Journal of Medicinal Plants Biotechnology
JMPB

Original Article

Metabolic Engineering of Medicinal Plants Using CRISPR/Cas Technology

Mohammad Majidi [1], *Alireza Tarinejad* [1]
1. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

ARTICLEINFO

Article history

Submitted:2022-6-25
Revised: 2022-7-30
Accepted:2022-8-20

KEYWORDS

CRISPR/Cas, Gene Editing, Manipulation of Metabolic Pathways, Medicinal Plants, Plant Secondary Metabolites.

ABSTRACT

Medicinal plants have been a source of medicinal compounds and other useful products since ancient times. Due to some limitations, the traditional methods of supplying medicinal compounds are not able to meet the ever-increasing needs of the market, and therefore the use of alternative methods is inevitable. Metabolic engineering is a logical and efficient solution to increase the production of medicinal compounds and reduce related costs. In addition to improving the production of desired metabolites and reducing the production of unwanted metabolites, metabolic engineering also leads to the production of new metabolites in plants. Currently, many methods are used to manipulate metabolic pathways, among which CRISPR/Cas technology has a special place due to its high accuracy and ease of use. The remarkable effects of this technology on the metabolic improvement of medicinal plants have been proven in numerous studies. In this article, the importance of medicinal plants and their metabolites has been discussed first, and then the necessity of using metabolic engineering to increase the medicinal compounds of these plants has been pointed out. In the following, we have explained the CRISPR/Cas technology and how it works in gene editing. Then, the application of this technology in manipulating the metabolic pathways of medicinal plants is discussed, focusing on three major groups of plant metabolites, namely terpenoids, alkaloids and phenylpropanoids. The next section deals with some of the challenges in the application of this technology in the metabolic engineering of medicinal plants, and proposed solutions. At the end, the future prospects of using this technology in metabolic improvements of medicinal plants are briefly described.

* Corresponding author: ***Mohammad Majidi***
✉ E-mail: mmajidi82@yahoo.com
Journal homepage: **jmpb.znu.ac.ir**

CC BY

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
JMPB

مقاله پژوهشی

مهندسی متابولیک گیاهان دارویی با استفاده از فناوری CRISPR/Cas

محمد مجیدی [1]، علیرضا تاری‌نژاد [2]

۱. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۲. استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۴-۴-۱۴۰۱
بازنگری: ۸-۵-۱۴۰۱
پذیرش: ۲۹-۵-۱۴۰۱

واژگان کلیدی

دستورزی مسیرهای متابولیکی، گیاهان دارویی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ویرایش ژن، CRISPR/Cas.

چکیده

گیاهان دارویی از زمان‌های بسیار دور تاکنون منبع تهیه ترکیبات دارویی و همچنین دیگر فراورده‌های مفید بوده‌اند. به دلیل برخی محدودیت‌ها، روش‌های سنتی تهیه ترکیبات دارویی، قادر به تامین نیاز روزافزون بازار نمی‌باشند و از اینرو استفاده از روش‌های جایگزین، امری اجتناب‌ناپذیر است. مهندسی متابولیک یک راه حل منطقی و کارامد برای افزایش تولید ترکیبات دارویی و کاهش هزینه‌های مربوطه می‌باشد. مهندسی متابولیک علاوه بر بهبود تولید متابولیت‌های مورد نظر و کاهش تولید متابولیت‌های ناخواسته، همچنین منجر به تولید متابولیت‌های جدید در گیاهان می‌گردد. در حال حاضر روش‌های بسیاری به منظور دستورزی مسیرهای متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در این میان، فناوری CRISPR/Cas به دلیل دقت بالا و سهولت استفاده، از جایگاه خاصی برخوردار است. اثرات چشمگیر این فناوری بر بهبود متابولیکی گیاهان دارویی در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. در مقاله حاضر، ابتدا در خصوص اهمیت گیاهان دارویی و متابولیت‌های آنها بحث شده است و پس از آن به لزوم استفاده از مهندسی متابولیک در افزایش ترکیبات دارویی این گیاهان اشاره شده است. در ادامه، به تشریح فناوری CRISPR/Cas و نحوه عمل آن در ویرایش ژن‌ها پرداخته‌ایم. سپس کاربرد این فناوری در دستورزی مسیرهای متابولیکی گیاهان دارویی، با تمرکز بر سه گروه عمده متابولیت‌های گیاهی یعنی ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فنیل پروپانوئیدها، مورد بحث قرار گرفته است. بخش بعدی به طرح برخی از چالش‌های موجود در کاربرد این تکنولوژی در مهندسی متابولیک گیاهان دارویی، و راه حل‌های پیشنهادی می‌پردازد. در پایان نیز چشم‌اندازهای آینده این فناوری در بهبود متابولیکی گیاهان دارویی، بطور خلاصه توضیح داده شده است.

*نویسنده مسئول: **محمد مجیدی**

✉ E-mail: *mmajidi82@yahoo.com*
Journal homepage: **jmpb.znu.ac.ir**

CC BY

مقدمه

گیاهان طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که دارای خصوصیات شیمیایی متنوعی هستند. این متابولیت‌ها، ابزارهای گیاهان برای سازگاری و بقاء در شرایط محیطی مختلف می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه که با نام‌هایی از قبیل متابولیت‌های اختصاصی و یا فراورده‌های طبیعی نیز شناخته می‌شوند؛ بخشی از مکانیسم‌های پاسخ گیاهان در برابر تنش‌های غیر زیستی (شوری، خشکی، دمای بالا و تابش شدید) و تنش‌های زیستی (آفات و بیماری‌ها) هستند. از سوی دیگر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، کاربردهای وسیعی در زندگی بشر دارند؛ آنها به عنوان افزودنی‌های غذایی، ترکیبات دارویی، مواد شیمیایی-کشاورزی، عطر و رنگ مورد استفاده قرار می‌گیرند و بدین ترتیب باعث ارتقای تغذیه، سلامت و رفاه بشر می‌شوند. تعداد متابولیت‌های ثانویه گیاهی در حدود ۱۰۰.۰۰۰ عدد تخمین زده می‌شود که هر روز ترکیبات جدیدی به این لیست اضافه می‌گردند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی در گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند که معروف‌ترین گروه‌های متابولیکی ثانویه عبارتند از: ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فنیل پروپانوئیدها (Kutchan et al. 2015؛ Hussein and El-Anssary 2018؛ Yang et al. 2018؛ Elshafie et al. 2023).

گیاهان دارویی منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه به منظور درمان و پیشگیری از بیماری‌ها می‌باشند. ترکیبات دارویی گیاهی حاوی طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی هستند که می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، تنظیم‌کننده قند خون، کاهنده چربی، ضد التهابی و موثر بر سیستم اعصاب مرکزی، اشاره نمود. بطور کلی متابولیت‌های ثانویه گیاهی جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارویی دارند و تخمین زده می‌شود که حدود ۲۵ درصد از ترکیبات دارویی بطور مستقیم یا غیرمستقیم از منابع گیاهی حاصل شده‌اند. استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات زیست- فعال آنها، با تقاضای روزافزونی مواجه است که دلیل اصلی آن عوارض جانبی کمتر این ترکیبات می‌باشد. از سوی دیگر، گیاهان دارویی منبعی برای کشف گروه‌های جدیدی از مولکول‌های شیمیایی هستند که می‌توانند درمان‌های نوینی را برای انواع بیمارها، خصوصا بیماری‌های نوظهور فراهم آورند (Gurib-Fakim 2006؛ Ahad et al. 2021). در جدول

۱ به برخی از ترکیبات دارویی گیاهی و ویژگی‌های درمانی آنها اشاره شده است.

هرچند منبع اولیه تهیه ترکیبات دارویی گیاهی، گیاهان موجود در محیط‌های طبیعی و یا گیاهان کشت شده می‌باشند، با این وجود، تهیه ترکیبات مذکور از چنین منابعی با محدودیت‌هایی همراه است، که برخی از این محدودیت‌ها عبارتند از: ۱- غلظت بسیاری از این ترکیبات در گیاهان موجود در طبیعت یا گیاهان کشت شده بسیار پایین است؛ به عنوان مثال غلظت متابولیت تاکسول معادل یک صدم درصد وزن خشک گیاه سرخدار است، درحالی‌که غلظت برخی دیگر از متابولیت‌های گیاهی حتی از این مقدار نیز کمتر می‌باشد، ۲- بعضا ترکیبات مشابه فراوانی با ترکیب مورد نظر در گیاه وجود دارند که حضور آنها فرایند جداسازی و خالص‌سازی ترکیب اصلی را پیچیده و پرهزینه می‌نماید، ۳- تولید بشدت متغیر است و عواملی مثل شرایط محیطی، تاثیر زیادی بر میزان تولید متابولیت‌ها دارند، بنابراین راندمان تولید در این روش با نوسانات زیادی همراه است، ۴- فرایند تولید ترکیبات دارویی از منابع سنتی بعضا بسیار طولانی است و ممکن است به چندین سال زمان نیاز داشته باشد، ۵- برخی گیاهان تولید کننده این ترکیبات، کمیاب و کند رشد هستند و در چنین شرایطی جمع‌آوری آنها از طبیعت باعث آسیب به محیط زیست می‌شود (Rao and Ravishankar 2002؛ Murthy et al. 2014؛ Verpoorte et al. 2002؛ Majidi and Tarinejad 2018).

جدول ۱. نمونه‌هایی از ترکیبات دارویی گیاهی و اثرات درمانی آنها (Gurib-Fakim 2006؛ Kutchan et al. 2015؛ Sakure et al. 2023).

ترکیب دارویی	منبع گیاهی	خصوصیات دارویی
آرتمیزینین	درمنه (*Artemisia annua*)	ضد میکروب، ضد التهاب
آلکالوئیدهای وینکا	پروانش (*Catharanthus roseus*)	ضد سرطان
آلکامیدها و مشتقات اسید کافئیک	سرخارگل (*Echinacea purpurea*)	بهبود سیستم ایمنی بدن
آنتراکوئینون‌ها	نوعی علف هفت‌بند (*Polygonum multiflorum*)	ملین، ضد التهاب، درمان آرتریت و مالتیپل اسکلروزیس (MS)
اکدیستروئیدها	(*Achyranthes bidentate*)	کاهنده قند و کلسترول، تنظیم‌کننده اعصاب
ایزوفلاونوئیدها	رنگین زرد (*Genista tinctoria*)	درمان پوکی استخوان و اختلال شناخت
بتاسیانین‌ها و بتالائین‌ها	چغندر قند (*Beta vulgaris*)	آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب
پلومباگین	(*Plumbago indica*)	درمان سرطان پروستات
پیپرین	دارفلفل (*Piper longum*)	آنتی‌اکسیدان، آنتی دیابت، ضد چاقی، پارکینسون
تاکسول	سرخدار (*Taxus* spp.)	ضد سرطان
تریگونلین	شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*)	کاهنده قند و چربی
جنسنوزیدها	جینسنگ (*Panax ginseng*)	ترکیبات مقوی، بهبود گردش خون
دیگوکسین و دیجیتوکسین	گل انگشتانه (*Digitalis purpurea*)	درمان نارسایی‌های قلبی
رزرپین	(*Rauwolfia serpentine*)	کاهنده فشار خون، ضد روان‌پریشی
کدئین و مورفین	خشخاش (*Papaver* spp.)	مُسکن
گالانتامین	نرگس دروغین (*Narcissus pseudonarcissus*)	درمان بیماری آلزایمر
لیگنان‌ها	کتان (*Linum* spp.)	کاهش ریسک بیماری‌های قلبی و عوارض یائسگی
والپوتریات‌ها	سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)	درمان بی‌خوابی و استرس
هیپریسین و هیپرفورین	گل راعی (*Hypericum perforatum*)	ضد افسردگی
هیوسیامین و آتروپین	بلادون (*Atropa belladonna*)	زخم معده، سندروم روده تحریک‌پذیر

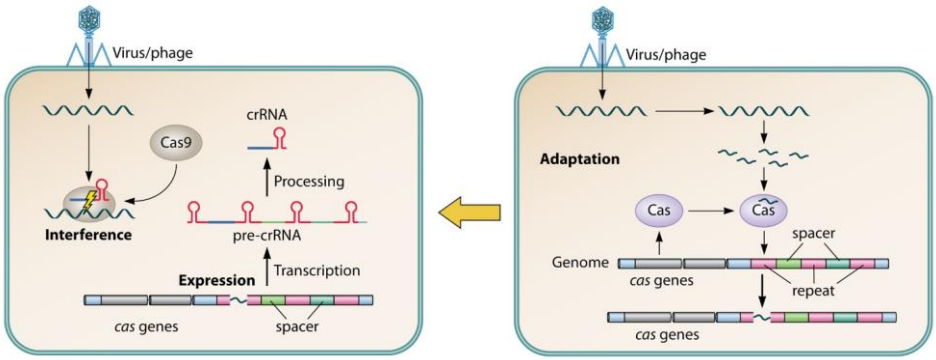
با توجه به مشکلات اشاره شده در تهیه ترکیبات دارویی گیاهی، محققان به دنبال یافتن راه حل‌هایی برای کاهش این مشکلات می‌باشند. دستورزی مسیرهای متابولیکی که به مهندسی متابولیک نیز معروف است یکی از گزینه‌های پیشنهادی به منظور افزایش تولید این ترکیبات می‌باشد. بطور کلی در مهندسی متابولیک، ژن‌های مسیرهای متابولیکی و یا توالی‌های تنظیمی آنها دچار تغییر می‌شوند که نتیجه آن، افزایش تولید متابولیت مورد نظر است. علاوه بر افزایش بیان ژن‌های مورد نظر، مهندسی متابولیک با کاهش بیان ژن‌های نامطلوب و یا مسیرهای رقیب، به افزایش تولید متابولیت‌های مورد نظر کمک می‌نماید. پتانسیل دیگر مهندسی متابولیک، تولید ترکیبات جدید در گیاهان است که این امر منجر به گسترش ویژگی‌های دارویی گیاهان می‌شود (Wu and Chappel 2008؛ Majidi and Bahmani 2017؛ Taghavi et al. 2020؛ Birchfield and McIntosh 2020؛ Arya et al. 2023).

در حال حاضر از روش‌های مختلفی به منظور مهندسی متابولیک گیاهی استفاده می‌شود که فناوری‌های ویرایش ژنومی از قبیل ZFN، TALEN و CRISPR/Cas از جایگاه خاصی برخوردار هستند. فناوری‌های ویرایش ژنومی، منجر به ایجاد تغییرات مورد نظر در جایگاه مشخصی از ژنوم می‌شوند و از اینرو در مقایسه با روش‌های قدیمی‌تر دستورزی ژنتیکی، از دقت بسیار بیشتری برخوردار می‌باشند. در میان فناوری‌های ویرایش ژنومی، CRISPR/Cas به دلیل مزایای بیشتر نسبت به سایر روش‌ها، توجهات بسیاری را به سمت خود معطوف نموده است؛ بطوری‌که این فناوری برای ویرایش ژنوم انواع بسیاری از موجودات زنده از قبیل حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zhang et al. 2017؛ Cardi et al. 2023؛ Mipeshwaree Devi et al. 2023). با توجه به اهمیت موضوع، در بخش‌های بعدی مقاله به توضیح این فناوری و استفاده از آن در مهندسی متابولیک گیاهی پرداخته شده است.

۱. CRISPR/Cas، از یک سیستم دفاعی تا یک فناوری قدرتمند

CRISPR/Cas یک تکنولوژی توانمند برای ویرایش ژنوم است که باعث ایجاد تغییرات دقیق در ماده ژنتیکی موجودات زنده می‌شود. این فناوری از توسعه سیستم دفاعی طبیعی CRISPR/Cas9 حاصل شده است. CRISPR/Cas9 یک سیستم ایمنی

اکستابی در پروکاریوت‌ها می‌باشد که از باکتری‌ها و آرکی‌ها در برابر ویروس‌ها، محافظت به عمل می‌آورد. بطور خلاصه، در ژنوم پروکاریوت‌ها، جایگاهی به نام لوکوس CRISPR وجود دارد که در آن توالی‌های پالیندرومی کوتاهی از DNA بطور مرتب تکرار می‌شوند. در فاصله بین توالی‌های تکراری کوتاه، توالی‌های غیرتکراری و منحصر بفرد وجود دارند که به آنها توالی‌های فاصله‌دهنده (spacer) گفته می‌شود. هریک از این توالی‌های فاصله‌دهنده، بخش‌هایی از ژنوم ویروس‌هایی هستند که باکتری قبلا موفق به از بین بردن آنها شده است (شکل ۱). به عبارت دیگر می‌توان جایگاه CRISPR را، حافظه ویروسی پروکاریوت‌ها دانست. هنگامی‌که ویروسی مجددا به باکتری حمله می‌نماید، توالی‌های مربوط به جایگاه CRISPR بیان می‌شوند و از آنجایی‌که بخشی از ژنوم ویروس مهاجم در جایگاه CRISPR وجود دارد، این رونوشت به بخش مکمل خود در ژنوم ویروس مهاجم متصل می‌شود. در ادامه پروتئینی به نام Cas9 که یک نوکلئاز است به کمپلکس DNA ویروس – RNA کریسپری متصل می‌شود. Cas9 باعث ایجاد برش در DNA ویروس می‌گردد و بدین ترتیب با از بین بردن ماده ژنتیکی، مانع از تکمیل چرخه زندگی ویروس و در نتیجه مصون ماندن میزبان می‌شود (Ishino et al. 2018؛ Zhang 2019).



شکل ۱. سیستم ایمنی اکتسابی CRISPR/Cas9. در گام اول این سیستم، سازگاری ایجاد می‌شود که در این مرحله پس از قطعه قطعه شدن DNA ویروسی، بخشی از DNA ویروس مهاجم در بین توالی‌های تکراری ناحیه CRISPR، درج می‌گردد. گام دوم در سیستم ایمنی CRISPR/Cas9، تداخل نام دارد. در این مرحله، ناحیه CRISPR رونویسی می‌شود که رونوشت حاصل pre-crRNA نام دارد. در ادامه pre-crRNA به چندین crRNA مجزا تبدیل می‌شود. هریک از این crRNAها (RNAهای کریسپری) با بخشی از ماده ژنتیکی یک ویروس خاص، همولوگ می‌باشد و در صورتی‌که ویروس وارد سلول میزبان شود، crRNA به DNA ویروس مربوطه متصل می‌گردد. کمپلکس RNA-DNA مذکور توسط پروتئین Cas9 شناخته شده و در ادامه پروتئین Cas9، شکست دو رشته‌ای در DNA ویروس ایجاد می‌نماید (Ishino et al. 2018).

اولین مشاهده مرتبط با سیستم دفاعی CRISPR در سال ۱۹۸۷ توسط دانشمند ژاپنی به نام Ishino صورت گرفت. او در تحقیق خود درباره ژن مسئول تبدیل آلکالاین فسفاتاز در *E. coli*، با گروهی از توالی‌های غیرعادی DNA مواجه شد که حاوی توالی‌های تکراری کوتاهی بودند. او متوجه شد که در فاصله بین این توالی‌های تکراری کوتاه، توالی‌های غیرتکراری قرار دارند. به هر حال، به دلیل نبود داده‌های توالی کافی، نقش و اهمیت اینگونه توالی‌ها در آن زمان مشخص نشد. در سال ۱۹۹۳، گروهی از محققان در هلند، کشف نمودند که استرین‌های مختلف *Mycobacterium tuberculosis* حاوی توالی‌های فاصله‌دهنده متفاوتی می‌باشند. آنها با استفاده از این توالی‌های فاصله‌دهنده یک تکنیک برای شناسایی استرین‌های باکتریایی مختلف ابداع کردند که آنرا spacer oligonucleotide typing یا spoligotyping نامیدند (Groenen et al. 1993). پس از آن مشخص شد که این توالی‌ها در دیگر ژنوم‌های باکتریایی و آرکیایی نیز حضور دارند. Jansen و همکاران (۲۰۰۲) برای اولین بار از واژه CRISPR برای نامگذاری اینگونه توالی‌ها استفاده نمودند که مخفف Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats می‌باشد. تحقیقات بعدی نشان دادند که توالی‌های فاصله‌دهنده ، مشابه توالی‌های

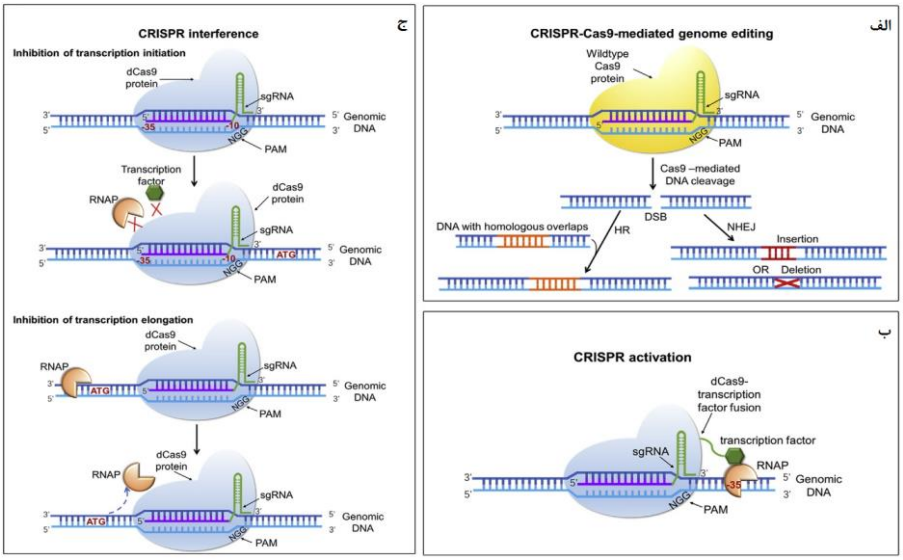
موجود در باکتریوفاژها، ویروس‌ها و پلاسمیدها هستند. در ادامه نیز مشخص شد که باکتری‌های حاوی توالی‌های فاصله‌دهنده خاص، در برابر ویروس‌هایی که ماده ژنتیکی مشابه با این توالی‌ها دارند، مصون می‌باشند و بدین ترتیب نقش این توالی‌ها در ایجاد ایمنی اکتسابی در پروکاریوت‌ها پیشنهاد شد (Mojica et al. 2005؛ Pourcel et al. 2005؛ Bolotin et al. 2005). همچنین Barrangou و همکاران (۲۰۰۷) مشخص نمودند که حذف یا اضافه نمودن توالی‌های فاصله‌دهنده، مقاومت میزبان به فاژها را تغییر می‌دهد.

در سال ۲۰۱۲، محققان به سرپرستی Jennifer Doudna و Emmanuelle Charpentier کشف کردند که با ترکیب دو جزء مختلف سیستم CRISPR/Cas9 و ایجاد یک نوع RNA راهنما، می‌توان از سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک ابزار برش و جایگذاری برای تغییر ژنوم‌ها استفاده نمود و بدین ترتیب فناوری ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 معرفی شد (Jinek et al. 2012). این فناوری قادر به حذف ژن‌ها، ورود ژن‌های جدید و همچنین فعال‌سازی یا خاموشی ژن‌ها است. CRISPR/Cas از زمان معرفی، اثری انقلابی بر تمامی حوزه‌های علوم زیستی داشته است و بسرعت در پزشکی، صنعت، کشاورزی و محیط زیست مورد استفاده قرار گرفت. دقت بالا و همچنین سهولت استفاده از این فناوری، از دلایل محبوبیت روز افزون این فناوری می‌باشد. مجله Science در سال ۲۰۱۵، این فناوری را موفقیت بزرگ سال نامید و جایزه نوبل شیمی در سال ۲۰۲۰، به پاس توسعه فناوری CRISPR/Cas9 به پدیدآورندگان آن یعنی Doudna و Charpentier اعطا شد (Molla et al. 2020؛ Gostimskaya 2022؛ Villiger et al. 2024).

بطور خلاصه، فناوری ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 بدین صورت عمل می‌نماید که ابتدا یک RNA راهنما به نام single guide RNA یا به اختصار sgRNA طراحی می‌شود که از دو بخش crRNA و tracrRNA تشکیل شده است (شکل ۲). وظیفه بخش crRNA اتصال به ویروس مهاجم و وظیفه بخش tracrRNA، جذب پروتئین Cas9 می‌باشد. sgRNA باعث هدفگیری دقیق جایگاه ژنومی برای ویرایش می‌شود. پس از اتصال sgRNA به محل مورد نظر، پروتئین Cas9 باعث ایجاد یک شکست در DNA دو رشته‌ای می‌شود. در ادامه محل شکستگی توسط دو نوع مکانیسم نوترکیبی، یعنی نوترکیبی همولوگ (HR) و نوترکیبی اتصال انتهای غیر همولوگ (NHEJ) تعمیر

می‌شود. در مکانیسم HR، ویرایش به کمک الگو صورت می‌پذیرد که حاصل کار، ایجاد تغییر بازی مورد نظر است. در NHEJ، تعمیر بدون الگو است که نتیجه آن ایجاد حذف یا اضافه در جایگاه ژنومی مورد نظر می‌باشد. مکانیسم نوترکیبی NHEJ به دلیل تغییر چارچوب خوانش، باعث ایجاد تغییرات گسترده در توالی پروتئین می‌شود که حاصل کار ایجاد پروتئین‌های کاملا متفاوت و معمولا غیرفعال است (Jiang and Doudna 2017؛ Tian 2017).

در حال حاضر انواع تغییریافته بسیاری از فناوری CRISPR/Cas اولیه ایجاد شده‌اند؛ بطوری‌که در برخی از این روش‌ها، می‌توان بجای ایجاد شکست دو رشته‌ای در DNA، شکست تک رشته‌ای در آن ایجاد نمود. در انواع دیگری از فناوری CRISPR، بجای DNA، شکست در RNA ایجاد می‌شود. در برخی دیگر نیز هیچ‌گونه شکستی در DNA یا RNA ایجاد نمی‌شود، در عوض، آنها باعث جذب عواملی مثل فاکتورهای رونویسی به جایگاه مورد نظر و در نتیجه افزایش نسخه برداری ژن هدف می‌گردند (Nidhi et al. 2021؛ Bharathkumar et al. 2022؛ Li et al. 2023).



شکل ۲. ابزارهای CRISPR برای ویرایش، فعال‌سازی و تداخل ژنوم. **الف**- ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR/Cas9. پروتئین Cas9 با sgRNA تشکیل کمپلکس داده و به جایگاه هدف در DNA ژنومی متصل می‌شود و یک شکست دو رشته‌ای در ۳ یا ۴ نوکلئوتید بالادست توالی PAM ایجاد می‌کند. شکست دو رشته‌ای توسط نوترکیبی اتصال انتهای غیر همولوگ (NHEJ) یا نوترکیبی همولوگ (HR)، تعمیر می‌شود. در NHEJ، حذف‌ها یا درج‌های تصادفی وارد ژنوم می‌شوند. در نوترکیبی همولوگ، موتاسیون‌های مورد نظر در محل ژنومی هدف به وقوع می‌پیوندند که این کار از طریق یک توالی دهنده (donor) دارای همولوژی با جایگاه شکست دو رشته‌ای، صورت می‌پذیرد. **ب**- فعال‌سازی CRISPR. پروتئین Cas9 غیرفعال از لحاظ کاتالیتیک (dCas9) با یک فاکتور نسخه برداری ترکیب می‌شود، که بالادست ژن مورد نظر را هدف قرار می دهد و با تحویل آن به پروموتر، باعث تسهیل دسترسی RNA پلیمراز به فاکتور نسخه برداری و در نتیجه افزایش بیان ژن هدف می‌گردد. **ج**- تداخل CRISPR. دو روش برای خاموشی بیان ژن وجود دارد. کمپلکس dCas-sgRNA، توالی پروموتر یا ارتقا دهنده را هدف قرار می‌دهد و بدین ترتیب مانع از اتصال RNA پلیمراز یا فاکتورهای نسخه برداری به توالی‌های تنظیمی و در نتیجه عدم شروع نسخه‌برداری می‌شوند. در حالت دوم، کمپلکس dCas9-sgRNA توالی ژن یا توالی 5'UTR را هدف قرار می‌دهد که اینکار از مرحله طویل سازی نسخه‌برداری جلوگیری به عمل می‌آورد (Tian et al. 2017).

۲. مطالعات موردی در خصوص کاربرد فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک گیاهان دارویی

با توجه به تنوع گسترده ترکیبات دارویی گیاهی و به منظور تسهیل مطالعه پژوهش‌های مرتبط با کاربرد فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک گیاهان دارویی، این تحقیقات در سه گروه اصلی متابولیت‌های ثانویه یعنی ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فنیل پروپانوئیدها مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

۲-۱. کاربرد فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک ترپنوئیدها

ترپنوئیدها که به ترپن‌ها یا ایزوپرنوئیدها نیز معروف هستند، بزرگترین گروه ترکیبات ثانویه گیاهی هستند. این ترکیبات از پیش‌ساز پنج کربنه ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) و ایزومر آن دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) مشتق شده‌اند و به دلیل تفاوت در تعداد زیرواحدهای تشکیل دهنده و همچنین نحوه اتصال این زیرواحدها، دارای تنوع قابل توجهی هستند. ترپن‌های با وزن مولکولی پایین، اغلب فرار و معطر می‌باشند و در جذب حشرات گرده افشان ایفای نقش می‌کنند، به علاوه در گروه ترپن‌ها، ترکیبات دارای اثرات دارویی مثل آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد ضد میکروب و یا ترکیبات آنتی توموری نیز حضور دارند (Lanier et al. 2023؛ Kutchan et al. 2015).

ساپونین‌ها، گروه بزرگی از تری‌ترپنها در جنس *Medicago* می‌باشند. در این جنس دو گروه عمده ساپونین‌ها به نام‌های ساپوجنین‌های همولیتیک و سویاساپوجنول‌ها حضور دارند. ساپوجنین‌های همولیتیک دارای فعالیت‌های دارویی ارزشمندی هستند، در مقابل سویاساپوجنول‌ها فاقد این ویژگی‌ها می‌باشند. بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان با ممانعت از تولید سویاساپوجنول‌ها، موجبات افزایش ساپوجنین‌های همولیتیک را فراهم آورد (Jurzysta and Waller؛ Carelli et al. 2015). بدین منظور، Confalonieri و همکاران (۲۰۲۱)، با استفاده از فناوری CRISPR/Cas در گیاه *Medicago truncatula*، دو ژن CYP93E2 و CYP72A61 دخیل در بیوسنتز سویاساپوجنول B (فراوان‌ترین سویاساپوجنول موجود در این گیاه) را خاموش کردند. نتایج نشان داد که ناک‌اوت ژن‌های مزبور باعث عدم تولید سویاساپوجنول‌ها و متعاقبا انحراف مسیر بیوسنتزی به سمت افزایش تولید ساپوجنین‌های همولیتیک گردید.

در مطالعه‌ای از فناوری CRISPR/Cas به منظور افزایش تولید ترکیب ضد سرطانی تاکسول استفاده شد. در این تحقیق ژن فنیل‌آلانین آمونیالیاز (*PAL*) که در سنتز فنیل پروپانوئیدها دخیل است، ناک‌داون شد که نتیجه آن عدم سنتز ترکیبات فنولی بود. در ادامه از فنیل‌آلانین برونزاد و همچنین مهارکننده‌های شیمیایی استفاده شد. این مهارکننده‌ها شامل پیپرونیلیک اسید و کافئیک اسید بودند که به ترتیب دومین و سومین آنزیم مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها یعنی سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) و ۴- کومارویل- کوآ- لیگاز (4CL)، را مهار می‌نمودند. نتایج نشان داد که ناک‌داون *PAL* باعث افزایش ۲۵ برابری تولید تاکسول گردید. از سوی دیگر، فعالیت سینرژیستیک مهارکننده‌های شیمیایی و تغذیه با فنیل‌آلانین، منجر به افزایش ۳/۵ برابری تولید تاکسول شد (Brzycki Newton et al. 2023).

ریشه گیاه *Panax ginseng* Meyer منبعی غنی از ترکیبات دارویی، خصوصا جینسنوزیدها می‌باشد. جینسنوزیدها، متعلق به ساپونین‌ها هستند و ساپونین‌های موجود در این گیاه به دو گروه اصلی ساپونین‌های نوع پروتوپاناکسادیول (PPD) و ساپونین‌های نوع پروتوپاناکساتیول (PPT) تقسیم می‌شوند. جینسنوزیدهای PPD شامل Rb1، Rc، Rd، Rg3 و Rh2 هستند و جینسنوزیدهای PPT شامل Re، Rf، Rg1، Rg2 و Rh1 می‌باشند. جینسنوزیدها دارای خواص ضد سرطانی می‌باشند و مشخص شده است که خواص ضد سرطانی جینسنوزیدهای نوع PPD بسیار بیشتر از نوع PPT است (خصوصا Rg3 و Rh2). آنزیم پروتوپاناکسادیول ۶- هیدروکسیلاز (PPT سنتاز)، مسئول تولید PPT از پیش‌ساز PPD می‌باشد (Christensen 2008؛ You et al. 2022). در تحقیقی به منظور افزایش محتوای جینسنوزیدهای PPD و کاهش انواع PPT، ژن PPT سنتاز با روش CRISPR/Cas9 ناک‌اوت شد (Choi et al. 2022). نتایج نشان داد که در موتانت‌های هموزیگوت، ریشه‌ها عاری از PPT بودند که این امر منجر به افزایش تولید ساپونین‌های نوع PPD گردید. از آنجایی‌که ساپونین‌های نوع PPD و PPT دارای خواص فارماکولوژیک متفاوتی می‌باشند، بنابراین می‌توان انتظار داشت گیاهان ویرایش ژنی شده مذکور، دارای خواص درمانی متفاوتی با انواع ویرایش نشده خود باشند.

کاسنی (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*) یک گیاه مهم برای تولید پلیمر فروکتوزی اینولین، یک شیرین‌کننده کم کالری و یک پری‌بیوتیک است. در این گیاه، گروهی از ترکیبات ترپنوئیدی به نام سزکوئی ترپن لاکتون‌ها (STLها) وجود دارند که ترکیباتی تلخ مزه هستند و در فرایند استخراج اینولین، می‌بایست حذف شوند. کاهش مقدار STL در گیاه کاسنی می‌تواند منجر به کاهش هزینه‌های فراوری پایین دستی تولید اینولین گردد (Janda et al. 2021). در پژوهشی ناک‌اوت ژن جرماکرن A سنتاز (*CiGAS*) توسط فناوری CRISPR/Cas انجام شد. *CiGAS* اولین آنزیم متعهد مسیر بیوسنتزی STLها را کد می‌کند. بررسی نتایج مشخص نمود که ناک‌اوت ژن مذکور، موجب حذف کامل سزکوئی ترپن لاکتون‌ها شده است (Cankar et al. 2021).

گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)، گیاهی با خصوصیات دارویی چشمگیر و در عین حال منبعی از ترکیبات مخدر می‌باشد. مهمترین ترکیبات دارویی موجود در این گیاه، کانابینوئیدها هستند که زیرگروهی از ترپنوئیدها به حساب می‌آیند (Sampson 2020؛ Jurga et al. 2024). هرچند که این گیاه بیشتر به دلیل اثرات روانگردان دلتا-۹- تترا- هیدرو کانابینول (THC) معروف است ولی سایر کانابینوئیدهای این گیاه از جمله کانابیدیول (CBD)، کانابینول (CBN)، کانابیجرول (CBG) و کانابیکرومن (CBC) دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های دارویی مفید از جمله درمان بیماری‌های عصبی و سرطان می‌باشند. در حال حاضر، کشت شاهدانه به منظور مصارف دارویی، در بیش از ۵۰ کشور بطور قانونی صورت می‌پذیرد و پیش‌بینی می‌شود که بازار جهانی شاهدانه دارویی در بین سال‌های ۲۰۲۰ تا ۲۰۲۵ در حدود ۲۰ میلیارد دلار باشد (Aliekperova et al. 2020؛ Galan-Avila et al. 2020؛ Blebea et al. 2024). اولین مورد موفقیت‌آمیز ویرایش ژنی این گیاه با فناوری CRISPR/Cas، توسط Zhang و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد. آنها sgRNAهای مختلفی را برای ویرایش ژن فیتوئن دسچوراز (*PDS*) طراحی نمودند. نتایج نشان داد که جایگاه ویرایش انتخابی و همچنین پروموترهای مورد استفاده، نقش بسزایی در کارایی و موفقیت ویرایش ژن‌ها در این گیاه دارند. Shiels و همکاران (۲۰۲۲) پیشنهاد کردند که در گام بعدی، ژن عامل سنتز دلتا- ۹- تترا- هیدرو کانابینول یعنی ژن *THCAS* توسط

CRISPR/Cas ناک‌اوت شود تا گیاهانی عاری از THC حاصل گردند. این امر می‌تواند به تولید بیشتر کانابینوئیدهای دارویی از قبیل کانابیدیول منجر شود و از سوی دیگر موجبات پذیرش کشت و کار این گیاهان در کشورهای دارای قوانین سختگیرانه در خصوص محتوای THC این گیاهان، را فراهم آورد.

دیوسجنین یک فیتواستروئید مهم است که علاوه بر خواص ضد سرطانی، به عنوان پیش ماده برای ساخت هورمون‌های استروئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعه‌ای نقش ژن *Dzfps* در گیاه *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright مورد بررسی قرار گرفت (Feng et al. 2018). sgRNA به منظور هدفگیری اگزون اول ژن *Dzfps* طراحی و از پروموترهای OsU6 و CaMV35S نیز برای تنظیم بیان sgRNA و Cas9 استفاده شد. بررسی گیاهان حاصله، نشان داد که کارایی سیستم ویرایش ژنومی مذکور در این گیاه بالا می‌باشد، بطوری‌که از ۱۵ گیاه بدست آمده، ۹ عدد از آنها دارای ویرایش ژنی در جایگاه هدف بودند. میزان بیان ژن *Dzfpz* و همچنین تولید متابولیت اسکوالن در گیاهان حاوی ژن ناک‌اوت، بشدت کاهش یافت. این نتایج اهمیت ژن *Dzfps* را در بیوسنتز ترکیبات تری‌ترپنی مثل دیوسجنین، به اثبات رساند.

۲-۲- کاربرد فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک آلکالوئیدها

آلکالوئیدها، گروهی از ترکیبات ثانویه هستند که عمدتا از اسیدهای آمینه مشتق شده‌اند و دارای خاصیت قلیایی (بار مثبت) می‌باشند. آلکالوئیدها معمولا تلخ‌مزه هستند و گیاهان از آنها برای مقابله با آفات، پاتوژن‌ها و گیاهخواران استفاده می‌کنند. خواص دارویی آلکالوئیدها از زمان‌های دور برای بشر شناخته شده بود و آنها برای اهداف دارویی مختلف مورد استفاده قرار می‌گرفتند. بسیاری از آلکالوئیدها بر سیستم اعصاب مرکزی (CNS) اثر می‌گذارند، از اینرو دارای خواص ضد درد، ضد استرس، ضد افسردگی و یا خواب‌آور هستند (Kutchan et al. 2015؛ Gutierrez-Grijalva et al. 2020).

از فناوری CRISPR/Cas9 بطور موفقیت‌آمیزی برای تغییر محتوای آلکالوئیدها در گیاه بلادون (*Atropa belladonna* L.) استفاده شد (Zeng et al. 2021). این گیاه منبع ارزشمندی برای تهیه آلکالوئیدهای تروپانی (TAs) دارای ویژگی‌های آنتی‌کولینرژیک است.

هیوسیامین، اسکوپولامین و آنیسودامین از معروفترین آلکالوئیدهای تروپانی گیاه بلادون می‌باشند. اسکوپولامین و آنیسودامین از هیوسیامین مشتق شده‌اند و به دلیل شباهت ساختاری زیاد، باعث ایجاد اختلال در فرایند خالص‌سازی هیوسیامین می‌گردند. آنزیم هیوسیامین ۶ بتا-هیدروکسیلاز (H6H) مسئول تبدیل هیوسیامین به آنیسودامین است که در ادامه با اپوکسیداسیون آنیسودامین، اسکوپولامین حاصل می‌شود (Kohnen-Johannsen and Kayser 2019). در مطالعه‌ای به منظور افزایش تولید هیوسیامین و کاهش میزان ترکیبات مشتق از هیوسیامین، اگزون دوم ژن *AbH6H* مورد هدف قرار گرفت که نتیجه آن ایجاد جهش تغییر چارچوب خوانش (frame-shift) بود. بررسی‌های بعدی نشان داد که جهش مذکور، باعث تغییرات چشمگیر در ترکیب اسیدهای آمینه آنزیم H6H و در نهایت غیرفعال شدن آنزیم گردید. در جهش‌یافته‌های هموزیگوت که هر دو آلل *H6H* ویرایش شده بودند، غلظت هیوسیامین در لاین‌های مورد آزمون به میزان ۳/۶۸ تا ۴/۲۸ برابر میزان گیاهان ویرایش نشده افزایش یافت؛ درحالی‌که در این لاین‌ها، آلکالوئیدهای واقع در پایین‌دست یعنی اسکوپولامین و آنیسودامین مشاهده نشدند (Zeng et al. 2021).

گیاه دارویی *Symphytum officinale* L. دارای اثرات ضد التهابی و مسکن قابل توجهی می‌باشد؛ با این حال، حضور آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی، این گیاه را برای انسان سمی نموده و در نتیجه اهمیت دارویی آنرا تحت‌الشعاع قرار داده است (Trifan et al. 2024). آنزیم هموسپرمیدین سنتاز (HSS) اولین آنزیم متعهد مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی است. استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas در این گیاه، منجر به ناک‌اوت موفقیت‌آمیز ژن *HSS* گردید. در موتانت‌های هتروزیگوت که تنها یک آلل ژن *HSS* ویرایش شده بودند، کاهش محسوس در محتوای آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی مشاهده شد. از سوی دیگر در موتانت‌های هموزیگوت که هر دو آلل این ژن ویرایش شده بودند، میزان آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی به حدی پایین بود که قابل تشخیص نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از موتانت‌های ناک‌اوت این گیاه به عنوان منبع اقتصادی و ایمن (غیر سمی) برای استخراج متابولیت‌های دارویی ارزشمند خصوصا رزمارینیک اسید و

آلانتوئین استفاده نمود (Zakaria et al. 2021).

گیاه خشخاش (*Papaver somniferum* L.) منبع متابولیت‌های ثانویه دارویی خصوصا آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی است. مورفین و تبائین از معروفترین آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی هستند که اثرات ضد درد آنها از اهمیت خاصی در پزشکی برخوردار است (Aalinezhad et al. 2024). به منظور شناسایی ژن‌های موثر در بیوسنتز این آلکالوئیدها، ناک‌اوت ژن‌های 4'OMT و 4'OMT2 گیاه خشخاش با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 صورت گرفت. نتایج نشان داد که سطوح مورفین و تبائین در گیاهان ویرایش شده بشدت کاهش یافت. این مطالعه، نقش مهم دو ژن مذکور را در بیوسنتز آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولینی به اثبات رساند. از سوی دیگر، مشخص شد که در گیاهان ویرایش شده، آلکالوئیدهای جدیدی به وجود آمده بودند که در تیپ وحشی حضور نداشتند. این نتیجه جالب توجه نشان داد که ویرایش مسیرهای بیوسنتزی می‌تواند به عنوان منبعی برای سنتز ترکیبات زیست فعال جدید باشد که به نوبه خود، موجب گسترش بیش از پیش پتانسیل دارویی گیاهان می‌شود (Alagoz et al. 2016).

گیاه توتون (*Nicotiana* spp.) حاوی نیکوتین است که ترکیبی اعتیادآور می‌باشد. مصرف طولانی‌مدت نیکوتین، می‌تواند مشکلات بهداشتی چشمگیری را ایجاد نماید (Al-Snafi 2022)؛ بطوریکه سالانه بیش از ۷ میلیون مرگ و میر در اثر عوارض منفی نیکوتین اتفاق می‌افتد. به منظور کاهش مشکلات ناشی از مصرف سیگار (حدود ۱/۱ میلیارد فرد سیگاری در جهان وجود دارد)، ایجاد گیاهان توتون با مقدار کاهش یافته نیکوتین، یک راه حل مهم می‌باشد (Schachtsiek and Stehle 2019؛ Govindasamy et al. 2024). در مطالعه‌ای ناک‌اوت ژن‌های خانواده *BBL* که در بیوسنتز نیکوتین درگیر هستند با کمک فناوری CRISPR/Cas انجام شد. مشخص گردید که گیاهان ویرایش شده عاری از نیکوتین بودند و آنالیزهای بیشتر نشان داد که تغییر مذکور اثرات سوئی بر مسیرهای متابولیکی اولیه و حیاتی گیاه ندارد. به علاوه، ویژگی‌های رشدی ناهنجار در گیاهان عاری از نیکوتین نیز مشاهده نشد. پیشنهاد می‌شود که از گیاهان توتون عاری از نیکوتین می‌توان به عنوان منبع ایمنی

برای تولید انواع ترکیبات ارزشمند خصوصا پروتئین‌های دارویی هترولوگ استفاده نمود؛ زیرا گیاه توتون به دلیل دارا بودن مزایایی از قبیل دستورزی ژنتیکی آسان، رشد سریع و تولید بیوماس فراوان، پلتفرم مناسبی برای تولید ترکیبات هترولوگ است (Schachtsiek and Stehle 2019).

سانگوئینارین یک آلکالوئید آنتی‌باکتریال معروف است که از گیاه *Macleaya cordata* Willd. بدست می‌آید. مشخص شده است که در مسیر بیوسنتزی سانگوینارین، ژن *McSMT* باعث انحراف متابولیت‌ها به سمت مسیر رقیب سانگوئینارین می‌شود (Kosina et al. 2010). در یک تحقیق Sun و همکاران (۲۰۲۴)، ژن *McSMT* را با استفاده از فناوری CRISPR/Cas ناک‌اوت نمودند. آنالیزهای متابولیکی گیاهان ویرایش شده حاصل، نشان داد که سطوح متابولیت‌های مسیر رقیب بطور معنی‌داری کاهش یافتند و متابولیت‌های مربوط به مسیر سانگوئینارین افزایش چشمگیری نشان دادند (۳/۲۹ تا ۴/۹۵ برابر). آنالیز بیان ژن‌ها نیز کاهش بیان ژن‌های مسیر رقیب و افزایش بیان ژن‌های مسیر سانگوئینارین را نشان داد. همچنین مشخص شد که چهار فاکتور نسخه برداری MYB3، MYB5، MYB82 و bHLH130، به احتمال زیاد نقش تنظیمی را در متابولیسم بنزیل ایزوکوئینولین آلکالوئیدها در *M. cordata* برعهده دارند.

۳-۲- کاربرد فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک فنیل پروپانوئیدها

فنیل پروپانوئیدها که به فنولیک اسیدها یا ترکیبات فنولی نیز معروف می‌باشند مشتقات اسید آمینه فنیل‌آلانین و یا تیروزین هستند که نقش‌های اکولوژیکی بسیاری در گیاهان دارند. برخی از ترکیبات فنولی مثل فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند و باعث تحمل در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند. برخی دیگر به استحکام سلول‌های گیاهی کمک می‌نمایند (مثل لیگنین) و گروه دیگری از فنول‌ها نیز مانع از دست رفتن آب در گیاهان شده و همچنین به عنوان لایه‌های محافظ عمل می‌کنند (سوبرین و کوتین). فنول‌های ضد تغذیه‌ای مثل تانن‌ها از گیاهان در برابر آفات و گیاهخواران محافظت به عمل می‌آورند. علاوه بر نقش‌های اکولوژیکی، فنل‌های گیاهی منبع مهمی از ترکیبات دارویی می‌باشند (Kutchan et al. 2015؛ Yadav et al. 2020) که در ادامه به مثال‌هایی از کاربرد

CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک این ترکیبات اشاره شده است.

گیاه *Fagopyrum tataricum* Gaertn.

یک گیاه غنی از فلاونوئیدهای روتین و کاتچین است (Singh et al. 2024). در مطالعه‌ای از CRISPR/Cas برای ویرایش ژن *FtMYB45* به منظور افزایش محتوای فلاونوئیدی این گیاه استفاده شد. FtMYB45 یک فاکتور نسخه برداری است که موجب تنظیم منفی بیوسنتز فلاونوئیدها می‌شود. دو sgRNA برای هدف قرار دادن اگزون دوم ژن *FtMYB45* طراحی شدند و نمونه‌های گیاهی توسط آگروباکتریوم رایزوژنز ترانسفورم گردیدند. آنالیزهای متابولیکی ریشه‌های موئین حاوی ویرایش ژنی، افزایش تولید در روتین، کاتچین و سایر فلانوئیدها را نشان داد (Wen et al. 2022).

در گیاه *Salvia miltiorrhiza* Bunge، مشخص شده است که فاکتور نسخه برداری bZIP اثر ممانعت کننده‌ای بر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها دارد (Deng et al. 2020). در پژوهشی، از نواحی محافظت شده فاکتور نسخه برداری مذکور به منظور طراحی sgRNA استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۴۵ ریشه موئین ترانسژنیک بدست آمده، ۱۸ نمونه دارای ویرایش ژنی در جایگاه هدف بودند. این ویرایش‌ها شامل اضافه شدن یا حذف نوکلئوتیدها (اصطلاحا ایندل‌ها) بودند. گیاهان ویرایش شده در مقایسه با گیاهان ویرایش نشده، افزایش محسوسی (۲۳ تا ۵۳ درصد) را در محتوای فنولیک اسیدها، خصوصا رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B (SAB) نشان دادند. همچنین سطح بیان ژن‌های مربوط به مسیر فنیل پروپانوئیدی خصوصا اولین ژن مسیر یعنی فنیل‌آلانین آمونیالیاز (*PAL*) بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. نتایج این پژوهش، نقش سرکوب‌کننده bZIP را در بیوسنتز فنولیک اسیدها تایید نمود (Shi et al. 2021).

به منظور بررسی اهمیت ژن رزمارینیک اسید سنتاز (*RAS*) در بیوسنتز فنولیک اسیدها، Zhou و همکاران (۲۰۱۸)، ژن مذکور را ناک‌اوت نمودند. بررسی ریشه‌های موئین حاوی *RAS* ویرایش شده، کاهش ۵۰ درصدی در محتوای رزمارینیک اسید و لیتوسپرمیک اسید را نشان داد.

لاکازها گلیکوپروتئین‌های حاوی چندین یون مس (مولتی کاپر) می‌باشند که با اکسیداسیون و پلیمریزاسیون مونولیگنول‌ها مرتبط هستند. در پژوهشی،

محققان نقش احتمالی لاکازها در بیوسنتز فنول‌های دارویی موجود در گیاه *S. miltiorrhiza* Bunge را مورد بررسی قرار دادند (Zhou et al. 2021). ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی بر روی توالی‌های ۲۹ ژن لاکاز صورت گرفت و بر این اساس آنها در ۷ خوشه مجزا طبقه‌بندی شدند. در ادامه با توجه به نواحی حفاظت شده ژن‌های لاکاز، دو sgRNA مختلف طراحی شد. نتایج نشان داد که در ریشه‌های موئین حاوی ویرایش ژنی مورد نظر، بیان ژن‌های لاکاز و همچنین بیوسنتز فنولیک اسیدها، به میزان زیادی کاهش یافت. سرعت رشد و نمو ریشه‌های موئین ویرایش‌شده کندتر از ریشه‌های ویرایش‌نشده بود. برخی ناهنجاری‌ها در ریشه‌های حاوی ویرایش ژنی مشاهده شد؛ بطوری‌که آوندهای چوبی در ریشه‌های ویرایش شده، بزرگتر و سست‌تر از تیپ وحشی بودند. میزان تولید رزمارینیک اسید و سالویانولیک اسید B کاهش چشمگیری نشان داد و محتوای لیگنین در ریشه‌های حاوی ژن ناک‌اوت، تقریبا غیرقابل تشخیص بود. در کل این بررسی تایید نمود که ژن‌های لاکاز در نمو ریشه و همچنین تشکیل لیگنین در *S. miltiorrhiza* Bunge نقش کلیدی دارند و برای بیوسنتز سایر ترکیبات فنولی نیز ضروری هستند (Zhou et al. 2021).

۳. چالش‌ها و چشم‌اندازها

هرچند استفاده از فناوری CRISPR/Cas در مهندسی متابولیک گیاهان دارویی، با موفقیت‌های چشمگیری همراه بوده است؛ با این وجود، محدودیت‌ها و چالش‌هایی نیز در این راه وجود دارند. برخی از چالش‌ها و محدودیت‌های CRISPR/Cas جنبه عمومی داشته و شامل همه حوزه‌های کاربرد این فناوری می‌شوند، در مقابل برخی از آنها بیشتر با حوزه مهندسی متابولیک گیاهان دارویی مرتبط هستند. مهمترین چالش سیستم‌های ویرایش ژنی مبتنی بر CRISPR/Cas، اثرات خارج از هدف یا off-target می‌باشد. اثرات خارج از هدف بطور بالقوه منجر به تغییر در ژن‌های حیاتی گیاه و در نتیجه ناهنجاری‌های رشدی، کاهش رشد، اختلال نمو و مرگ گیاه می‌گردد. اثرات خارج از هدف معمولا به دلیل کافی نبودن اطلاعات توالی‌های ژنومی و ترانسکریپتومی گیاهان هدف و یا مشکلات مربوط به طراحی sgRNA رخ می‌دهد. با تکمیل پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم و ترانسکریپتوم در گیاهان دارویی و همچنین پیشرفت‌های بیشتر در نرم‌افزارهای

بیوانفورماتیکی می‌توان انتظار داشت که این اثرات به حداقل ممکن کاهش یابند (Kim et al. 2017؛ Gohil et al. 2021). یکی دیگر از دلایل فراوانی بالای وقوع اثرات خارج از هدف، بیان بیش از حد نوکلئاز است. بیان زیاد و طولانی‌مدت نوکلئاز معمولا در نتیجه بهره‌گیری از وکتورهای ویروسی یا پلاسمیدی ایجاد می‌شود. برای حل مشکل مذکور، استفاده از سایر سیستم‌ها (مثل اجزای شبه- ویروسی و یا نوکلئازهای کپسوله شده) برای تحویل نوکلئاز به سلول هدف، پیشنهاد می‌گردد (Mipeshwaree Devi et al. 2023). همچنین مشخص شده است که استفاده از انواع دیگر پروتئین‌های Cas، ایجاد تغییرات در زیرواحدهای پروتئین Cas و یا تلفیق پروتئین Cas با بخش‌هایی از دیگر سیستم‌های ویرایش ژنومی مثل ZFN و TALEN، می‌تواند به افزایش دقت ویرایش و کاهش اثرات آف- تارگت منجر شود. به عنوان نمونه اختصاصیت ویرایش سیستم fCas9 که از ادغام یک dCas9 و نوکلئاز FokI حاصل شده است، ۱۴۰ برابر سیستم متداول CRISPR/Cas9 می‌باشد (Guilinger et al. 2014).

چالش دیگر مهندسی متابولیک گیاهی، وجود ژن‌های تقریبا مشابه با ژن هدف است. این پدیده در خانواده‌های ژنی و همچنین در گیاهان پلی‌پلوئید، شایع می‌باشد. حضور ژن‌های تقریبا مشابه، باعث می‌گردد که با وجود ناک‌اوت ژن هدف، متابولیت ناخواسته، همچنان تولید شود. در اینگونه موارد، ناک‌اوت ژن‌های مشابه همراه با ژن هدف ضروری است. در صورتی‌که ژن‌های مشابه دارای ناحیه حفاظت شده مشترکی باشند با طراحی یک sgRNA امکان ناک‌اوت همه آنها وجود دارد؛ اما اگر یک ناحیه مشترک در میان همه ژن‌های مشابه وجود نداشته باشد، بایستی از چند sgRNA مختلف برای تحت پوشش قرار دادن تمامی ژن‌های مورد نظر استفاده نمود (این روش، CRISPR/Cas چندگانه نیز نامیده می‌شود). همچنین یک مشکل دیگر در خصوص ویرایش گیاهان پلی‌پلوئید، اثرات مربوط به وجود چندین نسخه ژنی است که به آن اثرات دز (dosage effect) نیز گفته می‌شود. در این حالت استفاده از CRISPR/Cas بعضا ممکن است به افزایش موفق تولید ترکیبات دارویی منجر گردد و یا بالعکس موجب رشد و نمو غیرنرمال شود (Schaart et al. 2021؛ Munir et al. 2024).

استفاده از پروموترهای مناسب، نیز کمک شایانی به بهبود مهندسی متابولیک گیاهی می‌نماید. معمولا بهتر است برای گیاهان تک لپه از پروموترهای با منشأ تک لپه‌ای‌ها و برای گیاهان دولپه نیز از پروموترهای با منشأ دولپه‌ای ها استفاده شود. از سوی دیگر استفاده از پروموترهای ویژه بافتی نیز می‌تواند به افزایش کارایی مهندسی متابولیک منجر شود. پروموترهای ویژه بافتی باعث انباشت مقادیر زیادی از متابولیت‌های مورد نظر در اندام‌های گیاهی خاص می‌شوند (اندام‌های ذخیره‌ای مثل دانه، غده و میوه بسیار مناسب هستند) و بدین ترتیب فیزیولوژی عادی گیاه، کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. ذخیره متابولیت‌ها در اندام‌های خاص، همچنین منجر به افزایش راندمان و تسهیل فرایند استخراج ترکیبات ثانویه گیاهی می‌شود (Allok et al. 2020؛ Singha et al. 2022).

شناخت و هدفگیری فاکتورهای نسخه برداری موثر بر بیوسنتز ترکیبات دارویی گیاهی، یک راه حل دیگر برای افزایش موفقیت مهندسی متابولیک گیاهان دارویی با واسطه CRISPR/Cas است. فاکتورهای نسخه برداری، قادر به فعال‌سازی و یا ممانعت از بیان تعداد زیادی از ژن‌های درگیر در یک مسیر متابولیکی می‌باشند. بنابراین ایجاد تغییر در یک فاکتور نسخه برداری، معادل دستورزی بیان چندین ژن اصلی یک مسیر متابولیکی است. از فاکتورهای نسخه برداری دخیل در متابولیسم ثانویه می‌توان به نقش AP2/ERF و WRKY در بیوسنتز آرتمیزینین، bHLH در ساخت ترپنوئیدها و ORCA در تولید آلکالوئیدهای وینکا، اشاره نمود (Meraj et al. 2020؛ Wang et al. 2021).

یک راه حل پیشنهادی برای چالش ناکافی بودن اطلاعات بیوشیمیایی و ژنتیکی در گیاهان دارویی، استفاده از اطلاعات متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان غیر دارویی است. در برخی از گیاهان زراعی مثل برنج و گوجه فرنگی تحقیقاتی در خصوص مهندسی مسیرهای متابولیکی ثانویه با استفاده از CRISPR/Cas صورت گرفته است و با توجه به اشتراکات موجود در بین مسیرهای ثانویه گیاهان زراعی و دارویی، می‌توان از اطلاعات آنها برای مهندسی متابولیک گیاهان دارویی استفاده نمود (Dong et al. 2020؛ Li et al. 2022).

در حال حاضر پروژه‌های ژنومیک بسیاری در خصوص گیاهان دارویی در حال انجام می‌باشند که در این بین گیاهانی از

قبیل *Papaver* spp.، *Cannabis sativa* L.، *Salvia miltiorrhiza* Bunge، *Panax ginseng* Meyer، *Catharanthus roseous* L. و *Taxus* spp. مورد توجه خاصی قرار دارند (Younas et al. 2023؛ Pandita et al. 2021).

تکمیل پروژه‌های ژنومیک به همراه توسعه روش‌های آنالیز متابولیکی، راه را برای طراحی منطقی‌تر و موفق‌تر استراتژی‌های مهندسی متابولیک هموارتر خواهد نمود (Younas et el 2023؛ Pandita et al. 2021). به عنوان مثال Strickler و همکاران در سال ۲۰۱۲، پایگاه داده CathaCys را تاسیس کردند که هدف آن تسهیل دسترسی، مشاهده و تفسیر اطلاعات مربوط به ترانسکریپتوم *Catharanthus roseous* L. است (Strickler et al. 2012).

نتیجه‌گیری

فناوری CRISPR/Cas از زمان معرفی تاکنون، به دلیل توانایی‌ها و مزایای متعدد، باعث شتاب بخشیدن به پژوهش‌های زیستی شده است که این پیشرفت‌ها چه در حوزه تحقیقات پایه و چه در حوزه تحقیقات کاربردی، نتایج قابل توجهی را در پی داشته است. با توجه به توسعه واریانت‌های مختلف فناوری CRISPR/Cas و بهبودهای تکنیکی آن و همچنین پیشرفت‌ها در سایر عرصه‌ها، خصوصا تکمیل پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم، ترانسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم و نیز پایگاه‌های داده‌های بیوانفورماتیکی و نرم‌افزارهای مرتبط، به همراه بهبود سیستم‌های ترانسفورماسیون، کشت بافت و باززایی گیاهان، می‌توان انتظار داشت در آینده نزدیک، شاهد دستاوردهای بسیار بیشتری در عرصه مهندسی متابولیک گیاهان دارویی باشیم. از سوی دیگر، کشف ترکیبات دارویی و خواص درمانی جدید، مشوق همیشگی پژوهشگران در زمینه تحقیقات مهندسی متابولیک گیاهان دارویی خواهد بود.

منابع

- Aalinezhad S, Dabaghian F, Namdari A, Akaberi M and Emami SA. 2024. Phytochemistry and Pharmacology of Alkaloids from *Papaver* spp.: A Structure–activity Based Study. Phytochemistry Reviews (2024): 1-73.
- Ahad B, Shahri W, Rasool H, Reshi ZA, Rasool S and Hussain T. 2021. Medicinal Plants and Herbal Drugs: An Overview. Medicinal and Aromatic Plants: Healthcare and Industrial Applications pp: 1-40.
- Al-Snafi AE. 2022. Pharmacological and Toxicological Effects of Nicotiana tabacum. World Journal of Advanced Pharmaceutical and Medical Research 3(1): 6-18.
- Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B and Unver T. 2016. Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology. Scientific reports 6(1): 30910.
- Aliekperova N, Kosyachenko K and and Kaniura O. 2020. Perspectives on Formation of Medical Cannabis Market in Ukraine Based on Holistic Approach. Journal of Cannabis Research 2: 1-19.
- Alok A, Jain P, Kumar J, Yajnik K and Bhalothia P. 2020. Genome Engineering in Medicinally Important Plants Using CRISPR/Cas9 Tool. In: Genome Engineering via CRISPR-Cas9 System pp: 155-161. Academic Press.
- Arya A, Gautam S, Goel S, Grewal S and Bhattacharyya M. 2023. Metabolic Engineering for High-Value Bioactive Compounds from Medicinal Plants. in: Phytochemical Genomics: Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics. pp. 521-544. Singapore: Springer Nature Singapore.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA and Horvath P. 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. Science 315(5819): 1709-1712.
- Bharathkumar N, Sunil A, Meera P, Aksah S, Kannan M, Saravanan KM and Anand T. 2022. CRISPR/Cas-based Modifications for Therapeutic

Inactivation of the Germacrene A Synthase Genes by CRISPR/Cas9 Eliminates the Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Cichorium intybus L. Plant Biotechnology Journal 19(12): 2442-2453.

- Cardi T, Murovec J, Bakhsh A, Boniecka J, Bruegmann T, Bull SE, Eeckhaut T, Fladung M, Galovic V, Linkiewicz A and Lukan T. 2023. CRISPR/Cas-mediated Plant Genome Editing: Outstanding Challenges a Decade After Implementation. Trends in Plant Science 28(10): 1144-1165.

- Carelli M, Biazzi E, Tava A, Losini I, Abbruscato P, Depedro C and Scotti C. 2015. Sapogenin Content Variation in Medicago Inter-specific Hybrid Derivatives Highlights Some Aspects of Saponin Synthesis and Control. New Phytologist 206(1): 303-314.

- Choi HS, Koo HB, Jeon SW, Han JY, Kim JS, Jun KM and Choi YE. 2022. Modification of Ginsenoside Saponin Composition via the CRISPR/Cas9-mediated Knockout of Protopanaxadiol 6-hydroxylase Gene in Panax ginseng. Journal of Ginseng Research, 46(4): 505-514.

Applications: A Review. Molecular Biotechnology 64(4): 355-372.

- Birchfield AS and McIntosh CA. 2020. Metabolic Engineering and Synthetic Biology of Plant Natural Products–A Minireview. Current Plant Biology 24:100163.

- Blebea NM, Pricopie AI, Vlad RA and Hancu G. 2024. Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use. International Journal of Molecular Sciences 25: 4204.

- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A and Ehrlich SD. 2005. Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin. Microbiology 151(8): 2551-2561.

- Brzycki Newton C, Young EM and Roberts SC. 2023. Targeted Control of Supporting Pathways in Paclitaxel Biosynthesis with CRISPR-guided Methylation. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 11: 1272811.

- Cankar K, Bundock P, Sevenier R, Hakkinen ST, Hakkert JC, Beekwilder J, van der Meer IM, de Both M and Bosch D. 2021.

- Elshafie HS, Camele I and Mohamed AA. 2023. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. International Journal of Molecular Sciences 24(4): 3266.
- Feng S, Song W, Fu R, Zhang H, Xu A and Li J. 2018. Application of the CRISPR/Cas9 System in Dioscorea zingiberensis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 135: 133-141.
- Galan-Avila A, Garcia-Fortea, E, Prohens J and Herraiz FJ. 2020. Development of a Direct In Vitro Plant Regeneration Protocol from Cannabis sativa L. Seedling Explants: Developmental Morphology of Shoot Regeneration and Ploidy Level of Regenerated Plants. Frontiers in Plant Science 11: 645.
- Gohil N, Bhattacharjee G, Lam NL, Perli SD and Singh V. 2021. CRISPR-Cas Systems: Challenges and Future Prospects. Progress in Molecular Biology and Translational Science 180: 141-151.
- Gostimskaya I. 2022. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery
- Christensen LP. 2008. Ginsenosides: Chemistry, Biosynthesis, Analysis, and Potential Health Effects. Advances in Food and Nutrition Research 55: 1-99.
- Confalonieri M, Carelli M, Gianoglio S, Moglia A, Biazzi E and Tava A. 2021. CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis of CYP93E2 Modulates the Triterpene Saponin Biosynthesis in Medicago truncatula. Frontiers in Plant Science 12: 690231.
- Deng C, Shi M, Fu R, Zhang Y, Wang Q, Zhou Y, Wang, Y, Ma X and Kai G. 2020. ABA-responsive Transcription Factor bZIP1 Is Involved in Modulating Biosynthesis of Phenolic Acids and Tanshinones in Salvia miltiorrhiza. Journal of Experimental Botany 71(19): 5948-5962.
- Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW and Schmutz J. 2020. Marker-free Carotenoid-enriched Rice Generated Through Targeted Gene Insertion Using CRISPR-Cas9. Nature communications 11(1): 1178.

LA, Elizalde-Romero CA and Heredia JB. 2020. Plant Alkaloids: Structures and Bioactive Properties. Plant-derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action 85-117.

- Hussein RA and El-Anssary AA. 2018. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. Herbal Medicine 1(3): 11-30.

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. Journal of Bacteriology 169(12): 5429-5433.

- Ishino Y, Krupovic M and Forterre P. 2018. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. Journal of Bacteriology 200(7): 10-1128.

- Jansen R, van Emben JDA, Gaastra W and Schouls LM. 2002. Identification of Genes that Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes. Molecular Microbiology 43: 1565-1575.

and Ethical Considerations of Its Use in Genome editing. Biochemistry (Moscow) 87(8): 777-788.

- Govindasamy R, Baskar V and Muthu T. 2024. Current Strategies for Overcoming Smoking Addiction: A Major Cause of Oral Cancer. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 19(2): 123-125.

- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D and van Embden JD. 1993. Nature of DNA Polymorphism in the Direct Repeat Cluster of Mycobacterium tuberculosis; Application for Strain Differentiation by a Novel Typing method. Molecular Microbiology 10: 1057-1065.

- Guilinger JP, Thompson DB and Liu DR. 2014. Fusion of Catalytically Inactive Cas9 to FokI Nuclease Improves the Specificity of Genome Modification. Nature biotechnology 32(6): 577-582.

- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27(1): 1-93.

- Gutierrez-Grijalva EP, Lopez-Martinez LX, Contreras-Angulo

Medicine (pp. 565-574). Boston, MA: Springer US.

- Kim D, Lim K, Kim ST, Yoon SH, Kim K, Ryu SM and Kim JS. 2017. Genomewide Target Specificities of CRISPR RNA-guided Programmable Deaminases. Nature biotechnology 35(5): 475–480.
- Kohnen-Johannsen KL and Kayser O. 2019. Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. Molecules 24(4): 796.
- Kosina P, Gregorova J, Gruz J, Vacek J, Kolar M, Vogel M, Roos W, Naumann K, Simanek V and Ulrichova J. 2010. Phytochemical and Antimicrobial Characterization of Macleaya cordata Herb. Fitoterapia 81(8): 1006-1012.
- Kutchan T, Gershenzon J, Moller BL and Gang D. 2015. Natural Products. in Biochemistry and Molecular Biology of Plants. 2nd Edition. pp: 1135-1206. John Wiley and Sons.
- Lanier ER, Andersen TB and Hamberger B. 2023. Plant Terpene Specialized Metabolism: Complex Networks or Simple Linear Pathways? The Plant Journal 114(5): 1178-1201.
- Janda K, Gutowska I, Geszke-Moritz M and Jakubczyk K. 2021. The Common Cichory (Cichorium intybus L.) as a Source of Extracts with Health-promoting Properties—a Review. Molecules 26(6): 1814.
- Jiang F and Doudna JA. 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. Annual Review of Biophysics, 46(1): 505-529.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA–guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science 337(6096): 816-821.
- Jurga M, Jurga A, Jurga K, Kazmierczak B, Kusmierczyk K and Chabowski M. 2024. Cannabis-based Phytocannabinoids: Overview, Mechanism of Action, Therapeutic Application, Production, and Affecting Environmental Factors. International Journal of Molecular Sciences 25(20): 11258.
- Jurzysta M and Waller GR. 1996. Antifungal and Hemolytic Activity of Aerial Parts of Alfalfa (Medicago) Species in Relation to Saponin Composition. In: Saponins Used in Traditional and Modern

Lakshmipriyari Devi M and Das S. 2023. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolites: Prospects and Its Technological Challenges. Frontiers in Plant Science 14: 1171154.

- Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J and Soria E. 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. Journal of Molecular Evolution 60: 174-182.
- Molla KA, Karmakar S and Islam MT. 2020. Wide Horizons of CRISPR-Cas-Derived Technologies for Basic Biology, Agriculture, and Medicine. CRISPR-Cas methods 1-23.
- Munir A, Amin I, Zahoor MK, Majeed HN, Almoammar H, Ghaffar A and Ahmad A. 2024. Multiplex Genome Editing in Plants Through CRISPR-Cas. in: CRISPRized Horticulture Crops pp: 127-142. Academic Press.
- Murthy HN, Lee EJ and Paek KY. 2014. Production of Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures: Strategies and Approaches for Biomass Improvement and Metabolite Accumulation. Plant
- Li J, Scarano A, Gonzalez NM, D'Orso F, Yue Y, Nemeth K, Saalbach G, Hill L, de Oliveira Martins C, Moran R and Santino A. 2022. Biofortified Tomatoes Provide a New Route to Vitamin D Sufficiency. Nature Plants 8(6): 611-616.
- Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, He X, Liu M, Li PF and Yu T. 2023. CRISPR/Cas9 Therapeutics: Progress and Prospects. Signal Transduction and Targeted Therapy 8(1): 36.
- Majidi M and Bahmani Y. 2017. Isolation of High-Quality RNA from a Wide Range of Woody Plants. Journal of Plant Molecular Breeding 5(2): 50-59.
- Majidi M and Tarinejad A. 2018. A Review on Taxol Production through Biotechnological Approaches. Journal of Medicinal Plants 17 (68): 1-14.
- Meraj TA, Fu J, Raza MA, Zhu C, Shen Q, Xu D and Wang Q. 2020. Transcriptional Factors Regulate Plant Stress Responses Through Mediating Secondary Metabolism. Genes 11(4): 346.
- Mipeshwaree Devi A, Khedashwori Devi K, Premi Devi P,

- Sakure AA, Thounaojam AS, Kumar S. and Patel DA. 2023. Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plant-Based Products. in: Biosynthesis of Bioactive Compounds in Medicinal and Aromatic Plants: Manipulation by Conventional and Biotechnological Approaches. pp: 1-39. Cham: Springer Nature Switzerland.
- Sampson PB. 2020. Phytocannabinoid Pharmacology: Medicinal Properties of Cannabis sativa Constituents Aside from the “Big Two”. Journal of Natural Products 84(1): 142-160.
- Schaart JG, van de Wiel CCM and Smulders MJM. 2021. Genome Editing of Polyploid Crops: Prospects, Achievements and Bottlenecks. Transgenic Research 30(4): 337–351
- Schachtsiek J and Stehle F. 2019. Nicotine-free, Nontransgenic Tobacco (Nicotiana tabacum L.) Edited by CRISPR-Cas9. Plant Biotechnology Journal 17(12): 2228.
- Shi M, Du Z, Hua Q and Kai G. 2021. CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis of bZIP2 in Salvia miltiorrhiza Leads to Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 118: 1-16.
- Nidhi S, Anand U, Oleksak P, Tripathi P, Lal JA, Thomas G, Kuca K. and Tripathi V. 2021. Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. International Journal of Molecular Sciences 22(7): 3327.
- Pandita D, Pandita A, Wani SH, Abdelmohsen SA, Alyousef HA, Abdelbacki AM, Al-Yafrasi MA, Al-Mana, FA and Elansary HO. 2021. Crosstalk of Multi-Omics Platforms with Plants of Therapeutic Importance. Cells 10(6):1296.
- Pourcel C, Salvignol G and 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(3): 653-663.
- Rao SR and Ravishankar GA. 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. Biotechnology advances 20(2): 101-153.

- Sun M, Zhong X, Zhou L, Liu W, Song R, Huang P and Zeng J. 2024. CRISPR/Cas9 Revolutionizes Macleaya cordata Breeding: A Leap in Sanguinarine Biosynthesis. Horticulture Research 11(3): p.uhae024.
- Taghavi D, Majidi M, Mollaei S and Panahi B. 2020. Effect of Methyl Jasmonate on Expression of Some Genes Related to Shikonin Biosynthetic Pathway in Lithospermum officinale. Journal of Plant Molecular Breeding 8(2): 1-9.
- Tian P, Wang J, Shen X, Rey JF, Yuan Q and Yan Y. 2017. Fundamental CRISPR-Cas9 Tools and Current Applications in Microbial Systems. Synthetic and Systems Biotechnology, 2(3): 219-225.
- Trifan A, Wolfram E, Skalicka-Wozniak K and Luca SV. 2024. Symphytum Genus—From Traditional Medicine to Modern Uses: An Update on Phytochemistry, Pharmacological Activity, and Safety. Phytochemistry Reviews (2024): 1-58.
- Verpoorte R, Contin A and Memelink J. 2002. Biotechnology for the Production of Plant Promoted Phenolic Acid Biosynthesis. Industrial Crops and Products 167: 113560.
- Shiels D, Prestwich B, Koo O, Kanchiswamy CN, O Halloran R and Badmi R. 2022. Hemp Genome Editing—Challenges and Opportunities. Frontiers in Genome Editing 4: 823486.
- Singh B, Somna O, and Amritpal K. Phenolic Composition, Antioxidant Activity and Health Benefits of Tartary (Fagopyrum tataricum Gaerth) and Common (F. esculentum Moench) Buckwheat Grains: A Review. Food Chemistry Advances (2024): 100820.
- Singha DL, Das D, Sarki YN, Chowdhury N, Sharma M, Maharana J and Chikkaputtaiah C. 2022. Harnessing Tissue-specific Genome Editing in Plants Through CRISPR/Cas System: Current State and Future Prospects. Planta 255: 1-17.
- Strickler SR, Bombarely A and Mueller LA. 2012. Designing a Transcriptome Next-Generation Sequencing Project for a Non-Model Plant Species. American Journal of Botany 99: 257-266.

- Yadav V, Wang Z, Wei C, Amo A, Ahmed B, Yang X and Zhang X. 2020. Phenylpropanoid Pathway Engineering: An Emerging Approach Towards Plant Defense. Pathogens 9(4): 312.
- Yang L, Wen K, Ruan X, Zhao Y, Wei F and Wang Q. 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. Molecules 23: 762.
- You L, Cha S, Kim MY and Cho JY. 2022. Ginsenosides Are Active Ingredients in Panax ginseng With Immunomodulatory Properties from Cellular to Organismal Levels. Journal of Ginseng Research 46(6): 711-721.
- Younas A, Riaz N and Rashid M. 2023. Multi-Omics Approaches for Breeding in Medicinal Plants. in: Sustainable Agriculture in the Era of the OMICs Revolution pp: 165-191. Cham: Springer International Publishing.
- Zakaria MM, Schemmerling B and Ober D. 2021. CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing in Comfrey (Symphytum officinale) Hairy Roots Results in the Complete Eradication of Pyrrolizidine Alkaloids. Molecules 26(6): 1498.

Secondary Metabolites. Phytochemistry Reviews 1: 13-25.

- Villiger L, Joung J, Koblan L, Weissman J, Abudayyeh OO and Gootenberg JS. 2024. CRISPR Technologies for Genome, Epigenome and Transcriptome Editing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 1-24.
- Wang M, Qiu X, Pan X and Li C. 2021. Transcriptional Factor-mediated Regulation of Active Component Biosynthesis in Medicinal Plants. Current Pharmaceutical Biotechnology 22(6): 848-866.
- Wen D, Wu L, Wang M, Yang W, Wang X, Ma W, Sun W, Chen S, Xiang L and Shi Y. 2022. CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis of FtMYB45 Promotes Flavonoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (Fagopyrum tataricum). Frontiers in Plant Science 13: 879390.
- Wu S and Chappell J. 2008. Metabolic Engineering of Natural Products in Plants; Tools of the Trade and Challenges for the Future. Current Opinion in Biotechnology 19(2): 145-152.

RAS in Salvia miltiorrhiza. Phytochemistry 148: 63–70.

Zhou Z, Li Q, Xiao L, Wang Y, Feng J, Bu Q, Xiao Y, Hao K, Guo M, Chen W and Zhang L. 2021. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated Knockout of Laccase Genes in Salvia miltiorrhiza Revealed Their.

- Zeng L, Zhang Q, Jiang C, Zheng Y, Zuo Y, Qin JZ, Liao Z and Deng H. 2021. Development of Atropa belladonna L. Plants with High-Yield Hyoscyamine and without Its Derivatives Using the CRISPR/Cas9 System. International Journal of Molecular Sciences 22(4): 1731

- Zhang K, Raboanatahiry N, Zhu B and Li M. 2017. Progress in Genome Editing Technology and Its Application in Plants. Frontiers in Plant science 8: 177.

- Zhang F. 2019. Development of CRISPR-Cas Systems for Genome Editing and Beyond. Quarterly Reviews of Biophysics 52: e6.

- Zhang X, Xu G, Cheng C, Lei L, Sun J, Xu Y, Deng C, Dai Z, Yang Z, Chen X and Liu C. 2021. Establishment of an Agrobacterium-mediated Genetic Transformation and CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in Hemp (Cannabis sativa L.). Plant Biotechnology Journal 19(10): 1979-1987.

- Zhou Z, Tan H, Li Q, Chen J, Gao S, Wang Y, Chen W and Zhang L. 2018. CRISPR/Cas9-mediated Efficient Targeted Mutagenesis of