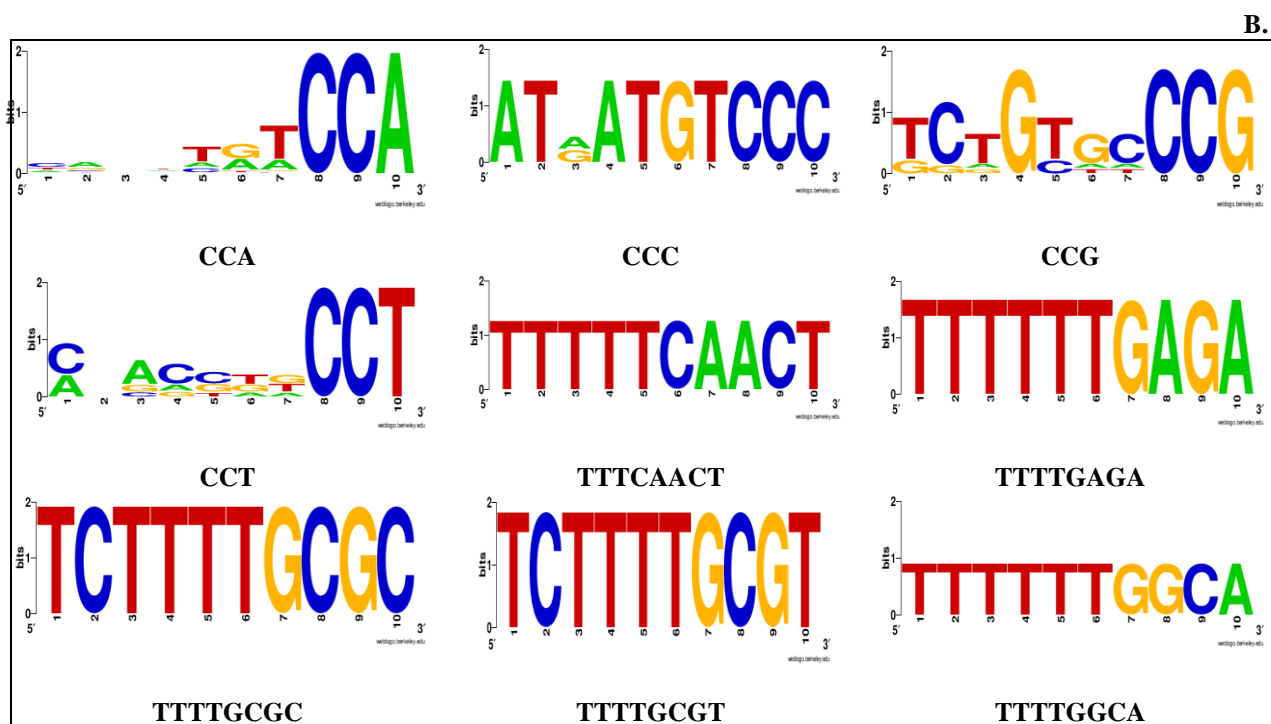
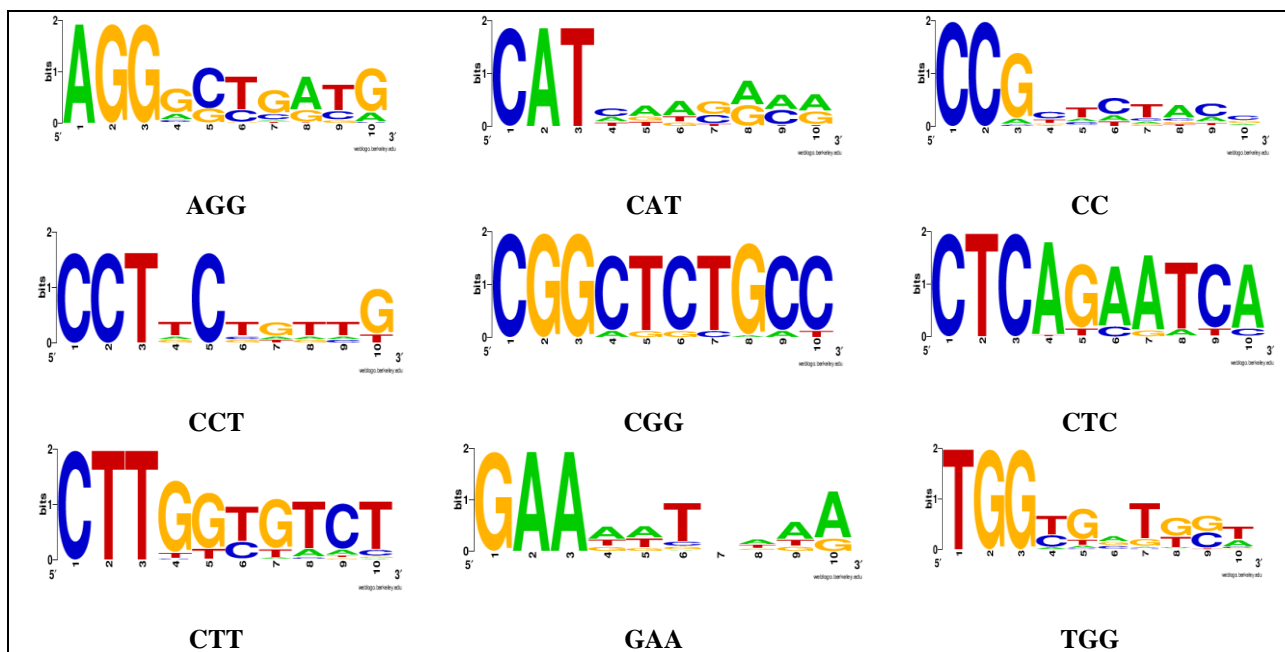
با توجه به ساختارهای پیش بینی شده در شکل ۳، جایگاه CRISPR پیوسته با Cas های زیرنوع II-A تنوع بسیار بالایی دارد. همچنین بر اساس ساختارهای پیش بینی شده پایداری ساختارهایی با طول بیشتر ساقه بیشتر (انرژی آزاد بیشتر منفی) و بر عکس پایداری ساختارهای فاقد ساقه، که بازهای جفت شده ندارند کمتر است (MFE کمتر منفی).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



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

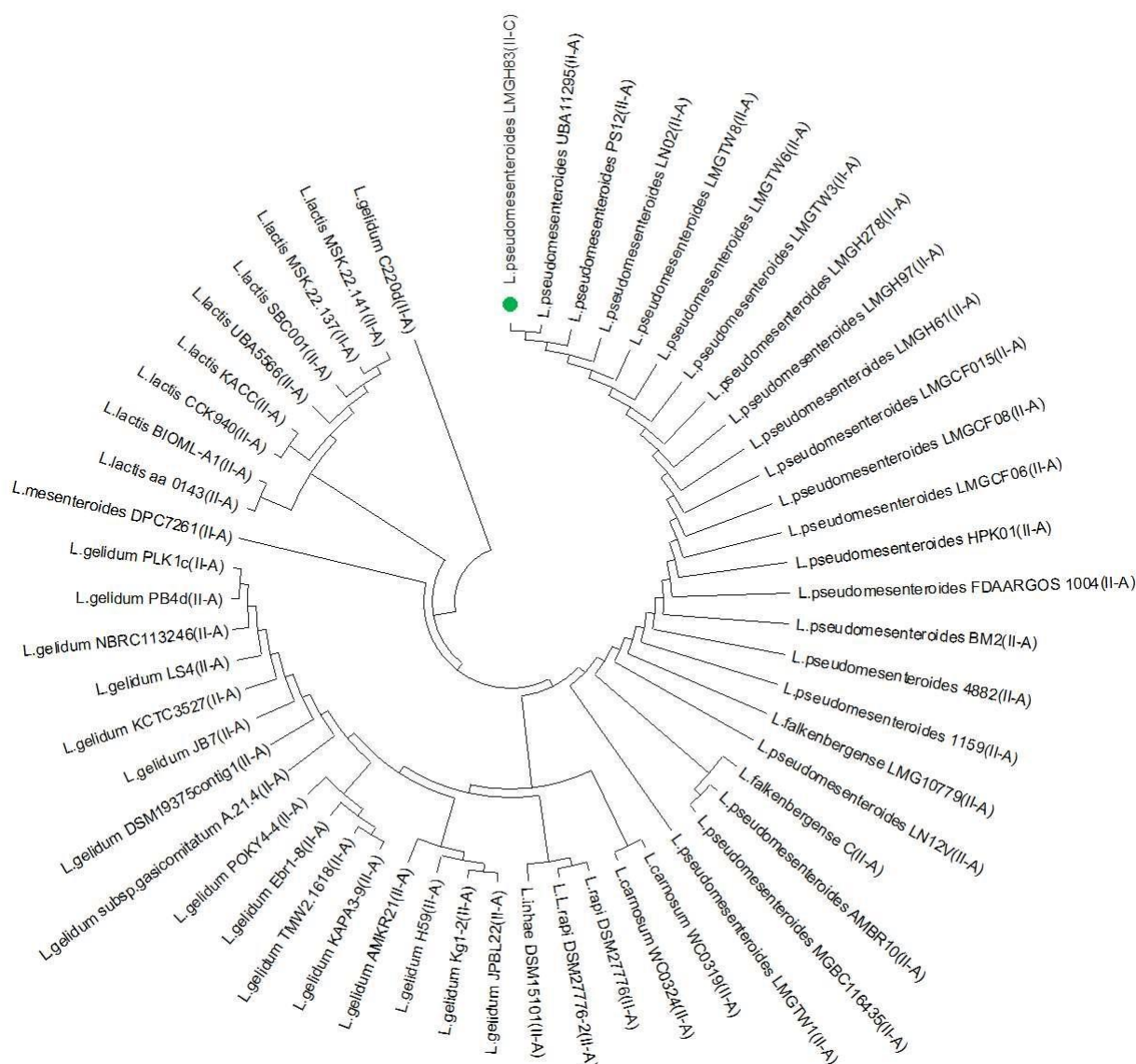
Fig 3. The prediction of consensus direct repeat secondary structure and corresponding MFE values.

A.



شکل ۴- توالی های PAM پیش بینی شده در گونه ها و سویه های جنس لوکونوستوک در انتهای A. ۳' و B. ۵' (ارتفاع هر حرف نشان دهنده ی حفاظت شدگی نوکلئوتید در موقعیت است).

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



شکل ۵- درخت فیلوژنی بر مبنای توالی آمینواسیدی پروتئین های Cas1.

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

زیر شاخه‌ی دوم که خود شامل دو زیر گروه اصلی بود قرار گرفتند (شکل ۵).

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان دهنده تنوع نسبتاً 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

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

عمیق از تنوع و عملکرد سیستم CRISPR/Cas در جنس لئونوستوک ارائه می‌کند و اطلاعات پایه‌ای با ارزشی را برای مطالعات آینده فراهم می‌کند.

سیستم های ضد فازی 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 پیشی

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 CRISPRFinder, 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
- Ilikkan, Ö.K. (2021). CRISPR-Cas systems and anti-repeat sequences of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus fuchuensis*, and *Lactobacillus sakei* genomes. *Microbiology Society 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. *jonggajbkimchii* 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 perfringens*. *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

- 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 *coagulansnegative 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-El salam, 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., Ujjirohene, 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