اصلاح دقیق و هدفمند گیاهان به کمک فناوری CRISPR/Cas

رحیم غزی و لیلا نژادصادقی*

ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

چکیده

نیاز به بهبود عملکرد گیاهان زراعی به کمک فناوری‌های نوین به‌نژادی، جهت افزایش تولید محصولات غذایی در سراسر دنیا امروز بیش از گذشته احساس می‌شود. پیشرفت‌های اخیر در زمینه ویرایش ژنوم به کمک فناوری کریسپر، دستورزی هدفمند با کارایی بالا را در اکثر گیاهان زراعی ممکن ساخته است، بنابراین این نوید را می‌دهد که بهبود گیاهان به کمک این ابزار شتاب بیشتری پیدا کند. در این مقاله به پیشرفت‌های CRISPR/Cas9، انواع و کاربردهای آن در ویرایش ژنوم گیاهان و دستورزی‌های حاصل به کمک این تکنیک، پرداخته شده است. ابزارهای پایه‌ای ویرایش که امکان جایگزینی هدفمند نوکلئوتیدها را فراهم ساخته و سیستم‌های انتقالی مختلف به ویژه روش‌های عاری از DNA که ویرایش ژنومی را به اصلاح گیاهان زراعی مرتبط می‌سازد بطور برجسته‌تر بیان شده‌اند. بطور خلاصه کاربرد ویرایش ژنوم در بهبود صفات، توسعه تنظیم دقیق بیان ژن، استراتژی‌های اصلاحی برای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله مواردی است که در این مقاله به بحث و بررسی گذاشته شده است.

کلیدواژگان: اصلاح دقیق گیاهان، ویرایش ژنوم، کریسپر، هدف‌گیری ژنی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: L.nejadsadeghi@scu.ac.ir

مقدمه

در حال حاضر یکی از چالش‌های پیش روی بشر، تامین امنیت غذای جمعیت در حال رشد دنیا است. پیش‌بینی می‌شود جمعیت کره زمین تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیارد نفر برسد و برای تامین غذای این جمعیت لازم است تولیدات کشاورزی ۶۰ تا ۱۰۰ درصد میزان کنونی افزایش یابد (8). به منظور تغذیه جمعیت در حال رشد و در مواجه با معضلاتی مانند تغییرات اقلیمی، کاهش اراضی قابل کشت و محدود شدن منابع آبی در دسترس، نیاز فوری به فناوری‌هایی در زمینه به‌نژادی گیاهان زراعی که بتوانند تولیدات کشاورزی را ارتقا داده و کشاورزی پایدار را توسعه دهند، شدیداً احساس می‌شود. اصلاح به کمک تلاقی، موتاسیون و انتقال ژن در حال حاضر مهمترین روش‌های بهبود عملکرد گیاهان زراعی در کشاورزی مدرن هستند. سالیان درازی طول می‌کشد تا به کمک تلاقی، آلل‌های مطلوب معرفی گردد و تنوع لازم از طریق نوترکیبی ژنتیکی افزایش یابد. به دلیل هزاران سال تکامل مستقیم بواسطه انتخاب طبیعی، بخش‌های بزرگی از ژنوم گیاهان زراعی مهم تثبیت شده و تنوع ژنتیکی شدیداً کاهش یافته است، در نتیجه پتانسیل بهبود بسیاری از صفات محدود شده است. اصلاح به کمک جهش تنوع ژنتیکی را از طریق معرفی جهش‌های تصادفی با استفاده از مواد جهش‌زای شیمیایی و یا فیزیکی توسعه داده است (30). با این حال این روش‌ها نیز به دلیل ماهیت تصادفی بودن و تولید تعداد زیادی موتانت که می‌بایست غربالگری شوند، چالش برانگیز هستند.

این قبیل برنامه‌های اصلاحی وقت‌گیر، پر هزینه و غیر هدفمند نمی‌توانند همگام با تقاضای روزافزون برای محصولات زراعی گام بردارند، با وجودی که رویکردهای نوین به‌نژادی مانند انتخاب به کمک نشانگرها کارایی این روش‌ها را تا حدودی افزایش داده است (34). از زمان اولین آزمایش مبتنی بر هدف‌گیری ژنی[1] در گیاه توتون در سال ۱۹۸۸ تا کشف این پدیده در سال ۱۹۹۳ که برش DNA دو رشته‌ای باعث افزایش کارایی هدف‌گیری ژنی می‌گردد، دانشمندان به دنبال یافتن ابزاری برای ویرایش هدفمند ژنوم در گیاهان بودند. در سال ۲۰۰۵ نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs) در گیاه توتون سازگار و در بهبود

1. gene-targeting

صفات چندین گیاه دیگر نیز بکار گرفته شدند (45). در سال ۲۰۱۰ نوکلئازهای تاثیرگذار شبه فعال کننده رونویسی (TALENs) به جعبه ابزار ویرایش ژنوم در گیاهان افزوده شد (6). با وجودی که کاربرد این دو پلتفورم منجر به پیشرفت‌های مهمی گردید، هر یک از این دو محدودیت-های خاص خود را داشت و استفاده از آنها در گیاهان، خارج از یک رویه معمول و روتین بود. اخیراً نیز فناوری ویرایش ژنوم به کمک سیستم CRISPR/Cas به یک فناوری شناخته شده در بسیاری از آزمایشگاه‌های بیولوژیکی تبدیل شده است و پیش‌بینی می‌شود این ابزار در زمینه کشاورزی انقلاب سبز دوم را به کمک گشایش فصل جدیدی در اصلاح دقیق و هدفمند گیاهان رقم بزند. بعنوان یکی از بهترین و جدیدترین روش‌های اصلاح گیاهان، CRISPR/Cas می‌تواند مسیرهای جایگزین جدیدی برای اجتناب از روش‌های مستقیم تولید موجودات تراریخته یا GMO فراهم نماید.

سیستم‌های CRISPR/Cas

سیستم CRISPR/Cas با ترکیبی از آرایه‌های تکراری فاصله-دار CRISPR و پروتئین Cas، یک سیستم ایمنی تطبیقی به واسطه RNA است که در باکتری‌ها و آرکی‌ها سیستم دفاعی علیه فاژها و دیگر عناصر ژنتیکی مهاجم را از طریق برش اسیدهای نوکلئیک ژنوم مهاجم فراهم ساخته است. بر اساس ویژگی خاص ژن‌های پروتئین Cas و طبیعت مجموعه مداخله‌گر، سیستم CRISPR/Cas به دو دسته تقسیم می‌گردد و برحسب اثر پروتئین‌های Cas آنها، در پنج گروه دسته بندی شده است: نوع I، II، III، V و VI. در نوع I مکانیسم CRISPR/Cas9 بصورت یک مجموعه آبشار تصور می‌شود که شامل تعدادی از پروتئین‌های Cas می-باشد که DNA خارجی را توسط crRNA بعنوان یک ریبونوکلئوپرونئین برش می‌دهند. در سیستم نوع III، کمپلکس Cmr که به crRNA متصل می‌گردد، کار هضم DNA خارجی را انجام می‌دهد. کمپلکس پروتئینی نوع I و III بعنوان برش دهنده DNA یا RNA خارجی عمل می-کنند در حالی که، Cas9 در سیستم نوع II، Cpf در نوع V و Cas13 در نوع VI بعنوان یک بخش واحد از پروتئین هضم کننده نوکلئوتیدی با crRNA همکاری می‌نمایند و این در حالی است که Cas13 در سیستم نوع VI می‌تواند بعنوان برش دهنده DNA خارجی وارد عمل شود (25). هردو سیستم Cas9 و Cpf1 بعنوان ابزارهای قدرتمند بطور گسترده‌ای در ویرایش ژنوم تعداد زیادی از گونه‌ها بکار گرفته شده‌اند.

یک ویژگی مهم و کلیدی در مورد سیستم CRISPR/Cas9 اطمینان از برش DNA در هر دو رشته و در محل مورد نظر است که می‌تواند برای معرفی یکی از روش‌های متنوع دستکاری ژنوم به کمک یکی از دو مسیر ترمیم DNA یعنی اتصال انتهایی غیرهمسان (NHEJ) (Non-homologous end joining) و ترمیم معطوف به همسانی (HDR) (homology-directed repair) استفاده گردد (شکل ۱- ب).

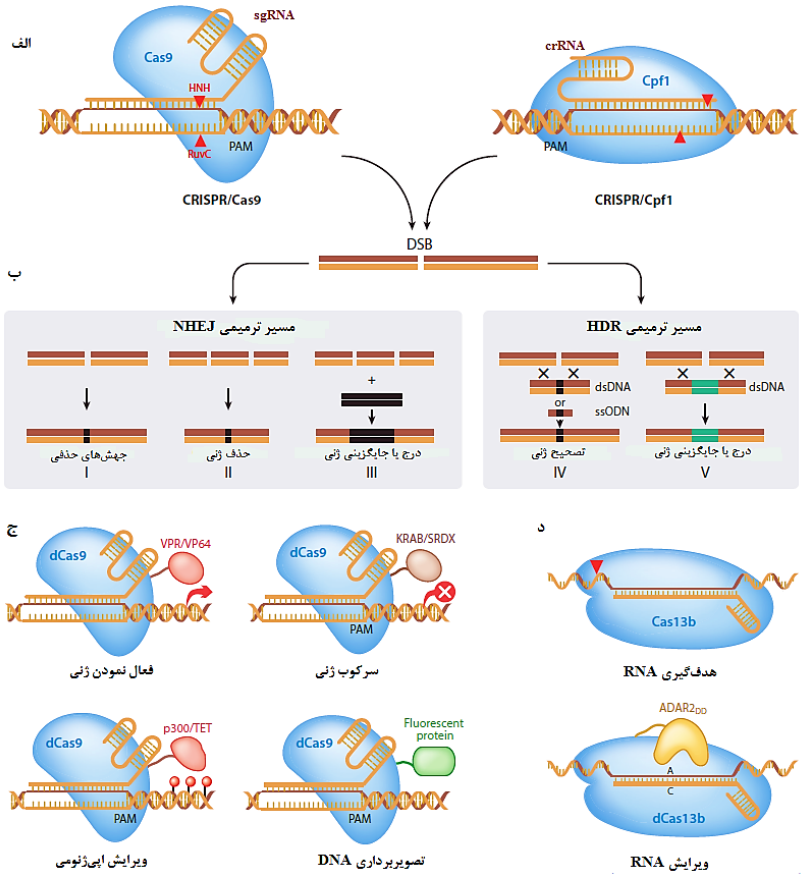
ویرایش ژنوم به کمک اتصال انتهایی غیرهمسان

مسیر ترمیمی NHEJ در اکثر مراحل چرخه سلولی ترجیح داده شده و نیاز به یک الگوی همولوگ جهت ترمیم ندارد. به همین دلیل به یک روش پرکاربرد و محبوب برای ایجاد اختلال در عملکرد ژن بواسطه ایجاد حذف یا اضافه در یک نقطه معینی از توالی هدف تبدیل شده است (شکل ۱- ب). NHEJ می‌تواند در درج توالی DNA خارجی به روش مستقل از همسان‌سازی بکار رود و در نتیجه یک روش کارآمد برای انباشت ژنی به منظور بهبود عملکرد گیاهان زراعی بکار گرفته شود.

یک مزیت بزرگ CRISPR نسبت به نوکلئازهای TALEN و ZFN این است که در این سیستم می‌توان با استفاده از چند sgRNA و بیان یک پروتئین Cas9 یا Cpf1 چندین نقطه مورد نظر در ژنوم را بطور همزمان هدف قرار داد. ویرایش چندگانه می‌تواند در مهندسی ژنوم کاربردهای پیچیده‌ای از قبیل خاموشی چندژنی، حذف یا جابجایی کروموزومی و knock-in ژنی داشته باشد (32). تاکنون چندین روش برای دستیابی به بیان چندگانه gRNA از یک کاست در گیاهان استفاده شده است. یکی از بهترین روش‌ها استفاده از یک پیش‌بر (پروموتر) جهت دستیابی به بیان یکنواخت هر gRNA است به گونه‌ای که این سیستم را در یک ناقل[1] کوچک جاسازی نماید تا حداکثر کارایی ویرایش حاصل گردد. این امر به کمک یک ساختار ژنی پلی‌سیسترونی حاصل شده که در آن gRNA با استفاده از جایگاه‌های ریبوزومی، جایگاه‌های شناساگر Csy4 یا توالی‌های RNA ناقل (47) پراکنده شده است، به نحوی که این ساختار در

1. vector

سلول‌های گیاهی جهت رهاسازی gRNA بالغ و به منظور ویرایش ژنوم، فرآوری شده است. علاوه بر توانایی Cpf1 در فرآوری crRNA خودی، این پروتئین توانسته است روشی با کارایی بسیار موثر در ویرایش چندگانه ژنوم در گیاهان را فراهم سازد (40). از آنجا به کمک این مطالعات امکان تغییر همزمان چندین صفت فراهم گشته، کریسپر یک روش بسیار کارآمد در اصلاح صفات به شکل هرمی است.



شکل ۱- سیستم‌های کریسپر برای ویرایش ژنوم و دیگر مقاصد دستورزی. الف) دو سیستم کریسپر برای مهندسی ژنوم گیاهان: Cas9 و Cpf1. ب) ویرایش ژنوم به کمک کریسپر بسته به مسیر ترمیمی DBS می‌تواند نتایج متفاوتی داشته باشد: I، II و III می‌توانند نتیجه غالبیت مسیر ترمیمی NHEJ باشند در حالی که IV و V می‌توانند در نتیجه فعالیت مسیر HDR که مبتنی بر استفاده از DNA الگو است ناشی شوند. ج) بررسی اجمالی کاربردهای دستکاری ژنوم مبتنی بر همجوشی dCas9: پروتئین dCas9 در ترکیب با دیگر پروتئین‌ها از جمله فعال کننده‌ها یا سرکوب کننده‌های رونویسی، عوامل دخیل در تغییرات اپی‌ژنتیک و پروتئین‌های فلورسنت می‌تواند در تنظیم بیان ژن، ویرایش اپی‌ژنوم و برچسب‌گذاری ژنومی کاربرد داشته باشد. د) Cas13 می‌تواند RNA را هدف قرار دهد و dCas13b می‌تواند در ترکیب با ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) در ویرایش RNA بکار گرفته شود.

ویرایش

دقیق ژنوم به کمک مسیر ترمیمی مستقیم همسان

با وجودی که NHEJ بسیار کارآمد بوده و در مطالعات گسترده‌ای که به منظور غیرفعال نمودن ژن‌ها طراحی شد و عملکرد آن بخوبی شناخته شده است، اما فاقد دقت لازم برای مهندسی ژنوم‌های پیچیده‌تر می‌باشد. از ویرایش ژنوم بواسطه HDR می‌توان برای ایجاد جهش‌های نقطه‌ای دقیق جهت درج یا جایگزینی توالی‌های مورد نظر در DNA هدف بهره برد (شکل ۱- ب). HDR در فاز S و G2 چرخه سلولی القا می‌گردد. ترمیم DBS نیازمند یک الگوی همسان با محل برش است. الگوی ترمیم می‌تواند کروماتید خواهری یا یک الگوی خارجی مانند یک DNA بیرونی یا دی.ان.ا تک رشته‌ای حاوی توالی مورد نظر باشد که بتواند در جایگاه هدف گنجانده شود (32) (شکل ۱- ب). اصلاح دقیق ژنوم به کمک HDR در بسیاری از موجودات بطور

گسترده به خدمت گرفته شده است. با این حال ارائه این سیستم بعنوان یک ابزار در هدف قرار دادن ژن‌ها در گیاهان هنوز چالش برانگیز بوده و این به دلیل کارایی پائین HDR و محدودیت‌های موجود در مسیر تحویل الگوی اهدایی به سلول‌های گیاهی است. برای غلبه بر این محدودیت‌ها تاکنون چندین رویکرد به منظور افزایش کارایی هدف‌گیری ژن‌ها بواسطه روش HDR در گیاهان ابداع شده است. استفاده از انتخاب مثبت منفی منجر به هدف‌گیری موفق ژن‌ها در برنج به روش Cas9 شده است (23).

دستورزی‌های
فراتر از برش دورشته به کمک CRISPR/Cas9

کریسپر محدود به ایجاد برش‌های دو رشته‌ای نیست، dCas9 می‌تواند بستر منحصر بفردی برای جذب پروتئین‌ها به منظور تنظیم توالی ژنی خاص، ویرایش اپی‌ژنوم و تصویربرداری ژنومی فراهم سازد. دمین‌های سرکوب کننده رونویسی و همچنین فعال کننده‌های رونویسی همجوش با dCas9 می‌توانند در تنظیم ژنی بکار روند (شکل ۱- ج). تنظیم هدفمند بیان ژن، دیدگاه‌های جالبی را در مورد ژنوم گیاهان ارائه نموده است. لودر و همکاران (۲۰۱۵) اخیراً فعال‌سازی و سرکوب همزمان چندین ژن را در گیاهان ارزیابی نموده‌اند. یک سیستم سرکوبگر مصنوعی (pCo-dCas9-3X-SRDX) طراحی و در مورد ژن CLEAVAGE STIMULATING FACTOR64 و ژن‌های غیر کدکننده مانند mi159A و mi159B ارزیابی شد (20). علاوه بر این، dCas9 متصل به چندین TALENs (یک dCas9-TV قدرتمند) فعالیت رونویسی قدرتمندی را به ژن‌های هدف منفرد یا چندگانه نسبت به زمانی که dCas9-VP64 بطور معمول در سلول‌های گیاهی و حیوانی استفاده شود، القا می‌کند (17). dCas9 فاکتورهای دخیل در تغییرات اپی‌ژنتیک از قبیل هیستون دمتیلاز LSD1، هیستون استیل ترانسفراز P300 و ده تا یازده پروتئین انتقالی را جهت تنظیم تغییرات اپی-ژنتیک روی DNA یا هیستون‌های هدف به خدمت می‌گیرد (شکل ۱- ج). این امر می‌تواند وضعیت تنظیم کروماتینی را تغییر دهد، در نتیجه بیان ژن، تمایز سلولی و دیگر فرایندهای بیولوژیکی را نیز می‌تواند تحت تاثیر قرار دهد (16).

ویرایش بازها در گیاهان

فراتر از ویرایش ژنوم بواسطه DSB، سیستم ویرایش بازی می‌تواند تغیرات نوکلئوتیدی ویژه را که نه به HDR و نه DNA اهدایی وابسته باشد القا نماید بطوری که در شکل-گیری DSBs مشارکتی نداشته اما در عین حال می‌تواند کارایی بالا، سادگی و استراتژی جهانی را برای مهندسی جایگزینی نوکلئوتید در جایگاه‌های هدف فراهم آورد.

سیستم ویرایش بازی سیتوزین (CBE)، که حاوی سیتیدین دآمیناز متصل به nCas9 (D10A) و مهار کننده یوراسیل گلیکولاز می‌باشد، سیتوزین هدف را در DNA به یوراسیل تبدیل می‌کند. در ابتدا سیتئین دآمیناز سیتوزین موجود در DNA را به یوراسیل تبدیل می‌کند و در ادامه یوراسیل طی فرآیند همانندسازی DNA، با تیمین جایگزین می‌گردد. طی این فرآیند، مهار کننده یوراسیل گلیکولاز متصل شده و سبب مهار یوراسیل DNA گلی‌کوزیلاز می‌گردد، این مهار برش یوریدین، فعالیت ترمیمی مسیر برش بازی را تضمین و کارایی ویرایش بازی را بالا می‌برد. سیستم کارآمد ویرایش بازی۳ (BE3) که شامل اتصال سیستئین دآمیناز APOBEC1 موش می‌باشد، بطور گسترده در ویرایش ژن گونه‌های مختلف گیاهی و جانوری بکار گرفته شده است. اصلاحاتی که بر روی BE3 به منظور توسعه PAM صورت گرفته سبب افزایش کارایی و درجه اختصاصی این سیستم شده است (13). بطور مشابه، سه اورتولوگ سیستئین دآمیناز یعنی PmCDA1 بدست آمده از مارماهی نوع انسانی AID و APOBEC3A (42) با Cas9 ترکیب شده و جایگزینی C با T با کارایی بالایی حاصل شده است.

روش‌های انتقال سازه‌های CRISPR/Cas به ژنوم گیاهان

همان گونه که در بالا اشاره شده سیستم CRISPR/Cas9 یک فناوری ساده بوده که به کمک مجموعه Cas9/sgRNA وارد عمل می‌شود. برای مثال در ویرایش ژنوم حیوانات تنها به تزریق تخمک‌های دارای پروتئین نوترکیب واجد Cas9 با یک سیگنال مستقر در هسته و سنتز مصنوعی sgRNA نیاز است (48). با این وجود ریزتزریقی برخلاف حیوانات در گیاهان با چالش‌هایی روبرو است و به سادگی قابل استفاده نیست. به منظور معرفی سیستم CRISPR/Cas9 به سلول‌های گیاهی روش‌هایی مانند استفاده از اگروباکتریوم، انتقال مبتنی بر PEG و استفاده از تفنگ ژنی

بکار گرفته شده است که هریک از این تکنیک‌ها محاسن و معایبی دارد. اگروباکتریوم می‌تواند T-DNA را به گستره وسیعی از گیاهان از بریوفیت‌ها گرفته تا گونه‌های درختی انتقال دهد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه روش‌های انتقال سازه‌های کریسپر به ژنوم گیاهان

روش	مزایا	معایب
اگروباکتریوم	**- قابلیت استفاده در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی - بیان پایدار**	**۱) نیاز به بهینه‌سازی برای هر گونه گیاهی ۲) مسائل قانونی**
PEG	**توانایی انتقال پروتئین، RNPs و پلاسمید**	**۱)چالش‌های تکنیکی در بازیابی گیاهان**
تفنگ ژنی	**عدم محدودیت در نوع گونه گیاهی**	**۱) تشخیص دشوار سلول‌های تراریختی ۲) درج تصادفی ژن**

T-DNA درج شده به کمک اگروباکتریوم می‌تواند بیان پایدار Cas9 و sgRNA جهت ویرایش ژنومی با کارایی بالا در گیاهان را تضمین نماید. با این حال ممکن است حتی در بین گونه‌های مختلف یک گیاه زراعی کارایی انتقال کاملاً متفاوت باشد (33). از اینرو احتمالاً ضروری است برای گونه‌های مختلف پروتوکل‌های اختصاصی و کارآمد تدوین گردد. روش PEG که مبتنی بر استفاده از پروتوپلاست می‌باشد این مزیت را دارد که ترکیبات متنوعی مانند RNPها انتقال یابند. کمپلکس Cas9/sgRNA به کمک این روش می‌تواند به پروتوپلاست گیاه کاهو انتقال داده شده و ویرایش ژنومی عاری از DNA را رقم بزند (44). از آنجا که بازیابی برخی از گیاهان از کشت پروتوپلاستی مشکل است، گستره گیاهانی که به کمک این روش قابل دستکاری هستند بسیار محدود است. تکنیک تفنگ ژنی به واسطه عدم محدودیت در انتقال مولکول‌ها به گونه‌های مختلف گیاهی، کاربرد وسیعی در انتقال ژن به گیاهان دارد. ویرایش ژنوم در گیاهانی مانند جو، ذرت، سویا و گندم به کمک این روش صورت گرفته است (18). از معایب این روش عدم تولید سلول‌های تراریخته کافی می باشد که کار انتخاب سلول‌های تراریخت شده واقعی را مشکل می‌سازد. همچنین زمانی که ناقل‌های پلاسمیدی به کمک این روش به سلول‌های گیاهی انتقال داده می‌شوند، این خطر وجود دارد که بخش‌هایی از DNA خارجی وارد ژنوم گیاه گردد. با این حال، برای ویرایش ژنوم گیان لازم است یکی از این روش‌ها انتخاب و جهت افزایش کارایی انتقال بهینه سازی گردد.

کاربردهای CRISPR/Cas در اصلاح دقیق گیاهان

بهبود صفات گیاهان زراعی از طریق ناک‌اوت[1] ژنی

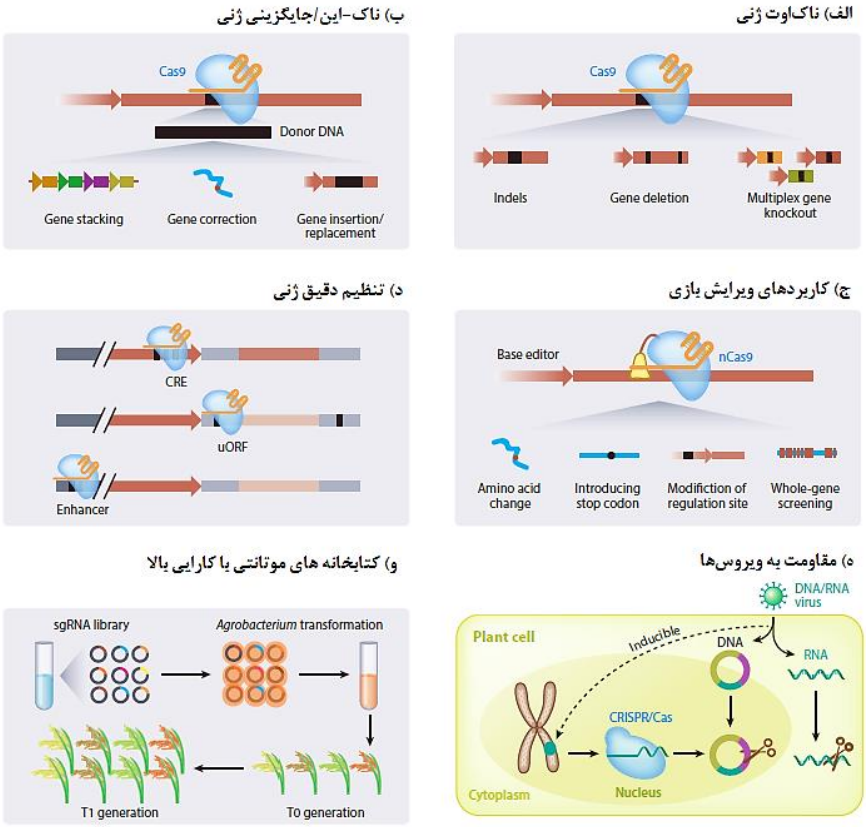
از بین بردن یا محدود کردن صفات منفی یکی از استراتژی‌های امیدوار کننده در اصلاح گیاهان است. از این رو ناک‌اوت ژن‌هایی که حامل صفات نامطلوب هستند، ساده‌ترین و رایج‌ترین کاربرد تکنیک CRISPR/Cas است (شکل ۲- الف). صفاتی که تا این تاریخ به کمک CRISPR/Cas9 ارتقاء یافته‌اند شامل: عملکرد، کیفیت و افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. تکنیک‌های اصلاح گیاهان هیبرید و بسیاری از جنبه‌های مهم تولید گیاهان زراعی نیز به کمک این روش بهبود قابل توجهی حاصل نمودند.

افزایش عملکرد

نیاز به تامین امنیت غذایی، افزایش عملکرد را به اولین هدف ویرایش ژنی برای بهبود گیاهان زراعی تبدیل نموده است. عملکرد صفت پیچیده‌ای بوده و تحت کنترل عوامل زیادی است. حذف تنظیم کننده‌های منفی شناخته شده موثر بر شاخص‌های تعیین کننده عملکرد مانند: تعداد دانه (OsGn1a)، اندازه دانه (OsGS3)، وزن دانه (TaGW2, OsGW5, OsGLW2یا TaGASR)، اندازه سنبله و تعداد پنجه (OsAAP3) که سبب ایجاد فنوتیپ مورد انتظار در گیاه بدون ایجاد اختلال در عملکرد این ژنها گردد، این باور را بوجود آورده است که CRISPR/Cas9 ابزاری بسیار مفید و قدرتمند برای بهبود این گونه صفات است (5). حذف

1. Nock-out

همزمان سه ژن مربوط به وزن دانه (GW2, GW5 و TGW6) در گیاه برنج منجر به هرمی شدن صفات گشته، که این امر سبب افزایش موثری در وزن دانه‌ها شده است (47).



شکل ۲- نمای کلی از کاربردهای CRISPR/Cas9 در اصلاح گیاهان: بهبود گیاهان زراعی به کمک این تکنیک روی عملکرد، کیفیت و افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غبرزیستی تمرکز نموده است. (الف) ایجاد جهش بکمک CRISPR/cas می‌تواند محو، حذف‌ژنی و یا ناکوت چندگانه ژن را تامین نماید. (ب) جایگذاری یا جایگزینی ژنی به واسطه ترمیم مستقیم همسان و یا ترمیم انتهایی غیرهمسان می‌تواند منجر به تجمع ژنی برای ویژگی‌های چندگانه، اصلاح ژنی جهت افزایش کارکرد و جایگذاری یا جایگزینی ژن به منظور تولید صفات جدید در بەنژادی کاربرد داشته باشد. (ج) کاربرد ویرایش ژنی به منظور بهبود صفات گیاهان زراعی مانند: جایگزینی دقیق اسیدهای آمینه، اختلال ژنی از طریق جایگذاری کدون ختم، تنظیم ژنی و پایش کل ژنوم. (د) تنظیم ژنی مبتنی بر کریسپرکس از طریق ویرایش جایگاه‌های تنظیم ژن در نواحی غیرترجمه شونده، پیش بر و بهبود دهنده-ها (enhancer). (ه) استراتژی‌های اصلاحی بر علیه ویروس‌ها به کمک کریسپرکس: در این شیوه سیستم کریسپری واجد sgRNA که DNA یا RNA ویروس را هدف قرار می‌دهد در ژنوم گیاهی درج شده و سبب القا مقاومت نسبت به ویروس‌های مهاجم می‌گردد. (و) سیستم پایش گسترده ژنوم مبتنی بر کریسپرکس که ابزاری ارزشمند در ژنومیکس کارکردی و بهبود ژنتیکی است.

با این حال به دلیل پیچیدگی صفات کمی و کنترل آنها توسط مکان‌های ژنی متعدد، خاموش کردن عوامل منفرد ممکن است برای افزایش عملکرد در شرایط مزرعه‌ای کافی نباشد. ژو و همکاران (۲۰۱۶) اخیراً روشی برای شناسایی گسترده ژن‌های کنترل کننده صفات پیچیده مانند عملکرد به کمک ترکیبی از روش آنالیز شجره‌ای، ویرایش ژنی، توالی‌یابی کل ژنوم و فناوری CRISPR/Cas9 توسعه دادند (51).

بهبود کیفیت

صفات کیفی بسته به نیازهای ویژه اصلاحی و ذائقه مصرف کنندگان، بسیار متنوع هستند. تا به امروز بهبود کیفیت به کمک ویرایش ژنوم بر محتوای نشاسته، عطر و طعم، مواد مغذی و کیفیت ذخیره‌سازی در گیاهان زراعی تاثیرگذار بوده است. برنج با محتوای آمیلوز پائین که دارای مزه و کیفیت پخت بالاتری است با خاموش کردن ژن WAXY از طریق CRISPR/Cas9 حاصل شده است (22). با

استفاده از همین تکنیک و خاموش نمودن ژن WAXY لاین‌های با عملکرد بالا در گیاه ذرت تولید شده است (39). از دیگر محصولات با کیفیت ارتقا یافته می‌توان به دانه‌های *Camelina sativa* و کلزا که حاوی مقادیر بالای اولوئیک اسید هستند اشاره نمود (15 ،26). گوجه فرنگی-های با عمر انبارداری بالا (17)، دارای لیکوپن بالاتر یا محتوای گاما آمینوبوتریک اسید (17، 29) و همچنین سیب زمینی‌های با سطح پائین گلیکوآلکالوئیدهای استروئیدی سمی نیز در این دسته از تغییرات قرار می‌گیرند (27).

مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی

تنش‌ها یکی از مهمترین عوامل تاثیرگذار بر کمیت و کیفیت گیاهان زراعی هستند. تعداد زیادی از گیاهان واجد مقاومت به تنش‌های زیستی مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و حشرات به کمک تکنیک کریسپر تولید شده-اند. برای مثال سفیدک پودری یکی از بیماری‌های قارچی مخرب در گیاهان زراعی است. با استفاده از TALEN و CRISPR/Cas9 کلیه ۶ آلل TaMLO در گندم خاموش شده و گیاهان با مقاومت بالاتر نسبت به این بیماری بدست آمده اند (43). بطور مشابهی نکراسو و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند خاموشی ژن به کمک CRISPR/Cas9 سبب القا مقاومت به سفیدک پودری در گیاه گوجه‌فرنگی شده است (28). بلاست یکی از بیماری‌های قارچی مخرب در برنج است. برنج مقاوم به بلاست با خاموش کردن ژن OsERF922 که یک عامل رونویسی پاسخ دهنده به اتیلن است حاصل گردید (41). بلایت باکتریایی در برنج توسط *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* ایجاد می‌گردد. حذف پیش‌بر ژن OsSWEET13 سبب تولید گیاهان مقاوم به این بیماری شده است (51). در مورد بیماری‌های ویروسی نیز، با استفاده از تکنیک CRISPR/Cas9 برنج‌های eif4g مقاوم به بیماری تونگرو تولید شده است (23).

بهبود صفات

گیاهان زراعی به کمک knock-in و جایگزینی ژنی

بسیاری از صفات زراعی به کمک جایگزینی تک نوکلئوتیدی، تغییرات بیان ژنی و یا اضافه شدن یک عملکرد جدید ژنی تغییر می‌یابند. تنظیمات دقیق ژنی مانند knock-in و جایگزینی نوکلئوتیدی سبب تسهیل کار اصلاح از طریق معرفی آلل‌های جدید بدون لینکاژ یا ایجاد تنوع آللی می‌گردد (شکل ۲- ب) که این ویژگی در حالت طبیعی وجود ندارد (21). علاوه بر این knock-in می‌تواند در جهت تغییر صفات چندگانه از طریق انباشت ژنی در تک واریته‌ها بکار گرفته شود. به همین دلیل knock-in و جایگزینی نوکلئوتیدی در بهبود صفات گیاهان زراعی می-توانند بسیار موثر باشند (شکل ۲- ب). متاسفانه به دلیل نادر بودن مسیر HDR در ترمیم DNA، یک تکنیک غیر معمول بوده و استفاده از آن در بهبود صفات با محدودیت-های جدی روبرو است. با این وجود شی و همکاران (۲۰۱۷) از ویرایش ژنی به کمک CRISPR/Cas9 برای بهبود مقاومت به خشکی در گیاه ذرت بهره بردند (35). ARGOS8 یک تنظیم کننده منفی پاسخ به اتیلن را کد می-کند که در اکثر هیبریدهای ذرت و در سطح کم بیان می-شود. واریته‌هایی که در آنها رونویسی این ژن افزایش داده شده بود در شرایط تنش خشکی عملکرد بالاتری تولید نمودند. یو و همکاران (۲۰۱۷) نیز توانستند به کمک ویرایش T317A و جایگزینی در ژن ALC توانستند گوجه فرنگی‌هایی با قابلیت حمل و نقل بالا و عمر طولانی تولید نمایند (40).

ویرایش بازها در گیاهان

همان گونه که بسیاری از صفات مهم زراعی از طریق تنوع موجود در یک نوکلئوتید چه در ناحیه کد کننده یا غیر کدکننده از هم متمایز می‌شوند، ویرایش بازی در اصلاح و بهبود گیاهان زراعی می‌تواند بسیار مفید واقع شود (شکل ۲- ج). یکی از کاربردهای مهم ویرایش بازی در نواحی کد کننده، توانایی تمایز مقاومت به علفکش‌ها است. مقاومت به سولفونیل اوره یا ایمیدیازول در برنج (36)، گندم، آرابیدوپسیس (5) و هندوانه (38) به کمک هدف قرار دادن ALS توسط ویرایش‌گر باز سیستیدین بدست آمده است.

تنظیم دقیق ژنی در گیاهان

در کنار ایجاد جهش در توالی‌های حفاظت شده، تعدیل بیان ژن یکی دیگر از دیدگاه‌های مفید در بررسی عملکرد ژن بوده و می‌تواند اصلاح گیاهان را بطور موثری تسهیل نماید. بیان ژن می‌تواند در سطوح مختلفی تنظیم شود، این سطوح شامل رونویسی، سرهم بندی mRNA و ترجمه آن است. این فرآیندها تحت کنترل یکسری از عناصر تنظیمی

Cis هستند که به کمک ویرایش ژنوم قابل تنظیم هستند (شکل ۲- د). تا کنون ویرایش ژنوم در گیاهان در جهت تغییر بیان ژنها، عمدتاً روی پیش‌برها از قبیل جایگزینی پیش‌بر و حذف عناصر تنظیمی Cis تمرکز داشته است.

تولید گیاهان مقاوم به ویروس

بخش بزرگی از بیماری‌های گیاهی توسط ویروس‌ها ایجاد می‌شوند، در نتیجه هرساله بخش قابل توجهی از تولیدات کشاورزی به وسیله این گروه از عوامل بیماری‌زا ازدست می‌رود. با توجه به اینکه کریسپر توانایی ایجاد مقاومت در باکتری‌ها در برابر حمله ویروس‌ها را دارد، لذا قطعاً این توانایی را خواهد داشت که گیاهان را به حمله ویروس‌ها مقاوم سازد (شکل ۲- ه). برای مثال جیمینی ویروس‌ها، جزء ویروس‌های با DNA تک رشته‌ای هستند که یک بخش دو رشته‌ای ضروری جهت همانندسازی به روش دایره غلتان دارند. استراتژی بیش‌بیان پایدار Cas9 و sgRNA که بطور ویژه ژنوم جیمینی ویروس‌ها را هدف قرار می-دهد تا همانندسازی آنها را مهار کند، برای اصلاح گیاهان مقاوم به ویروس بکار گرفته شده است (2). با این حال تغییرات ایجاد شده در جایگاه‌های برش دو رشته‌ای توسط مسیر ترمیمی NHJE، این امکان را فراهم می‌سازد که فرم-هایی از ویروس بتوانند از برش Cas9/gRNA فرار کنند (24). از آنجا که توالی ساقه–حلقه درونی برای همانند-سازی جیمینی ویروس‌ها ضروری است، لذا این توالی‌ها بعنوان هدف‌های ایدئال برای تولید گیاهان مقاوم به جیمینی ویروس‌ها بشمار می‌روند (1).

ایجاد کتابخانه‌های موتانتی با کارایی بالا در گیاهان

کتابخانه‌های موتانتی در برگیرنده یک ژنوم کامل می‌تواند کاربردهای گسترده و ارزشمندی در ژنومیکس کارکردی و پیشبرد علم ژنتیک داشته باشند (شکل ۲- و). کتابخانه‌های موتانتی قدیمی مبتنی بر ایجاد جهش‌های تصادفی به کمک عواملی مانند اشعه‌ها، جایگزینی T-DNA، EMS و ترانسپوزون‌ها می‌باشند. استفاده از این روش‌ها نیازمند ایجاد تعداد زیادی نسل جهت پایداری موتانت‌های غیرفعال است و تعیین ارتباط بین فنوتیپ و ژنوتیپ در بین این موتانت‌ها فرآیندی بسیار زمانبر است. برای مثال کتابخانه موتانتی حاصل از دو کانسترکت بزرگ تولید شده به کمک کریسپر می‌تواند بیشتر ژن‌های گیاه برنج را پوشش دهد. به کمک این روش موتانت‌های هموزیگوت نیز در یک نسل قابل تولید هستند.

نتیجه‌گیری

ویرایش ژنوم بطور عام و CRISPR/Cas9 بطور خاص، ابزارهای قدرتمندی هستند که می‌توانند تحولی بزرگ در تولیدات کشاورزی و امنیت غذایی ایجاد نمایند. فناوری CRISPR/Cas9 این پتانسیل را دارد که کشاورزی را از طریق تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و ارتقاء عملکرد کمی و کیفی آنها دگرگون سازد. این ویژگی‌ها برای تامین امنیت غذایی جمعیت در حال رشد دنیا لازم و ضروری هستند. به کمک این روش دانشمندان توانستند با بالاترین دقت و در کمترین زمان صفات مورد نظر را در گیاهان ایجاد نمایند. با وجودی که این روش در مدت کوتاهی توانسته تغییرات بزرگی در گیاهان ایجاد نماید، کاربرد این روش نیازمند اطلاعات دقیق از توالی ژنهای هدف و همچنین بهبود کارایی این قیچی مولکولی در جهت کاهش اثرات غیر هدفمند و سمی آن است. دانشمندان بسیار امیدوارند این فناوری بتواند نگرانی‌های عامه در مورد گیاهان تراریخته را برطرف نماید.

منابع

1. Ali Z, Ali S, Tashkandi M, Zaidi SS, Mahfouz MM. 2016. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. *Sci. Rep.* 6:26912.
2. Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, et al. 2015. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. *Nat. Plants* 1:15145.
3. Butt H, Eid A, Ali Z, Atia MAM, Mokhtar MM, et al. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front. Plant Sci.* 8:1441.
4. Cermak T, Baltes NJ,Cegan R, Zhang Y, Voytas DF. 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*. 16:232.
5. Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. Annu. Rev. Plant Biol. 2019. 70:28.1–28.31.
6. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, et al. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186:757–61.

7. Dreissig S, Schiml S, Schindele P,Weiss O, Rutten T, et al. 2017. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements. *Plant J*. 91:565–73.

8. FAOSTAT. FAOSTAT Database. 2016. Available at: http://faostat3.fao.org/ faostatgateway/ go/to/download/Q/QC/E.

9. Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K.S., Lecrivain, A.L., Bzdrenga, J., et al. 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res. 42, 2577–2590.

10. Gallego-Bartolome J, Gardiner J, Liu W, Papikian A, Ghoshal B, et al. 2018. Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *PNAS* 115:E2125–34.

11. Gao Y, Zhao Y. 2013. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* 56:343–49.

12. He Y, Zhu M,Wang L,Wu J,Wang Q, et al. 2018. Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. *Mol. Plant* 11:P1210– 13.

13. Hess GT,Tycko J,Yao D, Bassik MC. 2017. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol. Cell* 68:26–43.

14. Ji X, Si X, Zhang Y, Zhang H, Zhang F, et al. 2018. ConferringDNAvirus resistance with high specificity in plants using a virus-inducible genome editing system. *Genome Biol*. 19:197.

15. Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB,Weeks DP. 2017. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol. J*. 15:648–57.

16. Kungulovski G, Jeltsch A. 2016. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet*. 32:101–13.

17. Li J, Zhang H, Si X, Tian Y, Chen K, et al. 2017. Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. *J. Genet. Genom.* 44:465–68.

18. Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, et al. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* 8:14261.

19. Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., et al. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread. 23: 233.

20. Lowder LG, Zhang D, Baltes NJ, Paul JW,Tang X, et al. 2015. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*. 169:971–85.

21. Luo M, Gilbert B, Ayliffe M. 2016. Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Rep*. 35:1439–50.

22. Ma Y, Zhang J, Yin W, Zhang Z, Song Y, Chang X. 2016. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat. Methods* 13:1029.

23. Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, et al. 2018. Novel alleles of rice *eIF4G* generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to *Rice tungro spherical virus*. *Plant Biotechnol. J*. 16:1918–27.

24. Mehta D, Sturchler A, Hirsch-Hoffmann M, Gruissem W, Vanderschuren H. 2018. CRISPR-Cas9 interference in cassava linked to the evolution of editing-resistant geminiviruses. bioRxiv 314542.

25. Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., van der Oost, J. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. Science 353, aad5147.

26. Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, et al. 2017. Selective gene dosage by CRISPRCas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol. J*. 15:729–39.

27. Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, Osakabe K, Osakabe Y, et al. 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.

28. 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. *Sci. Rep.* 7:482.

29. Nonaka S, Arai C,Takayama M, Matsukura C, Ezura H. 2017. Efficient increase of γ-aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep*. 7:7057.

30. Pacher M, Puchta H. 2017. From classical mutagenesis to nuclease-based breeding-directing natural DNA repair for a natural end-product. *Plant J*. 90:819–33.

31. Prado JR, Segers G, Voelker T, Carson D, Dobert R, et al. 2014. Genetically engineered crops: from idea to product. *Annu. Rev. Plant Biol*. 65:769–90.

32. Salsman J, Dellaire G. 2016. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem. Cell Biol.* 95:187–201.

33. Sato, H., Yamada, T., Kita, Y., Ishimoto, M., Kitamura, K.. 2007. Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Kariyutaka. Plant Biotechnol. 24, 533–536.

34. Scheben A, Wolter F, Batley J, Puchta H, Edwards D. 2017. Towards CRISPR/Cas crops—bringing together genomics and genome editing. *New Phytol*. 216:682–98.

35. Shi J, Gao H,Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, et al. 2017. *ARGOS8* variants generated by CRISPRCas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J*. 15:207– 16.

36. Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, et al. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 35:441–43.

37. Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, et al. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* 35:441–43.

38. Tian S, Jiang L, Cui X, Zhang J, Guo S, et al. 2018. Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Rep*. 37:1353–56.

39. Waltz E. 2016. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat. Biotechnol.* 34:582.

40. Wang FZ, Chen MX, Yu LJ, Xie LJ, Yuan LB, et al. 2017. *OsARM1*, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice. *Front. Plant Sci.* 8:1868.

41. Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, Zhu JK. 2017. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant* 10:1007–10.

42. Wang X, Li J,Wang Y, Yang B,Wei J, et al. 2018. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. *Nat. Biotechnol.* 36:946–49.

43. Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, et al. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* 32:947–51.

44. Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalan, C., Cho, S.W., Kim, H., et al. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol. 33, 1162–1164.

45. Wright DA,Townsend JA,WinfreyRJ Jr., Irwin PA, Rajagopal J, et al. 2005. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. Plant J. 44:693–705.

46. Xie Y, Niu B, Long Y, Li G, Tang J, et al. 2017. Suppression or knockout of *SaF/SaM* overcomes the *Sa*-mediated hybrid male sterility in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 59:669–79.

47. Xu, R., Yang, Y., Qin, R., Li, H., Qiu, C., Li, L., ... & Yang, J. 2016. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *Journal of Genetics and Genomics= Yi chuan xue bao*, *43*(8), 529-532.

48. Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *cell*, *153*(4), 910-918.

49. Yu QH,Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, et al. 2017. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci. Rep.* 7:11874.

50. Yu X, Zhao Z, Zheng X, Zhou J, Kong W, et al. 2018. A selfish genetic element confers non-Mendelian inheritance in rice. *Science* 360:1130–32.

51. Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, et al. 2016. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated *TMS5* editing system. *Sci. Rep.* 6:373.95.

Precision and Targeted Breeding of Plants Using CRISPR/Cas Technology

Ghezzi R. and Nejadsadeghi L.

Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, I.R. of Iran

Abstract

Enhanced agricultural production through innovative breeding technology is urgently needed to increase access to nutritious foods worldwide. Recent advances in CRISPR/Cas genome editing enable efficient targeted modification in most crops, thus promising to accelerate crop improvement. Here, we review advances in CRISPR/Cas9 and its variants and examine their applications in plant genome editing and related manipulations. We highlight base-editing tools that enable targeted nucleotide substitutions and describe the various delivery systems, particularly DNA-free methods, that have linked genome editing with crop breeding. We summarize the applications of genome editing for trait improvement, development of fine-tuning gene regulation and strategies for breeding biotic and abiotic stress tolerant plants.

Key words: precision plant breeding, genome editing, CRISPR/Cas, gene targeting