

بررسی اثر ویرایش ژن *MAPKKKε* سیبزمینی با استفاده از فناوری

CRISPR در مواجهه با *Phytophthora infestans*

Investigating the effect of *StMAPKKKε* gene editing using CRISPR technology against *Phytophthora infestans*

محسن نوروزی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۱*}، احمد اسماعیلی^۱، رحیم احمدوند^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری تخصصی، استاد، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج،

ایران

Norouzi M¹, Nazarian Firouz-Abadi F^{*1}, Ismaili A¹, Ahmadvand R²

1- Graduated PhD Student, Professor, Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture and Natural resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nazarian.f@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱)

چکیده

کینازهای فعال شونده با میتوزن (MAPKs)، از آبشارهای پروتئینی مهم، در درون سلول‌های یوکاریوتی هستند که نقش کلیدی مهمی در مسیرهای سیگنالینگ ایمنی در جانوران عالی بازی می‌کنند. آبشارهای پروتئینی مسیر MAPK، دارای ژن‌های متعددی هستند که در این میان، ژن‌های MAPKKK در بالادست آبشار کینازی قرار دارند و از این‌رو در دریافت پیام از پروتئین‌های غشایی نقش اساسی را بازی می‌کنند. ژن *MAPKKKε*، تنظیم‌کننده مثبت مرگ سلولی مرتبط با ایمنی در سلول‌های گیاهی می‌باشد. شبه قارچ *Phytophthora infestans* یک اوومیسیت بیماری‌زای گیاهی است که باعث ایجاد بیماری سوختگی دیررس سیبزمینی می‌شود. این قارچ پروتئین‌های افکتور RXLR را جهت تعدیل سیگنال‌های ایمنی میزبان و بالا بردن شانس کلونیزاسیون خود به داخل سلول‌های گیاهی تزریق می‌نماید. افکتور PexRD2 از گروه RXLRها، با دومین کینازی پروتئین *MAPKKKε*، تعامل دارد و بنابراین به نظر می‌رسد که از آن به‌عنوان یک ژن حساسیت استفاده می‌کند. به‌منظور ایجاد جهش در ژن *MAPKKKε*، از یک سیستم CRISPR/Cas9، با بیان هم‌زمان چهار RNA راهنما (gRNA)، استفاده شد. تعداد ۳۵ لاین تراریخت به کمک سیستم CRISPR/Cas9، در جریان کشت بافت باززایی شدند که به ترتیب در سه و دو لاین حذف و اضافه شدگی قطعات به‌وسیله PCR و سپس توالی‌یابی تایید شد. لاین‌هایی با سه آلل جهش یافته در ژن *MAPKKKε* گیاه سیبزمینی تولید شدند. در این لاین‌های تراریخت، میزان بیان ژن *MAPKKKε* حدود ۷۰ درصد کاهش یافت که به دنبال این موضوع، حساسیت به *P. infestans* در گیاهان تراریخت افزایش پیدا کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که ویرایش ژن *MAPKKKε* به‌طوری که تعامل آن با افکتور PexRD2 مختل گردد، موجب افزایش حساسیت به *P. infestans* می‌شود. این یافته بر این موضوع دلالت دارد که *MAPKKKε* نقش مهمی در مقاومت گیاه سیبزمینی به *P. infestans* دارد و لذا می‌توان از این ژن برای افزایش مقامت به بیماری بلایت سیبزمینی در برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

باد زدگی

سیبزمینی

کریسپر - کس ۹

Phytophthora infestans
StMAPKKKε

مقدمه

می‌شود (Nimchuk et al. 2003; Kishi-Kaboshi et al. 2010). هر دو مکانیسم دفاعی PTI و ETI از فرآیندهای مشابهی مانند تولید و انباشت ROS، افزایش میزان رونویسی ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سنتز متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی و تقویت اجزا دیواره سلولی با تولید کالوز و رسوب لیگنین‌ها سبب محدود نمودن پاتوژن و کاهش خسارت آن می‌شوند (Kishi-Kaboshi et al. 2010). با این حال، در گیاهان مکانیسم اول بیشتر توسط عوامل و مولکول‌های حفظ شده در جریان تکامل، فعال می‌شود، اما مکانیسم دفاعی ETI، به نژاد خاص پاتوژن مربوط بوده و اختصاصی عمل می‌کند (Dodds and Rathjen 2010).

آبشار MAP کیناز، یکی از آبشارهای مهم انتقال پیام در یوکاریوت‌ها می‌باشد که توسط عوامل مختلف زیستی و غیرزیستی و همچنین به وسیله مولکول‌های خاص برخی پاتوژن‌ها، فعال می‌شود و نقش مهمی در پاسخ به تنش‌ها در میزبان بازی می‌کند (Hamel et al. 2006; Neupane et al. 2019). در گیاهان، هر آبشار MAP کیناز، حداقل از سه پروتئین کیناز *MAPK*، *MAPKK* و *MAPKKK* تشکیل شده است که از نظر عملکرد به هم وابسته هستند (Mishra et al. 2006; Jing et al. 2017). تحقیقات نشان می‌دهند که این آبشار شامل برخی پروتئین‌های داخل سیتوپلاسم و داخل هسته مانند فاکتورهای نسخه‌برداری باشد (Rodriguez et al. 2010). در آبشار MAP کیناز، اعضای خانواده MAPK به‌عنوان آخرین جز آبشار، اختصاصی عمل می‌کنند. اعضای گروه MAPKKها، یک خانواده ژنی نسبتاً کوچک را تشکیل می‌دهند که به وسیله پروتئین‌های خانواده MAPKKKها فعال می‌شوند (Hashimoto et al. 2012). اعضا گروه ژن‌های MAPKKK نسبت به دو گروه دیگر، بزرگ‌تر و متنوع‌تر هستند و همچنین در بالادست آبشار کینازی قرار دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد که پروتئین‌های این گروه جز مهم آبشار MAPK باشند و در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی در گیاهان نقش داشته باشند (Hashimoto et al. 2012). در آبشار MAP کیناز، پروتئین‌های بالادست سبب فسفریلاسیون پروتئین‌های پائین دست شده و از این طریق آبشار کینازی فعال می‌شود. فسفریلاسیون پروتئین‌های MAP کیناز در جایگاه خاصی از موتیف‌های مربوطه صورت می‌گیرد (Frye et al. 2001).

گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی پیشرفته‌ای در برابر عوامل بیماری‌زا هستند (Van Schie and Takken 2014). این موضوع نشان دهنده درجه بالایی از سازگاری عوامل بیمارگر است تا بتوانند میزبان خاصی را انتخاب و بر سیستم دفاعی گیاه میزبان و همچنین سیستم دفاعی القا شده آن غلبه کنند. به نظر می‌رسد که پاتوژن‌های بیوتروف (قارچ و اوومیسیت) در انتخاب میزبان خاص خود انتخابی عمل می‌کنند (Van Schie and Takken 2014). این پاتوژن‌ها با میزبان خاص خود دارای ارتباطی بسیار دقیق هستند، به گونه‌ای که هر گونه تغییر در این تعادل، سبب اختلال در رابطه پاتوژن - میزبان می‌شود. به‌طور کلی، گیاهان دارای دو نوع سیستم دفاعی برای مقابله با پاتوژن‌ها هستند: سیستم دفاعی اول مبتنی بر شناسایی الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن (PAMPs) توسط پروتئین‌های دفاعی گیاه میزبان است که به آن ایمنی ناشی از PAMP و یا به اختصار PTI گفته می‌شود (Van Schie and Takken 2014). فعال‌سازی PTI در اثر حمله پاتوژن منجر به ایجاد یک سری از پاسخ‌های ایمنی شامل رسوب کالوز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، القاء رونویسی از ژن‌های دفاعی مانند: پپتیدهای ضد میکروبی، کیتینازها، گلوکانازها و فعال‌سازی آبشارهای پروتئین‌کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) می‌شود (Macho and Zipfel 2014). در مقابل، پاتوژن برای خنثی کردن مکانیسم PTI گیاه میزبان، مبادرت به تولید مولکول‌های افکتوری می‌کند تا بتواند امکان سازگاری در گیاه میزبان را افزایش دهد (Dou and Zhou 2012). گیاهان برای مقابله با ترفند جدید پاتوژن، دومین سیستم دفاعی خود را فعال می‌کنند که به کمک آن قادرند افکتورهای پاتوژن را توسط ژن‌های مقاومت (ژن R) شناسایی کنند. به این نوع از سیستم ایمنی گیاه در اصطلاح ایمنی القا شده توسط افکتور (ETI) گفته می‌شود. مکانیسم دفاعی ETI باعث واکنش‌های دفاعی سریع می‌شود که اغلب شامل مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده موضعی (واکنش فوق حساس HR⁹)

¹ Pathogen-Associated Molecular Patterns

² PAMP-Triggered Immunity

³ Mitogen-Activated Protein Kinases

⁴ Effector-Triggered Immunity

⁵ Hypersensitive Reaction

PexRD2 بیمارگر تیپ RXLR را تولید می‌کند که در تعامل با دومین کینازی ژن MAPKKKε سیبزمینی می‌باشد و در مسیر پیام‌رسانی وابسته به MAPKKKε دخالت می‌کند و به‌طور مستقیم در فعالیت MAPKK و MAPK تأثیرگذار است (King et al. 2007; Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2014).

خاموشی موقت (VIGS) ژن MAPKKKε در *benthamiana* *Nicotiana* مرگ سلولی القا شده توسط بیمارگرهای باکتریایی و قارچی را کاهش می‌دهد (Wang et al. 2017). کینگ و همکاران (King et al. 2014) نیز این نتایج را برای *Avr4/CF4* مربوط به بیمارگر *Cladosporium fulvum* و *AvrPto/Pto* مربوط به بیمارگر *Pseudomonas syringae* را تایید کردند. همچنین King et al. (2014) یک افکتور از گروه RXLR را از پاتوژن *P. infestans* شناسایی کردند که با پروتئین MAPKKKε برهم‌کنش نشان می‌دهد و فرآیندهای دفاعی گیاه وابسته به فعالیت این کیناز را مختل می‌کند. گزارش‌های متعددی وجود دارد که بسیاری از پروتئین‌های میزبان، نقش کمک‌کننده‌ای را در استقرار و بیماری‌زایی پاتوژن‌های خاصی بازی می‌کنند (Win et al. 2012). اگرچه گزارش‌های به نسبت بیشتری در مورد نقش موثر پروتئین MAPKKKε در جریان سیگنالینگ کیتین برای ایجاد مقاومت در گیاهان وجود دارد، با این حال نمی‌توان نقش کمک‌کننده پروتئین MAPKKKε را در بیماری‌زایی *P. infestans* از نظر دور داشت (King et al. 2014). بنابراین تغییر در ارتباط بین پروتئین MAPKKKε و افکتور *P. infestans* می‌تواند به روش شدن مکانیسم این ارتباط کمک کند.

مهندسی هدفدار ژنوم یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌های مهندسی ژنتیک برای مطالعه فعالیت ژن‌ها در گیاهان و بهبود ژنتیکی محصولات کشاورزی است. اساس فناوری‌های ویرایش ژنوم مبتنی بر عملکرد اندونوکلازهای مهندسی شده می‌باشد. نسل جدید و پیشرفته نوکلئازهای درگیر در ویرایش ژنوم، فناوری CRISPR/Cas9 است که از سیستم ایمنی موسوم به CRISPR نوع ۲ در *Streptococcus pyogenes* اقتباس شده است (Jinek et al. 2012). سیستم CRISPR/Cas9 می‌تواند به‌طور مؤثری جهش‌های هدفمند را بر اساس جفت شدن بازها بین یک راهنمای تک رشته‌ای مهندسی شده (sgRNAs) با ناحیه مکمل

پروتئین‌های MAPK هنگامی فعال می‌شوند که هر دو اسیدآمینو تیروزین و ترئونین در موتیف TEY یا TDY توسط پروتئینی از گروه MAPKK فسفریله شوند (Wu et al. 2014). همچنین پروتئین‌های MAPKK وقتی فعال می‌شوند که سرین و سرین/ترئونین در موتیف S/TXXXXXS/T به‌وسیله پروتئین‌های MAPKKK فسفریله شوند. پروتئین‌های MAPKKK نیز خود از طریق فسفوریلاسیون یا با تعامل فیزیکی با گیرنده‌ها فسفریله فعال می‌شوند (Jonak et al. 2002; Jing et al. 2017; Goyal et al. 2018).

در جریان حمله پاتوژن به گیاه میزبان، پاتوژن ضمن سرکوب سیستم ایمنی گیاه، به همکاری نزدیک برخی پروتئین‌های میزبان برای استقرار و بیماری‌زایی نیاز دارد. به چنین پروتئین‌هایی از میزبان که در خدمت پاتوژن قرار می‌گیرند پروتئین حساسیت و به ژن کدکننده آن ژن حساسیت (Susceptibility-gene: S-gene) اطلاق می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که جهش در این ژن‌ها و یا خاموش‌سازی آن‌ها سبب شود که پاتوژن یک پروتئین همکار در گیاه میزبان را از دست بدهد و از این‌رو نتواند به راحتی بیماری‌زایی ایجاد کند. اگرچه اکثر ژن‌های مقاومت (R-gene) غالب هستند، اما ژن‌های حساسیت از توارث مغلوب برخوردار هستند (Van Schie and Takken 2014). البته نباید از نظر دور داشت که اتصال یک MAPK با افکتوری از پاتوژن می‌تواند به این دلیل باشد که در اثر این تعامل، آبشار MAPK فعل شود که در نهایت سبب ایجاد مقاومت شود.

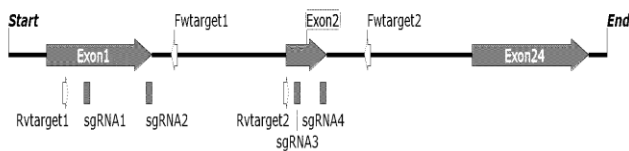
شبه قارچ *Phytophthora infestans* باعث ایجاد بادزدگی دیررس در سیب‌زمینی می‌شود (Andrivon 1996). این پاتوژن برای دستکاری میزبان خود، افکتورهایی را ترشح می‌کند که برخی از آن‌ها به سلول‌های میزبان منتقل می‌شوند (King et al. 2020; Naveed et al. 2014). یک گروه از این افکتورها در گروه افکتورهای درون سلولی مانند RXLR و Crinklers (CRN) قرار دارند که حاوی موتیف‌های انتهایی N بوده که برای انتقال به سلول‌های میزبان مورد نیاز می‌باشند (Du et al. 2015). افکتورهای RXLR بزرگ‌ترین کلاس از افکتورها هستند که تنها در پاتوژن‌های گیاهی اوومیست یافت می‌شوند (Du et al. 2015). اوومیست همی‌بیوتروفیک بیماری‌زای *P. infestans*، افکتور

توالی کامل CDS ژن *StMAPKKKε* به شماره دسترسی (XM_006366274.2) از پایگاه داده‌های NCBI و همچنین پایگاه اختصاصی سیب‌زمینی (<http://spuddb.uga.edu>) دریافت شد. چهار RNA راهنما کوچک (sgRNA) که ژن *StMAPKKKε* را در سر N آن هدف قرار می‌دهند، طراحی شدند (جدول ۱) (Liang et al. 2016).

جدول ۱- چهار توالی هدف ژن *StMAPKKKε* و سنجش کارایی آن‌ها با

sgRNA Scorer 2.0			ردیف
کارایی توالی (درصد)	توالی هدف (5'-3')	توالی PAM (5'-3')	
۶۹	AATTCGATCGGTTACCCGC	CGG	۱
۶۷	ATATTGTATCAAGCGTCT	TGG	۲
۶۸	GCTTATGGTCGAGTCTATAA	AGG	۳
۷۳	GGAGGATCTCAACGTCATTA	TGG	۴

اولین فهرست از sgRNAها با استفاده از CC-TopCRISPR/Cas9 Target Prediction Tool (Stemmer et al. 2015) ایجاد شد. محتوای sgRNA G+Cs با استفاده از ابزار وبسایت ENDMEM (<http://www.endmemo.com/bio/gc>) محاسبه شد. تا شدن sgRNAها با استفاده از وب سرور Mfold (Zuker 2003) و کارایی فعالیت sgRNAها پیش‌بینی شد (Chari et al. 2017). در نهایت چهار sgRNA طراحی شدند که sgRNAهای ۱ و ۲ در آزمون اول به‌عنوان یک جفت و sgRNAهای ۲ و ۳ به‌عنوان جفت دوم بر روی آزمون دوم ژن *StMAPKKKε* قرار داشتند (شکل ۱).



StMAPKKKε (XM_006366274.2)

شکل ۱- موقعیت sgRNAها، و آغازگرهای تکثیر PCR روی ژن

StMAPKKKε

به‌منظور بررسی توالی‌های غیر هدف از برنامه Cas-OFFinder (Bae et al. 2014) سرور (<http://www.rgenome.net/cas-offinder>) استفاده شد. ساخت سازه با استفاده از پلاسمیدهای

موجود در DNA هدف ایجاد نماید (Jinek et al. 2012). این ویژگی منحصر به فرد، این فناوری را به ابزاری بسیار آسان‌تر و کارآمدتر از ZFNs و TALENs برای دستکاری ژنوم تبدیل کرده است (Jiang et al. 2014). مهم‌تر از همه، با توجه به اختصاصی بودن کمپلکس نوکلئاز Cas9/sgRNA برای مکان‌های هدف، می‌توان به سادگی با طراحی انواعی از sgRNA از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک به ویرایش ژنوم مبادرت ورزید (Jiang et al. 2014).

مشابه گونه‌های گیاهی دیگر که در آن‌ها از فناوری CRISPR/Cas9 با موفقیت برای ویرایش ژن‌ها استفاده شده است، ویرایش ژن در سیب‌زمینی به‌وسیله این روش کارآمد است. به‌ویژه به این دلیل که توالی ژنوم دابل‌هپلوئید و RH دیپلوئید این گیاه دردسترس می‌باشد. بنابراین سیب‌زمینی یک گیاه ایده‌آل برای این نوع از سیستم ویرایش ژنوم است.

با توجه به اهمیت سیب‌زمینی و محدودیت کشت آن و همچنین اهمیت ژن *StMAPKKKε*، در این مطالعه از سیستم CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژن *StMAPKKKε* در سیب‌زمینی رقم آگریا و بررسی اثرات درون‌زای این ژن در آلودگی‌های قارچی استفاده شد. با توجه به اینکه ژن *StMAPKKKε* که از اجزای اساسی مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با ایمنی گیاه می‌باشد، انتظار می‌رود که اختلال در عدم برهمکنش لازم بین افکتور قارچ و پروتئین *StMAPKKKε* گیاه سیب‌زمینی سبب رفتار متفاوت گیاهان موات نسبت به پاتوژن قارچی *P. infestans* شود. در این مطالعه تأثیر این دستکاری ژنتیکی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم آگریا، از بخش تحقیقات سبزی‌های زراعی (مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج) تهیه شدند. در ابتدا سیب‌زمینی‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق جوانه‌های جانبی در محیط پایه جامد MS همراه با ویتامین‌ها کشت شدند و در دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی به مدت چهار هفته نگهداری شدند.

E. coli کلون و به *Agrobacterium tumefaciens* سویه AGL1 ترانسفورم شدند.

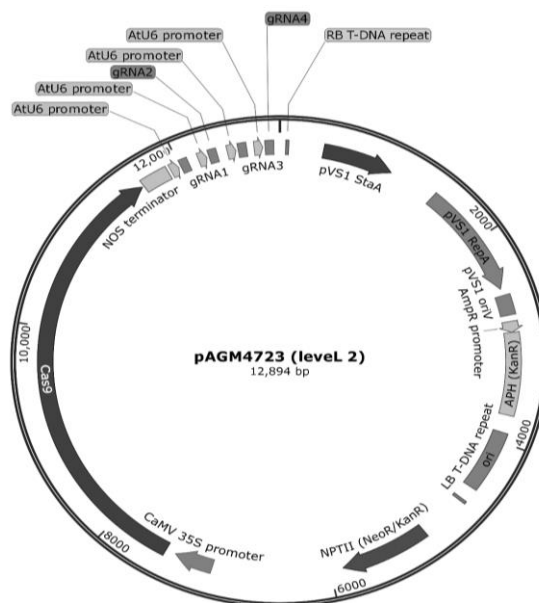
در ابتدا سیب زمینی‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق جوانه‌های جانبی در محیط پایه جامد MS همراه با ویتامین‌ها کشت شدند و در دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی به مدت چهار هفته نگهداری شدند. از گیاهان چهار هفته‌ای برای انجام ترانسفورماسیون استفاده شد. بدین منظور میانگروهایی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متری از ساقه‌های قطور و سبز گیاهان درون شیشه‌ای سیب‌زمینی تهیه و روی محیط MS برای دو روز کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت، ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری *A. tumefaciens* سویه AGL1 حاوی پلاسمیدهای مورد نظر غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط MS پایه در تاریکی کشت شدند. سپس به محیط باززایی MS حاوی هورمون‌های زاتین ریبوزاید (2mg/L)، NAA (0.01 mg/L)، GA3 (0.03 mg/L) منتقل شدند. این محیط کشت همچنین حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی بیوتیک کانامایسین، سفاتوکسیم و ونکومایسین بود. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار تا ظهور گیاهچه‌های مستقل به محیط تازه کشت منتقل شدند.

Addgene (به سفارش دانشگاه واخنینگن هلند) و به کمک فناوری گلدن‌گیت انجام گرفت (Weber et al. 2011; Engler et al. 2008). به‌طور خلاصه از پلاسمید pICH86966 به‌عنوان الگو و آغازگرهای عمومی (شکل ۲) برای سنتز چهار sgRNA استفاده شد.

```
TGTGGTCTCAATTCNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTITAGAGCTAGAAATAGCAAG
TGTGGTCTCAAGCGTAATGCCAACTTGTAC
```

شکل ۲- مشخصات آغازگرهای عمومی مورد استفاده برای تکثیر هر sgRNA، مکان برش (AATTC)، جایگاه شناسایی آنزیم (GGTCTC)، توالی کمک‌کننده به آنزیم (TGT)، حروف N توالی هدف و توالی سیاه مکمل پلاسمید الگو (pICH86966).

هر یک از چهار sgRNA و پروموتور U6-26 از وکتور pICSL01009، در داخل یکی از چهار ناقل سطح یک pICH47751، pICH47761، pICH47772 و pICH47781 و با استفاده از آنزیم برشی *BsaI* سرهم شدند. چهار ناقل سطح یک pICH47732 (دهنده ژن NPTII)، pICH47742 (دهنده ژن Cas9) و pICH41822 به‌عنوان پیوند دهنده در داخل ناقل دوگانه سطح ۲ pAGM4723 با استفاده از آنزیم *BpiI* (شکل ۳) ترکیب شدند (Werner et al. 2012). پلاسمیدها با استفاده از DH5α



شکل ۳- شمای کلی از وکتور نهایی برای ترانسفورم گیاه سیب‌زمینی

جدول ۲- لیست پرایمرهای استفاده شده به منظور Qpcr ژن *StMAPKKKε* و تکثیر توالی کناری sgRNAها

نام	توالی	هدف
FwTarget1	5'-AAACCTAAATCTCCGAAACG-3'	تکثیر توالی کناری جفت sgRNA اول
RvTarget1	5'- GAACCGGGCTTTGGTAAG-3'	تکثیر توالی کناری جفت sgRNA اول
FwTarget2	5'- GCAAAAATCTGTGCTATCAAG -3'	تکثیر توالی کناری جفت sgRNA دوم
RvTarget2	5'-GGATTGAAGATGCTTGGAG-3'	تکثیر توالی کناری جفت sgRNA دوم
FMapcD1	5'- GTGTTGAAGGAGGATGTAATAG -3'	qPCR
RMapcD1	5'- CCTCCTTGACGCTCTTGAC-3'	qPCR
RMapcD2	5'- AGAGGTAGACCGCTGAAG -3'	qPCR
FMapcD2	5'- TTGCTAACCGTGAATACC -3'	qPCR
FMapcD2	5'- ACTTCTGACAAGCTGATACA -3'	qPCR
FwElong	5'- ACAGTTCCAATACCACCAATCT-3'	qPCR
RvElong	5'- GTGTTGAAGGAGGATGTAATAG -3'	qPCR

همچنین توسط تجزیه و تحلیل منحنی تفکیک مشخص شد. به منظور نرمال سازی واریانس cDNA ورودی، مطابق گزارشات گذشته از ژن Elongation factor 1a (*elf1a*) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Nicot et al. 2005). به منظور آنالیز داده های داخلی از تفاضل میانگین چرخه آستانه (CT) ژن کنترل داخلی از میانگین CT ژن مورد نظر برای هر دو نمونه شاهد و تیمار، شاخص ΔCT در دو نمونه تیمار و شاهد به دست آمد و هم چنین از تفاضل دو ΔCT ، شاخصی تحت عنوان $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد و نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه تیمار و شاهد با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ تعیین شد (Livak and Schmittgen, 2001).

جدایه های قارچ *P. infestans* از مزارع سیب زمینی از مناطق سرخنکلاته و بندرگز استان گلستان انجام گرفت. جدایه های قارچ *P. infestans* در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد در محیط چاودار جامد و غده های سیب زمینی در تاریکی کشت شدند (Norouzi et al. 2021). پس از ۲ هفته، سطح میسیلیومها با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل غرق شد و در غلظت ۷۰ ژئوسپور در ماکرولیت رقیق شد. میسیلیومها به مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، برگ های جدا شده با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون در سمت زیرین تلقیح شدند. برگ های جدا شده در فوم فلورال در داخل جعبه های مرطوب

انتخاب گیاهان حامل حذف در ژن *StMAPKKKε* با استفاده از تجزیه و تحلیل محصول PCR با آغازگرهای در دو طرف جفت sgRNAها انجام شد (شکل ۱). مناطق هدف PCR با استفاده از آغازگرهای کنار دو جفت sgRNA تکثیر شدند (جدول ۲) (شکل ۱). گیاهان تراریخت به ترتیب از شماره M1 تا M35 نام گذاری شدند و گیاهانی که از یک نمونه بازایی شده بودند با اعداد صحیح بعد از خط تیره نام گذاری شدند.

استخراج RNA کل با استفاده از تریزول (Invitrogen آلمان) بر اساس شیوه نامه شرکت سازنده صورت گرفت. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو درآپ و کیفیت آن توسط ژل آگارز یک درصد تعیین شد. سنتز cDNA با استفاده RNA تیمار شده با آنزیم DNaseI و بر اساس روش شرکت سیناکلون (تهران، ایران) انجام شد. برای تجزیه و تحلیل پروفایل بیان ژن *StMAPKKKε*، از دو جفت آغازگر با دو تکرار تکنیکال در واکنش qRT-PCR انجام شد (جدول ۲). هر واکنش ۱۰ میکرولیتری با کمک مسترمیکس (Portugal Master Power Genall PCBR)، انجام گرفت. واکنشها با استفاده از سیستم micPCR version 2.10.5 با شرایط qPCR شامل دناتورسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. ویژگی تکثیر

¹ Cycle of threshold

بیمارگرهای باکتریایی و قارچی را کاهش می‌دهد (Melech- Bonfil and Sessa 2010). به منظور ویرایش ژن *StMAPKKKε* سیب زمینی با استفاده از روش CRISPR/Cas-9، به منظور کارایی بالا یک سازه با چهار gRNA ساخته شد. به منظور افزایش احتمال حذف در ناحیه بین دو gRNA و همچنین آنالیز آسان‌تر، هر دو gRNA نزدیک به هم طراحی شدند (Fu et al. 2013; Santillán Martínez et al. 2020). موقعیت چهار sgrNAs در توالی ژنومی ژن *StMAPKKKε* در شکل ۱ نشان داده شده است. از بین ۳۵ گیاه به ظاهر تراریخت (T0) دو گیاه حذف و اضافه قطعه و یک لاین از این گیاهان جهش یافته حذف قطعه مشاهده شد (شکل ۴).

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از چهار sgRNA برای جهش توسط فناوری CRISPR و انتخاب با استفاده از تکثیر PCR برای غربالگری حذف‌های قابل مشاهده (بزرگ) کارآمد بود. تجزیه و تحلیل مکان‌های مختلف هدف تفاوت در اثر بخشی چهار sgRNA را نشان داد، اگرچه هر چهار sgRNA بر اساس معیارهای دقیق یکسان مانند محتوای GC، ساختار ثانویه و نمرات جفت شدن پایه (جدول ۱) انتخاب شده بودند.

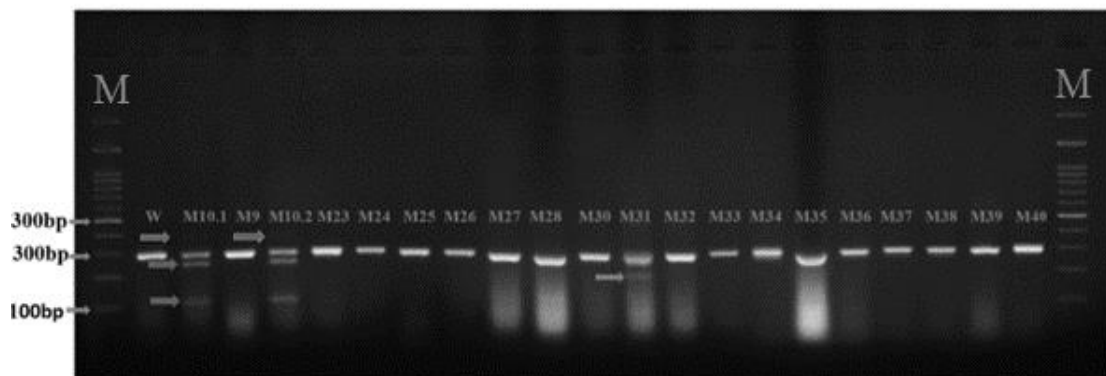
هیچ جهش قابل مشاهده‌ای (بزرگ) با PCR در نزدیکی محل هدف sgRNA1 و sgRNA2 یافت نشد، بنابراین در هدایت پروتئین Cas9 برای ایجاد شکستگی‌های دو رشته‌ای مناسب نبودند. هر پنج رویداد جهش توصیف شده، ناشی از برش دو رشته‌ای در محل‌های هدف هر دو sgRNA3 و sgRNA4 یافت شدند، زیرا حذف در موقعیت یا بین این موقعیت‌ها مشاهده شد.

قرار داده شدند. برای هر تکرار بیولوژیکی از سه برگ سه برگچه‌ای از دو گیاه مستقل استفاده شد. دوازده لکه روی هر برگ با سوسپانسیون زئوسپور تلقیح شدند و برای حفظ رطوبت بالا در یک کیسه پلاستیکی بسته قرار داده شدند. برگ‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقاومت بیماری در مقیاس ۱ تا ۱۰ برای هر برگچه تعیین شد. عدد ۱۰ بدون علامت بیماری، HR = ۹ بزرگ‌تر از قطره تلقیح نیست. ۸ ضایعه HR تا قطر ۰/۵ سانتی‌متر؛ ۷ ضایعات منتشر تا ۱ سانتی‌متر قطر، بدون اسپور، بدون خیساندن آب (no water soaking)؛ ۵ = ضایعات بزرگ‌تر از ۱ سانتی‌متر گاهی اوقات با خیساندن آب، بدون اسپور؛ ۴ ضایعات بزرگ آغشته به آب با اسپور که فقط از طریق بینکلر قابل مشاهده است؛ ۲ ضایعات بزرگ به‌طور ماکروسکوپی اسپورها روی یک طرف برگچه‌ها قابل مشاهده است؛ و ۱ = ضایعات بزرگ با اسپور به‌طور ماکروسکوپی در دو طرف برگچه قابل مشاهده بود.

نتایج و بحث

ویرایش ژن *StMAPKKKε*

King et al. (2014) یک افکتور نوع RXLR از *P. infestans* را شناسایی کردند که با *StMAPKKKε* (XM_006366274.2) برهم‌کنش نشان می‌داد و فرآیندهای مربوط به دفاع گیاه توسط فعالیت این کیناز را مختل می‌کرد. خاموشی موقت (VIGS) ژن *MAPKKKε* در *N. benthamiana* مرگ سلولی فعال شده توسط



شکل ۴- محصول PCR تعداد ۲۰ گیاه بازایی شده با جفت آغازگر Target2. باندهای کوچک‌تر و بزرگ‌تر نسب به رقم وحشی (W) به ترتیب نشان‌دهنده آله‌های موتانت داری قطعه حذف و اضافه (پیکان آبی) می‌باشند. M بیانگر نشانگر اندازه ۱ kb می‌باشد.

بنابراین، به نظر می‌رسد *sgRNA3* و *sgRNA4* بسیار کارآمدتر از *sgRNA1* و *sgRNA2* بودند. این کارایی بالا می‌تواند به خاطر فاصله خیلی نزدیک این دو *sgRNA* نیز باشد، با این حال، نمی‌توان با قطعیت در مورد عدم کارایی *sgRNA1* و *sgRNA2* قضاوت کرد، زیرا ممکن است عدم کارایی این *sgRNA*ها فقط به خاطر بررسی تعداد کم نمونه باشد. با وجود غربالگری مناسب برای انتخاب یک *sgRNA*، عدم کارایی بعضی از *sgRNA*ها در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است (Santillán Martínez et al. 2020). طراحی غلط *sgRNA*ها می‌تواند با ویرایش ژن‌های غیر هدف، باعث ایجاد انواع مشکلات مختلفی در سطح ژنومی، حذف‌های بزرگ و تغییرات ژنومی در موجود زنده شود که به ندرت می‌تواند نتیجه آن را به راحتی مشاهده کرد (Hu et al. 2018). توالی غیر هدف می‌تواند منجر به جهش‌های ژنتیکی کشنده شود که باعث از بین رفتن عملکرد ژن و ظهور فنوتیپ نامطلوب (حساسیت به بیماری) در گیاهان شود (Naveed et al. 2018; Nishimasu et al. 2020).

تجزیه و تحلیل موتانت‌ها

ژن *StMAPKKKε* در آرکیدوپسیس دارای دو ارتولوگ به نام‌های *AtMAPKKK6* و *AtMAPKKK7* می‌باشد و با پروتئین کیناز *MAP3K epsilon* گوجه‌فرنگی ۹۸ درصد شباهت دارد که یک ژن فوق حساس تنظیم کننده مثبت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و یک ژن مقاومت به بیماری مرتبط با باکتری‌های گرم منفی است (Melech-Bonfil and Sessa 2010). همچنین، ژن *MAPKKKε* در گیاه *N. benthamiana* (۹۳ درصد یکسانی) به عنوان ارتولوگ ژن *StMAPKKKε* می‌باشد که نقش آن در ایجاد آبشار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده اثبات شده است (Melech-Bonfil and Sessa 2010). ژن *StMAPKKKε* یک پروتئین بزرگ با ۱۴۰۱ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۵۴ کیلو دالتون است که دارای یک دومین کینازی در انتهای N (از اسید آمینه ۲۰ تا ۲۷۴) و دو ناحیه تکراری ARM (از اسید آمینه ۶۹۴ تا ۷۳۸ و از ۱۱۳۵ تا ۱۲۲۰) می‌باشد (King et al. 2014; Letunic et al. 2012). دومین کینازی *StMAPKKKε* به میزان ۱۰۰ درصد با دومین کینازی *SIMAPKKKε* گوجه‌فرنگی که یک تنظیم کننده مثبت مسیر سیگنالینگ ایمنی گیاه است و ۹۹ درصد با دومین کینازی

NbMAPKKKε1 و *NbMAPKKKε2* توتون همسانی دارد (Melech-Bonfil and Sessa 2010). برهم‌کنش بین دومین کینازی *StMAPKKKε* و *PexRD2* در مخمر به کمک هیبرید دوگانه مخمر نشان می‌دهد که دومین کیناز *StMAPKKKε* برای تعامل با *PexRD2* لازم و کافی است (King et al. 2014). بیان کامل *SIMAPKKKε* یا *SIMAPKKKε-KD1-332* مرگ سلولی مستقل از پاتوژن را در *N. benthamiana* فعال می‌نماید، بنابراین دومین کینازی فعال *SIMAPKKKε* برای فعال‌سازی این آبشار ضرورت دارد، به طوری که جهش *SIMAPKKKε-KD1-P-loop* از 332 (Lys49Arg) از فعال شدن مرگ سلولی مستقل از پاتوژن جلوگیری می‌کند (King et al. 2014; Melech-Bonfil and Sessa 2010). افکتور *PexRD2* مربوط به شبه قارچ *infestans*، با دومین کینازی *MAPKKKε* برهم‌کنش نشان می‌دهند (King et al. 2014) و به طور مستقیم فعالیت *MAPKK* و *MAPK* را مهار می‌کنند (King et al. 2014; Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2007). در این تحقیق تمام جهش‌های ارزیابی شده در آزمون شماره دو ژن *StMAPKKKε* سیب‌زمینی صورت گرفت که در برگ‌برنده دومین کینازی این ژن می‌باشد. حذف و اضافه صورت گرفته در گیاه شماره M10 سبب حذف ناحیه لیزین ۴۹ در دومین کینازی شد که باعث ناک‌اوت آل‌های جهش یافته می‌شود و این جهش در ژن *StMAPKKKε* حتی در صورت بیان این آل‌های جهش یافته این ژن توانایی تعامل با عامل بیمارگر *PexRD2* شبه قارچ *infestans* نمی‌باشد. با این حال برای اطمینان از این عدم تعامل بین پروتئین *StMAPKKKε* و *PexRD2* لازم است آزمایش‌های تکمیلی صورت گیرد. به منظور بررسی موتانت‌ها، باندهای تکثیر شده جداگانه تکثیر و توالی‌یابی شدند که نتایج توالی‌یابی جهش در منطقه بین *sgRNA3* و *sgRNA4* را تایید کرد (شکل ۵).

به منظور بررسی بیان ژن *StMAPKKKε* در گیاه موتانت شماره M10، از روش qRt-PCR با دو جفت آغازگر (*FMapcD1* و *FMapcD2*) و از روش qRt-PCR با دو جفت آغازگر (*FMapcD1* و *FMapcD2*) (جدول ۲) همراه با سه تکرار تکنیکال استفاده شد. نتایج بیان ژن نشان داد که میانگین تغییر بیان ژن با دو جفت آغازگر در گیاهان موتانت کاهش حدود ۷۲ درصدی بیان ژن هدف را نشان داد (شکل ۶).

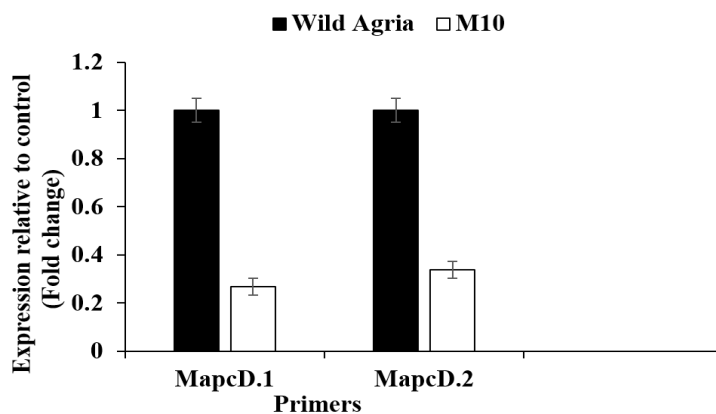
تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش حاصل از بیماری‌های قارچی مؤثر و ضروری می‌باشد (Wang et al. 2017). برگ‌های جدا شده از گیاهان چهارهفته‌ای با اسپورهای *infestans* *P.* تلقیح شدند. در روز پنجم بعد از تلقیح، رشد قارچ‌ها قابل مشاهده بود و داده برداری انجام شد. رشد قارچ در برگ‌های جدا شده جهش یافته بیشتر از گیاه تیپ وحشی به‌عنوان کنترل بود و شدت بیماری در گیاهان جهش یافته بیشتر از گیاه تیپ وحشی ارزیابی شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهند که ژن *StMAPKKKε* احتمالاً در پاسخ ایمنی گیاه به *P. infestans* دخالت دارد که می‌تواند آلودگی ایجاد شده توسط عامل بیماری‌زا را محدود کند. در تأیید یافته‌های این مطالعه، مطالعه ژن *MAPKKK* در گوجه‌فرنگی نشان داد که ژن *SIMAPKKKε* برای مرگ سلولی به پاسخ فوق حساسیت ضروری است و باعث مقاومت به پاتوژن‌های باکتریایی گرم منفی می‌شود (Melech- (Bonfil and Sessa 2010).

ارزیابی گیاهان موتانت پس از تلقیح با *P. infestans* در بین گیاهان ویرایش شده، فقط گیاه شماره M10-1 و M10-2 که هر دو از ریزنمونه شماره ده مشتق شدند (در واقع یک گیاه هستند) دارای چهار آلل، دو آلل حذف، یک آلل اضافه و وحشی بودند (شکل ۳). با توجه به اینکه هیچکدام از گیاهچه‌های باززایی شده دارای چهار آلل موتانت نبودند و مقایسه نسبت کمتر از ده درصد تعداد گیاهان باززایی شده به گیاهان باززایی شده برای ویرایش ژن *StNRL1* (داده‌های ویرایش این ژن در جای دیگر منتشر می‌شوند) که تمام شرایط کشت و باززایی، نمونه انتخاب شده و شرایط نگهداری آن‌ها یکسان بود، می‌توان نتیجه گرفت که ژن *StMAPKKKε* سیب‌زمینی در رشد گیاه دخالت دارد که این نتیجه‌گیری با مطالعات پیشین *StMAPKKKε* در برنج و همولگ این ژن (*MAPKKKε1/MAPKKKε2*) در آرابیدوپسیس همخوانی دارد (Wang et al. 2017; Chaiwongsar et al. 2012) این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن *StMAPKKKε* در توسعه و پاسخ به

```

Target  GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGT-----GGAGGATCTCAACGCATTATGG
Wild type GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGCTGGATTGGAAAAATGGAGACTTTGTAGCAATTAAGCAAGTTTCTCTGGAGAATATTGCTCAGGAGGATCTCAACGCATTATGG
M10.1.A  GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGCTGGATTGGAAAAATGGAGACTTTGTAGCAATTAAGCAA-----GTCATTATGG
M10.1.B  GCTTATGGTCGAGTC-----
M31      GCT-----ATAAAGGCTGGATTGGAAAAATGGAGACTTT-----|-----TCATTATGG
    
```

شکل ۵- توالی آلل‌های موتانت حذف A و B در گیاه شماره M10.1 و M31، Wild type رقم آگریا وحشی و Target توالی هدف ۳ و ۴ و سه باز GGT و TGG جایگاه PAM را نشان می‌دهند.



شکل ۶- تغییرات سطح رونویسی ژن *StMAPKKKε* گیاه موتانت شماره ۱۰ و گیاه وحشی (رقم آگریا) با دو جفت آغازگر (MapcD1,2)



شکل ۷- خاموش سازی به وسیله CRISPR-Cas9 در ژن *StMAPKKKε* منجر رشد گسترده *Phytophthora* روی برگ شد. (الف). رقم اگر یا به عنوان گیاه شاهد (ب) لاین جهش یافته M10 با سه آل جهش یافته (شکل ۶) که کاهش بیان آن حدود ۷۲ درصد ارزیابی شد. (WT).

به وسیله کیتین، سبب نتایج متفاوت شده است. در مورد قارچ *P. infestans* که در واقع یک شبه قارچ پارازیت اجباری از گروه اوومیسیتها فاقد کیتین در دیواره سلولی است، احتمالاً نقش فوق حساسیت پرنک تر باشد و گیاه با مرگ سلول از رشد بیشتر قارچ جلوگیری نماید، بنابراین این امکان وجود دارد که خاموش سازی *MAPKKKε* به عنوان عامل فعال کننده مرگ سلولی فعال شده توسط پاتوژن (فوق حساسیت) باعث حساسیت میزبان به پاتوژن گردد. در قارچهای پارازیت غیراجباری با توجه به اینکه مرگ سلولی مانع رشد آنها نمی شود و حتی ممکن است به بیماریزایی هم کمک کند، بنابراین آبخار MAPK القاء شده توسط کیتین بیشتر اهمیت دارد و احتمالاً با حذف دومین کینازی ژن *MAPKKKε* گیاهان تراریخت مقاومت بیشتری به این قبیل از پاتوژن نشان دهند. با این حال، این فرضیه باید با آزمایشهای تکمیلی مورد آزمایش قرار گیرد.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *MAPKKKε* نقش مهمی در پاسخ به آلودگی توسط قارچ *P. infestans* دارد، به طوری که در لاینهایی با کاهش بیان این ژن، میزان مقاومت به بیماری کاهش معنی داری پیدا کرد. نتایج این مطالعه می تواند استفاده از این ژن را برای برنامه های به نژادی سیب زمینی و سایر گیاهان با تکیه بر سیستم مقاومت PTI پیشنهاد دهد.

خاموش سازی ژن *SIMAPKKKε* گوجه فرنگی سبب حساسیت در برابر باکتری های *Xanthomonas scampetstri* و *Pseudomonas syringae* شد و منجر به ظاهر شدن علائم بیماری و افزایش رشد باکتری شد (Melech-Bonfil and Sessa 2010). علاوه بر این، خاموش کردن *NbMAPKKKε* در گیاه *N. benthamiana* به طور قابل توجهی از مرگ سلولی ناشی (القا) از بیان هم زمان ژن های R و عوامل بیمارگر مختلف جلوگیری می نماید (Melech-Bonfil and Sessa 2010).

ژن شبه گیرنده مرتبط با PRR، RLCK185 برنج (*Oryza sativa*) به یک کیناز سیتوپلاسمی *OsMAPKKKε* برای انتقال پیام از گیرنده PAMP یعنی ژن *OsCERK1* به آبخار پیام MAPK نیاز دارد. دومین ناقص انتهایی C (اسید آمینه های ۱۳۵۷-۷۶۹) *OsMAPKKKε* برای تعامل با *OsRLCK185* ضروری و کافی می باشد (Wang et al. 2017). بیش بیان و خاموش سازی *OsMAPKKKε* به ترتیب باعث افزایش و کاهش مقاومت به قارچ بلاست از طریق فعال کردن *MAPK3/6* القاء شده به وسیله کیتین می شود (Wang et al. 2017). نقش های متفاوت ژن *MAPKKKε* بیانگر دومین های و عملکرد متفاوت این ژن مثل دیگر ژن های گروه MAPKKK می باشد. همین نقش دوگانه این ژن در مقابل پاتوژن ها با فعال سازی مرگ سلولی از طریق فوق حساسیت و فعال سازی مسیر PAMP از طریق آبخار MAPK القاء شده

سپاسگزاری

INSF Foundation: انجام شده است بدین وسیله مراتب تشکر و سپاسگزاری اعلام می‌شود.

این پژوهش مستخرج از طرح ویرایش *MAPKKKε* به شماره ۹۶۰۱۲۱۵۶ می‌باشد که با حمایت مالی (Iran National Science

منابع

- Andrivon D (1996) The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* 45:1027-1035.
- Bae S, Park J, Kim JS (2014) Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30:1473-1475.
- Chaiwongsar S, Strohm A, Su S-H, Krysan P (2012) Genetic analysis of the Arabidopsis protein kinases MAP3Kε1 and MAP3Kε2 indicates roles in cell expansion and embryo development. *Frontiers in plant science* 3.
- Chari R, Yeo NC, Chavez A, Church GM (2017) sgRNA Scorer 2.0: A Species-Independent Model To Predict CRISPR/Cas9 Activity. *ACS synthetic biology* 6:902-904.
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11:539-548
- Dou D, Zhou J-M (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell host & microbe* 12:484-495
- Du Y, Mpina MH, Birch PRJ, Bouwmeester K, Govers F (2015) *Phytophthora infestans* RXLR Effector AVR1 Interacts with Exocyst Component Sec5 to Manipulate Plant Immunity. *Plant Physiology* 169:1975-1990.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS one* 3:e3647.
- Frye C, Tang D, Innes R (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:373-378.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology* 31:822-826.
- Goyal RK, Tulpan D, Chomistek N, González-Peña Fundora D, West C, Ellis BE, Frick M, Laroche A, Foroud NA (2018) Analysis of MAPK and MAPKK gene families in wheat and related Triticeae species. *BMC Genomics* 19:178.
- Hamel L-P, Nicole M-C, Sritubtim S, Morency M-J, Ellis M, Ehrling J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in Plant Science* 11:192-198.
- Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Okano Y, Shiraiishi T, Ishikawa K, Takinami Y, Yamaji Y, Namba S (2012) Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology* 12:03.
- Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina CM, Gao X, Rees HA, Lin Z, Liu DR (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* 556:57-63.
- Jiang W, Yang B, Weeks D (2014) Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Arabidopsis thaliana and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations. *PloS one* 9:e99225.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337:816-821.
- Jing T, Wang L, Liu H, Wuyun T-n, Du H (2017) Genome-Wide Identification of Mitogen-activated Protein Kinase Cascade Genes and Transcriptional Profiling Analysis during Organ Development in *Eucommia ulmoides*. *Scientific Reports* 7:17732.
- Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H (2002) Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:415-424.
- King S, McLellan H, Boevink P, Armstrong M, Bukharova T, Sukarta O, Win J, Kamoun S, Birch P, Banfield M (2014) *Phytophthora infestans* RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK? to suppress plant immune signaling. *The Plant Cell* 26:1345-1359.
- Kishi-Kaboshi M, Okada K, Kurimoto L, Murakami S, Umezawa T, Shibuya N, Yamane H, Miyao A, Takatsuji H, Takahashi A, Hirochika H (2010) A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *The Plant Journal* 63:599-612.
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue):D302-305.
- Liang G, Zhang H, Lou D, Yu D (2016) Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports* 6:21451.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402-408
- Macho A, Zipfel C (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* 54:263-272.
- Melech-Bonfil S, Sessa G (2010) Tomato MAPKKKε is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity. *The Plant Journal* 64:379-391.

- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 452:55-68.
- Naveed ZA, Wei X, Chen J, Mubeen H, Ali GS (2020) The PTI to ETI Continuum in Phytophthora-Plant Interactions. 11.
- Neupane S, Schweitzer SE, Neupane A, Andersen EJ, Fennell A, Zhou R, Nepal MP (2019) Identification and Characterization of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Genes in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plants (Basel, Switzerland)* 8:28.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56:2907-2914.
- Nimchuk Z, Eulgem T, Holt B, Dangl J (2003) Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annual Review of Genetics* 37:579-609.
- Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O (2018) Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361:1259-1262.
- Norouzi M, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Ahmadvand R (2021) In silico analysis and expression profile of potato MAPKKK gene family in response to abiotic and biotic stresses. (In Farsi).
- Rodriguez MCS, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:621-649.
- Santillán Martínez MI, Bracuto V, Koseoglou E, Appiano M, Jacobsen E, Visser RGF, Wolters A-MA, Bai Y (2020) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biology* 20:1-13.
- Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL (2015) CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PloS One* 10:e0124633.
- van Schie CC, Takken FL (2014) Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu Rev Phytopathol* 52:551-581.
- Wang C, Wang G, Zhang C, Zhu P, Dai H, Yu N, He Z, Xu L, Wang E (2017) OsCERK1-Mediated Chitin Perception and Immune Signaling Requires Receptor-like Cytoplasmic Kinase 185 to Activate an MAPK Cascade in Rice. *Molecular Plant* 10:619-633.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PloS One* 6:e16765.
- Werner S, Engler C, Weber E, Gruetzner R, Marillonnet S (2012) Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered* 3:38-43.
- Win J, Chaparro-Garcia A, Belhaj K, Saunders DGO, Yoshida K, Dong S, Schornack S, Zipfel C, Robatzek S, Hogenhout S, Kamoun S (2012) Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 77.
- Wu J, Wang J, Pan C, Guan X, Wang Y, Liu S, He Y, Chen J, Chen L, Lu G (2014) Genome-Wide Identification of MAPKK and MAPKKK Gene Families in Tomato and Transcriptional Profiling Analysis during Development and Stress Response. *PloS One* 9:e103032.
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou J-M (2007) A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* 1:175-185.
- Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, Ba H, Zhou J, Zhang Y (2012) Disruption of PAMP-Induced MAP Kinase Cascade by a *Pseudomonas syringae* Effector Activates Plant Immunity Mediated by the NB-LRR Protein SUMM2. *Cell Host & Microbe* 11:253-263.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406-3415.