گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۰)، ۶(۱): ۳۷-۴۸
مقاله مروری
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.1.37

CRISPR/Cas، ابزار قدرتمند دستورزی ژنوم در گیاهان زینتی

مصطفی خوشحال سرمست

گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان

mkhsarmast@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۷، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۵/۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۳

چکیده

زیست‌فناوری ابزاری مناسب برای بهنژادی ویژگی‌هایی مانند اندازه، رنگ و عطر گل همچنین مقاومت به بیماری و بهبود عمر گلجایی گیاهان زینتی است. با تکمیل توالی‌یابی ژنوم بسیاری از گیاهان زینتی و پیشرفت‌های چشمگیر به‌دست آمده در ویرایش جایگاه اختصاصی در ژنوم، روند ایجاد گوناگونی لازم برای بهنژادی بسیاری از گیاهان زینتی تسریع خواهد شد. امروزه فناوری کریسپر Cas به دلیل آسانی چشمگیر در انجام، هزینه پایین و دسترسی آسان، گوی سبقت را از دیگر فناوری‌های ویرایش ژنوم از جمله نوکلئاز انگشت روی، عملگرهای شبه فعال کننده رونویسی، مگانوکلئازها و غیره ربوده است. کریسپر Cas در واقع نوعی سیستم ایمنی اکتسابی در آرکیا و برخی باکتری‌ها است که در پاسخ به ورود ماده ژنتیکی موجود مهاجم به درون یاخته، با ساخت رونوشت‌های کوچک مکمل، توالی موجود مهاجم را رهگیری و به کمک پروتئین نوکلئازی Cas، DNA هدف را غیرفعال می‌کند. مهمترین دستاورد این فناوری در گیاهان زینتی تاکنون در رابطه با غیر فعال نمودن ژن‌های کارا در فرایندهای نموی و همچنین تغییر میزان آنتوسیانین گلبرگ اطلسی، تورنیا، گل کوشاد، ارکید و نیلوفر بوده است. با پیشرفت و بهینه‌سازی بیشتر این روش به زودی شاهد دگرگونی‌های زیادی در بهنژادی ویژگی‌های مقاومت به تنش‌های زیوا (زیستی) نیز خواهیم بود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آنزیم Cas9، موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه، RNA راهنما.

مقدمه

گلکاری سهم مهمی از تولید محصولات باغی در جهان را به خود اختصاص داده است و مشتریان، همیشه به دنبال رقم‌های جدید و گوناگون گیاهان زینتی می‌باشند. جهش و دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای، از جمله روش‌های کلاسیک بهنژادی گیاهان زینتی از قرن ۱۸ میلادی بوده است که با وجود داشتن سهم زیاد در بهنژادی و تولید رقم‌های جدید گل و گیاهان زینتی، معایبی از جمله هتروزیگوتی و محدودیت انتقال ویژگی‌ها از خویشاوند دور در تلاقی، در این روش‌های بهنژادی وجود دارد (Vainstein, 2002). استفاده از فنون انتقال ژن در چند دهه اخیر تا حد زیادی برخی از موانع بهنژادی کلاسیک را برداشته است (Gelvin, 2003)، اما تلفیق تصادفی ژن‌ها به درون ژنوم، همچنان به عنوان یک محدودیت در انتقال ژن مطرح

می‌باشد. با پیشرفت فناوری‌های مختلف ویرایش ژنوم مانند نوکلئاز انگشت روی[۱]، عملگرهای شبه فعال کننده رونویسی[۲]، مگانوکلئازها[۳] و کریسپر، پیشرفت‌های قابل توجهی در آمیختن و دستورزی هدفمند ژن‌ها در ژنوم موجودات مختلف حاصل شده است که می‌تواند به ایجاد گوناگونی زیستی بیشتر در گیاهان زینتی و بهنژادی ویژگی‌های کلیدی در آن‌ها کمک نماید (Xu *el al*., 2019; Hahne *et al*., 2019; Hilscher *et al*., 2016). پس از کشف خوشه‌های منظمِ میان تکرارهای کوتاه پالیندرومی[۴] (کریسپر) در سال ۱۹۸۰ در باکتری‌ها و در اواسط ۱۹۹۰ در ژنوم آرکیا که به واسطه وجود توالی‌های فاصله انداز و توالی‌های مشابه (که بعدها به فاصله‌انداز اولیه[۵] معروف شد) درون DNA میکروارگانیزم‌های مهاجم کشف شد، این فرضیه که کریسپر Cas یک سیستم ایمنی در مقابل هجوم DNA بیگانه است، بیش از پیش تقویت شد (Bolotin *et al*., 2005; Mojica *et al*., 2005; Pourcel *et al*., 2005). جستجو در منابع نشان داد که ویروس‌ها و پلاسمیدهایی که فاصله‌انداز اولیه را در خود دارند، میزبان‌های مجهز به فاصله اندازهای کریسپر مشابه را آلوده نمی‌کنند. تمام این شواهد ارائه شده، اساسی برای این فرضیه بودند که آرایه‌های کریسپر جزئی از یک سیستم دفاعی قابل تطبیق است که ایمنی ویژه‌ای را در برابر عناصر ژنتیکی مهاجم توسط یک سازوکار جدید دفاعی ایجاد می‌کنند (Mojica *et al*., 2005; Pourcel *et al*., 2005). استفاده از این سیستم به عنوان ابزار دستورزی ژنتیکی، در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ کاربردی شد. در سال ۲۰۱۲ گروه پژوهشی جنیفر دودنا[۶] در دانشگاه "برکلی در کالیفرنیا" سازوکار کریسپر Cas9 و دو دامنه[۷] درگیر در شکست DNA دو رشته‌ای را شرح دادند و به صورت عملی، قدرت این سیستم در تخریب ژن "پروتئین فلورسنت سبز[۸]" را نشان دادند. شش ماه بعد گروه پژوهشی ژنگ فنگ[۹] در "انستیتو فناوری ماساچوست" ویرایش عملی ژن در یاخته انسانی و موش را به کمک فناوری کریسپر Cas9 شرح دادند. نخستین گزارش در رابطه با کاربرد فناوری کریسپر در گیاه در آگوست ۲۰۱۳ در مجله Nature Biotechnology منتشر شد. درست سه ماه بعد ۷ گروه پژوهشی دیگر، فناوری کریسپر با استفاده از RNA هدایتگر را در گونه‌های گیاهی بیشتری گزارش نمودند (Sarmast & Janati, 2019). در سال ۲۰۲۰ خانم جنیفر دودنا و خانم امانوئل کارپنتیر[۱۰] به طور مشترک جایزه نوبل شیمی را به خاطر پژوهش‌های پایه روی ویرایش ژنوم به کمک سیستم کریسپر Cas دریافت نمودند. امروزه شمار گونه‌های گیاهی که به وسیله سیستم کریسپر در حال ویرایش هستند رو به فزونی است. دستورزی گیاهان زینتی توسط کریسپر Cas از سال ۲۰۱۶ شروع شده است. بدین منظور مقاله‌های مروری Giovannini و همکاران (۲۰۲۱) و Ahn و همکاران (۲۰۲۰) را ملاحظه فرمایید.

چگونگی فعالیت کریسپر Cas

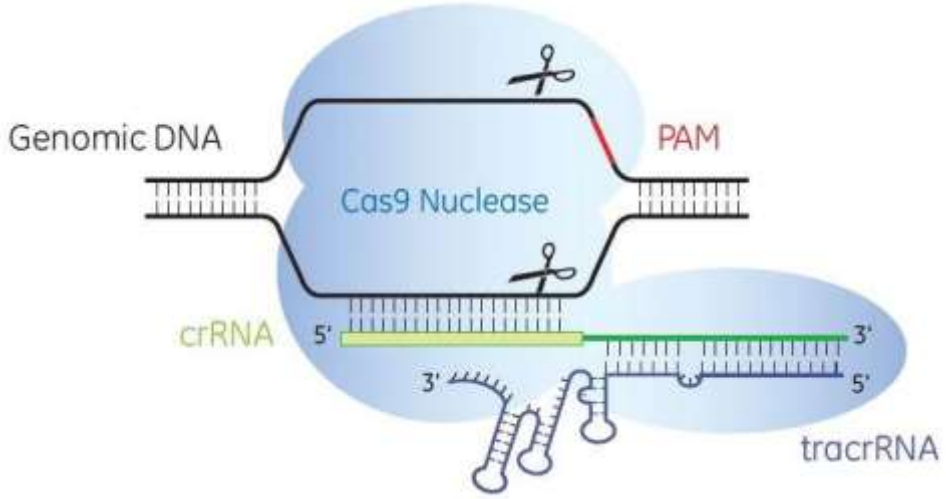
کریسپر Cas (پروتئین‌های وابسته به کریسپر[۱۱]یا Cas) یک سیستم ایمنی در آرکیا و باکتری‌ها بر علیه حمله ویروس‌ها است. از سه نوع سیستم کریسپر Cas شناسایی شده بر اساس عناصر اصلی و توالی، سیستم‌های نوع I و III نیازمند پروتئین‌های فراوان Cas برای تشکیل یک کمپلکس بزرگ فعال می‌باشند در حالی که سیستم نوع II تنها نیازمند یک پروتئین Cas9 (توالی

۱- Zinc-finger nucleases (ZFNs)
۲- Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)
۳- Meganucleases
۴- Clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)
۵- Protospacers
۶- Jennifer Doudna
۷- Domain
۸- Green fluorescent protein (GFP)
۹- Feng Zhang
۱۰- Emmanuelle Charpentier
۱۱- CRISPR-associated (Cas) proteins

ژنی آن ۴۱۰۷ نوکلئوتید است) می‌باشد و به آسانی قابل استفاده عملی در دیگر موجودات است. به محض تهاجم ویروس یا پلاسمید به یاخته میزبان، یاخته میزبان با وارد کردن قطعات کوتاه از ژنوم موجود بیگانه (فاصله‌انداز اولیه) به درون مکان ژنی کریسپر خود به عنوان یک توالی فاصله‌انداز جدید پاسخ می‌دهد. در ادامه RNAهای Tracer (که در مکانی دور از آرایه کریسپر قرار دارند) و توالی‌های طویل pre-crRNA منشاء گرفته از آرایه تکرار- فاصله انداز، رونویسی می‌گردند. سپس tracrRNA به هر یک از توالی‌های crRNA برای ایجاد یک RNA دورشته‌ای متصل می‌شود. پس از آن، این RNAهای دو رشته‌ای به وسیله یک اندونوکلئاز RNAase III و یک نوکلئاز ناشناخته مرتبط با CAS_9 دیگر بریده شده و در نهایت crRNAs بالغ رها می‌شود. crRNA با tracr RNA و پروتئین Cas9 یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی را برای رهگیری DNA دو رشته‌ای موجود بیگانه تشکیل می‌دهند. مشخص شده است که موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه[1] برای اتصال آنزیم Cas9 به DNA ضروری است. در صورت نبودِ موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه (توالی NGG)، حتی توالی هدفی که به طور کامل با RNA راهنما توانایی جفت شدن را دارد، به وسیله Cas9 قابل شناسایی نخواهد بود (Doudna & Charpantier, 2014). ساختار کریستالی تهیه شده از پروتئین Cas9 در تعامل با RNA راهنما و قسمتی از DNA دو رشته‌ای هدف به وضوح نشان می‌دهد که توالی موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه در درون ساختار DNA با جفت بازهای متصل به هم حضور دارد. موتیف‌های آرژنین در سمت دامنه کربوکسیلی Cas9 با توالی NGG روی رشته غیر مکمل درون شکاف بزرگ DNA برهمکنش دارد. اتصال فسفودی‌استر در موقعیت شماره یک رشته DNA هدف با شکاف کوچک توالی موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه دوتایی برهمکنش دارند که به احتمال منجر به جداسازی رشته‌ها در محل شده که به اصطلاح به آن حلقه آر[2] گویند که بلافاصله بالادست ناحیه موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه رخ می‌دهد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان ارتباط حلقه آر در ابتدا به وسیله موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه متاثر می‌شود. واسرشت شدن DNA از قسمت شناسایی NGG شروع می‌شود که منجر به شکل‌گیری جهت‌دار حلقه آر می‌شود و این باز شدن به سمت انتهای دور از فاصله‌انداز اولیه بوده و همزمان حمله RNA راهنما به توالی مکمل خود در روی DNA و تشکیل دورگ DNA و RNA رخ می‌دهد (Sarmast, 2019). در سیستم نوع II، پروتئین Cas9 با استفاده از دامنه HNH، رشته DNAای که مکمل توالی ۲۰ نوکلئوتیدی RNA راهنما (crRNA) است را شکسته و دامنه RuvC-like این آنزیم، رشته DNA مقابل (بالا دست NGG) را می‌شکند (شکل ۱). برش دقیق نوکلئوتید در سه جفت باز بالا دست موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه (NGG)، منجر به تولید یک انتهای صاف در DNA بریده شده می‌شود که در ادامه، این شکست در دو رشته به وسیله ماشین ترمیم یاخته دوباره احیاء می‌گردد (Barrangou & van der Oost, 2013) اما تغییر جزئی نوکلئوتیدها طی این فرایند به غیر فعال شدن ژن خواهد انجامید. امروزه استفاده از این سیستم‌ها در آزمایشگاه تنها نیاز به وارد کردن یک RNA راهنما مناسب (از پروموتر U3 RNA pol III و U6 گونه‌های بومی مثل آرابیدوپسیس، گندم یا برنج برای بیان آن استفاده می‌شود) به حامل دارای ژن Cas9 (راه‌اندازهای یوبیکویتین ذرت، برنج و آرابیدوپسیس و راه‌انداز ویروس موزائیک گل کلم می‌تواند برای بیان ژن Cas9 در تک لپه‌ای‌ها و

۱- Protospacer adjacent motif (PAM)
۲- R-loop

دو لپه‌ای‌ها کارا عمل کند) دارد و تنها محدودیت این سیستم این است که ناحیه برش بایستی دارای ناحیه NGG (PAM) در سمت ′۳ RNA راهنمایِ طراحی شده باشد (Ma *et al.*, 2016).



شکل ۱- این تصویر نحوه اتصال RNA هدایتگر (راهنما) به توالی مکمل خود روی DNA و محل برش دو رشته DNA به وسیله دو دامنه نوکلئازی Cas9 را نشان می‌دهد. برای شرح بیشتر به متن مراجعه کنید (Barrangou & van der Oost, 2013).

Figure 1- This figure represents the binding of guide RNA to its complement DNA strand and the position of double strand break induced by two Cas9 nuclease domains. See the text for further information (Barrangou & van der Oost, 2013).

استفاده از سیستم کریسپر Cpf1[1] (این سیستم ایمنی کریسپر از باکتری *Prevotella* و *Francisella* گرفته شده است) به جای سیستم کریسپر Cas تنها نیاز به یک RNA پس از بیان در یاخته میزبان دارد. همچنین این سیستم بر خلاف سیستم کریسپر Cas9 به جای ایجاد یک انتهای صاف در دو رشته DNA، یک بیرون زدگی در رشته‌های DNA ایجاد می‌کند که پژوهشگران را قادر می‌سازد تا یک DNA خارجی را به طور دقیق و هدفمند به ژنوم میزبان وارد نمایند. افزون بر این به دلیل متفاوت بودن موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه (NGG) در سیستم Cpf1 ، توانایی دستورزی و ویرایش ژنوم‌های موجودات مختلف به ویژه در نقاطی از رشته DNA که توالی سه نوکلئوتیدی NGG حضور ندارد (Zetsche *et al.*, 2015) بیشتر فراهم خواهد شد. آزمایشاتی که با استفاده از روش‌های رسوب ایمنولوژیک پروتئین[2] و توالی‌یابی‌های پیشرفته انجام شد، آشکار کرد که آنزیم Cas9 به نقاط غیر هدف در ژنوم که به احتمال دارای توالی PAM و تا حدی مکمل RNA راهنماند نیز متصل می‌شود. از طرفی اتصال Cas9 به نقاط هدف در نواحی دارای کروماتین باز شده خیلی بیشتر از نواحی دارای کروماتین فشرده رخ می‌دهد که از لحاظ رونویسی غیرفعال‌اند. بخشی از این غیر هدفمند عمل نمودن سیستم کریسپر Cas به خطای آزمایش و سیستم بیان موقت ژن نیز مربوط می‌باشد.

کاربردهای کریسپر

یکی از ویژگی‌های جالب سیستم کریسپر این است که قابلیت ویرایشگری چندین مکان ژنی را در یک زمان به وسیله وارد کردن چندین RNA هدایت‌گر (راهنما[3]) روی یک سازه به صورت همزمان فراهم می‌کند. برای مثال در گل کوشاد[4]، دو RNA راهنما

۱- CRISPR/Cpf1 ۲- Chromatin immunoprecipitation ۳- Guid RNA ۴- *Gentiana* spp.

روی یک حامل دوتایی برای هدف قرار دادن اگزون شماره ۳ ژن *GST1* طراحی گردید (Tasaki *et al*., 2020). انجام این مهم به وسیله سیستم ZFNs و TALENs دشوار است. با ایجاد تغییر در دامنه برشی آنزیم Cas9 به عنوان مثال Cas9-D1A یا Cas9-H840A و اتصال آن با یک RNA راهنما قادر خواهیم بود تا رشته DNA مقابل ناحیه هدف را بریده و اختصاصی عمل نمودن سیستم را به میزان ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ برابر افزایش دهیم (Shen *et al*., 2014). از سویی آنزیم Cas9 بدون فعالیت اندونوکلئازی که به طور شیمیایی دچار نقص (dCas9[1]) شده است (به وسیله ایجاد جهش نقطه‌ای در هر یک از دامنه‌های RuvC و HNH) قادر خواهد بود که به افکتورهای[2] فراوانی متصل شود. بنابراین کریسپر وابسته به dCas9 می‌تواند وظایف دیگری را به جز شکستن توالی DNA انجام دهد. در باکتری *E-Coli*، کاهش بیان ژن به سادگی با استفاده از بیان dCas9 به همراه یک RNA راهنما[3] (sgRNA) به‌دست آمده است. sgRNA و dCas9 می‌توانند به هم متصل شوند تا تشکیل یک کمپلکس شناسایی DNA را بدهند. dCas9 که به وسیله RNA راهنما به سمت توالی مکمل خود (ناحیه اتصال فاکتور رونویسی یا ناحیه اتصال RNA پلیمراز مربوط به راه‌انداز یا اپراتور یک ژن) هدایت می‌شود، قادر به بلوکه کردن نقطه شروع رونویسی و مداخله در طویل شدن رونوشت است که در نهایت منجر به کاهش بیان ژن می‌شود. به این کار فناوری کریسپر مداخله‌گر[4] می‌گویند که می‌توان برای سرکوب کردن چندین ژن هدف مورد استفاده قرار گیرد. این عمل به وسیله بیان dCas9 به همراه چندین sgRNA امکان‌پذیر است. این روش تاکنون در پستانداران گزارش شده و گزارشی از این روش در گیاهان زینتی وجود ندارد (Zhang *et al*., 2015).

پروتئین dCas9 قابلیت اتصال به کنشگرهای فعال کننده یا سرکوب کننده رونویسی را دارد. فناوری فعال‌سازی کریسپر[5] شامل اتصال یک dCas9 به دامنه فعال‌کننده مانند VP64 یا p65 است و نشان داده شده که در فعال کردن بیان یک ژن تکی یا چندتایی در یاخته‌های انسان کارا است. فعال‌سازی یا سرکوب کردن رونویسی RNA پلی مرازدر باکتری‌ها با استفاده از dCas9 ثابت شده است. حتی dCas9 قابلیت ترکیب با عوامل اپی‌ژنتیک از قبیل آنزیم‌های متیله کننده DNA یا متاثر کننده هیستون‌ها را نیز دارد. این نتایج نشان می‌دهد که ویرایش اپی‌ژنوم به وسیله CRISPR اپی‌ژنتیک[6] در آینده نزدیک به وسیله فناوری مشابه به وقوع خواهد پیوست (Mendenhall *et al*., 2013).

استفاده از پروتئین فلورسنت سبز متصل به dCas9 و استفاده از RNA راهنمایی که از لحاظ ساختاری بهینه‌سازی شده این اجازه را می‌دهد که بتوانیم از عناصر تکراری و غیرتکراری در نواحی تلومری و ژن‌های رمز کننده در یاخته‌های زنده تصویر برداری نماییم (Chen *et al*., 2014). از آنجایی که در ابتدا سیستم کریسپر Cas در رابطه با ایجاد ایمنی در برابر ویروس‌ها شناخته شد، این سیستم برای شکست و ایجاد جهش در نواحی تکراری بلند انتهایی ویروس HIV-1 و همچنین حذف ژن‌های ویروسی داخلی از کروموزوم یاخته‌های آلوده به کار رفته است (Ebina *et al*., 2013). افزون بر این‌ها می‌توان آنزیم Cas9 را به شکلی تحریک نمود تا قادر باشد که به RNA تک رشته‌ای به شکل قابل برنامه‌ریزی به کمک الیگونوکلئوتیدهای کوتاه DNA دارای توالی PAM که مکمل ناحیه هدف است متصل شود. این روش نو برای هدف قرار دادن رونوشت (mRNA) در سیتوپلاسم قابل استفاده خواهد بود. CRISPRa که منجر به افزایش بیان ژن‌های درونی می‌شود یک وسیله قوی برای به‌دست آوردن بیش بیان ژن‌ها در محل درست است. به طور مشابه‌ای، CRISPRi می‌تواند برای ایجاد یک جهش با ایجاد کاهش در بیان یک ژن ویژه مورد استفاده

۱- Deactivated Cas9 (dCas9) ۲- Effector ۳- Single guide RNA (sgRNA) ۴- CRISPR interference

۵- CRISPR activation (CRISPRa) ۶- EpiCRISPR

قرار گیرد و به ویژه برای ایجاد خاموشی ژن در چندین مکان ژنی همولوگ قابل کاربرد است. این روش سریع و تطبیق پذیر دارای آینده روشن برای پژوهش‌های ژنوم گیاهی خواهد بود و در آینده نزدیک با بالا رفتن دقت آن به یک روش بهنژادی جدید معمول تبدیل خواهد شد.

کاربرد فناوری کریسپر در گیاهان زینتی

تاکنون تمامی گزارش‌های منتشر شده در خصوص ویرایش ژنوم گیاهان زینتی مربوط به غیر فعال نمودن ژن‌ها و به ویژه ژن‌های کارا در تغییر رنگیزه‌های آنتوسیانین گلبرگ و کلروفیل برگ می‌باشد. آسانی شناسایی تغییرهای رخداده پس از خاموشی در این ویژگی‌های کیفی از جمله دلایل بالا بودن بازده دستورزی این ژن‌ها به کمک کریسپر Cas می‌باشد. جدول ۱ لیستی از گیاهان زینتی که تاکنون به طور موفقیت آمیزی به کمک فناوری کریسپر مورد ویرایش قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد.

جدول ۱- دستورزی ژنتیکی موفق در گیاهان زینتی به کمک فناوری CRISPR/Cas.

Table 1- Successful genetic manipulation of ornamental plants through CRISPR/Cas9 technology.

منبع Reference	ریز نمونه Material	روش انتقال ژن Method	صفت Gene Function	ژن هدف Targeted Gene	گیاه زینتی Species
Yu *et al.*, 2020	پروتوپلاست Protoplast	انتقال ژن به پروتوپلاست به کمک PEG PEG-mediated protoplast transfection	تغییر رنگ گلبرگ Altered petal color	*F3H*	*Petunia hybrida* Vilm. *'Madness Midnight*
Xu *et al.*, 2020	پروتوپلاست Protoplast	انتقال ژن به پروتوپلاست به کمک PEG PEG-mediated protoplast transfection	پیری گلبرگ Petal senescence	*PhACO1, PhACO2, PhACO3*	*Petunia hybrida*
Sun *et al.*, 2018	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	خود ناسازگاری Self-incompatibility	*PiSSK1*	*Petunia inflata*
Subburaj *et al.*, 2016	پروتوپلاست Protoplast	انتقال ژن به پروتوپلاست به کمک PEG PEG-mediated protoplast transfection	کمبود در آسیمیلاسیون نیترات Deficiency in nitrate assimilation	*PhNR*	*Petunia hybrida*
Zhang *et al.*, 2016	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	فنوتیپ زال Albino phenotype	*PhPDS*	*Petunia hybrida*
Tasaki *et al.*, 2020	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	تغییر رنگ گلبرگ Altered petal color	*GST1*	*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*
Tasaki *et al.*, 2019	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	تغییر رنگ گلبرگ Altered petal color	*Gt5GT, Gt3'GT, and*	*Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*

Tong *et al*., 2020	پروتوکورم Protocorm	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	آغازش و نمو گل Floral initiation and development	*Gt5/3′AT* *MADS*	*Phalaenopsis equestris*
Nishihara *et al*., 2018	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	ساخت فلاونوئید Flavonoid biosynthesis	*F3H*	*Torenia fournieri*
Watanabeh *et al*., 2017	رویان نابالغ Immature embryo	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	ساخت آنتوسیانین Anthocyanin biosynthesis	*InDFR*	*Ipomoea nil*
Watanabeh *et al*., 2018	رویان نابالغ Immature embryo	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	تغییر رنگ گلبرگ Altered petal color	*InCCD4*	*Ipomoea nil*
Shibuya *et al*., 2018	رویان نابالغ Immature embryo	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	پیری گلبرگ Petal senescence	*EPH1*	*Ipomoea nil*
Yan *et al*., 2019	پینه رویان زا و فلس کشت بافتی Embryogenic callus and tissue cultured scales	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	فنوتیپ زال Albino phenotype	*LpPDS*	*Lilium longiflorum, L. pumilum*
Kishi-Kaboshi *et al*., 2017	برگ Leaf	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	فلورسنت سبز Green fluorescent	*CpYGFP*	*Chrysanthemum morifolium*
Kui *et al*., 2017	پروتوکورم Protocorm	اگروباکتریوم *Agrobacterium*	ساخت لیگنوسلولوز Lignocellulose biosynthesis	*C3H, C4H, 4CL, CCR, IRX*	*Dendrobium officinale*
Sarmast, 2019	برگ Leaf	بیان موقت با اگروباکتریوم Transient *Agrobacterium*-mediated transformation	تجزیه کلرفیل Chlorophyll degradation	*SGR*	*Festuca arundinacea* schreb.

اطلسی[1] یک گیاه مهم زینتی مدل است. یکی از آنزیم‌های حیاتی در تولید کارتنوئیدها در گل‌ها PhPDS[2] می‌باشد. در یک بررسی به وسیله کریسپر Cas، ژن کدکننده این آنزیم به وسیله کریسپر Cas مورد هدف قرار گرفت. گیاهان تراریخته باززایی شده پس از به‌کارگیری این روش، فنوتیپ زال و افزایش یا کاهش نوکلئوتید در محل هدف‌گیری ژن در روی توالی اسید نوکلئیک را نشان دادند. با توجه به دوگان بودن لینه Mitchell Diploid (MD) اطلسی، تولید گیاهان زال بیانگر این بود که هر

۱- *Petunia hybrida*

۲- Phytoene desaturase

دو کپی موجود در ژن *PDS* در کروموزوم این گیاه با استفاده از روش کریسپر Cas9 خاموش شده است. در حقیقت تولید گیاهان هموزیگوت یکی از مزایای این فناوری است. اگرچه که گیاهان دوآللی و بافت‌ناهمسان نیز در این بین نیز تولید شدند. به طور میانگین ۵۵/۶ تا ۸۷/۵٪ لینه‌های اطلسی تراریخته باززایی شده در محیط دارای علفکش Basta زال بودند که این امر نشان از کارا بودن کاربرد سیستم کریسپر Cas در اطلسی است (Zhang *et al.*, 2016). اگرچه که سیستم کریسپر Cas ظرفیت بالایی برای ویرایش ژنوم دارد ولی دارای محدودیت نیز می‌باشد. به عنوان مثال به‌دست آوردن بیان هماهنگ و انگیزش‌پذیر در رابطه با Cas9 و RNA راهنما مشکل است. استفاده از چندین RNA راهنما در یک سیستم به طور همزمان سخت و نیازمند چندین راه‌انداز RNA پلیمراز III می‌باشد. در بسیاری از موجودهای غیر مدل، راه‌اندازRNA پلیمراز III به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته و بیان آن به صورت هترولوگوس اغلب نتایج ضعیفی به همراه داشته است. در پژوهشی دیگر یک RNA راهنما، بر اساس یکی از اگزون‌های ژن *SGR*[1] چمن فستوکای بلند[2] طراحی و به کمک فناوری gateway در حامل دارای آنزیم Cas9 قرار داده شد. ژن *SGR* در فرایند تخریب کلروفیل نقش کلیدی داشته و در گیاه آرابیدوپسیس[3] مشخص شده که ایجاد جهش در این ژن، پیری و تخریب کلروفیل را به تاخیر انداخته و بیش بیان این ژن پیری را تسریع می‌کند (Wei *et al.*, 2011). در این آزمایش به کمک روش تزریق باکتری به بافت[4]، حامل دارای RNA راهنما و Cas9 که به طور مشترک روی یک حامل دوتایی قرا داشتند، به درون برگ‌های جوان چمانواش بلند در شرایط خلاء منتقل شد. نتایج نشان داد که گیاهان تیمار شده با حامل دارای کریسپر Cas9 در مقایسه با شاهد کلروفیل بیشتری را در برگ‌های خود نگه داشتند (Sarmast, 2019) که این نتیجه نشان از موفقیت کاربرد این سامانه در تک لپه‌ای‌ها دارد. در فاصله سال‌های ۲۰۱۷ و ۲۰۱۸ سه پژوهش با استفاده از فناوری کریسپر Cas روی گل نیلوفر پیچ[5] انجام شد. در پژوهش اول که از آن به عنوان نخستین پژوهش تغییر رنگ گل در گیاهان با استفاده از کریسپر یاد می‌شود، ژن *DFR-B*[6] که رمز کننده یک آنزیم مرتبط با زیست‌ساخت آنتوسیانین می‌باشد به کمک کریسپر و با واسطه‌گری اگروباکتریوم مورد هدف قرار گرفت و ۷۵٪ گیاهان تراریخته گل‌های با آنتوسیانین کمتری در گلبرگ‌های خود تولید نمودند (Watanabe *et al.*, 2017). در همان سال پژوهشی دیگر برای ایجاد رنگ زرد در گلبرگ‌های این گل صورت گرفت. در این گزارش ژن *InCCD4*[7] که به وسیله شکستن اتصال‌های دوگانه ویژه در زنجیره polyene ، در تخریب کارتنوئید نقش ایفا می‌کند به کمک کریسپر Cas برای غیر فعال نمودن آن مورد هدف قرار گرفت. نتایج این آزمایش در رقم با گل‌های سفید منجر به تولید گیاهان تراریخته با گلبرگ زرد کم رنگ گردید. نتایج آن‌ها نشان داد که هم تخریب کارتنوئید و هم بیان کم ژن‌های درگیر در زیست‌ساخت کارتنوئید، علت عدم تولید گلبرگ‌های زرد بوده است (Watanabe *et al.*, 2018). در پژوهشی دیگر به وسیله این گروه ژاپنی، تاخیری مشهود در پیری گلبرگ گیاهان تراریخته نسل اول که ژن *EPH1*[8] آن به کمک کریسپر Cas9 خاموش شده بود رخ داد. EPH1 یک عامل رونویسی NAC بوده که تنظیم‌کننده کلیدی پیری در نیلوفر پیچ به حساب می‌آید (Shibuya *et al.*, 2018). در گزارشی دیگر ژن *F3H*[9] که رمز کننده یک آنزیم کلیدی در زیست‌ساخت فلاونوئید می‌باشد به کمک فناوری کریسپر Cas

---

۱- Stay green ۲- *Festuca arundinacea* ۳- *Arabidopsis* ۴- Agroinfiltration ۵- *Ipomoea nil*

۶- dihydrofavonol-4-reductase-B ۷- Carotenoid cleavage dioxygenase ۸- EPHEMERAL$_1$

۹- Flavanone 3-hydroxylase

برای ایجاد جهش در گل تورنیا[۱] مورد هدف قرار گرفت. گیاهان تراریخته باززایی شده گلبرگ‌های آبیِ رنگ پریده (به تقریب سفید) را بروز دادند. تایید ایجاد جهش در این ژن در ژنوم تورنیا به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی‌یابی تایید گردید. حدود ۸۰٪ گیاهان تراریخته، تغییر رنگ را در گلبرگ‌های خود نشان دادند. این روش برای تغییر رنگ گل و واکاوی دیگر ژن‌ها در تورنیا مفید شناخته شد (Nishihara *et al.*, 2018). تغییر رنگ مشاهده شده پس از کاربرد کریسپر در لاین‌های تراریخته مرتبط با خاموش شدن یکی از دو آلل *F3H*، پدیده بافت‌ناهمسانی، جهش دو آللی و ابلقی بوده است که در مورد نیلوفر پیچ هم پیش‌تر گزارش شده بود (Watanabe *et al.*, 2017).

غیر فعال نمودن پروتئین درگیر در انتقال آنتوسیانین با نام گلوتاتیون S ترانسفراز (GSTs) روی گل کوشاد رقم آبی رنگ Albireo[۲] به وسیله کریسپر Cas9 منجر به تولید دو لینه با گل‌های سفید و آبی کم رنگ شد (Tasaki *et al.*, 2020). بررسی میزان آنتوسانین در گلبرگ نشان دهنده کاهش میزان آنتوسیانین در گلبرگ گیاهان تراریخته بود. در پژوهشی دیگر به وسیله همین گروه که روی گل کوشاد آبی رنگ انجام شد، آشکار شد که گلیکولیزه شدن و سپس آسیلاسیون گروه هیدروکسیل حلقه B در رنگیزه آنتوسیانینی دلفینیدین در نمو رنگ آبی در گلبرگ گل کوشاد موثر است (Tasaki *et al.*, 2019). تولید این دو لینه تراریخته به کمک ویرایش ژنوم کریسپر، نه تنها گوناگونی رنگ گل در این گونه گیاهی را افزایش خواهد داد بلکه کمکِ بزرگی به بهنژادی رقم‌های جدیدتر این گل نیز خواهد نمود. جهش ویژه یک محل در گل اطلسی برای دستورزی رنگ گل در رقم Madness Midnight به کمک فناوری کریسپر انجام شده است. غیر فعال نمودن هر دو ژن رمز کننده آنزیم فلاونوئید ۳′ هیدروکسیلاز (جهش یافته دوتاییF3H) منجر به تولید اطلسی با رنگ گلبرگ صورتی مایل به ارغوانی کم رنگ شد در حالی که در صورت خاموشی تک ژن، رنگ بنفش در گلبرگ مشاهده شد (Yu *el al.*, 2020). در پژوهشی دیگر به دلیل همبستگی بالا میان بیان بالای رونوشت ژن *ACO*[۳] و تولید اتیلن در مراحل انتهایی گلدهی در گیاه اطلسی، این ژن به کمک سازه کریسپر در پروتوپلاست‌های این گل با روش PEG خاموش شد. در گیاهان باززایی شده که ژن *ACO* دچار جهش شده بود، تولید اتیلن کاهش و طول عمر گل افزایش یافت (Xu *et al.*, 2020).

بهبود دقت کریسپر

تغییرهای ناخواسته مشاهده شده در رنگ گلبرگ گل‌های زینتی که به وسیله کریسپر دست‌ورزی شده‌اند نشان از نیاز به بهینه‌سازی این روش بهنژادی دارد (Tasaki *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016). از نظر تئوری، دقت کریسپر وابسته به ۲۰ نوکلئوتید crRNA می‌باشد، در حالی که ناحیه مرکزی ۱۳ جفت بازی نزدیک به موتیف مجاور فاصله‌انداز اولیه لازم است که Cas9 به طور دقیقی به توالی هدف بچسبد. تحمل اشتباه در اتصال ناحیه انتهای ۵′ crRNA بارها در یاخته‌های پستانداران و گیاهان دیده شده است (Sarmast & Janati, 2019). بزرگترین مشکل کریسپر بالا بودن اتصالش به نواحی غیر هدف است. در پستانداران، اتصال به نواحی غیر هدف خیلی بیشتر نسبت به اتصال در محل هدف دیده شده است. میزان بازده آنزیم Cas9 به‌طورمعمول به وسیله درصد اتصال نادرست آن برآورد می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های بالای آنزیم، باعث افزایش اتصال‌های نادرست به توالی DNA می‌شود. در حالی که کاهش غلظت Cas9 در یاخته باعث افزایش دقت و

۱- *Torenia fournieri*

۲- *Gentiana triflora* × *Gentiana scabra*

۳- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO)

کاهش اتصال‌های نادرست می‌شود. در برخی دیگر از آرکیا و باکتری‌های دارای پروتئین Cas9، موتیف‌های مجاور فاصله‌انداز آغازین بلندتری پیدا شده است. به عنوان مثال پروتئین NmCas9 مربوط به *Neisserio meningitides* 8013 به یک توالی فاصله‌انداز اولیه ۲۴ نوکلئوتیدی با توالی PAM 5′NNNAGAA-3 متصل می‌شود و این باعث افزایش دقت در اتصال به ناحیه هدف می‌شود. انواع جدیدی از پروتئین‌های Cas9 توانمند در شناسایی توالی‌های موتیف مجاور فاصله انداز مختلف شناسایی شده است. به عنوان مثال آنزیم St1Cas9 قادر به شناسایی توالی موتیف مجاور فاصله انداز آغازین با توالی NNAGAA می‌باشد یا آنزیم SaCas9 دارای سه ناحیه شناسایی مختلف مانند NNGGGT، NNGAAT و NNGAGT می‌باشد (Deveau *et al.*, 2008). استفاده از این آنزیم‌ها می‌تواند دقت اتصال آنزیم Cas9 به ژن هدف را به طور قابل توجهی افزایش دهد.

سری‌های جدید پروتئین Cas9 که دارای جهش نقطه‌ای در اسید آمینه ۱۱۳۵ (تبدیل آسپارژین به والین)، ۱۳۳۵ (آرژنین به گلوتامین)، ۱۳۳۷ (ترئونین به آرژنین) معروف به VQR و همچنین جهش نقطه‌ای در اسید آمینه ۱۱۳۵ (آسپارتات به گلوتامات)، ۱۳۳۵ (آرژنین به گلوتامین)، و ۱۳۳۷ (ترئونین به آرژنین) معروف به EQR تولید شده است. Cas9های VQR قادر به شکست نواحی موتیف مجاور فاصله انداز اولیه با توالی NGAN می‌باشند. در حالی که Cas9های EQR نواحی موتیف مجاور فاصله انداز اولیه با توالی NGAG، NGAN و NGNG را می‌شکنند (Kleisstiver *et al.*, 2015). وجود این توالی‌های موتیف مجاور فاصله انداز اولیه اختصاصی، پژوهشگران را قادر می‌سازد تا نواحی از DNA که به وسیله Cas9 معمولی قابل ردیابی و هدف قراردهی نیست را نیز مورد هدف قرار دهند. یک نوکلئاز اختصاصی با نام Cpf1 (کریسپر به‌دست آمده از *Prevotella* و *Francisella* 1) که غنی از T در انتهای ′۵ (Zetsche *et al.*, 2015) است، شناسایی شده که دو رشته DNA را با فاصله از PAM و بدون نیاز به tracrRNA می‌شکند. این سیستم توانایی بالای خود را در ویرایشگری ژنوم پستانداران نشان داده است (Song *et al.*, 2016). تیتراسیون RNA راهنما و سطوح Cas9 برای بالا بردن دقت واکنش بین RNA راهنما و آنزیم Cas9 اهمیت دارد. پیش‌بینی بیوانفورماتیکی برای کمک به شناسایی و انتخاب نواحی هدف در توالی موجود هدف و پیشبینی نواحی غیر هدف در بالا بردن دقت فناوری کریسپر Cas9 نیز اهمیت دارد (Mali *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014). استفاده از یک RNA راهنمای هدایت کننده dCas9 (آنزیم غیر فعال) که به نوکلئاز FokI متصل است، منجر می‌شود که دو مونومر dCas9-FoKI متصل، به طور پیوسته به ناحیه هدف در فاصله تعریف شده متصل شود.

استفاده از روش‌های دورگه‌گیری، نوترکیبی و جهش تصادفی در ژنوم، اغلب غیرهدفمند و زمانبر است. بنابراین استفاده از فناوری کریسپر به دلیل استفاده از یک نوکئاز مجهز به یک ردیاب هوشمند (RNA راهنما)، به ویژه در گیاهان زینتی که به طور عمده دارای ژنوم بزرگ، هتروزیگوت، دارای سطوح کروموزومی بالا، خودناسازگار و حتی دارای چرخه رشدی طولانی هستند، بسیار موثرتر از دیگر روش‌های بهنژادی خواهد بود.

پژوهش‌های موفق آغازین صورت گرفته در زمینه تغییر رنگ گلبرگ در گیاهان زینتی راه را برای بررسی بیشتر ویژگی‌های مرتبط با تنش‌های زیوا و نازیوا در گل‌ها هموار خواهد نمود. از سوی دیگر این فناوری زمان رسیدن به گیاهان پایدار تراریخته را نیز به دلیل جهش همزمان در دو رشته DNA کوتاه‌تر خواهد نمود. استفاده از dCas9 در آینده می‌تواند نقش مهمی در تنظیم هدفمند بیش بیان و یا کم بیان بسیاری از ژن‌های مرتبط با اهداف بهنژادی در گیاهان زینتی داشته باشد.

همچنین با توجه به اینکه در سیستم کریسپر Cas تنها دست‌ورزی هدفمند در ژن‌های طبیعی گیاه اصلی رخ می‌دهد، بسیاری از مقاومت‌هایی که در زمینه استفاده از گیاهان تراریخته وجود دارد نیز بیش از پیش مرتفع خواهد شد. با وجود مطالب گفته شده در بالا، ریزافزایی بسیاری از گونه‌های بااهمیت گیاهان زینتی به دلیل بازده پایین ریزافزایی و وابسته به ژنوتیپ بودن آن‌ها، با محدودیت‌های جدی روبرو است و نیاز به بهینه سازی بیشتر دارد.

منابع

Ahn, C.H., Ramya, M., An, H.R., Park, P.M., Kim, Y-J., Lee, S.Y., Jang, S. (2020). Progress and Challenges in the Improvement of Ornamental Plants by Genome Editing. *Plants*, doi:10.3390/plants9060687.

Barrangou, R., van der Oost, J. (2013). CRISPR-Cas Systems RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 229 p.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology, 151*, 2551–2561.

Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus hermophiles*. *Journal of Bacteriology*, *190*, 1390–1400.

Doudna, J.A., Charpentier, E. (2014). Genome editing, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*, 1258096.

Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent *HIV-1* provirus. *Scientific Report*, *3*, 2510.

Gelvin S.B. (2003). Improving plant genetic engineering by manipulation the host. *Nature*, *21*, 95-98.

Giovannini, A., Laura, M., Nesi, B., Savona, M., Cardi, T. (2021). Genes and genome editing tools for breeding desirable phenotypes in ornamentals. *Plant Cell Reports, 40*, 461–478.

Hahne, G., Tomlinson, L., Nogué, F. (2019). Precision genetic engineering tools for next-generation plant breeding. *Plant Cell Reports, 38*, 435–436.

Hischler, J., Bürstmayr, H., Stoger, E. (2016). Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. *Ciotechnology Journal*, *11*, 1-14.

Kishi-Kaboshi, M., Aida, R., Sasaki, K. (2017). Generation of gene-edited *Chrysanthemum morifolium* using multicopy transgenes as targets and markers. *Plant and Cell Physiology, 58*, 216–226.

Kui, L., Chen, H., Zhang, W., He, S., Xiong, Z., Zhang, Y., Yan, L., Zhong, C., He, F., Chen, J. (2017). Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: Identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium ocinale*. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 2036.

Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., Liu, Y.G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant*, *9*, 961–974.

Mali, P., Aach, J.P., Stranges, B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, l., Church, G.M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, *31*, 833–838.

Mendenhall, E.M., Williamson, K.E., Reyon, D. (2013). Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nature Biotechnology*, *31*, 1133–1136.

Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution, 60*, 174–182.

Montague, T., Cruz, G.J.M., Gagnon, J.A., Church, G.M., Valen, E. (2014). CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research, 42*, 401–407.

Nishihara, M., Higuchi, A., Watanabe, A., Tasaki, K. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in Torenia fournieri. *BMC Plant Biology*, *18*, 331.

Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, *151*, 653–663

Sarmast, M.K. Janati, M. (2019). Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes. Gorgan Universitu of Agricultural Sciences and Natural Resources Publication. 216p. (In Persian).

Sarmast, M.K. (2019). Transient expression-based CRISPR/Cas9 system for manipulation of tall fescue *SGR* gene. *Journal of Plant Production Research*, *56*, 35-43 (In Persian**).**

Sarmast, M.K. (2020). Principles and Application of CRISPR/Cas Technology in Genetic Modification of Plants. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Publication. 124p. (In Persian).

Shen, B., Zhang, W.S., Zhang, J., Zhou, J.K., Wang, J.Y., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X.X., Skarens, W.C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, *11*, 399–402.

Shibuya, K., Watanabeb, K., Ono, M. (2018). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *EPHEMERAL1* locus that 1 regulates petal 2 senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiology and Biochemistry*, *131*, 53-57.

Subburaj, S., Chung, S.J., Lee, C., Ryu, S.M., Kim, D.H., Kim, J.S., Bae, S., Lee, G.J. (2016). Site-directed mutagenesis in *Petunia hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*, *35*, 1535–1544.

Sun, L., Kao, T.H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knockout of PiSSK1 reveals essential role of S-locus F-box protein-containing SCF complexes in recognition of non-self S-RNases during cross-compatible pollination in self-incompatible *Petunia inflata*. *Plant Reproduction*, *31*, 129–143.

Tasaki, K., Higuchi, A., Watanabe, A., Sasaki, N., Nishihara, M. (2019). Effects of knocking out three anthocyanin modification genes on the blue pigmentation of gentian flowers. *Scientific Reports*, *9*, 15831.

Tasaki, T., Yoshida, M., Nakajim, M., Higuchi, A., Watanabe, A., Nishihara, M. (2020). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione Stransferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology*, *20*, 370.

Tong, C.G., Wu, F.H., Yuan, Y.H., Chen, Y.R., Lin, C.S. (2020). High efficiency CRISPR/Cas-based editing of *Phalaenopsis* orchid MADS genes. *Plant Biotechnology Journal*, *18*, 889–891.

Vainstein, A. (2002). Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches. Springer. 392p.

Watanabe, K., Kobayashi, A., Endo, M., Sage-Ono, K., Toki, S., Ono, M. (2017). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydrofavonol4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea* (*Pharbitis*) *nil*. *Scientific Report*, *7*, 10028.

Watanabe, K., Oda-Yamamizo, C., Sage-Ono, K., Ohmiya, A., Ono, M. (2018). Alteration of flower color in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research*, *27*, 25–38.

Wei, Q., Guo, Y., Kuai, B. (2011). Isolation and characterization of a chlorophyll degradation regulatory gene from tall fescue. *Plant Cell Report*, *30*, 1201-1207.

Xu, J., Hua, K., Lang, Z. (2019). Genome editing for horticultural crop improvement. *Horticulture Research*, *6*, 113.

Xu, J., Kang, B.C., Naing, A.H., Bae, S.J., Kim, J.S., Kim, H., Kim, C.K. (2020). CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 enhances *Petunia* flower longevity. *Plant Biotechnology Journal*, *18*, 287–297.

Yan, R., Wang, Z., Ren, Y., Li, H., Liu, N., Sun, H. (2019). Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* White Heaven. *International Journal of Molecular Science*, *20*, 2920.

Yu, J., Tu, L., Subburaj, S., Bae, S., Lee, G-J. (2020). Simultaneous targeting of duplicated genes in *Petunia* protoplasts for flower color modification via CRISPR‐Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*, https://doi.org/10.1007/s00299-020-02593-1.

Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J.L., Oost, J.V.D., Regev, A., Koonin, E.V., Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guide endonuclease of a class 2 CRISPRran-Cas system. Cell, *163*, 1–13.

Zhang, B., Yang, X., Yang, C., Li, M., Guo, Y. (2016). Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in *Petunia*. *Scientific Reports*, *6*, 20315.

Zhang, F., Puchta, H., Thomson, J.G. (2015). Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes. New York, NY: Springer New York. 166p.

Flower and Ornamental Plants (2021), 6(1): 37-48
Review article
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.1.37

CRISPR/Cas, a powerful tool for genome editing in ornamental plants

Mostafa Khoshhal Sarmast
Department of Horticultural Science, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan
✉ mkhsarmast@gau.ac.ir
Received: 7/12/2020, Revised: 25/7/2021, Accepted: 25/7/2021

Abstract
Biotechnology is a proper implement for breeding traits such as flower size, color and aroma as well as improving disease resistance and improvement of flower vase life. With completion of genome sequencing of many ornamental plants and astonishing progress on site-specific edition, the process of diversification for ornamental plant breeding will accelerate. Nowadays, due to the ease in application, low cost, and availability, CRISPR/Cas has overtaken the other genome editing technologies such as ZFNs, TALENs and meganuclease. CRISPR/Cas is an acquisition immune system in archaea and some bacteria wherein bacteria in response to introduced genetic materials start to make small complementary transcript by which intercepts the existing invasive sequence and inactivates the target DNA with the help of Cas nuclease protein. Broken strands join together by DNA repair system but the mutated nucleotides lead to inactivity of the target gene. The most important achievement of this technology in ornamental plants so far is knocking down homeotic genes involved in plant developmental process and also color change in petunia, torenia, gentian, orchids, and Japanese morning glory. With further development and optimization of this method, we will soon see many changes in the breeding of biotic traits resistance.
Keywords: Anthocyanin, Cas9 enzymes, Guide RNA, PAM.