

«مقاله پژوهشی»

بررسی افزایش میزان اسید اولئیک در گیاه گلرنگ با استفاده از تغییرات در ژن Fatty Acid Desaturase-2 پس از به کارگیری روش CRISPR-Cas9

محمدامین نیسی^۱، مظهره محسن پور^۲، حسن رهنا^{۳*}

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲. استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳. دانشیار زیست‌شناسی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۵)

Investigating the increase of oleic acid in safflower plant by changes in Fatty Acid Desaturase-2 gene after using CRISPR-Cas9 method

Mohamad Amin Neycee¹, Motahharez Mohsenpour², Hassan Rahnama^{3*}

1. Ph.D. Student in Agriculture Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

2. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

(Received: Aug. 16, 2022 - Accepted: Dec. 16, 2022)

Abstract

The safflower oil-seed plant is one of the native plants of Iran and oleic acid content (18:1) is low in all Iranian cultivars of safflower. Due to the presence of a double bond in oleic acid, oils with oleic acid levels higher than 50% have oxidative stability against heat compared to fatty acids with two or more double bonds. The use of genetic engineering and genome editing methods has made it possible to obtain oilseeds with high oleic acid. In this research, two guide RNA sequences were designed to target of *Fatty Acid Desaturase 2 (FAD2-1)* gene, which were located within the coding region and at a distance of 640 base pairs from each other. The guide sequences along with the codon optimized Cas9 gene were cloned in the T-DNA region of the *Agrobacterium* construct and transferred to the safflower boll by the *In-planta* method. The resulting seeds were cultivated and the resulting plants were screened to track changes in the fatty acid profile of the seeds. The results showed that the amount of oleic acid in the seeds of one of the lines reached 53.14% on average. This line had four amino acid changes (L66F, N204D, S236A and I238V) at the same time. This is while the amount of oleic acid in the control plant was measured as 11.62% on average. The results showed that in the segregating generation, the change in fatty acid profile occurred in the line with homozygous amino acid change, and the heterozygous plants have the same oil profile as the control plants. Also, the results of this research can indicate the possibility of increasing the amount of oleic acid in oilseeds by changing the *FAD2* enzyme sequence and without gene knockout.

Keywords: CRISPR-Cas9, Fatty Acid Desaturase, Oleic acid, Safflower.

چکیده

گیاه دانه‌روغنی گلرنگ از گیاهان بومی ایران است که میزان اسید اولئیک (18:1) آن در تمامی ارقام ایرانی پایین است. روغن‌های دارای سطوح اسید اولئیک بالاتر از ۵۰ درصد به علت وجود یک پیوند دوگانه در اسید اولئیک نسبت به اسیدهای چرب دارای دو یا چند پیوند دوگانه، دارای پایداری اکسیداتیو در برابر حرارت هستند. به‌کارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی دستیابی به دانه‌های روغنی با اولئیک اسید بالا را ممکن ساخته است. در این پژوهش که به منظور افزایش میزان اسید اولئیک در گیاه گلرنگ انجام شد، دو توالی gRNAی راهنما برای هدف‌گیری ژن *Fatty Acid Desaturase 2 (FAD2-1)* از دو ناحیه طراحی شد که محل هدف‌گیری آنها درون ناحیه کد کننده این ژن با فاصله ۶۴۰ جفت باز از یکدیگر قرار داشت. توالی‌های راهنما به همراه ژن Cas9 (بهینه‌سازی کدونی شده) در ناحیه T-DNA سازه اگروباکتریومی کلون‌سازی و به روش *In-planta* به غوزه گیاه گلرنگ منتقل شد. بذور حاصل کشت و گیاهان حاصل پس از بذرگیری در نسل بعد برای تغییر پروفایل اسیدهای چرب غربال شدند. نتایج نشان داد میزان اسید اولئیک در بذر یکی از لاین‌ها که دارای چهار تغییر اسید آمینه به طور همزمان بود به طور میانگین به ۵۳/۱۴ درصد رسیده است. این در حالی است که میزان اسید اولئیک در گیاه شاهد به طور میانگین ۱۱/۶۲ درصد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد در نسل در حال تفرق، تغییر پروفایل اسید چرب در لاین دارای تغییر اسید آمینه به صورت هموزایگوس اتفاق افتاده و گیاهان هتروزایگوس پروفایل روغن مشابه گیاهان شاهد دارند. همچنین نتایج این پژوهش می‌تواند نشان‌دهنده امکان ایجاد افزایش در میزان اسید اولئیک در دانه‌های روغنی با تغییر توالی آنزیم *FAD2-2* و بدون غیرفعال‌سازی کامل ژن باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید اولئیک، گلرنگ، CRISPR-Cas9. Fatty Acid Desaturase

مقدمه

گلرنگ (*Cartamus tinctorius*) یکی از گیاهان روغنی بومی ایران است. از بین دانه‌های روغنی سازگار با شرایط کشور ایران، گلرنگ به عنوان یک گیاه مقاوم به شوری و خشکی مطرح است (Bassil & Kaffka, 2002) و با داشتن تیپ‌های بهاره و پاییزه، آینده نویدبخشی دارد (Paseban Islam, 2001). بیش از ۶۰ کشور جهان تولیدکننده گلرنگ هستند. در ایران نیز کشت آن به عنوان یک گیاه روغنی از سال ۱۳۳۶ آغاز شده است (Younes Sinki, 2008). قابلیت ریشه‌های گلرنگ در جذب آب از اعماق خاک، نیاز آبی کمتر و قدرت جوانه زنی بالاتر بذر، این دانه روغنی را به رقیب توانمندی برای گیاهان زراعی مورد کشت در اراضی کم بازده (Marginal) تبدیل نموده است (Pourdad & Mohammadi, 2008). تحمل بالای گلرنگ در برابر تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی، شوری و گرما از یک سو (Hussain et al., 2016) و داشتن تیپ‌های بهاره و پاییزه سازگار با شرایط آب و هوایی کشور از سوی دیگر (Omidi et al., 2011) آینده نویدبخشی را برای توسعه کشت این دانه روغنی رقم زده است. ژن *FAD2* در گلرنگ دارای ۱۱ ایزومر فعال در سایر اندام‌ها است و تنها فعالیت *FAD2-1* محدود به بذر است (Cao et al., 2013).

صنعت روغن از صنایع غذایی مهم است. با افزایش اسیدهای چرب تک غیراشباع مانند اولئیک اسید در سید غذایی، اثرات مثبتی مانند کاهش چربی خون، کاهش کلسترول کل و LDL، کاهش تری‌گلیسیریدها و افزایش کلسترول خوب (HDL) مورد انتظار است (Ascherio et al., 1999). با افزایش میزان اسید اولئیک در پروفایل اسید چرب دانه‌های روغنی می‌تواند بدون نیاز به فراوری‌هایی مثل هیدروژن‌دار کردن شیمیایی، روغنی مناسب را برای تهیه غذاهایی که نیاز به سرخ‌کردن زیاد دارند در دسترس قرار دهد. روغن‌هایی که میزان اسید چرب تک اشباع آنها زیاد

است سالم‌تر هستند و معمولاً ماندگاری طولانی‌تری داشته و پایداری اکسیداتیو آنها بیشتر است (Clemente & Cahoon, 2009). اهمیت چربی‌ها و روغن‌ها و به طور ویژه اسید اولئیک نه تنها از دیدگاه سلامت بلکه از جنبه اقتصادی و مسائل تولیدی و صنعتی نیز حائز اهمیت خواهد بود. استفاده در صنایع چرم‌سازی، فلزکاری، رنگ‌سازی، خمیر و کاغذسازی، صنایع لحیم‌کاری و جوشکاری، ساخت‌وساز، صنایع بهداشتی (کرم‌های پوستی، مواد آرایشی، داروسازی)، صنایع شیمیایی (سوخت زیستی، زداینده‌ها، روانکارها، سورفاکتنت‌ها، حلال‌ها، سایر مواد شیمیایی) از جمله کاربردهای اسید اولئیک است. روغن گلرنگ میزان اسید چرب تک اشباع کمی دارد. کم بودن اسید چرب تک اشباع در پروفایل روغن باعث خواهد شد چنین روغنی کمتر بتواند با روغن‌هایی نظیر کلزا (۶۱ درصد) و روغن زیتون (۷۵ درصد) رقابت کند (Teres et al., 2008; White, 2007).

زنجیره‌های آسید تک غیراشباع موجود در روغن‌های دانه‌ها و میوه‌ها به دلیل ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی ذاتی در ساختار آنها به طور گسترده و به طور فزاینده‌ای در صنایع غذایی و شیمیایی استفاده می‌شوند. بنابراین به‌نژادگران و بیوتکنولوژیست‌های گیاهی، محصولات جدیدی را با محتوای تک‌غیراشباع بالا برای اهداف مختلف کشاورزی و صنعتی توسعه می‌دهند (Kazaz et al., 2022). راهکارهای مختلفی برای مهندسی متابولیک و بهبود پروفایل اسیدهای چرب در روغن‌های گیاهی مطرح شده است. رویکردهایی برای تغییر درصد اسیدهای چرب در گیاهان، از جمله خاموش کردن ژن، بیش بیان ژن‌ها برای سنتز اسیدهای چرب، تغییر الگوی بیان آنها و ویرایش ژنوم ارائه شده است (Porokhvinova et al., 2022). اصلاح سنتی تلاش‌هایی برای استفاده از نسخه‌های جهش‌یافته ژن‌های *FAD2-1A* و *FAD2-1B* داشته است. در تحقیقات مختلف مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی نیز برای کاهش دادن فعالیت

در این پژوهش با توجه به اینکه میزان اسید اولئیک در تمامی ارقام ایرانی گلرنگ پایین است، از روش CRISPR-Cas9 برای القای جهش و کاهش فعالیت آنزیم *FAD2-1* به منظور افزایش میزان اسید اولئیک استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه هدف‌گیری‌کننده ژن *FAD2-1* بر مبنای سیستم CRISPR/Cas9

توالی ژنی متناظر با *FAD2-1* از بانک اطلاعاتی (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) با شماره دسترسی HM165274.1 دریافت شد و آغازگرهای اختصاصی برای جداسازی ژن متناظر آن از ژنوم گلرنگ ارقام ایرانی طراحی شد. محصول PCR در حامل pTZ57R/T همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. بر اساس نتایج توالی‌یابی دو ناحیه برای هدف‌گیری ژن با سیستم CRISPR-Cas9 و براساس معیارهایی نظیر منحصر به فرد بودن، طول مناسب و قرارگیری PAM، در پایگاه <http://crispr.dbcls.jp> انتخاب شدند و کاست‌های gDNA ساخته شدند. این قطعه در ناحیه T-DNA سازه اگروباکتیریومی pBI121 همسانه‌سازی شد. سپس ژن کدکننده آنزیم Cas9 (بهینه‌سازی شده کدون) جایگزین ژن *GUS* در ناحیه T-DNA شد و سازه نهایی برای انتقال ژن به گلرنگ به دست آمد (شکل ۱). سازه نو ترکیب حاصل پس از تایید با هضم آنزیمی و PCR، به اگروباکتیریوم سویه EHA105 منتقل و برای انتقال ژن به گلرنگ به روش In-planta مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرها و نواحی هدف gRNAهای انتخاب شده در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

با توجه به وجود چندین ایزومر فعال ژن *FAD2* در اندام‌های مختلف گیاه گلرنگ، جهت ایجاد تغییر در میزان اسید اولئیک در بذر، نیاز بود gRNA به گونه‌ای طراحی شوند که فقط قادر به اتصال ژن *FAD2-1* بوده و سایر ایزومرهای این ژن را هدف‌گیری نکنند.

این ژن‌ها در تحقیقات مختلف برای دستیابی به روغن دارای اسید اولئیک بالا مورد توجه قرار گرفته است. کاهش بیان ژن *FAD2-1* با استفاده از RNAi یکی از این رویکردهاست. همچنین ایجاد جهش در ژن‌های *FAD2* با استفاده از ویرایش ژنومی نیز به عنوان روشی برای دستیابی به افزایش میزان روغن‌های 18:1 (اسید اولئیک) در بذر مطرح شده است. ویرایش ژن‌های *FAD2* با استفاده از CRISPR-Cas9 یا TALEN در سویا (Al Amin *et al.*, 2019; Demorest *et al.*, 2016; Do *et al.*, 2019; Haun *et al.*, 2014) و کاملینا (Jiang *et al.*, 2017) حاصل شده است که در نتیجه آن میزان روغن 18:1 پس از ویرایش ژنومی به ۵۰ تا ۸۳ درصد رسیده است و به طور همزمان کاهش روغن‌های 18:2 و 18:3 را به همراه داشته است، در حالی که میزان روغن 18:1 در بذرهای رایج ۱۰ تا ۲۵ درصد بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که چنین رویکردی دارای پتانسیل لازم برای استفاده به منظور ایجاد ژرم‌پلاسم دارای روغن 18:1 بالا در گونه‌ها و ارقامی است که تاکنون این صفت در آنها ایجاد نشده است.

استیل‌کوآنزیم‌آ پیش‌ماده‌ای برای مسیر بیوسنتزی لیپید است که این مسیر در شبکه اندوپلاسمی انجام می‌شود و لیپیدهای غشاء مثل تری‌آسیل‌گلیسرول را ایجاد می‌کند که باعث تشکیل روغن بذر می‌شود. در شبکه اندوپلاسمی آنزیم‌های دسچوراز، اسید چرب تک غیر اشباع 18:1 (اسید اولئیک) را به اسیدهای چرب چند غیر اشباع تبدیل می‌کنند. آنزیم دلتا ۱۲ دسچوراز (*FAD2*) باعث ایجاد پیوند دوگانه دیگری روی اسید اولئیک می‌شود و آن را تبدیل به 18:2 یا اسید لینولئیک می‌کند. دلتا ۱۵ دسچوراز (*FAD3*) پیوند دوگانه دیگری روی اسید لینولئیک ایجاد می‌کند و آن را تبدیل به 18:3 یا اسید لینولئیک می‌کند. ممانعت از فعالیت *FAD2* باعث افزایش اسید اولئیک 18:1 و به عبارتی افزایش اسیدچرب تک غیراشباع می‌شود.

جدول ۱. توالی‌های آغازگرهای طراحی شده برای ژن *FAD2-1* و نواحی هدف مورد استفاده در طراحی gRNA ها

نام آغازگر	توالی	شماره نوکلئوتید شروع و انتهای توالی در ژن <i>FAD2-1</i>	طول محصول PCR (bp)
Primer <i>FAD2-1-F</i>	ATGGGAGGAGGAGGGTGTATG	۱-۲۱	۱۱۴۳
Primer <i>FAD2-1-R</i>	TTACTTATTCTGTACCAAAACACAC	۱۱۱۸-۱۱۴۳	
Primer target1- F	CCGTTCCCTTATCCGTTTCCTT	۱۳۸-۱۵۸	۲۹۱
Primer target1- R	CGCCGATGACTGTATTCCAC	۴۰۸-۴۲۸	
gRNA Target1	GCATGGTGGCCGCATTCGT	۳۱۴-۳۳۲	
gRNA Target2	GCGGCATTGTGCGAGAACAGA	۹۵۷-۹۷۶	

مواد گیاهی و انتقال ژن

در این پژوهش از رقم گلدشت استفاده شد که این رقم از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج دریافت شده بود. در مشخصات این رقم در پایگاه موسسه مذکور به‌عنوان رقمی با سازگاری وسیع و مناسب کشت در اقلیم‌های گرم و معتدل سرد کشور اشاره شده است. این رقم بدون خار بوده و زودرس‌تر است.

انتقال به روش Floral Dip قبل از تشکیل غوزه گل (قبل از بسته شدن غوزه) در مزرعه گل‌رنگ انجام شد. به این ترتیب که ابتدا تک کلونی باکتری حاوی سازه ویرایش ژنومی در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریف‌آمپسین کشت شد و به مدت یک شب در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۳۸۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتریایی در محیط کشت MS یک دوم مایع در pH محدود ۵/۲ و ۵۰ گرم بر لیتر D-Glucose مجدداً حل شد. قبل از انجام عمل تلقیح مقدار ۲۰۰ میکرومولار استوسیرینگون و ۰/۴ درصد silwet L-77 به محلول باکتری که OD_{600nm} آن حدود ۰/۵ تنظیم شده بود، اضافه شد. در نهایت سوسپانسیون تلقیح، حاوی سازه ه ژنی ساخته شده، به گیاه گل‌رنگ منتقل شد. غوزه‌ها تا انتهای گرده‌افشانی با پاکت پوشیده شدند.

آنالیزهای ملکولی تشخیص تغییر نوکلئوتیدی و سنجش پروفایل اسید چرب به روش کروماتوگرافی گازی

به منظور تشخیص اولیه تغییر نوکلئوتیدی احتمالی از آنالیز HRM (High Resolution Melting) پس از روش Real-time PCR استفاده شد. این واکنش با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قسمتی از ژن *FAD2-1* در اطراف نواحی هدف‌گیری انجام شد (جدول ۱). ردیابی اولیه تغییرات ژن *FAD2* با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (Melt Curve)، برای گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری در مقایسه با منحنی ذوب گیاه شاهد انجام شد. اختلاف دمای ذوب بین نمونه‌های تلقیح شده و شاهد که بصورت عددی و پیک قابل رویت هستند، می‌تواند منجر به انتخاب و غربالگری گیاهانی شود که احتمال داشتن جهش نوکلئوتیدی در آنها نسبت به شاهد وجود دارد. سپس ژن *FAD2-1* از گیاهانی که در غربالگری اولیه احتمال تغییرات نوکلئوتیدی در آنها وجود داشت جداسازی و توالی‌یابی شده و نتایج توالی‌یابی با توالی گیاه شاهد با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) مقایسه شد.

به منظور تعیین میزان اسیدهای چرب در نمونه‌ها با استفاده از گاز کروماتوگرافی، آماده‌سازی متیل استر اسیدهای چرب بر اساس روش گزارش شده توسط Ortega *et al.* (2004) انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه بذر پودر شده، در یک لوله آزمایش درب‌دار ریخته شده و یک میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه شد.

SuSPect و (Choi & Chan, 2015) Provean (Yates *et al.*, 2014) بررسی شد. سپس پایگاه Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

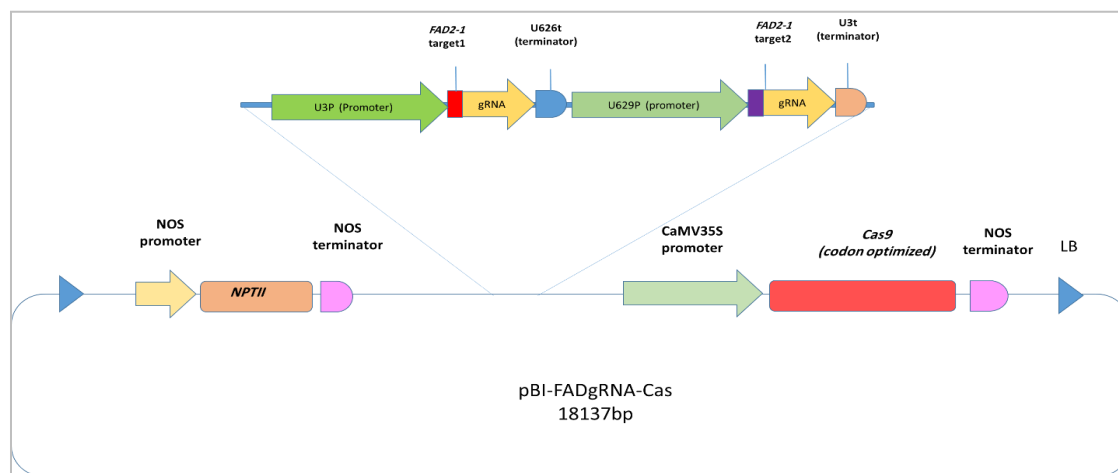
نتایج و بحث

غربال گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری و تشخیص لاین دارای تغییرات در توالی ژن *FAD2-1* اگر باکتریوم مورد استفاده برای انتقال، حاوی سازه نوترکیب CRISPR-Cas9 موسوم به pBI-*FAD2*-Cas، هدفگیری کننده ژن *FAD2-1* گیاه کلرنگ بود که نمای شماتیک آن در شکل ۱ نشان داده شده است. در این سازه دو gRNA تحت کنترل پیشبرهای جداگانه U3 و U6 قرار گرفته‌اند و ژن Cas9 نیز تحت پیشبر CaMV35S قرار داده شده است و از پای‌انبرهای U6، U3 و NOS برای آنها استفاده شده است. غربال گیاهان حاصل نسل اول، در واکنش Real-time PCR به روش HRM منجر به شناسایی گیاهی با تغییر واضح در دمای ذوب قطعه تکثیری حاصل نسبت به شاهد شد که این نتیجه از غربال گیاهان حاصل از کشت بذرهای تشکیل شده در غوزه‌ها به دست آمد (شکل ۲).

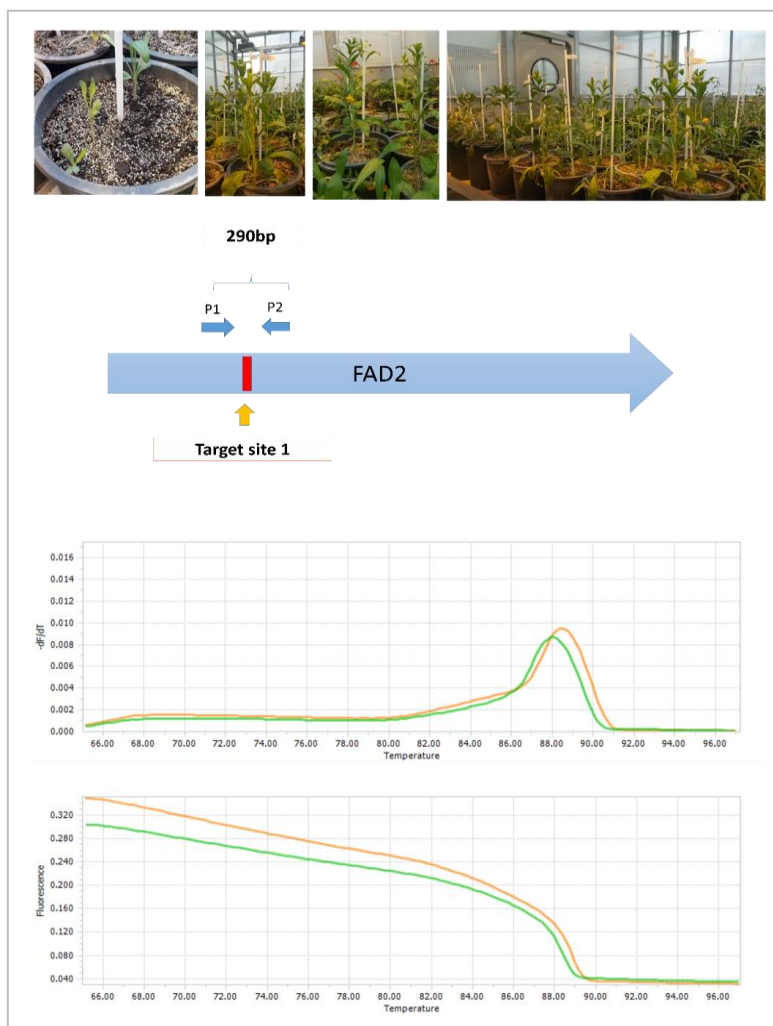
سپس ۱۰۰ میکرولیتر متوکسیدسدیم (Sodium methoxide) متانولی به آن افزوده و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری شیکردار قرار گرفت و بعد از گذشت زمان لازم جهت دو فاز شدن محتویات داخل لوله، فاز هگزانی پس از سانتریفیوژ، خارج شده و به یک لوله آزمایش دیگر که حاوی مقداری سولفات سدیم بود انتقال داده شد. یک میکرولیتر از این فاز هگزانی در زمان تزریق به دستگاه مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی موجود در آزمایشگاه فیزیولوژی دانه‌های روغنی-موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (Varian, CP3800) با ستون موئین (CP-SiI88, 50m, 0.25 mm, 0.2 μ m) استفاده شد.

آنالیزهای بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی اثر جهش در گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری و پیش‌بینی ساختار پروتئین

به منظور بررسی اثر جهش‌های منجرشده به تغییر اسیدآمیننه در ژن *FAD2-1*، توالی این ژن قبل و بعد از تلفیح با سازه کریسپری، جداسازی و توالی‌یابی شد و پس از ترجمه به اسیدآمیننه، با استفاده از پایگاه



شکل ۱. نمای شماتیک سازه ژنی CRISPR-Cas9 مورد استفاده برای ویرایش ژن *FAD2-1* که دارای دو gRNA برای هدف‌گیری دو ناحیه از ژن *FAD2-1* است.



شکل ۲. کشت بذور حاصل از گیاهانی تلقیح شده به روش In-planta (بالا)؛ غربال گیاهان حاصل در واکنش Real-time PCR به روش HRM و شناسایی گیاهی با تغییر در دمای ذوب قطعه تکثیر (پیک سبز) نسبت به شاهد (پیک نارنجی) (پایین).

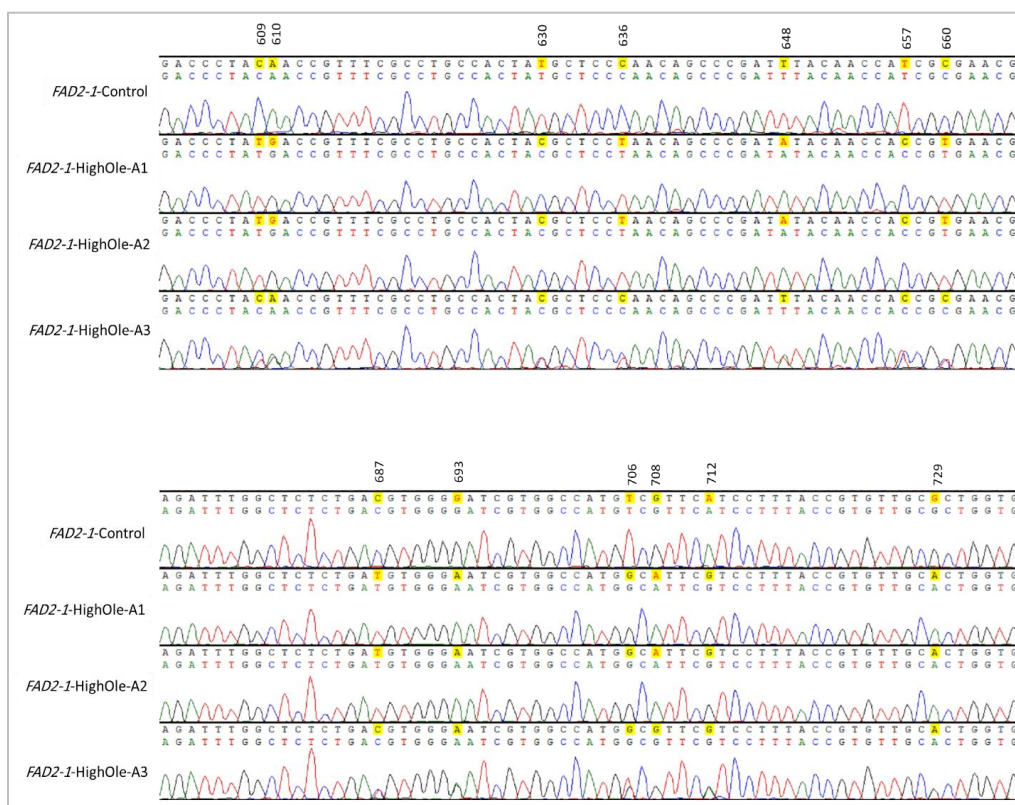
P1: پرایمر رو به جلو برای تکثیر محل هدف ۱

P2: پرایمر رو به عقب برای تکثیر محل هدف ۱

تغییر نوکلئوتیدی در ژن *FAD2-1* بود. تغییرات این لاین موسوم به HighOle-A در جدول ۲ نشان داده شده است.

از ۱۸ جهش نقطه‌ای مشاهده شده در ژن *FAD2-1*، پنج تغییر نوکلئوتیدی سبب تغییر اسید آمینه (Missense mutation) بودند، به طوری که چهار اسید آمینه را جایگزین می‌کردند و ۱۳ مورد جهش خاموش بدون تغییر اسید آمینه (Silent mutation) بودند. جهش تغییردهنده فریم خوانش و ایجاد کننده کدون پایان در این لاین مشاهده نشد.

پس از بذرگیری از گیاهان نسل ۱ (نسل در حال تفرق اول)، بذور آنها کشت شدند و مجدداً غربال‌گری گیاهان با استفاده از واکنش Real-time PCR انجام شد و سپس با توالی‌یابی گیاهان دارای جهش در ژن *FAD2-1* از گیاهان فاقد تغییرات جدا شدند. نتایج توالی‌یابی ژن *FAD2-1* در نسل در حال تفرق نشان داد تغییرات این ژن در گیاهان رشد داده شده پس از انتقال سازه کریسپری به صورت هموزیگوس یا هتروزیگوس قابل مشاهده است (شکل ۳). این غربالگری منجر به شناسایی لاینی شد که دارای ۱۸



شکل ۳. بخشی از نتایج توالی‌یابی ژن *FAD2-1* گیاه حاصل از انتقال سازه کریسپری *HighOle-A* در نسل در حال تفرق. نوکلئوتیدهای تغییر یافته در لاین حاصل از انتقال سازه کریسپری با هایلایت زرد مشخص شده‌اند. تغییرات در گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری به صورت هموزیگوس یا هتروزیگوس قابل مشاهده است. حضور نوکلئوتید به صورت هموزیگوس با تک پیک کروماتوگرام و به صورت هتروزیگوس با مشاهده دو پیک کروماتوگرام روی هم قابل تشخیص است. در این شکل گیاهان *HighOle-A2* و *HighOle-A1* به صورت هموزیگوس و گیاه *HighOle-A3* به صورت هتروزیگوس تغییرات را دربرداشتند.

بررسی پروفایل اسید چرب لاین حاصل از انتقال سازه کریسپری در حالت تغییرات هموزیگوس و هتروزیگوس ژن *FAD2-1*

نتایج اندازه‌گیری پروفایل اسید چرب لاین *HighOle-A* نشان داد میزان اسید اولئیک (C18:1) در این لاین در حالت هموزیگوس به بیش از ۵۰ درصد رسیده است (شکل ۴) و به طور میانگین میزان اسید اولئیک بذر این گیاه در حالت هموزیگوس ۵۳/۱۴ درصد اندازه‌گیری شد. این در حالی است که میزان اسید اولئیک در بذر گیاه شاهد کلرنگ رقم گل‌دشت به طور میانگین ۱۱/۶۲ درصد اندازه‌گیری شد. گیاهان شاهد در شرایط یکسانی با گیاهان دارای تغییر در گلخانه رشد داده شده بودند.

جدول ۲. تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در لاین حاصل از انتقال سازه کریسپری، *HighOle-A* کلرنگ رقم گل‌دشت و اثر آن بر اسیدآمینة متناظر

جایگاه تغییر باز	اسیدآمینة	جایگاه تغییر اسیدآمینة
C196T	Leu>Phe	L66F
A252G	Leu	-
G255A	Ala	-
C273A	Ile	-
C609T	Tyr	-
A610G	Asn>Asp	N204D
T630C	Tyr	-
C636T	Pro	-
T648A	Ile	-
T657C	His	-
C660T	Arg	-
C687T	Asp	-
G693A	Gly	-
T706G & G708A	Ser>Ala	S236A
A712G	Ile>Val	I238V
G729A	Ala	-
A876G	Gly	-

پیش‌بینی اثر جهش در گیاهان دارای تغییر

اسیدآمینه و پیش‌بینی ساختار پروتئین

در این پژوهش لاین HighOle-A دارای چهار تغییر اسید آمینه در آنزیم تولیدی توسط ژن *FAD2-1* تشخیص داده شد، توالی اسیدآمینه‌ای این ژن نسبت به توالی اسیدآمینه‌ای آن در گیاه شاهد در بررسی اثرات این جهش‌ها در پایگاه (Choi & Chan, Provean (2015) نشان داد جابجایی L66F با امتیاز 1.751، تبدیل N204D با امتیاز 3.009، تبدیل S236A با امتیاز -0.134 و تبدیل I238V با امتیاز 0.396 بوده که بنابراین هر چهار تغییر اسید آمینه به تنهایی جهش‌هایی خنثی هستند زیرا امتیاز جایگزینی آنها در این پایگاه زیر 2.5- محاسبه شده است (جدول ۴). این جهش‌ها به تنهایی عملکرد پروتئین حاصل را از بین نمی‌برند و آنزیم حاصل دارای عملکرد خواهد بود. به هر حال نتایج کروماتوگرافی گازی و کاهش تبدیل C18:1 به C18:2 که توسط ژن *FAD2-1* دارای جهش حاصل شده است نشان می‌دهد با وجود اینکه این چهار جهش هر یک به تنهایی جهشی خنثی هستند ولی وجود همزمان این چهار تغییر اسیدآمینه در آنزیم *FAD2-1* منجر به کاهش عملکرد ژن خواهد شد (شکل ۴).

امتیاز حد آستانه برای پیش‌بینی اثر تغییر

حد آستانه در این روش به صورت پیش‌فرض ۲/۵- است. بنابراین تغییراتی با امتیاز مساوی یا کمتر از ۲/۵- به عنوان تغییرات مخرب پیش‌بینی می‌شوند و تغییراتی با امتیاز بالای ۲/۵- را می‌توان تغییراتی خنثی در نظر گرفت.

میزان اسید اولئیک در بذر گیاهان رقم گلدشت کشت شده در مزرعه تا حدود ۲۰ درصد نیز گزارش شده است که حتی اگر این مقدار (۲۰ درصد) را نیز مبنای مقدار اسید اولئیک در گیاهان شاهد قرار دهیم باز هم گیاهان دارای جهش‌های مشاهده‌شده در این تحقیق، میزان اسید اولئیک بیش از دو برابر شرایط مزرعه را نشان می‌دادند. میزان اسید اولئیک در گیاهان هتروزایگوس، در حدود رقم شاهد بود. این مشاهده نشان می‌دهد حضور یک نسخه ژن اصلی بدون تغییر نوکلئوتیدی در این بذور سبب حفظ پروفایل اسید چرب اولیه شده و اثر نسخه دارای تغییر نوکلئوتیدی که نسخه ضعیفی از این ژن محسوب می‌شود را می‌پوشاند، بنابراین تبدیل C18:1 به C18:2 در گیاهان هتروزایگوس (که دارای یک نسخه ژن مشابه رقم شاهد و یک نسخه دارای جهش هستند) همانند گیاهان شاهد انجام می‌شود. اما در مورد گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری هموزایگوس HighOle-A که تنها دارای نسخه ژنی دارای چهار جهش تغییردهنده اسیدآمینه (I238V، S236A، N204D، L66F) در ژن *FAD2-1* هستند، وجود این نسخه ضعیف از آنزیم دساچوراز باعث می‌شود که توانایی کمتری برای تبدیل C18:1 به C18:2 داشته و بنابراین میزان C18:1 در گیاهان حاصل از انتقال سازه کریسپری افزایش و تبدیل آن به C18:2 کمتر صورت می‌گیرد، در نتیجه در این لاین میزان اسید اولئیک به بیش از ۵۰ درصد افزایش یافته است. نتایج پروفایل اسید چرب گیاه HighOle-A در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. نتایج آنالیز پروفایل اسیدچرب به روش کروماتوگرافی گازی لاین HighOle-A دارای جهش در ژن *FAD2-1* در

حالت هموزایگوس و هتروزایگوس در مقایسه با شاهد

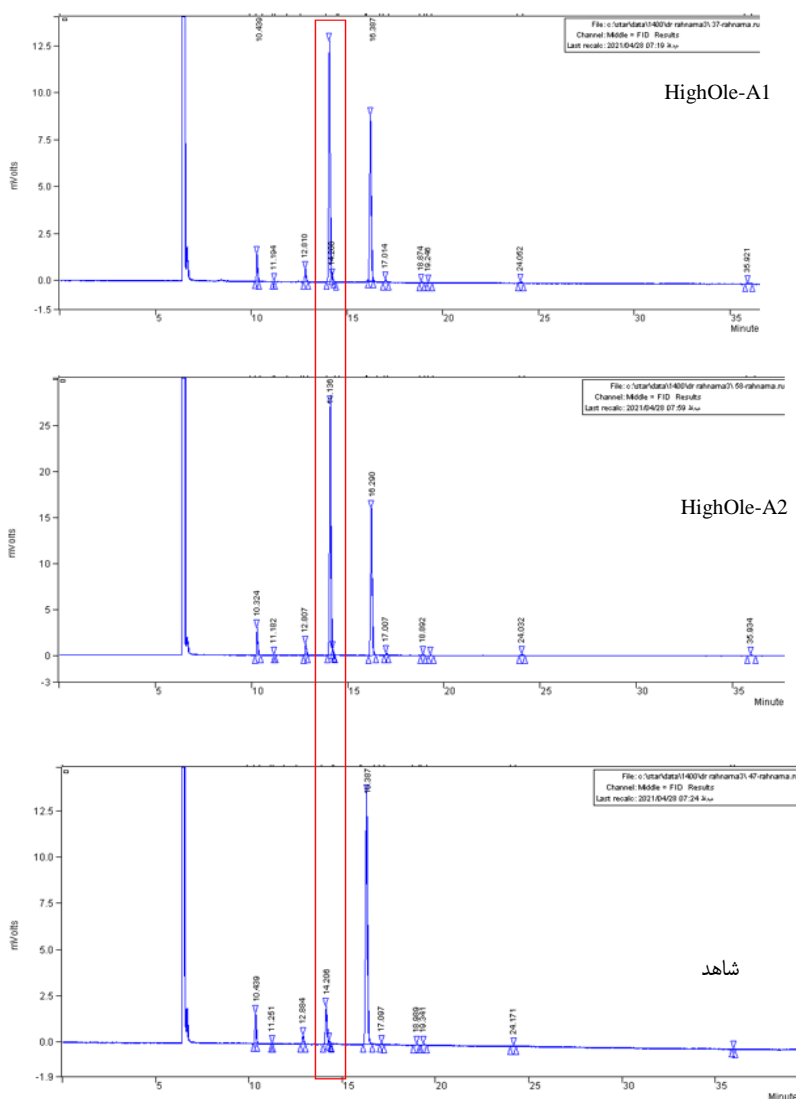
Fatty acid (%)	C16:0 Palmitic acid	C16:1 Palmitoleic acid	C18:0 Stearic acid	C18:1 Oleic acid	C18:2 Linoleic acid	C18:3 Linolenic acid	C20:0 Arachidic acid	C20:1 Eicoenic acid	C22:0 Behenic acid
شاهد رقم گلدشت	5.9978	0.1395	2.3535	11.7508	78.6128	0.2025	0.3012	0.2994	0.3375
HighOle-A1	4.3880	0.0913	2.3237	51.3989	39.4562	0.2181	0.7398	0.4799	0.5473
HighOle-A2	4.3633	0.0473	2.1972	54.8836	36.9941	ND	0.4835	0.3320	0.3765
HighOle-A3	5.9771	0.1486	2.3656	11.7446	78.6311	0.1998	0.2987	0.3002	0.3344

شد (شکل ۵). در این پایگاه امتیاز جایگزینی هر یک از اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آنزیم *FAD2-1* در حالت جایگزینی با ۲۰ اسید آمینه تشکیل دهنده ساختار پروتئینها محاسبه می‌شود. نتایج در شکل ۵ برای لوسین موقعیت ۶۶، آسپاراژین موقعیت ۲۰۴، سرین موقعیت ۲۳۶ و ایزولوسین موقعیت ۲۳۸ نشان داده شده است. امتیازها در این پایگاه برای هر چهار تغییر اسید آمینه که با کادر قرمز رنگ در شکل ۵ مشخص شده‌اند، به تنهایی تک رقمی بوده و در دامنه تغییرات خنثی قرار داشتند.

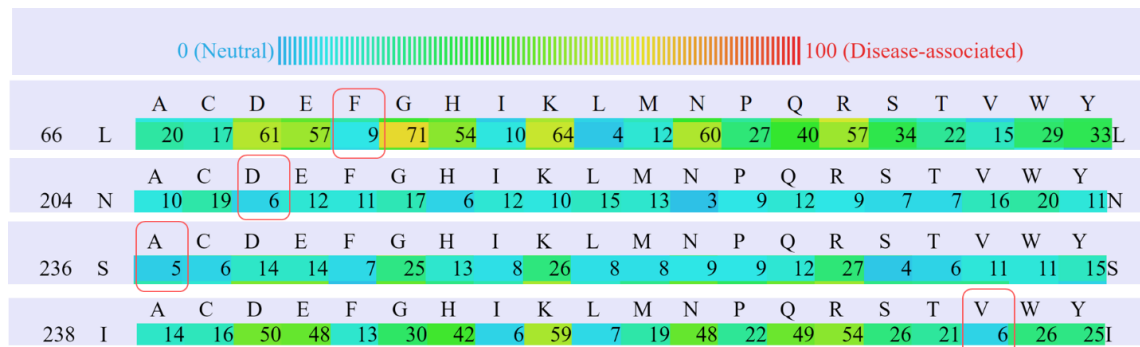
جدول ۴. نتایج وب سرور PROVEAN برای پیش بینی اثر عملکردی جایگزینی اسید آمینه در لاین حاصل از انتقال سازه کریسپری HighOle-A.

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff=-2.5)
L66F	1.751	Neutral
N204D	3.009	Neutral
S236A	-0.134	Neutral
I238V	0.396	Neutral

نتایج پایگاه PROVEAN توسط پایگاه نتایج پایگاه SuSPect (Yates *et al.*, 2014) که پیش‌بینی پیشرفته فنوتیپ نوع اسید آمینه منفرد (SAV) با استفاده از ویژگی‌های شبکه را انجام می‌دهد نیز تایید



شکل ۴. نتایج آنالیز پروفایل اسیدچرب به روش کروماتوگرافی گازی لاین HighOle-A دارای جهش در ژن *FAD2-1* در مقایسه با شاهد. (محدوده کادر قرمز رنگ پیک مربوط به اولئیک اسید در لاین های HighOle-A1,2 و شاهد می باشد).



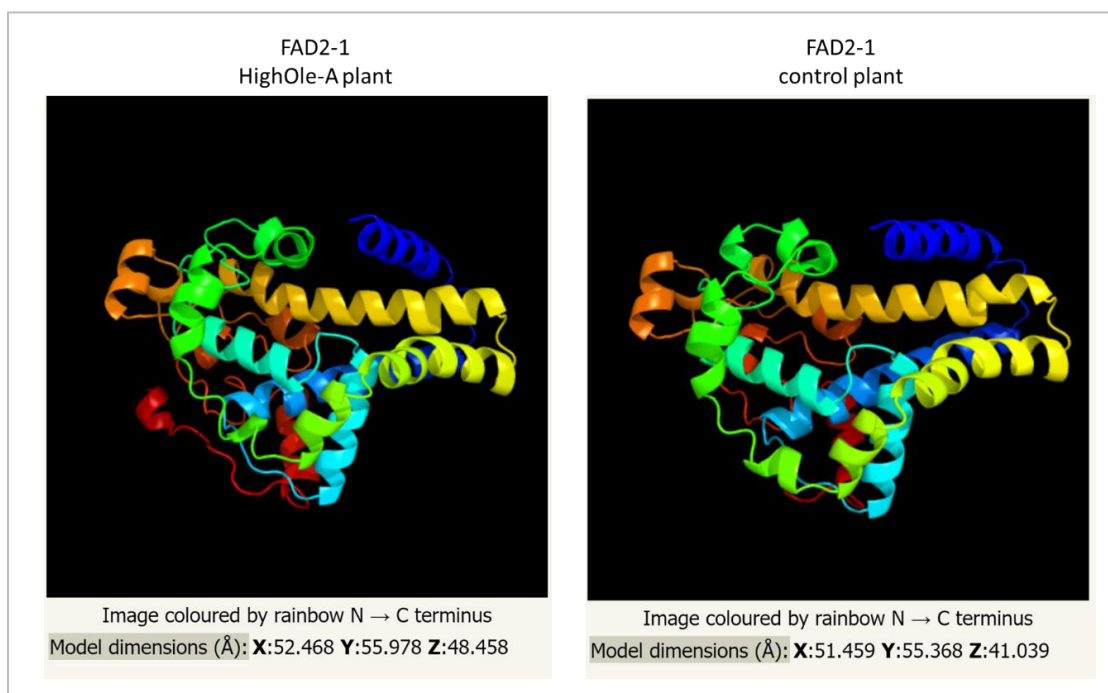
شکل ۵. نتایج پایگاه SuSPeCT برای پیش بینی پیشرفته نوع اسیدآمینه منفرد (SAV) با استفاده از ویژگی های شبکه. امتیاز تبدیل اسیدآمینه در چهار موقعیت ۶۶، ۲۰۴، ۲۳۶ و ۲۳۸ با ۲۰ اسیدآمینه نشان داده است. جایگزینی ایجاد شده در لاین HighOle-A با کادر قرمز رنگ مشخص شده است و در محدوده خنثی قرار دارد.

al., 2021; Jung *et al.*, 2018; Rao & Wang, 2019; Razzaq *et al.*, 2021). ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR/Cas9 نیازمند القای هدفمند شکست دو رشته‌ای (DSB) در ناحیه مورد نظر از DNA هدف برای القای جهش و احتمال ایجاد اشتباه در حین تعمیر آن است (Townson, 2017; Wolt *et al.*, 2016). استفاده از این سیستم برای القای جهش‌های تصادفی در ژن هدف و بررسی اثر جهش‌ها در فنوتیپ مورد نظر می‌تواند کمک کننده باشد (Jiang *et al.*, 2017; Okuzaki *et al.*, 2018; Subedi *et al.*, 2020).

این روش بر خلاف روش‌های ایجاد جهش که توسط مواد شیمیایی یا اشعه انجام می‌شوند و کل ژنوم را با جهش‌های ناخواسته مواجه می‌کنند دارای برتری‌های ویژه‌ای است و اثرات ناخواسته در ایجاد جهش توسط سیستم ویرایش ژنومی به حداقل رسیده و دستیابی به فنوتیپ مورد نظر با صرف هزینه و زمان بسیار کمتری امکان‌پذیر خواهد بود. در این تحقیق از دو جایگاه هدف برای ایجاد برش دو رشته‌ای توسط سیستم CRISPR/Cas در ژن *FAD2-1* گیاه گلرنگ استفاده شد، به طوری که جایگاه‌های هدف این ژن حدود ۶۴۰ باز با یکدیگر فاصله داشتند تا امکان القای جهش در لاین‌های حاصل بیشتر شود.

به منظور تعیین اثر همزمان هر چهار تغییر اسیدآمینه بر ساختار پروتئین دارای جهش از پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین شاهد و دارای جهش در پایگاه Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) استفاده شد که نتایج آن در شکل ۶ نشان داده شده است. در این پیش‌بینی که به ترتیب با ۶۹ درصد و ۶۷ درصد اسیدهای آمینه مورد استفاده در توالی آنزیم گیاهی دارای تغییر و شاهد و با اطمینان (confidence) ۹۹٪ و ۹۹/۸٪ توسط پایگاه Phyre2 به دست آمد، عملکرد پروتئین را در حالت جهش‌دار و بدون جهش به صورت آسیل-کوآ دساچوراز (acyl-coa desaturase) پیش‌بینی کرد. این نتیجه می‌تواند نشان‌دهنده حفظ عملکرد پروتئین در حالت دارای تغییر و از بین رفتن عملکرد کامل آن با وجود جهش باشد. تغییر جزئی ساختار پروتئین نسبت به شاهد که در مدل PDB مشخص است را می‌توان به ضعیف شدن عملکرد آنزیم *FAD2-1* و کاهش توانایی آن در تبدیل C18:1 به C18:2 نسبت داد که در نتیجه افزایش اسید اولئیک در این گیاه را سبب شده است.

بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی در علوم پایه، پزشکی و کشاورزی با پیدایش فناوری CRISPR/Cas متحول شده است (Ahmad *et al.*



شکل ۶ پیش بینی ساختار سه بعدی پروتئین دارای تغییر *FAD2-1* در گیاه HighOle-A (سمت چپ) در مقایسه با ساختار پیش‌بینی شده برای این پروتئین در حالت شاهد (سمت راست). تغییر جزئی ساختار پروتئین دارای تغییر با جایگزینی چهار اسیدآمینو نسبت به شاهد می‌تواند عامل ضعیف شدن عملکرد این پروتئین و در نتیجه افزایش میزان اسید اولئیک در بذر گیاهان دارای تغییر حاصل باشد.

گرفت. بهینه‌سازی کدونی می‌تواند در بهبود عملکرد تراژن‌ها موثر باشد (Chamani Mohasses *et al.*, 2020). به هر حال ممکن است مشاهده این جهش‌ها نه در اثر ویرایش بلکه نوعی جهش طبیعی پنهان موجود در این لاین بوده باشد. همچنین بررسی off-targetهای احتمالی در ژنوم گلرنگ دارای تغییر، نیز می‌تواند مفید باشد. به هر حال در مورد گیاهان این شانس وجود دارد که حتی در صورت ردیابی off-target بتوان آن را با استفاده از تلاقی لاین حاصل از انتقال سازه کریسپری و رقم شاهد و انتخاب ژن دارای تغییر در بک گراند ژنتیکی گیاه شاهد مرتفع ساخت. استفاده از روش‌های اصلاح سنتی در محصولات زراعی، به دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر، ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. به علاوه این روش‌ها زمان‌بر و پرهزینه هستند. اما انتظار بر این است با به‌کارگیری روش‌های مهندسی ژنتیک و انتقال یک یا چند ژن به

در چنین مواردی شاید بتوان وجود چندین جهش نقطه‌ای در فواصل دو جایگاه هدف را به رخ دادن اشتباه در سیستم تعمیر با مکانیسم Non-Homologous End Joining (NHEJ) نسبت داد، به طوری که احتمال خروج قطعه بین دو جایگاه هدف و القای چندین اشتباه حین ترمیم آن را می‌توان عامل ایجاد جهش‌ها دانست. البته تحقیقات دقیق‌تر، برای تعیین استفاده از دو gRNA و فاصله بهینه جایگاه هدف آنها از یکدیگر برای القای بیشترین نرخ جهش در ژن‌های هدف در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود. این امر ممکن است بر اساس گونه و موجودات مورد مطالعه، لوکوس ژن و فاصله بین جایگاه‌های هدف برای ایجاد برش دو رشته‌ای نتایج متفاوتی در بر داشته باشد که نیاز به تحقیق دارد. در این تحقیق ژن Cas9 بر اساس کدون‌های ترجیحی گیاه گلرنگ با تغییراتی (برای همسانه‌سازی آسان‌تر و حذف جایگاه شناسایی آنزیم‌های اندونوکلاز نوع II داخلی) مورد استفاده قرار

آن ویرایش شده بود هیچ افزایشی در روغن 18:1 مشاهده نشد (Okuzaki *et al.*, 2018). در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد زمانی که گیاهان در نسل در حال تفرق به صورت هتروزایگوس هستند، وجود یک نسخه اولیه ژن FAD2-1 بدون جهش نیز پروفایل اسید چرب را مشابه گیاه شاهد نشان می‌دهد و افزایش میزان اسید اولئیک فقط در گیاهان هموزایگوس مشاهده شد. در کاملینا ترکیبات مختلف جهش‌های تکی، دوتایی و سه آلی در نسل T3 این گیاه بررسی شد و نشان داد جهش کامل ژن FAD2 سبب از دست دادن عملکرد می‌شود که نشان‌دهنده اهمیت آنزیم دساچوراز مربوطه برای گیاه کاملینا است. ترکیب آلل‌های مختلف برای سه لوکوس ژن FAD2 تنوع زیادی از لاین‌های کاملینا با پروفایل‌های مختلف روغن از ۱۰ تا ۶۲ درصد تجمع اسید اولئیک را ایجاد کرد که منبع منحصر به فردی از تنوع ژنتیکی برای اصلاح نژاد این گیاه فراهم می‌کند (Morineau *et al.*, 2017). نتایج این پژوهش نشان داد وجود چندین جهش جایگزینی اسیدآمین خنثی و بدون ناک-اوت کامل ژن FAD2-1 می‌تواند امکان ایجاد افزایش در میزان اسید اولئیک در دانه‌های روغنی را فراهم کند. به هر حال وجود جهش‌هایی در ارقام گلرنگ در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است که نتوانسته میزان اسید اولئیک را افزایش دهد (Shafiei-Koij *et al.*, 2020). این روش برای مهندسی متابولیک با تغییر توالی ژن‌ها توسط القای جهش در ژن‌هایی که حضور آنها در ژنوم ممکن است مورد نیاز باشد و بدون ناک-اوت آنها پیشنهاد می‌شود.

REFERENCES

- Ahmad, S., Tang, L., Shahzad, R., Mawia, A. M., Rao, G. S., Jamil, S., Wei, C., Sheng, Z., Shao, G., Wei, X., Hu, P., Mahfouz, M. M., Hu, S., & Tang, S. (2021). *CRISPR-Based Crop Improvements: A Way Forward to Achieve Zero Hunger*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02653>
- Al Amin, N., Ahmad, N., Wu, N., Pu, X., Ma, T., Du, Y., Bo, X., Wang, N., Sharif, R., & Wang, P. (2019). CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of FAD2-2 microsomal omega-6 desaturase in soybean (*Glycine max* L.). *BMC Biotechnology*, 19(1), 1-10.
- محمول گیاهی یا خاموشی هدفمند ژن موردنظر، گیاهان تراریخته‌ی حاصل از نظر بازارپسندی، مانند همتای غیرتراریخته خود باشند و کیفیت و بازارپسندی محصول تغییر نکند. به هر حال این نوع محصولات برای رهاسازی تحت مقررات سخت‌گیرانه‌ای قرار دارند. بررسی‌های ایمنی‌زیستی به استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی و مدیریت آثار جانبی احتمالی این فناوری کمک می‌کند ولی مراحل تولید تا دریافت مجوز را طولانی خواهد کرد (Mohsenpour *et al.*, 2018). هر چند تاکنون محصولات مختلفی از طریق مهندسی ژنتیک در سطح تحقیقاتی تولید شده‌اند (Ghorbanzadeh *et al.*, 2022; Jahromi *et al.*, 2022; Kazemi alamouti *et al.*, 2022; Malboobi *et al.*, 2014; Mohkami 2015; Mohsenpour *et al.*, 2008, 2015; Salehian *et al.*, 2021; Tohidfar & Mohsenpour, 2010; Zandi *et al.*, 2019) ولی به دلایل مختلف تاکنون به صورت تجاری در کشور مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. بنابراین استفاده از فناوری‌هایی که با وجود استفاده از مهندسی ژنتیک، محصول نهایی آنها فاقد قطعات تراژن باشد ممکن است منجر به راه‌یابی این محصولات در زمان کوتاه‌تری به عرصه تجاری شود. البته برای ایجاد ویرایش برای دستیابی به دوزهای موردنظر یا به عبارتی هدف‌گیری نسخه‌های مختلف ژن موردنظر در گیاه، در مواردی که ژن هدف بیش از یک نسخه در ژنوم دارد، به دقت ویژه‌ای نیاز است، زیرا در مواردی مثل کلزایی که با استفاده از CRISPR-Cas یک ژن FAD2

- Ascherio, A., Katan, M. B., Zock, P. L., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1999). Trans fatty acids and coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, 340, 1994-1998.
- Bassil, E. S., & Kaffka, S. R. (2002). Response of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to saline soils and irrigation: I. Consumptive water use. *Agricultural Water Management*, 54(1), 67-80.
- Bi, H., & Yang, B. (2017). Gene Editing With TALEN and CRISPR/Cas in Rice. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol.149). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.04.006>
- Cao, S., Zhou, X.-R., Wood, C. C., Green, A. G., Singh, S. P., Liu, L., & Liu, Q. (2013). A large and functionally diverse family of Fad2 genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-18.
- Chamani Mohasses, F., Solouki, M., Ghareyazie, B., Fahmideh, L., & Mohsenpour, M. (2020). Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *Plos One*, 15(8), e0237334.
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16), 2745-2747.
- Clemente, T. E., & Cahoon, E. B. (2009). Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. *Plant Physiology*, 151(3), 1030-1040.
- Demorest, Z. L., Coffman, A., Baltes, N. J., Stoddard, T. J., Clasen, B. M., Luo, S., Retterath, A., Yabandith, A., Gamo, M. E., & Bissen, J. (2016). Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil. *BMC Plant Biology*, 16(1), 1-8.
- Do, P. T., Nguyen, C. X., Bui, H. T., Tran, L. T. N., Stacey, G., Gillman, J. D., Zhang, Z. J., & Stacey, M. G. (2019). Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous GmFAD2-1A and GmFAD2-1B genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-14.
- Ghorbanzadeh, Z., Kazemi Alamouti, M., Pourhang, L., Mousavi Pakzad, S. M., Moatamed, E., Mapar, M., Ebadi, A., Ghaffari, M. R., Hosseini Salekdeh, G., Ghareyazie, B., & Mohsenpour, M. (2022). Identification and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. *Crop Biotechnology*, 11(36), 49-62. <https://doi.org/10.30473/cb.2022.62378.1866>
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., & Cedrone, F. (2014). Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*, 12(7), 934-940.
- Hussain, M. I., Lyra, D.-A., Farooq, M., Nikoloudakis, N., & Khalid, N. (2016). Salt and drought stresses in safflower: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(1), 1-31.
- Jahromi, M. G., Rahnama, H., Mousavi, A., & Safarnejad, M. R. (2022). Comparative evaluation of resistance to potato virus Y (PVY) in three different RNAi-based transgenic potato plants. *Transgenic Research*, 1-11.
- Jiang, W. Z., Henry, I. M., Lynagh, P. G., Comai, L., Cahoon, E. B., & Weeks, D. P. (2017). Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 15(5), 648-657.

- Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., & Melzer, S. (2018). Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. *Plant Breeding*, 137(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/pbr.12526>
- Kazaz, S., Miray, R., Lepiniec, L., & Baud, S. (2022). Plant monounsaturated fatty acids: diversity, biosynthesis, functions and uses. *Progress in Lipid Research*, 85, 101138.
- Kazemi alamouti, M., Ghorbanzadeh, Z., Pourhang, L., Mousavi pakzad, S.M., Moatamed, E., Mapar, M., Ebadi, A.A., Ghaffari, M.R., Hosseini Salekdeh, Gh. G. B., & M. M. (2022). Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agricultural Biotechnology Journal*, 14(1), 1-22.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>
- Malboobi, M. A., Zamani, K., Lohrasebi, T., Sarikhani, M. R., Samaian, A., & Sabet, M. S. (2014). Phosphate: the silent challenge. *Progress in Biological Sciences*, 4(1), 1-32.
- Mohkami, A., Marashi, H., Shahriary Ahmadi, F., Tohidfar, M., & Mohsenpour, M. (2015). Evaluation of Agrobacterium-mediated Transformation of Chlamydomonas reinhardtii using a Synthetic amorpho-4, 11-diene Synthase Gene. *Journal of Cell and Molecular Research*, 7(1), 53-58.
- Mohsenpour, M., Babaeian Jeloudar, N. A., Tohidfar, M., & Habashi, A. A. (2008). Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and BT genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15 (4), 69-80 (In Persian).
- Mohsenpour, M., Kahak, S., & Ghareyazie, B. (2018). Genetic Engineering and Food Security. *Strategic Research Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 3(2), 195-208. http://srj.asnr.ias.ac.ir/article_112926.html (In Persian).
- Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Jelodar, N. B., & Jouzani, G. S. (2015). Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(4). <https://doi.org/10.1007/s13562-014-0294-2>
- Morineau, C., Bellec, Y., Tellier, F., Gissot, L., Kelemen, Z., Nogué, F., & Faure, J. (2017). Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid Camelina sativa. *Plant Biotechnology Journal*, 15(6), 729-739.
- Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., Kaneko, K., Inaba, M., Imamura, J., & Koizuka, N. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in Brassica napus. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 63-69.
- Omidi, A., Shahsavari, M., Alhani, A., & Jahanbin, A. (2011). Selection of New Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Genotypes for Different Climatic Conditions Using some Stability Parameters. *Seed and Plant Journal*, 27(3), 287-303. <https://doi.org/10.22092/spij.2017.111065>
- Ortega, J., Lopez-Hernandez, A., Garcia, H. S., & Hill Jr, C. G. (2004). Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid. *Journal of Food Science*, 69(1), FEP1-FEP6.
- Paseban Islam, B. (2001). Safflower. *East Azarbayegan Jahade Keshavarzi*, 694, 1-2.
- Porokhvinova, E. A., Matveeva, T. V., Khafizova, G. V., Bemova, V. D., Doubovskaya, A. G., Kishlyan, N. V., Podolnaya, L. P., & Gavrilova, V. A. (2022). Fatty acid composition of oil crops: genetics and genetic engineering. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-17.

- Pourdad, S. S., & Mohammadi, R. (2008). Use of Stability Parameters for Comparing Safflower Genotypes. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(1), 100-104.
- Rao, M. J., & Wang, L. (2021). CRISPR / Cas9 technology for improving agronomic traits and future prospective in agriculture. *Planta*, 254(4), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03716-y>
- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Muhammad, H., Arshad, I., Hameed, M. K., Khan, M. S., & Joyia, F. A. (2019). *Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR / Cas9 Toolbox*.
- Salehian, H., Rahnama, H., Dezhsetan, S., & Babaei, S. (2021). Constitutive expression of a synthetic cry1Ab gene confers resistance to potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) larva. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21.
- Shafiei-Koij, F., Ravichandran, S., Barthet, V. J., Rodrigue, N., Mirlohi, A., Majidi, M. M., & Cloutier, S. (2020). Evolution of *Carthamus* species revealed through sequence analyses of the *fad2* gene family. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(3), 419-432.
- Subedi, U., Jayawardhane, K. N., Pan, X., Ozga, J., & Chen, G. (2020). *The Potential of Genome Editing for Improving Seed Oil Content and Fatty Acid Composition in Oilseed Crops*. <https://doi.org/10.1002/lipd.12249>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Teres, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., & Escriba, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13811-13816.
- Tohidfar, M., & Mohsenpour, M. (2010). Effective factors in cotton (*Gossypium* spp.) transformation using *Agrobacterium*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 2 (1), 1-24 (In Persian).
- Townson, J. (2017). Review article Recent developments in genome editing for potential use in plants. *Bioscience Horizons*, 10(November), 1-17. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzx016>
- White, P. J. (2007). Fatty acids in oilseeds (vegetable oils). In *Fatty acids in foods and their health implications* (pp. 241-276). CRC Press.
- Wolt, J. D., Wang, K., & Yang, B. (2016). The Regulatory Status of Genome-edited Crops. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 510-518. <https://doi.org/10.1111/pbi.12444>
- Yates, C. M., Filippis, I., Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. E. (2014). SuSPect: enhanced prediction of single amino acid variant (SAV) phenotype using network features. *Journal of Molecular Biology*, 426(14), 2692-2701.
- Younes Sinki, N. (2008). Evaluation of oil quantitative and qualitative characteristics in safflower varieties produced at 2009. *Aftaabgardan* (In Persian).
- Zandi, M., Hosseini, R., Mohsenpour, M., HOSSEINI, S. G., & Ghareyazie, B. (2019). Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. *Gene Eng Biosafety J* 8(1), 77-89 (In Persian).