مجله علمی شیلات ایران ۳۳(۳) ۵۷-۷۶ (DOI): 10.22092/ISFJ.2024.131834

مقاله مروری:

فناوری CRISPR-Cas در آبزی‌پروری: مطالعه مروری

محمود حافظیه*[۱]، سیدپژمان حسینی شکرابی[۲]، محمد اخوان بهابادی[۲]

*jhafezieh@yahoo.com

۱- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات ملی آبزیان آبهای شور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۳

چکیده

پیشرفت صنعت آبزی‌پروری با چالش‌های متعددی از جمله شیوع بیماری‌های عفونی و عوامل‌بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، کاهش بقاء، کاهش باروری، رشد آهسته، فرار ماهیان پرورشی به اکوسیستم‌های طبیعی و آلودگی‌های زیست‌محیطی مواجه است. امروزه استفاده از فناوری CRISPR-Cas به عنوان یک راه‌حل بالقوه برای حل این چالش‌ها از طریق ویرایش ژنوم یاد می‌شود. در فناوری CRISPR، آنزیم نوکلئاز ۹ (Cas9) ابزاری قدرتمند و کارآمد برای ویرایش مولکولی DNA جهت بروز صفات مطلوب در میزبان است. در این زمینه مطالعات متعددی بر گونه‌های مختلف آبزیان با هدف بررسی صفات مطلوب مرتبط با آبزی‌پروری شامل سرکوب ژن Myostatin (افزایش رشد سوماتیک بدن)، بیوسنتز اسیدهای چرب، تحریک رنگدانه‌سازی بدن و تولید ماهیان با استخوان‌های ریز بین‌عضلانی کمتر صورت گرفته است. در خصوص صفات وابسته به تولید مثل، از این تکنولوژی جهت مهندسی ژنتیک سلول‌های جنسی و تغییر جنسیت استفاده شده است. در زمینه بهداشت آبزیان این سیستم اصلاحی برپایه ژنوم، در مقیاس آزمایشگاهی با موفقیت توانسته است، ماهیانی مقاوم در برابر بیماری‌های عفونی به‌خصوص بیماری‌های ویروسی تولید کند. همچنین ویرایش ژن‌های مرتبط با پپتیدهای ضدمیکروبی به‌وسیله CRISPR-Cas9 می‌تواند سبب بهبود سیستم ایمنی ذاتی و افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماری‌های عفونی می‌شود. به طورکلی، استفاده از فناوری CRISPR-Cas یک رویکرد موثر برای دستکاری ژن‌های هدف و بهبود ویژگی‌های اقتصادی در گونه‌های مختلف آبزیان در راستای برنامه‌های اصلاح ژنتیکی است. این مطالعه مروری، تصویر جامعی از فناوری CRISPR-Cas و پتانسیل آن در ویرایش ژنوم برای هدف قرار دادن ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی در ماهیان جهت غلبه بر برخی محدودیت‌ها و چالش‌های پیشروی آبزی‌پروری پایدار ارائه می‌دهد.

لغات کلیدی: CRISPR، Cas9، آبزی‌پروری پایدار، ویرایش ژنوم، ژنتیک مولکولی

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

CRISPR یک واژه مخفف به معنای "تکرارهای پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای" (CRISPR)[1] است که از جدیدترین روش‌های ویرایش ژنوم در دنیا بعد از تکنیک انتقال ژن به‌شمار می‌رود، زیرا این روش توانست ژنوم موجود در هسته سلول را به طور مستقیم ویرایش کند (Ghouneimy *et al.*, 2022). تا پیش از تکنیک CRISPR، دانشمندان از روش انتقال ژن با انتخاب یک ویروس بی‌ضرر (ناقل)[2] جهت ویرایش ژن استفاده می‌کردند. البته این روش به‌نوبه خود خطرات بالایی داشت، زیرا یک ژن ناشناس درون یک ویروس ممکن است منجر به بروز بیماری‌های ناشناخته‌ای شود. اما سیستم CRISPR از آنزیم‌های نوکلئاز مختلفی (آنزیم Cas9) تشکیل شده است که این آنزیم‌ها می‌توانند DNA را از طریق یک RNA راهنما (gRNA) که قادر به تشخیص توالی خاص ژن است، برش دهند. در نتیجه این برش و ایجاد یک شکاف دو رشته‌ای در ژنوم هسته سلول، محققان می‌توانند DNA موجود را از طریق تغییر، حذف یا درج توالی‌های جدید ویرایش کنند (Bohara *et al.*, 2024).

یک تیم تحقیقاتی در ژاپن، اولین بار مکانیزم CRISPR را در باکتری *Escherichia coli* بیان کردند و در سال ۲۰۱۴ CRISPR به طور رسمی به جهان معرفی شد و دنیای ژنتیک را متحول کرد (Doudna and Charpentier, 2014). در باکتری‌ها، CRISPR به صورت یک سیستم دفاعی عمل می‌کند و این امکان را می‌دهد که اگر ویروس‌ها به آنها حمله کنند، باکتری‌ها از طریق سیستم CRISPR مناطق خاصی از DNA ویروس‌ها را شناسایی کنند و به آن متصل شوند و سپس باکتری‌ها از یک آنزیم نوکلئاز (متداول‌ترین آن به نام Cas9) برای برش و تغییر DNA بیگانه استفاده کرده و خطرات تکثیر ژنوم ویروس را خنثی کنند. در واقع، کارایی بالای سیستم CRISPR به‌خصوص آنزیم نوکلئاز ۹ (CRISPR-Cas9)، آن را به یک ابزار ویرایش ژن قوی در زمینه مهندسی ژنتیک در رشته‌های مختلف تبدیل کرده است (Ansori *et al.*, 2023).

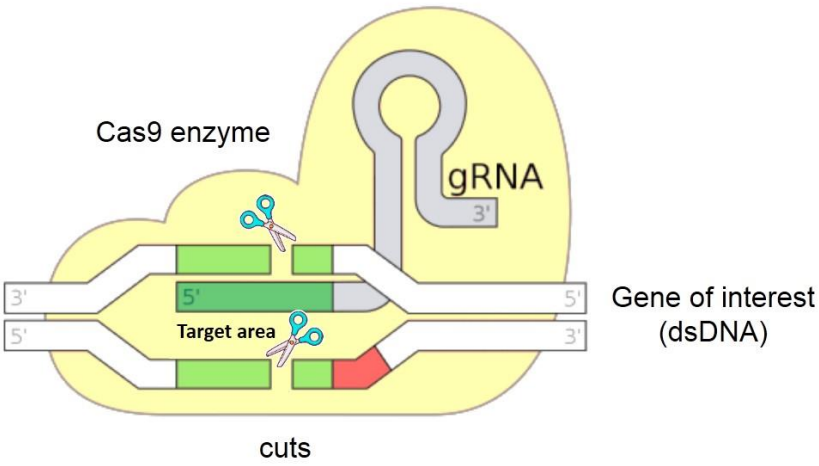
CRISPR به عنوان یک فناوری در مرز دانش، بسیار دقیق، سریع و کارآمد است و اجازه می‌دهد تغییرات ژنتیکی هدفمند (حذف، جایگزینی یا اضافه کردن توالی‌ها)، در DNA هسته سلول انجام شود که در نهایت سبب روشن یا خاموش کردن و حذف کارایی ژن یا ژن‌های هدف بدون افزودن یک پلی‌نوکلئوتید خارجی (ژن بیگانه) به ژنوم موجود می‌شود. به بیان دیگر، ویرایش ژن از طریق سیستم CRISPR-Cas، اجازه می‌دهد تا به طور مستقیم عملکرد ژن و تظاهرات صفت را از طریق تغییرات نقطه‌ای، حذف یا بازآرایی‌های ژنومی تحت کنترل درآورد (Lu *et al.*, 2021; Robinson *et al.*, 2024).

مطالعات متعددی تطبیق‌پذیری و پتانسیل فناوری CRISPR-Cas9 را در کاربردهای مختلف زیستی نشان داده‌اند. به طور کلی، فناوری CRISPR-Cas9 ویرایش ژنوم را متحول کرده و ابزاری همه‌کاره و کارآمد را برای اصلاح ژن در اختیار محققان قرار داده است. کاربردهای آن در تحقیقات پزشکی، کشاورزی، بیوانفورماتیک و بیوتکنولوژی، نویدبخش پاسخگویی به چالش‌های مختلف و در نهایت بهبود زندگی انسان خواهد بود. در صنعت کشاورزی سیستم CRISPR-Cas9 با اصلاح ژن‌های مربوط به مقاومت در برابر بیماری‌ها، بهبود عملکرد تولید و ارتقاء ارزش غذایی، یک رویکرد امیدوارکننده برای بهبود محصولات غذایی ارائه می‌کند (Chen *et al.*, 2019). بنابراین، فناوری CRISPR-Cas به‌خصوص استفاده از Cas9 می‌تواند جایگزینی برای روش‌های سنتی تولید محصولات کشاورزی باشد، اما استفاده از این فناوری باید با رعایت اصول زیست‌محیطی و تولید پایدار یا مسئولانه همراه باشد. البته تحقیقات تکمیلی باید در خصوص رعایت ملاحظات اخلاقی و ایمنی مرتبط با حیوانات و مصرف‌کنندگان این محصولات اصلاح ژنتیکی شده، انجام شود.

[1] Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)
[2] Vector

اصول کارکرد فناوری CRISPR-Cas

فناوری CRISPR-Cas یک ابزار قدرتمند ویرایش ژن است که از دو جزء اصلی تشکیل شده است: (۱) CRISPR: توالی‌های تکراری کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای (توالی‌هایی با قرارگیری به صورت هر دو جهت روی رشته‌های مکمل یکسان) با فاصله منظم و (۲) Cas: مخفف پروتئین‌های مرتبط با CRISPR بوده و شامل یک آنزیم نوکلئاز (معروف‌ترین آن به نام Cas9) است (شکل ۱).



شکل ۱: اجزاء سیستم زیستی CRISPR-Cas9. فناوری CRISPR-Cas9 شامل چندین جزء ضروری است که امکان ویرایش دقیق ژنوم را فراهم می‌کند. در مرحله اول، پروتئین Cas9 به عنوان یک قیچی مولکولی وارد هسته می‌شود و رشته‌های DNA را در مکان‌های خاص جدا می‌کند. در مرحله دوم، RNA راهنما (gRNA) به عنوان یک راهنمای مولکولی عمل می‌کند و اطلاعات توالی لازم برای هدف قرار دادن و اتصال به محل DNA مورد نظر (هدف) به Cas9 ارائه می‌دهد.

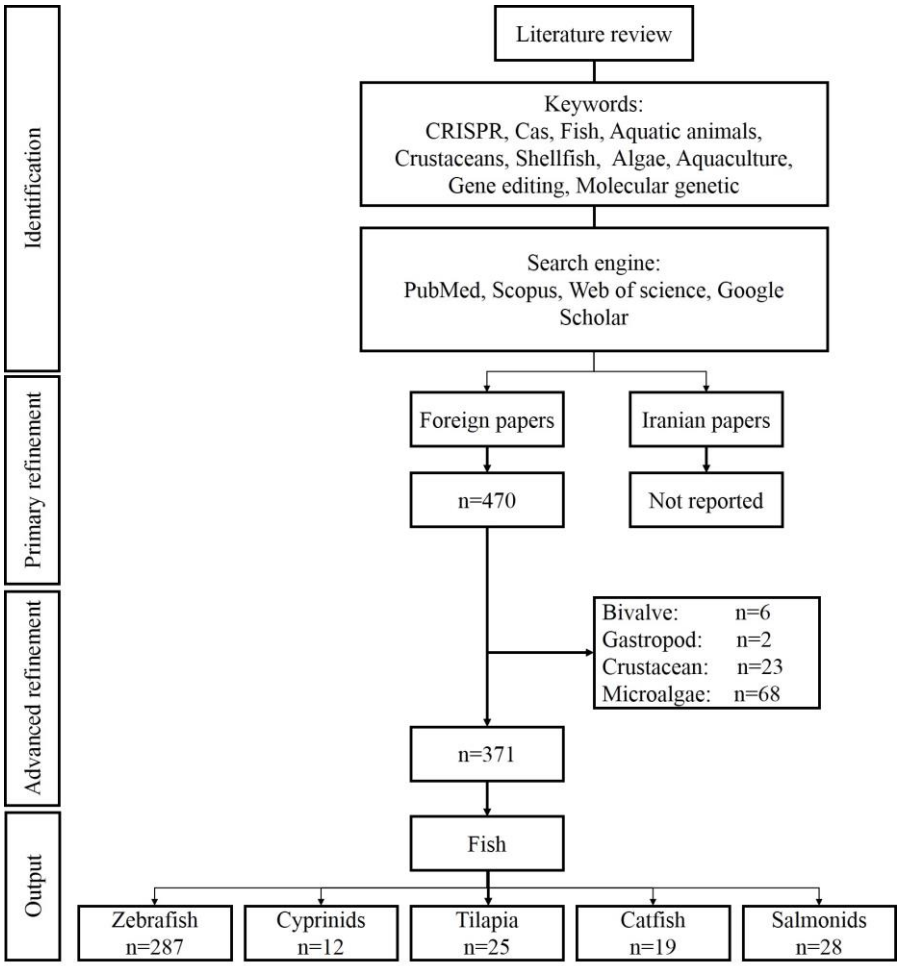
Figure 1: Components of CRISPR biological system with nuclease 9 (CRISPR-Cas9). The CRISPR-Cas9 technique includes several essential components that enable precise genome editing. In the first step, the Cas9 protein enters the nucleus as a molecular scissors and separates the DNA strands at specific locations. In the second step, the guide RNA (gRNA) acts as a molecular guide and provides Cas9 with the sequence information necessary to target and bind to the desired DNA site (target).

جزء CRISPR شامل توالی‌های مکرر کوتاه از DNA است که با توالی‌های فاصله‌دهنده منحصربه‌فرد پراکنده شده‌اند و به صورت طبیعی در بدن موجودات به عنوان خاطره‌ای از عفونت‌های ویروسی گذشته عمل می‌کنند. همچنین Cas9 آنزیم نوکلئازی است که به عنوان یک قیچی مولکولی عمل می‌کند و قادر به جدا کردن دو رشته DNA است. اجزاء CRISPR و Cas9 با هم به طور هماهنگ برای هدف قرار دادن و اصلاح توالی‌های خاص DNA کار می‌کنند (Mingarro and lí del Olmo, 2023; Richardson *et al.*, 2023). اگرچه به‌جز Cas9، از آنزیم‌های دیگر نیز می‌توان استفاده نمود. درون DNA هدف در نزدیکی نواحی متصل شونده CRISPR عموماً موتیف کوچکی به نام PAM[1] وجود دارد (ناحیه قرمز شده در شکل ۱). PAM یک توالی کوتاه و حفظ شده ۲-۵ جفت بازی است. سیستم CRISPR غالباً اهدافی که فاقد توالی PAM هستند، تشخیص نمی‌دهد. نکته کلیدی سیستم CRISPR-Cas9 در gRNA نهفته است، زیرا این RNA راهنما به‌گونه‌ای طراحی شده است که مکمل توالی DNA هدف باشد. gRNA به عنوان یک راهنمای مولکولی عمل می‌کند و Cas9 را به محل دقیق ژنوم که نیاز به اصلاح دارد، هدایت می‌کند. هنگامی که Cas9 به محل هدف می‌رسد، باعث ایجاد یک شکست در دو رشته DNA می‌شود.

[1] Protospacer adjacent motif

روش بررسی

این مقاله مروری بر کاربرد فنآوری CRISPR-Cas در آبزی‌پروری تمرکز دارد. در شکل ۲، خلاصه‌ای از معیارهای مرور پیشینه تحقیقات به صورت نمودار نشان داده شده است. از پایگاه‌های داده‌های علمی (WOS، Google Sccholar، PubMed و Scopus) با هدف جستجوی اولیه منابع برای تولید فهرست نهایی مقالات استفاده شد. در ارتباط با جستجوی اولیه منابع، عبارات جستجوی "CRISPR "، "مهندسی ژن"، "موجودات آبزی"، "آبزی‌پروری" و "ویرایش ژنوم" استفاده شد. کلیدواژه‌های انگلیسی "Gene editing"، "CRISPR-Cas"، "Gene targeting"، "CRISPR/Cas9"، "Gene Knock out"، "Genome editing"، "Genetic gngineering" و "Trasgentic" جهت جستجو استفاده شد. به‌علاوه، جهت تخصصی‌تر کردن جستجوها از سایر کلیدواژه‌های مرتبط شامل "Aquaculture"، "Sustainability"، " Transgenic AMPs"، "Fish" و "Shellfish" نیز استفاده شد.



شکل ۲: نمودار جریان نشان دهنده روش‌های جمع آوری مطالعات مربوط به استفاده از فناوری CRISPR-Cas در آبزیان است (منابع تا تاریخ می ۲۰۲۴ جستجو شده است).

Figure 2: The flow diagram shows the methods of collecting studies related to the use of CRISPR-Cas technology in aquatic animals (Sources have been searched until May 2024).

به طورکلی، همه مطالعات *in vitro* (مطالعات در شرایط آزمایشگاهی)، *in vivo* (مطالعات بر جاندارد زنده) یا *in silico* (روش‌ها یا پیش‌بینی‌ها با استفاده از رویکردهای محاسبات رایانه‌ای) که از فناوری CRISPR-Cas در موجودات آبزی استفاده کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. مطالعاتی که از این روش جهت ویرایش ژنوم در صدف‌ها، شکم‌پایان، سخت‌پوستان و ریزجلبک‌ها بود، از سایر مطالعات حذف شدند. بنابراین، معیار نهایی برای انتخاب مقالات، استفاده از این فناوری در ماهیان بود.

بحث

کاربرد CRISPR-Cas در ارتقاء عملکرد رشد و توسعه عضلات

فناوری CRISPR کاربردهای گسترده‌ای در آبزی‌پروری از جمله ویرایش ژن برای افزایش ارزش غذایی و بهبود کیفیت فیله (Kleppe *et al.*, 2022)، بهبود پاسخ‌های ایمنی (Elaswad *et al.*, 2018; Gratacap *et al.*, 2020)، بهبود باروری (Chu *et al.*, 2023) و ارتقاء عملکرد رشد (Zhong *et al.*, 2016) دارد. برنامه‌های بهبود ژنتیکی ممکن است دارای اهداف اصلاحی متعددی جهت بروز فنوتیپ مطلوب در آبزی‌پروری باشند. در این میان افزایش رشد و کوتاه شدن دوره رشد و افزایش توده عضلانی از صفات تجاری مهم بوده که از جایگاه ویژه‌ای در میان آبزی‌پروران برخوردارند. در این میان ژن‌های کد کننده هورمون‌های رشد و پروتئین Myostatin از طریق سیستم CRISPR قابل کنترل است. تکنیک ویرایش ژنوم با CRISPR برای افزایش نرخ رشد و توسعه عضلات با هدف قرار دادن ژن Myostatin (*mstn*) در چندین ماهی پرورشی تجاری به صورت موفقیت آمیز گزارش شده است (Hallerman, 2021; Roy *et al.*, 2022).

Myostatin یک پروتئین از خانواده پروتئین‌های عامل رشد-بتا (β-TGF) است که به‌وسیله سلول‌های ماهیچه‌ای یا میوسیت‌ها تولید و آزاد می‌شود که از رشد و حجم عضلانی بدن جلوگیری می‌کند و یک تنظیم‌کننده کلیدی رشد عضلات اسکلتی محسوب می‌شود (Sun *et al.*, 2020). فناوری CRISPR برای افزایش رشد عضلات با غیرفعال‌سازی ژن *mstn* در بسیاری از ماهیان پرورشی مانند کپور معمولی و گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*)، ماهی شانک، کفشک روغنی (*Paralichthys olivaceus*) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) با موفقیت عمل کرده است (Roy *et al.*, 2022). به‌تازگی، سیستم CRISPR-Cas9 با ایجاد اختلال هدفمند در ژن *mstn* سبب عدم بیان آن در ماهی سیم (*Pagrus major*) و باعث افزایش ۱۶ درصدی ماهیچه‌های اسکلتی و بهبود راندمان تغذیه شده است (Kishimoto *et al.*, 2018; Ohama *et al.*, 2020). به‌جز ژن *mstn*، سیستم CRISPR برای صفات مرتبط با رشد در ماهی پافر (*Takifugu rubripe*)با ایجاد اختلال در ژن گیرنده لپتین که اشتها را کنترل می‌کند، باعث شده است که اشتهاء ماهی‌ها بیشتر شود (Kishimoto *et al.*, 2018).

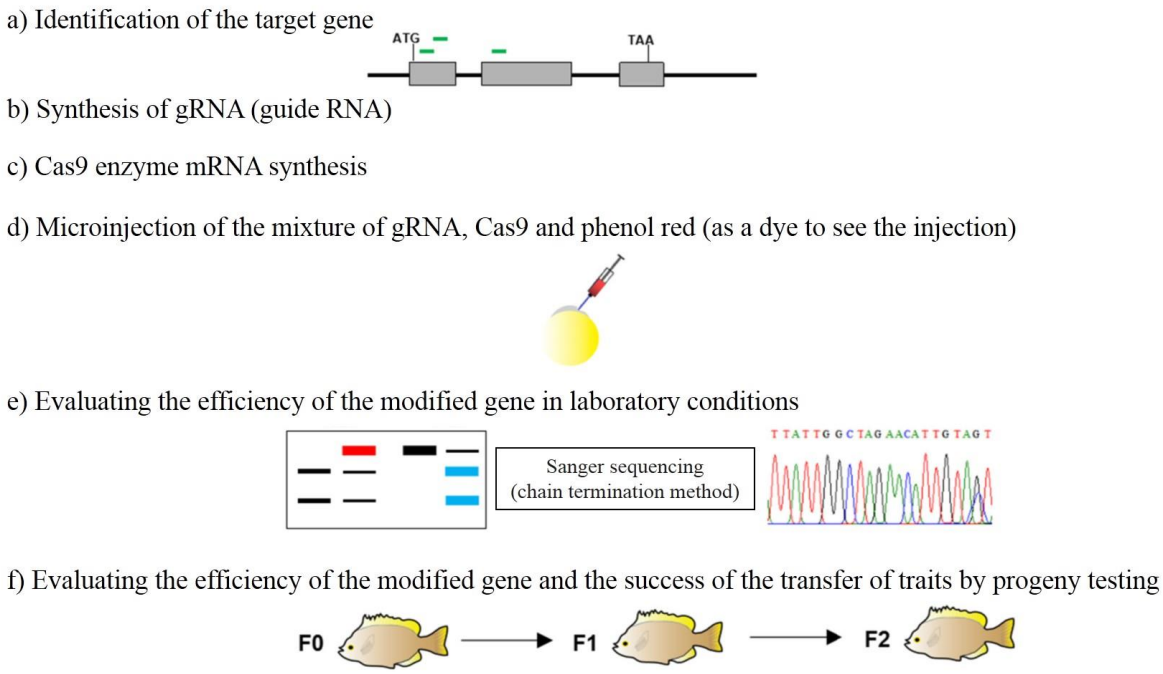
هورمون رشد (GH) و عامل رشد شبه انسولین (IGF) از تنظیم کننده‌های مثبت رشد در ماهیان هستند درحالی‌که پروتئین‌های اتصال دهنده IGF (*IGFBP*) به IGF متصل می‌شوند و به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی، رشد عضلات بدن را کنترل می‌کنند. از این‌رو، CRISPR-Cas9 برای اختلال در ژن *IGFBP-2b* در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جهت افزایش معنی‌دار نرخ رشد و توسعه توده عضلانی بدن استفاده شده است (Cleveland *et al.*, 2018). چنین رویکردهای ژنتیکی از طریق ویرایش ژنوم برای افزایش بهره‌وری مزارع پروشی، ممکن است وضعیت پایداری آبزی‌پروری را در آینده بهبود بخشد.

ویرایش ژن با واسطه CRISPR-Cas9 در پرورش تیلاپیا

ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)، یک ماهی استخوانی با جنس‌های جدا از هم بوده و دارای سیستم تعیین جنسیت XX/XY هستند. باتوجه به بلوغ زودهنگام (تقریباً ۵ ماه در شرایط اسارات)، این گونه ماهی یک مدل آزمایشگاهی مناسب برای مطالعات تعیین جنسیت و تولید مثلی است (Nafisi-Bahabadi and

Akhavan-Bahabadi, 2015). در آبزی‌پروری تیلاپیای نیل، جمعیت تمام نر به دلیل نرخ رشد و وزن‌گیری بالاتر نسبت به ماده به عنوان صفت برتر محسوب می‌شود. بنابراین، روش‌های تغییر جنسیت مختلفی مانند جداسازی دستی، دستکاری هورمونی، دستکاری کروموزومی (ماده زایی و نرزایی)، دورگه گیری درون گونه‌ای به‌کار گرفته می‌شود تا بچه ماهیان تمام نر تولید شوند (Farahmand *et al.*, 2015). همچنین محققان مختلفی اثرات استفاده از گیاهان اندروژنیک را در نرسازی ماهی تیلاپیا بررسی کرده‌اند. اگرچه درصد موفقیت نرسازی در این روش به نوع گیاه، ماده موثره، غلظت و مدت زمان تغذیه بستگی دارد، اما بازده نرسازی با این مواد طبیعی به صورت میانگین در مقالات مختلف ۸۵-۷۰ درصد گزارش شده است (Shekarabi and Akhavan-Bahabadi, 2024).

برای مدت طولانی، روش موثری (۱۰۰ درصدی) برای دستکاری ژنتیکی صفات تولیدمثلی در تیلاپیا ارائه نشده بود تا این‌که در سال‌های اخیر، سیستم CRISPR-Cas9 با ایجاد جهش‌هایی انتخابی در ژنوم تیلاپیا توانست نر سازی را القاء نماید (Li *et al.*, 2021). مراحل جهش ژنی در ماهی تیلاپیا با استفاده از CRISPR-Cas9 به صورت گام به گام شامل انتخاب محل هدف روی ژنوم، طراحی gRNA و استفاده از آنزیم Cas9 جهت برش (Cas9 به پیروی از gRNA، مکان مورد نظر روی دو رشته DNA را برش می‌دهد) در شرایط آزمایشگاهی، لقاح مصنوعی با روش ریز تزریقی و ارزیابی جهش زایی به صورت آزمایشگاهی و آزمون نتاج جهت بررسی موفقیت انتقال ژن اصلاح شده به نسل بعد، است (شکل ۳).



شکل ۳: مراحل روش کار اصلاح ژنوم تیلاپیای نیل با استفاده از CRISPR-Cas9 (اقتباس از Li *et al.*, 2021)

Figure 3: Nile tilapia genome editing procedure steps using CRISPR-Cas9 (adapted from Li *et al.*, 2021)

ویرایش ژنوم جهت بروز صفات تولیدمثلی مطلوب با استفاده از فناوری CRISPR

به‌جز روش‌های شوک‌دهی با عوامل فیزیکی و شیمیایی، استفاده از روش‌های هورمون تراپی خوراکی به‌وسیله هورمون‌های آندروژنیک یا شبه آندروژنی برای تولید مولدین قزل‌آلا ماده تغییر جنسیت یافته (نر XX) و نرسازی ماهیان به صورت مستقیم در صنعت کاربرد دارد (Mobini *et al.*, 2021). امروزه، ابزارهای ویرایش ژنوم

برای تولید جمعیت‌های مطلوب برای صنعت آبزی‌پروری و دوستدار محیط زیست، بسیار نویدبخش است. در این زمینه، مطالعات ویرایش ژنوم برای تغییر جنسیت به طور گسترده در ماهی زبرا یا گورخری (*Danio rerio*) و تیلاپیا با هدف قرار دادن ژن‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. البته مطالعات اندکی در خصوص گونه‌های دریایی نیز تاکنون انجام شده است. ژن‌های مرتبط با جنسیت در گونه‌های مختلف ماهیان شناسایی شده است (Akhavan-Bahabadi and Farahmand, 2011) و تا کنون ژن‌های *Sry* و *dmy/dmrt1bY* در ماهی مدکا ژاپنی (*Oryzias latipes*)، ژن *sdY* در قزل آلای رنگین کمان، ژن *amhy* در ماهی *Odontesthes hatcheri*، ژن *dnd1* در گربه ماهی راه راه (*Platydoras armatulus*)، ژن *gsdf* در ماهی تیلاپیا و ژن *dmrt1* در ماهی کفشک *Cynoglossus semilaevis* مورد ویرایش قرار گرفته است (Booncherd *et al.*, 2024; Mokrani and Liu, 2023). چندین مطالعه نشان داده است که از طریق خاموش کردن ژن‌های *gsdf* و *amhy* در تیلاپیای نیل، ژن‌های *Esr2a* و *Esr2b* در ماهی گورخری (Lu *et al.*, 2017) و ژن *cyp17a1* در ماهی کپور معمولی (Zhai *et al.*, 2022) منجر به تغییر جنسیت از حالت ماده به نر در ماهیان تیلاپیا و گورخری و تولید ماهیان کپور تمام ماده شده است.

درخصوص آبزی‌پروری ماهی تیلاپیا، روشی که به طور گسترده برای ایجاد جمعیت‌های تک جنس نر در صنعت استفاده می‌گردد؛ هورمون درمانی خوراکی (MT)[1] است (Nafisi-Bahabadi and Akhavan-Bahabadi, 2015). اما این رویکرد نگرانی‌هایی در خصوص احتمال ورود هورمون به آب و خطرات زیست‌محیطی آن را به‌همراه دارد (Shekarabi and Akhavan-Bahabadi, 2024). علاوه‌براین، مصرف‌کننده ممکن است تمایلی به خرید محصولات هورمون‌تراپی نشان ندهد. اگرچه تجویز خوراکی هورمون در ماهی تیلاپیا جهت نرسازی در سنین پایین (شروع تغذیه فعال) انجام شده و تحقیقات علمی نشان داده است که هورمون در بدن متابولیزه می‌شود و هیچ تجمعی در بدن ماهیان پروراری جهت مصرف ندارد. همچنین تغییر جنسیت با هورمون همیشه ۱۰۰ درصد نیست و می‌تواند با تغییر شرایط محیطی یا استرس تا حدودی قابل برگشت نیز باشد (Farahmand *et al.*, 2015) درحالی‌که روش CRISPR توانسته است با از کار انداختن ژن‌های مرتبط با تغییر جنسیت، جوامع تمام نر بدون بازگشت را تولید کند. برای مثال، جهش در ژن *gsdf* از طریق سیستم CRISPR-Cas9 در ماهی تیلاپیا XY (Jiang *et al.*, 2016) و YY (Chen *et al.*, 2018) منجر به برگشت کامل به ماده با تخمدان‌های فعال می‌شود درحالی‌که تلاقی ماده‌های کاذب *gsdf* YY (♀) بارور با نرها YY ممکن است یک روش بالقوه برای تولید جمعیت تمام نر بدون بازگشت باشد. با این‌حال، خصوصیات باروری با این ایجاد این تغییرات در ژنوم باید مورد آزمایش قرار گیرند. همچنین جهش در ژن‌های *foxl2* یا *cyp19a1a* منجر به تغییر جنسیت ماده به نر می گردد (Zhang *et al.*, 2017) و تلاقی نرهای کاذب XX (♂) *cyp19a1a* یا XX (♂) *foxl2* با ماده XX ممکن است، روشی بالقوه برای تولید جمعیت تمام XX باشد.

مدیریت بهداشتی مزارع با استفاده از فناوری CRISPR

استفاده از فناوری CRISPR-Cas9 در علوم شیلاتی بسیار جدید و نوپاست. از فناوری CRISPR-Cas9 به‌ویژه برای بهبود فعالیت‌های مرتبط با آبزی‌پروری، افزایش نرخ رشد و وزن بدن، بهبود سلامت ماهی و مدیریت ذخایر شیلاتی استفاده شده است (Liu *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2022). با مروری بر پیشینه تحقیقات انجام شده، CRISPR-Cas9 به عنوان ابزاری برای بهبود ژنتیکی ماهیان پرورشی در سیستم‌های آبزی‌پروری مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، Liu و همکاران (۲۰۱۹) از CRISPR-Cas9 برای معرفی صفات مطلوب آبزی‌پروری (مقاومت در برابر بیماری، بهبود نرخ رشد و افزایش تحمل به استرس) در ماهیان پرورشی تجاری مهم استفاده کردند. Li و همکاران (۲۰۲۱) به کاربرد موفقیت‌آمیز

[1] 17α-methyltestosterone (MT)

CRISPR-Cas9 در ماهی گورخری برای تولید زاده‌هایی با افزایش مقاومت به بیماری اشاره کردند. این فناوری همچنین پتانسیل مناسبی جهت کنترل گونه‌های مهاجم و جلوگیری از اثرات منفی آنها بر جمعیت ماهیان بومی و اکوسیستم طبیعی حاصل از فرار ماهیان پرورشی از طریق دستکاری‌های ژنتیک تولید مثلی افراد، ارائه می‌دهد. گونه‌های پرورشی مهاجم می‌توانند زیستگاه‌های طبیعی و تنوع زیستی ماهیان بومی را در معرض خطر قرار دهند. اما CRISPR-Cas9 می‌تواند برای اصلاح ژنوم ماهیان پرورشی با هدف کاهش موفقیت تولیدمثلی یا افزایش حساسیت آنها به عوامل محیطی طبیعی وارد عمل شود، اگرچه رویکردهای مبتنی بر CRISPR در آبزی‌پروری هنوز در مراحل اولیه تحقیقات است. علاوه‌براین، CRISPR-Cas9 با هدف قرار دادن و اصلاح ژن‌های مرتبط با حساسیت یا مقاومت به عوامل بیماری‌زای ویروسی، باکتریایی یا حتی انگلی می‌تواند سبب مقاومت به بیماری‌های عفونی در میزبان شود. با تقویت پاسخ‌های ایمنی ذاتی ماهیان، فناوری CRISPR-Cas9 ممکن است امکانات جدیدی را برای کنترل شیوع بیماری در محیط‌های پرورشی و ایجاد گونه‌های مقاوم به بیماری ارائه دهد. در تایید این سخنان، یک مطالعه پتانسیل CRISPR-Cas9 را برای تقویت سیستم ایمنی ماهی در برابر پاتوژن‌های ویروسی بیان کرده است (Li *et al.*, 2021).

علاوه بر این کاربردها، CRISPR به عنوان یک ابزار تشخیصی ارزشمند در زمینه بیماری‌های مهم در آبزی‌پروری، محققان تایلندی پیشگام توسعه ابزار تشخیصی مبتنی بر CRISPR برای تشخیص ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) هستند (Chaijarasphong *et al.*, 2019). تشخیص‌های مبتنی بر CRISPR معمولاً شامل جفت شدن آنزیم‌های مرتبط با CRISPR مانند Cas9، Cas12 و Cas13 با توالی اسید نوکلئیک هدف برای فعال کردن سیستم CRISPR است (Kaminski *et al.*, 2021). تشخیص‌های مبتنی بر CRISPR-Cas ممکن است پاتوژن‌ها را با حساسیت بالا و زمان کوتاه‌تر در مقایسه با روش های مرسوم PCR یا Realtime PCR شناسایی کند (Qi *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023).

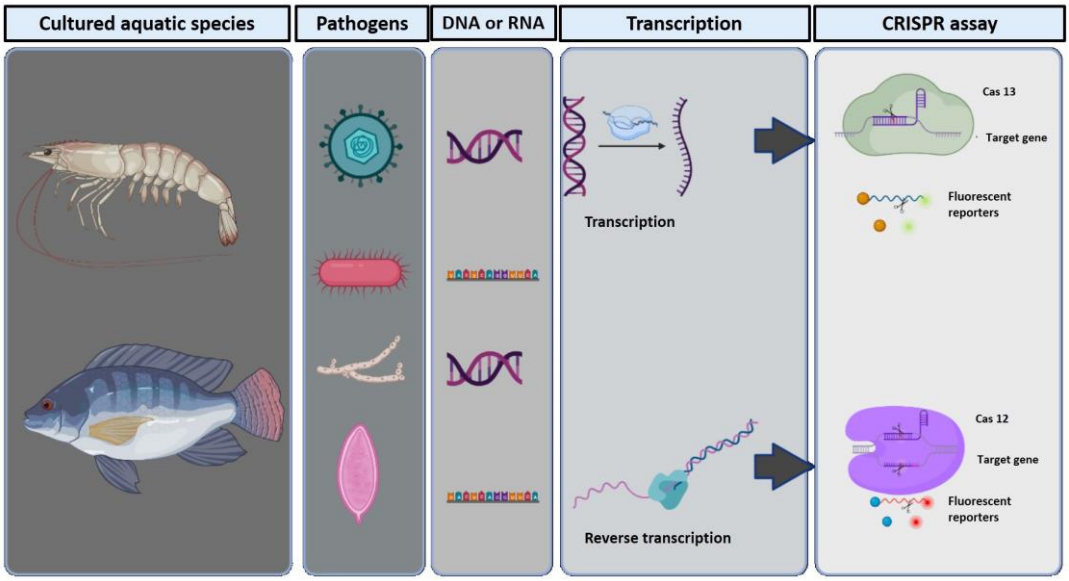
مدیریت کارآمد بهداشت و بیماری‌ها از طریق فناوری CRISPR-Cas مزایای متعددی برای صنعت آبزی‌پروری دارد به‌طوری‌که با استفاده از تکنولوژی CRISPR، به گونه‌های پرورشی دست یافته می‌شود که مقاومت بیشتری در برابر بیماری‌های عفونی شایع داشته باشند (Bohara *et al.*, 2024). با هدف قرار دادن ژن‌های خاص مرتبط با حساسیت به پاتوژن‌ها، سیستم CRISPR می‌تواند سبب بروز صفاتی شود که در نهایت سبب ایجاد مقاومت یا تحمل در برابر بیماری‌ها شود و نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی یا ضدعفونی‌کننده‌ها کاهش یابد. این امر باعث ترویج پایداری و شیوه‌های سازگار با محیط زیست در فعالیت‌های آبزی‌پروری خواهد شد.

طبق شکل ۴، سنجش‌های تشخیصی مبتنی بر CRISPR در آبزیان، شامل شناسایی سریع و دقیق پاتوژن‌ها از طریق بروز نشانگرهای فلوروسنتی است که تشخیص زودهنگام و اقدامات درمانی لازم را تسهیل می‌کند (Major *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024; Aiamsa-at *et al.*, 2024). در این میان، روش سنجش تشخیصی بیماری به‌وسیله CRISPR مبتنی بر Cas13، از حساسیت بالایی برخوردار است که در سال ۲۰۱۷ به‌ویژه برای شناسایی اهداف RNA ویروسی طراحی شده است (Gootenberg *et al.*, 2017).

سنجش‌های تشخیص بیماری مبتنی بر CRISPR شامل شناسایی توالی‌های اسید نوکلئیک منحصربه‌فرد پاتوژن‌هاست که امکان تشخیص دقیق و اختصاصی حتی در غلظت‌های پایین آلودگی به عوامل بیماری‌زا را در میزبان فراهم می‌کند (Tao *et al.*, 2023). علاوه‌براین، در بیماری‌های منتقله از طریق ناقلان آلوده به انسان (مالاریا یا ویروس Zika[1])، سیستم CRISPR برای کنترل بیماری، ناقلان آنها را (مانند پشه یا کنه) از طریق اصلاح ژنتیکی، تغییر دهد تا توانایی آنها را در انتقال عوامل بیماری‌زا کاهش دهد یا حتی متوقف کند

[1] نام یک ویروس از خانواده Flaviviridae است و ناقل آن پشه Aedes است.

(Gootenberg *et al.*, 2017). بنابراین، از این الگوهای موفق می‌توان برای ریشه‌کنی بیماری‌های عفونی در آبزیانی که به ناقل جهت تکمیل چرخه بیماری نیاز دارند، بهره برد.



شکل ۴: مکانیسم کلی کارکرد سیستم‌های مختلف تشخیص بیمارهای عفونی مختلف مبتی بر CRISPR-Cas (اقتباس از *Bohara et al.*, 2024)

Figure 4: General mechanism of various infectious disease detection systems based on CRISPR-Cas (adapted from Bohara *et al.*, 2024)

به طورکلی، فناوری CRISPR جزو ابزارهای همه‌کاره جدید برای مدیریت کارآمد بیماری‌ها در برنامه‌های مختلف آبزی‌پروری مطرح است که در نهایت سبب تحقق برنامه‌های امنیت زیستی مزارع و حفاظت از سلامت عمومی می‌شود.

فناوری CRISPR-Cas و پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs)[1]

نرخ جهانی بی‌سابقه رشد آبزی‌پروی همواره با استعمال گسترده و گاهی نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، برای جلوگیری از بیماری‌های باکتریایی ناشی از ضعف شرایط بهداشتی در سیستم‌های پرورش فوق متراکم، همراه بوده است (Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2021). این فرآیند منجر به ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در صنعت آبزی‌پروی و در نتیجه، بروز مقاومت آنتی‌بیوتیک در عوامل بیماری‌زای ماهی شده است (Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2021). ارتباط احتمالی ژن‌های مقاوم به عوامل بیماری‌زای جانوران آبزی و انسانی، منجر به پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های جدید، انتشار گسترده آنها و انتقال ژن‌های مقاومت به جانوران خشکی و جوامع انسانی می‌شود (Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2020a). پیش بینی می‌شود که مرگ‌ومیر جهانی در اثر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون برسد که این میزان بیشتر از تلفات ناشی از سرطان و بیماری‌هایی مانند دیابت است. بنابراین، رویکردهای مبتنی بر CRISPR با هدف قرار دادن و غیرفعال کردن ژن‌های مقاوم به پاتوژن‌های باکتریایی با مقاومت ضد میکروبی مبارزه می‌کند. این برش انتخابی و تخریب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با سیستم CRISPR-Cas، اثربخشی آنتی‌بیوتیک را بازیابی کرده و از گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری می‌کند. علاوه‌براین، با روش

[1] Antimicrobial peptides (AMPs)

تشخیص مبتنی بر CRISPR می‌توان به‌سرعت پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را شناسایی نمود و راهبردهای درمانی مناسب را به‌کار گرفت (Bohara *et al.*, 2024).

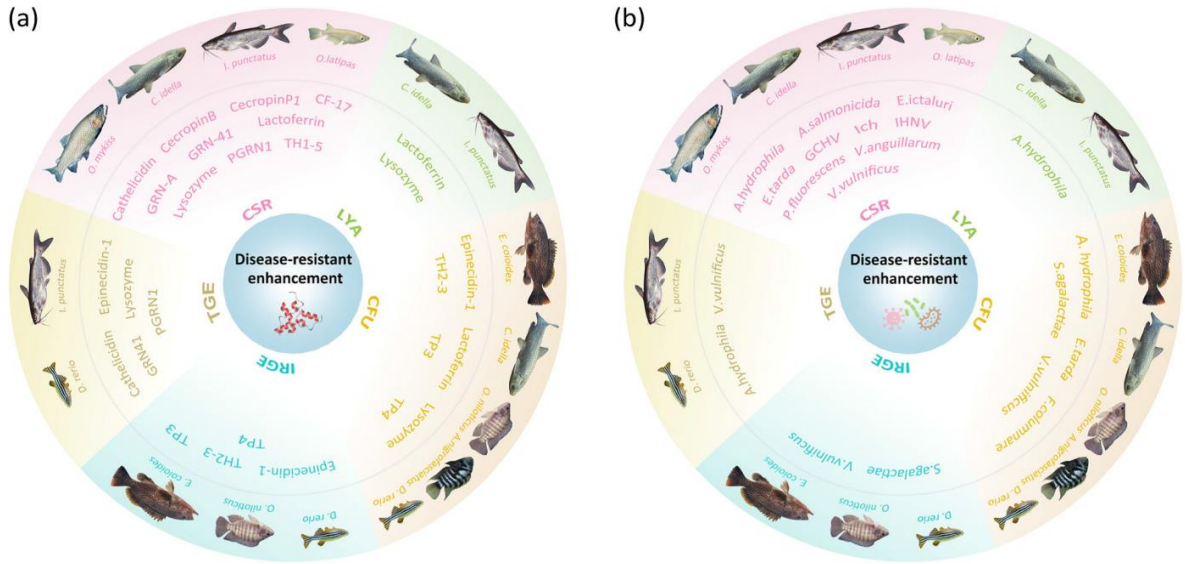
پپتیدهای ضدمیکروبی (AMPs) که به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان نیز شناخته می‌شوند (Akhavan-Bahabadi, 2020; Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2020b)، پپتیدهای کوتاه زنجیره، عموماً دارای بار مثبت و آبگریز هستند که در گستره وسیعی از اشکال زیستی از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها از جمله انسان یافت می‌شوند. این پپتیدها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی (تعدیل سیستم ایمنی، ضد فشار خون، ضد سرطان، آنتی اکسیدان، ضد انگل، ترمیم کننده زخم و ضد میکروبی) هستند. آنها همچنین اثرات ضد ویروسی قوی نسبت به ویروس‌های پوشش‌دار و بدون پوشش نشان می‌دهند (Akhavan-Bahabadi, 2020; Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2024).

با وجود ویژگی‌های منحصربه‌فرد AMPs از قبیل عمل انتخابی، ظرفیت کم برای ایجاد مقاومت ضد میکروبی و قابلیت تعدیل پاسخ ایمنی (Akhavan-Bahabadi *et al.*, 2020a)، امکان سنتز عظیم AMPs از نظر اقتصادی و فنی وجود ندارد. از این نظر، سنتز پپتیدهای نوترکیب در بدن میزبان عملی‌تر است و نیاز مبرمی به بهبود کیفیت و سطوح بیان برای جلوگیری از خاموش شدن ژن وجود دارد. فناوری CRISPR-Cas ممکن است قادر به غلبه بر آن یا به حداقل رساندن این موانع باشد (Valero *et al.*, 2020). لاین‌های سلولی با تولید AMPs با استفاده از CRISPR-Cas9 ایجاد شده است (Lo *et al.*, 2017). از این نظر، یک ژنوم اصلاح شده به‌وسیله CRISPR-Cas می‌تواند دارای توالی کدگذاری شده برای AMPs در منطقه مناسبی از DNA جهت بیان حداکثری باشد تا در نتیجه کمیت قابل قبولی از AMPs تولید شود (Valero *et al.*, 2020). از آن‌جایی‌که اصلاحات پس از رونویسی و پس از ترجمه می‌تواند منجر به کاهش کارایی بیان نهایی AMPs یا خاموش شدن آنها گردد، این مسیرها را نیز می‌توان با استفاده از فناوری CRISPR-Cas دستکاری نمود (Valero *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2024).

مطالعات قبلی نشان داده است که ویرایش ژن‌های مرتبط با تولید AMPs به‌وسیله CRISPR-Cas9 سبب تقویت سیستم ایمنی ذاتی ماهیان می‌شود. صرف نظر از نوع AMPs، AMPs تراریخته همراه با فعال شدن پاسخ‌های التهابی-ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا در نهایت نرخ مرگ‌ومیر را در کاهش می‌دهند (Wang *et al.*, 2023, 2024). اگرچه در مقایسه با عوامل بیماری‌زای باکتریایی، AMPs تراریخته مهار کمتری را در برابر ویروس‌ها و انگل‌ها در ماهیان ایجاد کرده‌اند (Wang and Cheng, 2024). در همین زمینه، Wang و Cheng (۲۰۲۴) براساس یک متا-آنالیز جدید، کاربردهای تکنیک ویرایش ژنوم با CRISPR-Cas9 را جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها در برخی ماهیان پرورشی تجاری در دو سری نمودار هیستوگرامی حاصل از ۲۳ مطالعه نشان دادند. در این مطالعه هشت گونه ماهی پرورشی، ۱۲ نوع بیماری و در مجموع ۱۵ ژن مرتبط با پپتیدهای ضد میکروبی بررسی شدند (شکل ۵).

بهبود کیفیت لاشه آبزیان با استفاده از فناوری کریسپر

استخوان‌های بین‌عضلانی، استخوان‌های ظریفی هستند که تقریباً تا نصف طول دنده‌ها در ماهی از سر تا دم توزیع شده است (Li *et al.*, 2013). این ساختارهای کوچک منجر به تأثیرات منفی متعدد بر بازده تولید فیله‌های بدون استخوان، ارزش غذایی و جراحت احتمالی در صورت قرار گرفتن در گلو یا دهان مصرف‌کننده می‌شوند (Nie *et al.*, 2020). در ماهیان استخوانی مانند کپور ماهیان، تعداد استخوان‌های بین‌عضلانی حدود ۱۶۹-۷۳ استخوان متغیر است و دارای پیچیدگی شدید در مورفولوژی ظاهری هستند (Yang *et al.*, 2019). به‌تازگی استفاده از فناوری‌های ژنتیک و شناسایی ژن‌های مرتبط با استخوان‌های بین‌عضلانی و ایجاد جهش هدفمند، توجه محققان را به تولید جمعیت ماهیان با استخوان‌های بین‌عضلانی کمتر جلب کرده است.



شکل ۵: خلاصه‌ای از کاربردهای اخیر تکنیک ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR-Cas9 برای افزایش مقاومت بیماری در ماهیان پرورشی تجاری درآبزی‌پروری با استفاده از ژن‌های مرتبط با پپتیدهای ضد میکروبی (Wang and Cheng, 2024). (a): ژن‌های مرتبط با پپتید ضد میکروبی مختلف (AMPs) و برخی از شاخص‌های ایمنی مرتبط با آنها و (b): انواع عوامل بیماری‌زاد و شاخص‌های ایمنی مورد بررسی با هریک از آنها. برای مثال، ویرایش ژنوم ماهیان کپور علفخوار و گربه ماهی کانالی در سنتز پپتیدهای ضد میکروبی لاکتوفرین و پپتیدهای مستخرج از لیزوزیم با ارزیابی فعالیت لایزوزیم (LYA) رهگیری شده است. IRGE، بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی؛ TGE، بیان ژن‌های پپتید ضد میکروبی با منشاء اگزوژن؛ CSR، نرخ بقاء تجمعی؛ CFU، واحد تشکیل‌دهنده کلونی باکتری‌ها

Figure 5: Summary of recent applications to increase disease resistance in commercial fish in aquaculture using genes related to antimicrobial peptides by genome editing technique with CRISPR-Cas9 system (Wang and Cheng, 2024). (a): Genes associated with different antimicrobial peptides (AMPs) and some immune-related parameters and (b): Different pathogens and immune-related parameters. For example, genome editing of grass carp and channel catfish has been detected in the synthesis of antimicrobial peptides of lactoferrin and peptides extracted from lysozyme by evaluating lysozyme activity (LYA). IRGE, the expression of immune-related genes; TGE, the expression of exogenous AMGs; CSR, cumulative survival rate; CFU, colony-forming unit of bacteria.

در این زمینه، استفاده از CRISPR-Cas9 جهت تغییر در ژن *runx2b* در ماهیان گورخری، سیم دریایی (*Megalobrama amblycephala*) و کاراس (*Carassius gibelio*) موجب تولید سویه‌های جدید فاقد استخوان‌های بین‌عضلانی، بدون به خطر انداختن شکل ظاهری و ساختار نگهداری کلی بدن گردید (Nie *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2023; Gan *et al.*, 2023). به طور مشابه، ایجاد تغییر در ژن *bmp6* (پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۶) در ماهی گورخری و ماهی حوض (*Carassius auratus*) با فناوری CRISPR-Cas9 منجر به جمعیت‌های عاری از استخوان‌های بین‌عضلانی بدون هیچ‌گونه اثرات نامطلوب بر رشد و تغییرات اسکلتی بدن شد (Kuang *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023). در آزمایش دیگری فعالیت ژن *scxa* در ماهی گورخری به‌وسیله فناوری CRISPR-Cas9 خاموش شد و یافته‌ها نشان داد که فراوانی استخوان‌های بین‌عضلانی به ۷۰ درصد در ماهیان جهش یافته بالغ کاهش یافت (Nie *et al.*, 2021). شایان ذکر است، تولید سویه‌های عاری از استخوان‌های بین‌عضلانی از طریق ابزارهای ویرایش ژنوم، یک پیشرفت مهم در مقایسه با فناوری‌های مختلف اصلاح ژن بوده و تحقیقات بیشتری برای استخراج ژن‌های کاندید مرتبط با این ویژگی و هدف قرار دادن سایر گونه‌های پرورشی مورد نیاز است.

در ماهیان، ژن‌های مرتبط با رنگ به عنوان یک صفت تجاری را می‌توان به چندین نوع از رنگدانه‌ها شامل ملانین، کاروتنوئیدها، پتریدین و پلاکت‌های گوانین مرتبط دانست (Eslamifar *et al.*, 2017). در میان این

رنگدانه‌ها، ملانین ممکن است به طور مستقیم یا غیرمستقیم به‌وسیله مکانیسم‌های مولکولی قابل کنترل باشد. برای درک مسیر بیوسنتز ملانین و سیگنال تنظیم‌کننده آن از طریق ژن تیروزیناز (*tyr*) و سایر ژن‌های همولوگ آن در ماهی، یک مطالعه با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 برای خاموش کردن ژن *tyr* در ماهی مدکا (*Oryzias latipes*) انجام شد که این اصلاح ژنوم منجر به قرمزی چشم‌های و سفیدی کامل بدن شد (Fang *et al.*, 2019). به طور مشابه، خاموش کردن ژن *tyr* سبب کاهش ملانین در پوست ماهی گورخری، ماهی حوض (*C. auratus*)، شمشیر ماهی و دلقک ماهی شد (Nakayama *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2024). یافته‌ها نشان داده است که یک ژن تنظیم‌کننده کلیدی در تکامل آلبینیسم در جمعیت‌های ماهی غار (*Astyanax mexicanus*) وجود دارد که ممکن است به دلایل محیط تاریک زیست این ماهی به طور طبیعی خاموش شود که البته قابل دستکاری ژنتیکی برای فعال‌سازی از طریق سیستم CRISPR است. شایان ذکر است، در برخی ماهیان پرورشی رنگ پوست بدن در بازار پسندی آن تاثیرگذار است (Eslamifar *et al.*, 2017). برای مثال، رنگ قرمز یا سیاه بودن پوست ماهی تیلاپیای نیل در مناطق مختلف دارای بازارپسندی و مقبولیت خاص خود است (Nafisi-Bahabadi and Akhavan-Bahabadi, 2015). در ماهی تیلاپیا، مطالعات متعددی برای بهبود صفت رنگ‌پذیری از طریق ابزار ویرایش ژنوم CRISPR انجام شده است. برای مثال، اختلال در ژن‌های *hps4* و *tyrb* منجر به کاهش بیوسنتز ملانین و ناپدید شدن کامل لکه‌های سیاه از پوست تیلاپیای نیل قرمز تمام نر شده است (Lu *et al.*, 2022a,b; Wang *et al.*, 2022a). علاوه‌براین، نرخ جهش بالا در ژن‌های *pmelb* و *pmela* منجر به از بین رفتن ملانوفورهای بیشتر و افزایش زانتوفورها (از نظر تعداد و اندازه) در پوست ماهیان تیلاپیا شده است (Wang *et al.*, 2022b).

محققان تلاش کردند تا روش‌های بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs) را در ماهیان به دلیل اهمیت و فواید آنها برای سلامت مصرف‌کنندگان، شناسایی کنند. در همین راستا، استفاده از ابزارهای ویرایش ژن مانند CRISPR-Cas9 می‌تواند میزان سنتز اسیدهای چرب دلخواه در بدن موجود را بهبود دهند. برای مثال، ژن *elovl2* یک تنظیم‌کننده اصلی در رونویسی بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع در فیله ماهی آزاد اقیانوس اطلس است و خاموش کردن این ژن با سیستم CRISPR در ماهی آزاد اقیانوس اطلس تغذیه شده با جیره‌ای دارای مقادیر پایین و بالای اسیدهای چرب غیراشباع برای ۵۶ روز، به‌ترتیب سبب کاهش اسید چرب دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و افزایش تجمع اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره در کبد، مغز و عضله سفید شد (Datsomor *et al.*, 2019 a, b).

هم‌سو با گزارش‌های مبتنی بر کاربرد سیستم CRISPR-Cas9 در تغییر محتویات اسیدهای چرب بدن ارگانیسم‌های آبزی، یکی از مدل‌های موفق ریزجبک‌ها هستند. صرفاً جهت یک اشاره کوتاه، تحقیقات نشان داده است، اگرچه تغییر الگوی پروفایل اسیدهای چرب در ریزجلبک‌ها به‌صورت سنتی با تغییر مواد موجود در محیط کشت آنها انجام می‌شود (Sabzi *et al.*, 2021; Shekarabi and Mehrgan, 2021)، اما امروزه سیستم CRISPR-Cas9 توانسته است که تولید اسیدهای چرب اشباع برای مصارف سوخت زیستی یا اسیدهای چرب غیراشباع را برای مصارف دارویی در ریزجلبک‌ها تغییر دهد (Tanwar and Kumar, 2020; Kukreja *et al.*, 2021)، زیرا روش‌های سنتی کارایی به نسبت پایین‌تری دارند و همواره احتمال ورود مواد شیمیایی به محیط زیست وجود دارد.

نتیجه‌گیری

فناوری CRISPR-Cas چشم‌اندازهای هیجان‌انگیزی را برای تحقیقات علوم شیلاتی به‌خصوص آبزی‌پروری ارائه می‌دهد. اگرچه استفاده از فناوری CRISPR-Cas در علوم شیلاتی هنوز در مراحل اولیه است و هیچکدام از کاربردهای آن تا به امروز وارد صنعت نشده است. مطالعه حاضر به تشریح فناوری CRISPR-Cas به عنوان یک ابزار قدرتمند جهت ویرایش ژنوم پرداخته است. جنبه‌های

مختلف این فناوری و کاربردهای آن نیز بررسی شد. با این‌حال، به رغم کاربردهای نویدبخش فناوری مبتنی بر CRISPR در بهبود عملکرد رشد و افزایش عضله‌سازی، تولید جمعیت تک‌جنس، تشخیص بیماری‌های آبزیان و تولید جمعیت‌های مقاوم به بیماری، تحقیقات مرتبط و تکمیلی در این حوزه‌ها نیاز است. همچنین تحقیقات آینده باید تجزیه‌وتحلیل‌های مرتبط با سود و هزینه را برای آبزی‌پروران علاقه‌مند به استفاده از فناوری CRISPR در زمینه‌های مختلف در اولویت قرار دهد تا ملاحظات مالی در کنار کارآمدی بالای این روش، در نظر گرفته شود. تحقیقات و ارزیابی‌های بیشتری برای ارزیابی ایمنی، ملاحظات اخلاق و رفاه آبزیان و اثرات بالقوه اکولوژیک این روش نیز مورد نیاز است. پیشنهاد می‌شود، چارچوب‌ها و دستورالعمل‌های نظارتی، اخلاقی، ایمنی و محیط زیستی جهت به‌کارگیری از فناوری CRISPR-Cas ایجاد شود تا از استفاده مسئولانه و اخلاقی این روش در علوم شیلاتی اطمینان حاصل شود. امید است تحقیقات مستمر و استفاده مسئولانه از فناوری CRISPR-Cas در صنایع شیلاتی بتواند راه را برای دستیابی به شیوه‌های آبزی‌پروری پایدار، هموارتر نماید.

منابع

Aiamsa-at, P., Sunantawanit, S., Chumroenvidhayakul, R., Nakarin, F., Sanguanrat, P., Sritunyalucksana, K. and Chaijarasphong, T., 2024. A novel dual CRISPR-Cas assay for detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp without false positives from its endogenous viral elements (EVEs). *Aquaculture*, 741452.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2024.741452

Akhavan-Bahabadi, M. and Farahmand, H., 2011. Genes involved in sex determination and differentiation in teleosts. The 7th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran. 12-14 Sep 2011. Tehran, Iran.

Akhavan-Bahabadi, M., 2020. Fish-derived antimicrobial peptides (AMPs): promising and novel candidates as potential therapeutic molecules for the preventing and treatment of Covid-19. Fourth International Fisheries and Aquatic Research Congress, 18-20. November 2020. Tehran, Iran.

Akhavan-Bahabadi, M., Paknejad, H., Habibi Rezaei, M., Hedayati, A. and Moghimi, H., 2021. Screening of epidermal mucus from *Neogobius fluviatilis pallasi* for finding antimicrobial peptides. *Aquatics Physiology and Biotechnology*, 8(4):93-114.
DOI:10.22124/JAPB.2021.15917. 1371. (In Persian)

Akhavan-Bahabadi, M., Paknejad, H., Hedayati, A. and Habibi Rezaei, M., 2020a. Identification and purification of antibacterial peptides of epidermal mucus of *Neogobius fluviatilis pallasi*. PhD Dissertation, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan, Iran (In Persian).

Akhavan-Bahabadi, M., Paknejad, H., Habibi-Rezaei, M. and Hedayati, A., 2020b. Antioxidant peptidic components derived from epidermal mucus of *Neogobius fluviatilis pallasi*. Fourth International Fisheries and Aquatic Research Congress, 18-20 November 2020. Tehran, Iran.

Akhavan-Bahabadi, M., Paknejad, H., Hedayati, A. and Habibi-Rezaei, M., 2024. Fractionation of the Caspian sand goby epidermal exudates using membrane ultrafiltration and reversed-phase chromatography: an investigation on bioactivities. *Scientific Reports*, 14(1):1716. DOI:10.1038/s41598-024-52126-z

Ansori, A.N., Antonius, Y., Susilo, R.J., Hayaza, S., Kharisma, V.D., Parikesit, A.A. and Burkov, P., 2023. Application of CRISPR-Cas9 genome editing technology in various fields: A review. *Narra Journal*, 3(2):1-14. DOI:10.52225/narra.v3i2.184

Bohara, K., Parsaeimehr, A. and Bhattarai, S., 2024. CRISPR-based diagnostic in aquaculture: Application, Potential/Opportunities, and Limitations. Potential/Opportunities, and Limitations. Available at: https://ssrn.com/abstract=4815342 (Accssed on: May 2, 2024).

Booncherd, K., Sreebun, S., Pasomboon, P. and Boonanuntanasarn, S., 2024. Effects of CRISPR/Cas9-mediated dnd1 knockout impairs gonadal development in striped catfish. *Animal*, 18(1):101039. DOI:10.1016/j.animal.2023.101039

Chaijarasphong, T., Thammachai, T., Itsathitphaisarn, O., Sritunyalucksana, K. and Suebsing, R., 2019. Potential application of CRISPR-Cas12a fluorescence assay coupled with rapid nucleic acid amplification for detection of white spot syndrome virus in shrimp. *Aquaculture*, 512:734340. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734340

Chen, J., Fan, Z., Tan, D., Jiang, D. and Wang, D., 2018. A review of genetic advances related to sex control and manipulation in tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(2): 277-291. DOI:10.1111/jwas.12479

Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. and Gao, C., 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70:667-697. DOI:10.1146/annurev-arplant-050718-100049

Chu, W.K., Huang, S.C., Chang, C.F., Wu, J.L. and Gong, H.Y., 2023. Infertility control of transgenic fluorescent zebrafish with targeted mutagenesis of the *dnd1* gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Frontiers in Genetics*, 14:1029200. DOI:10.3389/fgene.2023.1029200

Cleveland, B.M., Yamaguchi, G., Radler, L.M. and Shimizu, M., 2018. Editing the Duplicated Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2b Gene in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific Reports*, 8:16054. DOI: 10.1038/s41598-018-34326-6

Datsomor, A.K., Olsen, R.E., Zic, N., Madaro, A., Bones, A.M., Edvardsen, R.B., Wargelius, A. and Winge, P., 2019a. CRISPR/Cas9-mediated editing of Δ5 and Δ6 desaturases impairs Δ8-desaturation and docosahexaenoic acid synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*

different leveles of tomato powder on growth and survival rates and carotenoids deposition in skin and muscle tissues of silver dollar fish (*Metynnis hypsauchen*). *Journal of Animal Physiology and Development*, 39 (4):31-43. (In Persian)

Fang, L., Hung, S.S., Yek, J., El Wazan, L., Nguyen, T., Khan, S., Lim, S.Y., Hewitt, A.W. and Wong, R.C., 2019. A simple cloning-free method to efficiently induce gene expression using CRISPR/Cas9. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 14: 184-191. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.11.008

Farahmand, H., Akhavan-Bahabadi, M., Nematollahi, M.A. and Mirvaghefi, A., 2015. Investigate the possibility of Sex determination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using molecular markers. *Journal of Fisheries*, 68(1):1-11. DOI:10.22059/JFISHERIES.2015.53866.

Gan, R.H., Li, Z., Wang, Z.W., Li, X.Y., Wang, Y., Zhang, X.J., Tong, J.F., Wu, Y., Xia, L.Y., Gao, Z.X., Zhou, L. and Gui, J.F., 2023. Creation of intermuscular bone-free mutants in amphitriploid gibel carp by editing two duplicated runx2b homeologs. *Aquaculture*, 567:739300. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.739300

Ghouneimy, A., Mahas, A., Marsic, T., Aman, R. and Mahfouz, M., 2022. CRISPR-Based Diagnostics: Challenges and Potential Solutions toward Point-of-Care Applications. *ACS Synthetic Biology*, 12(1):1–16. DOI:10.1021/acssynbio.2c00496

L.). *Scientific Reports*, 9, 1–13. DOI:10.1038/s41598-019-53316-w

Datsomor, A.K., Zic, N., Li, K., Olsen, R.E., Jin, Y., Vik, J.O., Edvardsen, R.B., Grammes, F., Wargelius, A. and Winge, P., 2019b. CRISPR/Cas9-mediated ablation of elovl2 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) inhibits elongation of polyunsaturated fatty acids and induces Srebp-1 and target genes. *Scientific Reports*, 9(1):7533. DOI:10.1038/s41598-019-43862-8

Dong, Q., Nie, C.H., Wu, Y.M., Zhang, D.Y., Wang, X.D., Tu, T., Jin, J., Tian, Z.Y., Liu, J.Q., Xiao, Z.Y., Wan, S.M. and Gao, Z.X., 2023. Generation of blunt snout bream without intermuscular bones by runx2b gene mutation. *Aquaculture*, 567:739263. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.739263

Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213):1258096. DOI:10.1126/science.1258096

Elaswad, A., Khalil, K., Ye, Z., Liu, Z., Liu, S., Peatman, E., Odin, R., Vo, K., Drescher, D., Gosh, K. and Qin, G., 2018. Effects of CRISPR/Cas9 dosage on *TICAM1* and *RBL* gene mutation rate, embryonic development, hatchability and fry survival in channel catfish. *Scientific Reports*, 8(1):16499. DOI:10.1038/s41598-018-34738-4

Eslamifar, A., Farhangi, M., Rezaei, K., Majazi Amiri, B. and Akhavan-Bahabadi, M., 2017. The effects of

Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., Joung, J. and Zhang, F., 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336):438-442. DOI:10.1126/science.aam9321

Gratacap, R.L., Regan, T., Dehler, C.E., Martin, S.A., Boudinot, P., Collet, B. and Houston, R.D., 2020. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing in a salmonid fish cell line using a lentivirus delivery system. *BMC Biotechnology*, 20:1-9. DOI:10.1186/s12896-020-00626-x

Hallerman, E., 2021. Genome Editing in Cultured Fishes. CABI Agric. Biosci. 2.

Huang, T., Zhang, R. and Li, J., 2023. CRISPR-Cas-based techniques for pathogen detection: Retrospect, recent advances, and future perspectives. *Journal of Advanced Research*, 50:69-82. DOI:10.1016/j.jare.2022.10.011

Jiang, D.N., Yang, H.H., Li, M.H., Shi, H.J., Zhang X.B. and Wang, D.S., 2016. *gsdf* is a downstream gene of dmrt1 that functions in the male sex determination pathway of the Nile tilapia. *Molecular Reproduction and Development*, 83:497–508. DOI:10.1002/mrd.22642

Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Zhang, F. and Collins, J.J., 2021. CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, 5(7):643-656. DOI:10.1038/s41551-021-00760-7

Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T. and Fukuyama, H., 2018. Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle muss and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, 495, 415–427. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.05.055

Kleppe, L., Fjelldal, P.G., Andersson, E., Hansen, T., Sanden, M., Bruvik, A., Skaftnesmo, K.O., Furmanek, T., Kjærner-Semb, E., Crespo, D. and Flavell, S., 2022. Full production cycle performance of gene-edited, sterile Atlantic salmon-growth, smoltification, welfare indicators and fillet composition. *Aquaculture*, 560:738456. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738456

Kuang, Y., Zheng, X., Cao, D., Sun, Z., Tong, G., Xu, H., Yan, T., Tang, S., Chen, Z., Zhang, T., Zhang, T., Dong, L., Yang, X., Zhou, H., Guo, W. and Sun, X., 2023. Generate a new crucian carp (*Carassius auratus*) strain without intermuscular bones by knocking out *bmp6*. *Aquaculture*, 569:739407. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.739407

Kukreja, S., Gunarathne, S.S., Giri, T., Goutam, U. and Gautam, S., 2021. CRISPR-CAS9: A genome editing tool for improvement of biofuel production in diatoms: A review. *Plant Archives*, 21(1):202-209. DOI:10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.035

Li, H., Wang, X., Zhang, R., Liu, L. and Zhu, H., 2024. Generation of golden goldfish *Carassius auratus* via *tyrosinase* gene targeting by CRISPR/Cas9.

Aquaculture Reports, 23:101077. DOI:10.1016/j.aqrep.2022.101077

Lu, H., Cui, Y., Jiang, L. and Ge, W., 2017. Functional analysis of nuclear estrogen receptors in zebrafish reproduction by genome editing approach. *Endocrinology*, 158:2292–2308. DOI:10.1210/en.2017-00215

Lu, J., Fang, W., Huang, J. and Li, S., 2021. The application of genome editing technology in fish. *Marine Life Science & Technology*, 3(3):326-346. DOI:10.1007/s42995-021-00091-1

Luo, M., Wang, J., Dong, Z., Wang, C. and Lu, G., 2022. CRISPR-Cas9 sgRNA design and outcome assessment: Bioinformatics tools and aquaculture applications. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2):121-130. DOI:10.1016/j.aaf.2021.10.002

Major, L., McClements, M.E. and MacLaren, R.E., 2022. New CRISPR tools to correct pathogenic mutations in usher syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19):11669. DOI:10.3390/ijms231911669

Mingarro, G. and lí del Olmo, M., 2023. Improvements in the genetic editing technologies: CRISPR-Cas and beyond. *Gene*, 852:147064. DOI:10.1016/j.gene.2022.147064

Mobini, M., Salehi Farsani, A., Shamsaie Mehrgan, M. and Hosseini-Shekarabi, S.P., 2021. Effect of 17-α-methyl testosterone on the sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture*, 583:740594. DOI:10.1016/j.aquaculture.2024.740594

Li, L., Zhong, Z., Zeng, M., Liu, S., Zhou, Y., Xiao, J., Wang, J. and Liu, Y., 2013. Comparative analysis of intermuscular bones in fish of different ploidies. *Science China Life Sciences*, 56:341–350. DOI:10.1007/s11427-013-4465-5

Li, Y., Jia, Z., Zhang, S. and He, X., 2021. Progress in gene-editing technology of zebrafish. *Biomolecules*, 11(9):1300. DOI:10.3390/biom11091300

Liu, K., Petree, C., Requena, T., Varshney, P. and Varshney, G.K., 2019. Expanding the CRISPR toolbox in zebrafish for studying development and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:13. DOI:10.3389/fcell.2019.00013

Lo, C.A., Greben, A.W. and Chen, B.E., 2017. Generating stable cell lines with quantifiable protein production using CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *Biotechniques*, 62(4): 165-174. DOI: 10.2144/000114534

Lu, B., Liang, G., Xu, M., Wang, C., Tan, D., Tao, W., Sun, L., Wang, D., 2022a. Production of all male amelanotic red tilapia by combining *MAS-GMT* and *tyrb* mutation. *Aquaculture*, 546:737327. DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.737327

Lu, B., Wang, C., Liang, G., Xu, M., Kocher, T.D., Sun, L. and Wang, D., 2022b. Generation of ornamental Nile tilapia with distinct gray and black body color pattern by *csf1ra* mutation.

Aquaculture, 529:735672. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.735672

Qi, Y., Li, K., Li, Y., Guo, D., Xu, J., Li, Y. and Gong, W., 2022. CRISPR-based diagnostics: a potential tool to address the diagnostic challenges of tuberculosis. *Pathogens*, 11(10):1211. DOI:10.3390/pathogens11101211

Richardson, C., Kelsh, R.N. and J. Richardson, R., 2023. New advances in CRISPR/Cas-mediated precise gene-editing techniques. *Disease Models & Mechanisms*, 16(2):dmm049874. DOI:10.1242/dmm.049874

Robinson, N.A., Østbye, T.K.K., Kettunen, A.H., Coates, A., Barrett, L.T., Robledo, D. and Dempster, T., 2024. A guide to assess the use of gene editing in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 16(2):775-784. DOI:10.1111/raq.12866

Roy, S., Kumar, V., Behera, B.K., Parhi, J., Mohapatra, S., Chakraborty, T. and Das, B.K., 2022. CRISPR/Cas genome editing-can it become a game changer in future fisheries sector?. *Frontiers in Marine Science*, 9, 924475. DOI:10.3389/fmars.2022.924475

Sabzi, S., Mehrgan, M.S., Islami, H.R. and Shekarabi, S.P.H., 2021. Changes in biochemical composition and fatty acid accumulation of *Nannochloropsis oculata* in response to different iron concentrations. *Biofuels*, 12(1):1-12. DOI:10.1080/17597269.2018.1489672

Shekarabi, S.P.H. and Akhavan-Bahabadi, M.A., 2024. Medicinal plants as a safe and *Animal Environment*, 13(2), 295-302. (In Persian)

Mokrani, A. and Liu, S., 2023. Harnessing CRISPR/Cas9 system to improve economic traits in aquaculture species. *Aquaculture*, 579: 740279. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2023.740279

Nafisi-Bahabadi, M., Akhavan-Bahabadi, M., 2015. Tilapia culture (Translation). Persian Gulf University Press, Iran. 654 P. (In Persian)

Nakayama, T., Fish, M.B., Fisher, M., Oomen-Hajagos, J., Thomsen, G.H. and Grainger, R.M., 2013. Simple and efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Xenopus tropicalis. *Genesis*, 51:835–843. DOI:10.1002/dvg.22720

Nie, C., Wan, S., Chen, Y., Zhu, D., Wang, X., Dong, X. and Gao, Z. X., 2021. Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish. *Aquaculture and Fisheries*, 6(2):169-177. DOI:10.1016/j.aaf.2020.04.006

Nie, C.H., Hilsdorf, A.W.S., Wan, S.M. and Gao, Z.X., 2020. Understanding the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12:759–772. DOI: 10.1111/raq.12348

Ohama, M., Washio, Y., Kishimoto, K., Kinoshita, M. and Kato, K., 2020. Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9.

Aquaculture, 12(1):224-253. DOI:10.1016/j.cirep.2024.200150

Wang, C., Xu, J., Kocher, T.D., Li, M. and Wang, D., 2022b. CRISPR knockouts of pmela and pmelb engineered a Golden Tilapia by regulating relative pigment cell abundance. *Journal of Heredity*, 113:398–413. DOI:10.1093/jhered/esac018

Wang, J. and Cheng, Y., 2024. Enhancing aquaculture disease resistance: Antimicrobial peptides and gene editing. *Reviews in Aquaculture*, 16(1):433-451. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.739860

Wang, J., Su, B., Al-Armanazi, J., Wise, A.L., Shang, M., Bern, L. and Dunham, R.A., 2023. Integration of alligator cathelicidin gene via two CRISPR/Cas9-assisted systems enhances bacterial resistance in blue catfish, *Ictalurus furcatus*. *Aquaculture*, 576:739860. DOI:10.1016/j.aquaculture.2023.739860

Wang, J., Su, B., Xing, D., Bruce, T.J., Li, S., Bern, L. and Dunham, R.A., 2024. Generation of eco-friendly and disease-resistant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) harboring the alligator cathelicidin gene via CRISPR/Cas9 engineering. *Engineering*. [Online first]. DOI:10.1016/j.eng.2023.12.005

Wu, Y., Wu, T., Yang, L., Su, Y., Zhao, C., Li, L. and Zhou, L., 2023. Generation of fast growth Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by myostatin gene mutation. *Aquaculture*, 562:738762. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738762

environmentally friensdly appraoch to sex control in tilapia. First International Conference of Innovative Aquaculture. 16-17, April 2024. Gorgan, Iran.

Shekarabi, S.P.H. and Mehrgan, M.S., 2021. Cultivation of *Tetraselmis suecica* using a fishmeal factory effluent: effect on the growth, biochemical composition, and nutrient removal. *Journal of Applied Phycology*, 33(4):1949-1959. DOI:10.1007/s10811-021-02478-0

Sun, Y., Yan, C., Liu, M., Liu, Y., Wang, W. and Cheng, W., 2020. CRISPR/ Cas9-mediated deletion of one carotenoid isomerooxygenase gene (EcNinaB-X1) from *Exopalaemon carinicauda*. *Fish Shellfish Immunology*, 97:421–431. DOI:10.1016/j.fsi.2019.12.037

Tanwar, A. and Kumar, S., 2020. Genome editing of algal species by CRISPR Cas9 for biofuels. In: Genome engineering via CRISPR-Cas9 system. Academic Press, pp. 163-176.

Tao, Y., Zhou, X., Sun, L., Lin, D., Cai, H., Chen, X., Zhou, W., Yang, B., Hu, Z., Yu, J. and Zhang, J., 2023. Highly efficient and robust π-FISH rainbow for multiplexed in situ detection of diverse biomolecules. *Nature Communications*, 14(1):443. DOI:10.1038/s41467-023-36137-4

Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B. and Guardiola, F.A., 2020. Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in*

Xu, X., Chen, H., Mandal, B. K., Si, Z., Wang, J. and Wang, C., 2022. Duplicated *Tyr* disruption using CRISPR/Cas9 reveals melanophore formation in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*). *Reproduction and Breeding*, 2(2):37-45. DOI:10.1016/j.repbre.2022.05.001

Yang, K., Jiang, W., Wang, X., Zhang, Y., Pan, X. and Yang, J., 2019. Evolution of the intermuscular bones in the Cyprinidae (Pisces) from a phylogenetic perspective. *Ecology and Evolution*, 9(15):8555-8566. DOI:10.1002/ece3.5374

Zhai, G., Shu, T., Chen, K., Lou, Q., Jia, J., Huang, J. and Yin, Z., 2022. Successful production of an all-female common carp (*Cyprinus carpio* L.) population using *cyp17a1*-deficient neomale carp. *Engineering*, 8:181-189. DOI:10.1016/j.eng.2021.03.026

Zhang, C., Tao, Z., Ye, H., Wang, P., Jiang, M., Benard, K., Li, W. and Yan, X., 2024. Development and validation of a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and sensitive detection of the large yellow croaker iridovirus. *Aquaculture*, 584:740658. DOI:10.1016/j.aquaculture.2024.740658

Zhang, X., Li, M., Ma, H., Liu, X., Shi, H., Li, M. and Wang, D., 2017. Mutation of foxl2 or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia. *Endocrinology*, 158(8):2634-2647. DOI:10.1210/en.2017-00127

Zhong, Z., Niu, P., Wang, M., Huang, G., Xu, S., Sun, Y., Xu, X., Hou, Y., Sun, X., Yan, Y. and Wang, H., 2016. Targeted disruption of *sp7* and *myostatin* with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp. *Scientific Reports*, 6(1):22953. DOI:10.1038/srep22953

CRISPR-Cas technology in aquaculture: A review

Hafezieh M.[1*]; Hosseini shekarabi S.P.[2]; Akhavan Bahabadi M.[2]

[*]jhafezieh@yahoo.com

1- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

2- National Research Center of Saline-waters Aquatics, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bafgh Yazd, Iran

Abstract

The progress of the aquaculture industry is facing many challenges, including the spread of infectious diseases and antibiotic-resistant pathogens, reduced survival, reduced fertility, slow growth, escape of farmed fish to natural ecosystems, and environmental pollution. Today, the use of CRISPR-Cas technique is considered as a potential solution to solve these challenges through genome editing. In the CRISPR system, the nuclease 9 or Cas9 enzyme is a powerful and efficient tool for molecular editing of DNA to reveal desired traits in the host. In this context, several studies have been conducted on different aquatic species to investigate desirable traits related to aquaculture, including suppressing the myostatin gene (increasing somatic growth of the body), biosynthesis of fatty acids, stimulation of body pigmentation, and production of fish with less intermuscular bones. In terms of reproduction traits, this technology has been used for the genetic engineering of sex cells and sex reversal. In the field of aquatic health, this genome-based breeding system has successfully produced fish resistant to infectious diseases, especially viral diseases, on a laboratory scale. Also, editing genes related to antimicrobial peptides by CRISPR-Cas9 can improve the innate immune system and increases the resistance of fish against infectious diseases. In general, using the CRISPR-Cas system is an effective approach to manipulate target genes and improve economic traits in different aquatic species in line with genetic modification programs. This review study provides a comprehensive view of CRISPR-Cas technology and its potential in genome editing to target genes associated with economically valuable traits in fish to overcome some limitations and challenges of promoting sustainable aquaculture.

Keywords: CRISPR, Cas9, Sustainable aquaculture, Genome editing, Molecular genetics

[*]Corresponding author