ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحه ۱۲ - ۱

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- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری تخصصی، استاد، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

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

Norouzi M[1], Nazarian Firouz-Abadi F*[1], Ismaili A[1], Ahmadvand R[2]

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 میتوژن (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*، تنظیم کننده مثبت مرگ سلولی مرتبط با ایمنی در سلول‌های گیاهی می‌باشد. شبه قارچ *Phytophthora infestans* یک اوومیست 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 به‌نظر می‌رسدکه از آن به‌عنوان یک ژن حساسیت استفاده می‌کند. به‌منظور ایجاد جهش در ژن *MAPKKKε*، از یک سیستم CRISPR/Cas9، با بیان هم زمان چهار RNA راهنما (gRNA)، استفاده شد. تعداد ۳۵ لاین تراریخت به کمک سیستم CRISPR/Cas9، در جریان کشت بافت باززایی شدند که به‌ترتیب 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 ـ کَس ۹
Phytophthora infestans
StMAPKKKε

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

مقدمه

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. به‌نظر می‌رسد که پاتوژن‌های بیوتروف (قارچ و اوومیست) 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 اخلال 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[1]) توسط پروتئین‌های دفاعی گیاه میزبان است که به آن ایمنی ناشی از PAMP و یا به اختصار PTI[2] 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[3]) 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 کند. به این نوع از سیستم ایمنی گیاه در اصطلاح ایمنی القا شده توسط افکتور (ETI[4]) گفته می‌شود. مکانیسم دفاعی ETI باعث واکنش‌های دفاعی سریع می‌شود که اغلب شامل مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده موضعی (واکنش فوق حساس (HR[5]) 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 به‌وسیله 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 به‌هم 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 نسبتا کوچک را تشکیل می‌دهند که به‌وسیله 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، به‌نظر 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. فسفوریلاسیون پروتئین‌های MAP کیناز در جایگاه خاصی از موتیف‌های مربوطه صورت می‌گیرد (Frye et al. 2001).

[1] Pathogen-Associated Molecular Patterns
[2] PAMP-Triggered Immunity
[3] Mitogen-Activated Protein Kinases
[4] Effector-Triggered Immunity
[5] Hypersensitive Reaction

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

پروتئین‌های MAPK هنگامی فعال می‌شوند که هر دو اسیدآمینه 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. 2014; Naveed et al. 2020). 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 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. 2014; Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2007).

خاموشی موقت (VIGS) ژن *MAPKKKε* در *Nicotiana benthamiana*. 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 کمک کننده‌ای 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 کمک کننده 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 اندونوکلئازهای 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 RNA راهنمای تک رشته‌ای مهندسی شده (sgRNAs) با ناحیه مکمل

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

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 دابل‌هاپلوئید 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 اگریا و بررسی اثرات درونزای این ژن در آلودگی‌های قارچی استفاده شد. باتوجه 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 موتانت نسبت به پاتوژن قارچی *P. infestans* شود. در این مطالعه تأثیر این دستکاری ژنتیکی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

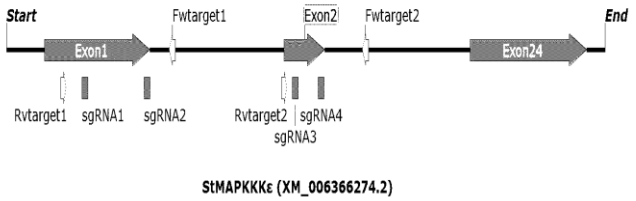
گیاهچه‌های سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم اگریا، از بخش تحقیقات سبزی‌های زراعی (مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج) تهیه شدند. در ابتدا سیب‌زمینی‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق جوانه‌های جانبی در محیط پایه جامد MS همراه با ویتامین‌ها کشت شدند و در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی به مدت چهار هفته نگهداری شدند.

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	توالی PAM (5'-3')	توالی هدف (5'-3')	کارایی توالی (درصد)
۱	CGG	AATTCCGATCGGTTCACCGC	۶۹
۲	TGG	ATATTTGTTATCAAGCGTCT	۶۷
۳	AGG	GCTTATGGTCGAGTCTATAA	۶۸
۴	TGG	GGAGGATCTCAACGTCATTA	۷۳

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



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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

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.

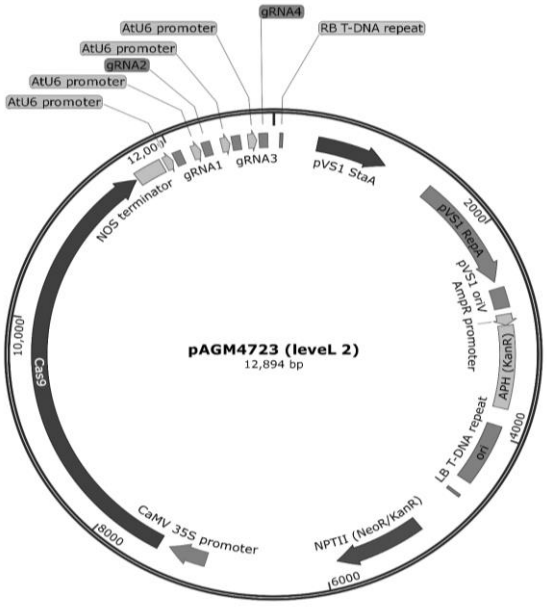
TGTGGTCTCAATTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

TGTGGTCTCAAGCGTAATGCCAACTTTGTAC

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

در ابتدا سیب‌زمینی‌ها در شرایط آزمایشگاهی از طریق جوانه‌های جانبی در محیط پایه جامد MS همراه با ویتامین‌ها کشت شدند و در دمای ۲۴±۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی به مدت چهار هفته نگهداری شدند. از گیاهان چهار هفته‌ای برای انجام ترانسفورماسیون استفاده شد. بدین منظور میانگره‌هایی 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 زآتین 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 هریک از آنتی بیوتیک کانامایسین، سفاتوکسیم و ونکومایسین بود. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار تا ظهور گیاهچه‌های مستقل به محیط تازه کشت منتقل شدند.



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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

جدول ۲- لیست پرایمرهای استفاده شده به‌منظور 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′- GCAAAATCTGTGCTATCAAG -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′- TTGCTAACCGTGGAATACC -3′	qPCR
FMapcD2	5′- ACTTCTGACAAGCTGATACA -3′	qPCR
FwElong	5′- ACAGTTCCAATACCACCAATCT-3′	qPCR
RvElong	5′- GTGTTGAAGGAGGATGTAATAG -3′	qPCR

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 به‌ترتیب از شماره M1 تا M35 نام‌گذاری شدند و گیاهانی که از یک نمونه باززایی شده بودند با اعداد صحیح بعد ازخط تیره نام‌گذاری شدند.

استخراج RNA کل با استفاده از ترایزول (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 دناتوره‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. ویژگی تکثیر همچنین توسط تجزیه و تحلیل منحنی تفکیک مشخص شد. به‌منظور نرمال‌سازی واریانس cDNA ورودی، مطابق گزارشات گذشته از ژن Elongation factor 1α (*elf*1α) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد (Nicot et al. 2005). به‌منظور آنالیز داده‌های qRT-PCR از تفاضل میانگین چرخه آستانه (CT)[1] ژن کنترل داخلی از میانگین CT ژن مورد نظر برای هر دو نمونه شاهد و تیمار، شاخص ΔCT در دو نمونه تیمار و شاهد به‌دست آمد و هم چنین از تفاضل دو ΔCT، شاخصی تحت عنوان ΔΔCT محاسبه شد و نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه تیمار و شاهد با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد (Livak and Schmittgen 2001).

جدایه‌های قارچ *P. infestans* از مزارع سیب‌زمینی از مناطق سرخنکلاته و بندرگز استان گلستان انجام گرفت. جدایه‌های قارچ *P. infestans* در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد در محیط چاودار جامد و غده‌های سیب‌زمینی در تاریکی کشت شدند (Norouzi et al. 2021). پس از ۲ هفته، سطح میسیلیوم‌ها با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل غرق شد و در غلظت ۷۰ زئوسپور در ماکرولیتر رقیق شد. میسیلیوم‌ها به مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، برگ‌های جدا شده با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون در سمت زیرین تلقیح شدند. برگ‌های جدا شده در فوم فلورال در داخل جعبه‌های مرطوب

[1] Cycle of threshold

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

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، ۹ = HR 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 اسپورکه 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.

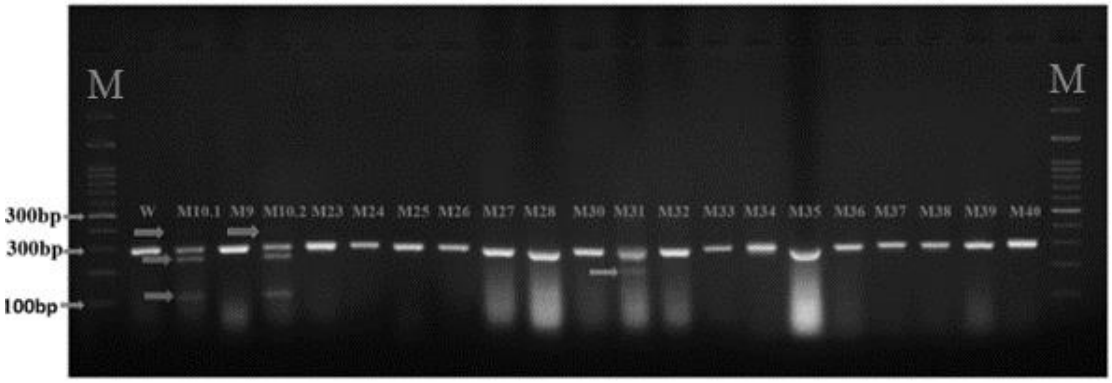
نتایج و بحث

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 بیمارگرهای باکتریایی و قارچی را کاهش می‌دهد (Melech-Bonfil and Sessa 2010). به‌منظور ویرایش ژن *StMAPKKKε* سیب‌زمینی با استفاده از روش CRISPR/Cas-9، به‌منظور کارایی بالا یک سازه با چهار gRNA ساخته شد. به‌منظور افزایش احتمال حذف در ناحیه بین دو gRNA و همچنین آنالیز آسان‌تر، هر دو gRNA نزدیک به‌هم 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 برای‌ایجاد 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.



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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

بنابراین، به‌نظر 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 sgRNAها فقط به‌خاطر بررسی تعداد کم نمونه باشد. با وجود غربالگری مناسب برای انتخاب یک sgRNA، عدم کارایی بعضی از sgRNAها در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است (Santillán Martínez et al. 2020). طراحی غلط sgRNAها 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. 2020; Nishimasu et al. 2018).

تجزیه و تحلیل موتانت‌ها

ژن *StMAPKKKε* در آرابیدوپسیس 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) به‌عنوان 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 اسیدآمینه با وزن مولکولی ۱۵۴ کیلودالتون 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 *SlMAPKKKε* 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 *SlMAPKKKε* یا *SlMAPKKKε-KD1*-332 مرگ سلولی مستقل از پاتوژن را در *N. benthamiana* فعال می‌نماید، بنابرین دومین کینازی فعال *SlMAPKKKε* برای فعال‌سازی این آبشار ضرورت دارد، به‌طوری که جهش P-loop *SlMAPKKKε-KD1*-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 *P. infestans*، با دومین کینازی *MAPKKKε* برهم‌کنش نشان می‌دهند (King et al. 2014) و به‌طور 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 اگزون شماره دو ژن *StMAPKKKε* سیب‌زمینی صورت گرفت که در برگیرنده 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 آلل‌های جهش یافته می‌شود و این جهش در ژن *StMAPKKKε* حتی در صورت بیان این الل‌های جهش یافته این ژن توانایی تعامل با عامل بیمارگر PexRD2 شبه قارچ *P. infestans* نمی‌باشد. با این حال برای اطمینان از این عدم تعامل بین پروتئین *StMAPKKKε* و PexRD2 لازم است آزمایش‌های تکمیلی صورت گیرد. به‌منظور 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).

به‌منظور بررسی بیان ژن *StMAPKKKε* در گیاه موتانت شماره M10، از روش qRt-PCR با دو جفت آغازگر (FMapcD1 و FMapcD1) و (FMapcD2 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) .

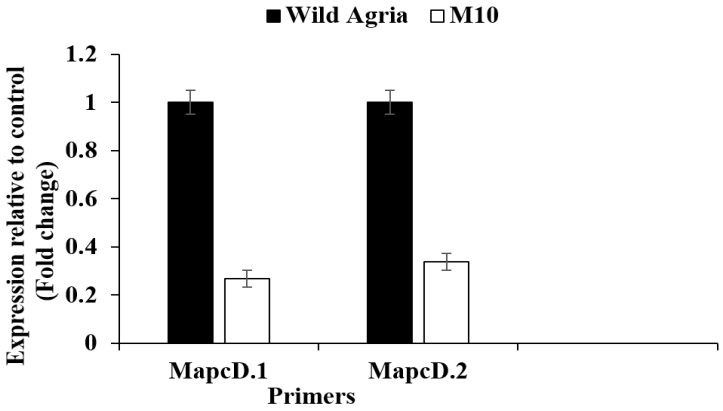
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

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) دارایی 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 بازایی شده به گیاهان بازایی 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 تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش حاصل از بیماری‌های قارچی مؤثر و ضروری می‌باشد (Wang et al. 2017).

برگ‌های جدا شده از گیاهان چهارهفته‌ای با اسپورهای *P. infestans* 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 گیان 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 تائید یافته‌های این مطالعه، مطالعه ژن MAPKKK در گوجه‌فرنگی نشان داد که ژن *SlMAPKKKε*، برای مرگ سلولی به پاسخ فوق حساسیت ضروری است و باعث مقاومت به پاتوژن‌های باکتریایی گرم منفی می‌شود (Melech-Bonfil and Sessa 2010).

```
Target     GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGT----------GGAGGATCTCAACGTCATTATGG
Wild type  GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGTCTGGATTTGGAAAATGGAGACTTTGTAGCAATTAAGCAAGTTTCTCTGGAGAATATTGCTCAGGAGGATCTCAACGTCATTATGG
M10.1.A    GCTTATGGTCGAGTCTATAAAGGTCTGGATTTGGAAAATGGAGACTTTGTAGCAATTAAGCAA----------GTCATTATGG
M10.1.B    GCTTATGGTCGAGTC----------
M31        GCT----------ATAAAGGTCTGGATTTGGAAAATGGAGACTTT----------TCATTATGG
```

شکل ۵- توالی آلل‌های موتانت حذف A و B در گیاه شماره M10.1 و M31، Wild type رقم اگریای 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 وگیاه وحشی (رقم اگریا) با دو جفت آغازگر (MapcD1,2)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]



شکل ۷- خاموش‌سازی به‌وسیله CRISPR-Cas9 در ژن *StMAPKKKε* منجر رشد گسترده *Phytophthora* روی برگ شد. (الف). رقم اگریا به‌عنوان گیاه شاهد (WT). (ب) لاین جهش یافته M10 با سه آلل جهش یافته (شکل ۶) که کاهش بیان آن حدود ۷۲ درصد ارزیابی شد.

خاموش‌سازی ژن *SlMAPKKKε* گوجه‌فرنگی سبب حساسیت در برابر باکتری‌های *Xanthomonas scampestri* 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* به‌طور قابل توجهی از مرگ سلولی ناشی (القا) از بیان هم زمان ژن‌های R و عوامل بیمارگر مختلف جلوگیری می‌نماید (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 آبشار پیام MAPK نیاز دارد. دومین ناقص انتهایی C (اسیدآمینه‌های ۱۳۵۷-۷۶۹) *OsMAPKKKε* برای تعامل با *OsRLCK185* ضروری و کافی می‌باشد (Wang et al. 2017). بیش بیان و خاموش‌سازی *OsMAPKKKε* به‌ترتیب باعث افزایش و کاهش مقاومت به قارچ بلاست از طریق فعال کردن *MAPK3/6* القاء شده به‌وسیله کیتین می‌شود (Wang et al. 2017). نقش‌های متفاوت ژن *MAPKKKε* بیانگر دومین‌های و عملکرد متفاوت این ژن مثل دیگر ژن‌های گروه MAPKKK می‌باشد. همین نقش دوگانه این ژن در مقابل پاتوژن‌ها با فعال‌سازی مرگ سلولی از طریق فوق حساسیت و فعال‌سازی مسیر PAMP از طریق آبشار MAPK القاء شده به‌وسیله کیتین، سبب نتایج متفاوت شده است. در مورد قارچ *P. infestans* که در واقع یک شبه قارچ پارازیت اجباری از گروه اوومیست‌ها فاقد کیتین در دیواره سلولی است، احتمالاً نقش فوق حساسیت پرنگ‌تر باشد و گیاه با مرگ سلول از رشد بیشتر قارچ جلوگیری نماید، بنابراین این امکان وجود دارد که خاموش‌سازی *MAPKKKε* به‌عنوان 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 نمی‌شود و حتی ممکن است به بیماریزایی هم کمک کند، بنابراین آبشار MAPK القاء شده توسط کیتین بیشتر اهمیت دارد و احتمالا 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.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که ژن MAPKKKε نقش مهمی در پاسخ به آلودگی توسط قارچ *P. infestans* دارد، به‌طوری که در لاین‌هایی با کاهش بیان این ژن، میزان مقاومت به بیماری کاهش معنی‌داری پیدا کرد. نتایج این مطالعه می‌تواند استفاده از این ژن را برای برنامه‌های به‌نژادی سیب‌زمینی و سایر گیاهان با تکیه بر سیستم مقاومت PTI پیشنهاد دهد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح ویرایش *MAPKKKε* به شماره ۹۶۰۱۲۱۵۶ می‌باشد که با حمایت مالی (Iran National Science INSF Foundation:) انجام شده است بدین‌وسیله مراتب تشکر و سپاسگزاری اعلام می‌شود.

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, Ehlting 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, Shiraishi 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]

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 Plant10:619-633.
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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-21]