


Design, construction, and delivery of an sgRNA expression cassette for targeted mutagenesis of α -1,3-fucosyltransferase gene in *Lemna minor* using the CRISPR/Cas9 System

Sadegh Shojaei Baghini 

PhD candidate of plant biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: s_shojaei@nigeb.ac.ir

Ali Hatef Salmanian 

Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. salman@nigeb.ac.ir

Elham Taghipour

PhD candidate of plant biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: e_taghipour@nigeb.ac.ir

Nima Rad 

PhD candidate of plant biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: nima.rad@ut.ac.ir

Kasra Esfahani 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Bioproducts Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: kasra13@nigeb.ac.ir

Abstract

Objective

Lemna minor has attracted attention as a promising plant platform for the production of recombinant human proteins due to its rapid growth, simple morphology and easy cultivation. However, the inherent differences in N-glycosylation pathways between plants and humans, particularly the presence of plant-specific sugar residues such as α -(1,3)-fucose, pose a major limitation to the commercial use of this system for the production of human recombinant proteins. In this study, to eliminate this plant-specific sugar, the gene encoding the α -(1,3)-fucosyltransferase (*FucT*) in *L. minor* was targeted for knock out using the CRISPR/Cas9 genome editing system.

Materials and methods

To induce targeted mutations in the *FucT* gene in *L. minor*, the sequence of the target gene was retrieved from databases and validated in Iranian native *L. minor* using PCR and sequencing. The sgRNA was designed using bioinformatics tools and synthesized as complementary forward and reverse oligonucleotides. After annealing and formation of the double-stranded structure, the sgRNA was cloned into the pRGEB32 plasmid. The recombinant construct was transferred into *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic *L. minor* lines were generated by Agrobacterium-mediated transformation. The successful transfer of the construct and the induction of mutations at the target site in the *FucT* gene were confirmed by PCR amplification and validated by DNA sequencing analysis.

Results

Putative transgenic lines of *L. minor* were successfully regenerated 6 to 8 weeks after transformation mediated by *A. tumefaciens*. Sequence analysis of the edited target regions in the genetically modified plants was analyzed by PCR amplification, Sanger sequencing and bioinformatic tools to detect and characterize nucleotide insertions and deletions (INDELs). Analysis of the sequence chromatograms showed that biallelic and chimeric mutations were induced in some of the plants.

Conclusions

The CRISPR/Cas9 system induced mutations in the *FucT* gene of *L. minor*. The edited lines showed no obvious phenotype. Although genomic mutations at the target site were confirmed by sequencing, conclusive proof of complete knockout of the *FucT* gene and changes in the glycosylation pattern requires further analyses at the protein and glycan levels in future studies.

Keywords: CRISPR/Cas9, N-glycosylation, α -1,3-fucosyltransferase

Paper Type: Research Paper.

Citation: Shojaei Baghini, S., Salmanian, A.H., Taghipour, E., Rad, N., & Esfahani, K. (2026). Design, construction, and delivery of an sgRNA expression cassette for targeted mutagenesis of α -1,3-fucosyltransferase gene in *Lemna minor* using the CRISPR/Cas9 System. *Agricultural Biotechnology Journal*, 18(2), 135-156.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(2), 135-156. DOI: 10.22103/jab.2026.25565.1733

Received: December 11, 2025.

Received in revised form: February 07, 2026.

Accepted: February 08, 2026.

Published online: February 28, 2026.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Duckweed (*L. minor*), a small aquatic monocotyledon of the Lemnaceae family (Heenatigala & Hou, 2024), is an ideal model for biological study and biotechnological applications such as recombinant protein production (Pasos-Panqueva et al., 2024; Sosa et al., 2024). Using plants for molecular farming is challenging due to N-glycosylation. Unlike mammals, plants have N-glycans that contain specific sugars, such as α -(1,3)-fucose and β -(1,2)-xylose, which can trigger allergic or immunological reactions in humans (Mammedov & Gun, 2022; Strasser, 2022). To address this issue, scientists have focused on eliminating plant glycosyltransferases, specifically α -(1,3)-fucosyltransferase (FucT) and β -(1,2)-xylosyltransferase (XylT). These enzymes add α -(1,3)-fucose and β -(1,2)-xylose sugars to the N-glycan chains of glycoproteins (Harmoko et al., 2016; Sim et al., 2018). CRISPR/Cas9 technology, as a precise and effective method, is the best strategy for modifying glycan structures in plants. To induce targeted mutations in the *FucT* gene of *L. minor*, a recombinant vector based on the CRISPR/Cas9 system was designed in this study. Molecular analyses were conducted to identify *FucT* gene mutations in transgenic lines.

Materials and methods

Sterile duckweed (*L. minor*) samples were obtained from the duckweed plant collection of the National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (Taghipour et al., 2022). Based on the *FucT* mRNA sequence deposited in NCBI (DQ789145), forward and reverse primers (FFucT and RFucT1, Table 1) were designed to amplify the first and second exons of the *FucT* gene in the native Iranian duckweed. The genomic DNA was extracted from sterile *L. minor* (Lodhi et al., 1994). PCR was performed to amplify exons 1 to 2 of the FucT gene. The PCR products were sequenced and the results were compared with the wild-type gene sequence using SnapGene 3.2.1 software. Based on the sequence of the first exon, the sgRNA was designed using online software tools such as Cas-Designer (Park et al., 2015) and CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018). The secondary structures of the sgRNA candidates were predicted using the RNAstructure 5.8 (Reuter & Mathews, 2010). Complementary forward and reverse oligonucleotide sequences of the selected sgRNA were chemically synthesized (Sinaclon, Iran). The sgRNA precursor oligonucleotides ligation was performed according to the protocol of Xie & Yang (2013). To confirm the successful formation of the double-stranded sgRNA, electrophoresis was performed on a 12% TBE polyacrylamide gel (SDS-free) (Green & Sambrook, 2020). The sgRNA was cloned into the *Bsa*I restriction site of the pRGE32 plasmid and the ligation was transformed into competent *E. coli* DH5 α (Sambrook & Russell, 2001). The recombinant *E. coli* colonies which grow on kanamycin medium were verified by colony PCR and subsequently on purified plasmid with specific primers (R32 and FsgRNA, Tables 1 and 2)

and sequencing. The authentic recombinant plasmid was transferred into *A. tumefaciens* strain EHA101 using the freeze-thaw method (Holsters et al. 1978). The recombinant Agrobacterium was confirmed by colony PCR with specific primers (R32 and FsgRNA, Tables 1 and 2). Recombinant Agrobacterium was cultured in liquid LB medium (50 mg/L kanamycin, 30 mg/L rifampicin) at 28°C. Once the OD₆₀₀ reached 0.5, The bacterial suspension (at OD_{600nm}= 0.5) was pelleted by centrifugation (3000 rpm, 10 minutes) and then resuspended in 10 mL inoculation medium (MS medium with 3% sucrose, 200 µM acetosyringone, pH 5.6). For callus induction and regeneration of duckweed plants, the protocol described by Taghipour et al. (2024) and for Agrobacterium-mediated transformation of calli, the method described by Liu et al. (2019) were used. DNA was extracted from both transformed and non-transformed Lemna plants using the Lodhi et al. (1994) method. PCR analysis was performed using specific primers (F32 and R32, Table 1) to confirm the transfer of the T-DNA region. To analyse CRISPR-induced mutations, PCR amplification was performed with primers flanking the target region (FFucT and RFucT1, Table 1). The PCR products were purified (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) and sequenced in both directions (Biomagic Gene, Iran). The sequencing result was aligned using SnapGene 3.2.1 software and compared with the wild-type sequence.

Results

The sequence submitted to NCBI (DQ789145) was validated by amplifying, purifying, and sequencing a ~968 bp DNA fragment, which matched the reference entirely, confirming it as a CRISPR-Cas9 target. After validation, sgRNA was designed using CRISPOR and Cas-Designer, and its secondary structure was predicted with RNA Structure v5.8. Following synthesis and ligation of precursor oligos, 12% TBE-PAGE confirmed successful duplex formation.

The pRGEB32-sgRNA plasmid was then constructed, verified by colony PCR using primers R32 and FsgRNA, and subsequently sequenced. The confirmed plasmid was introduced into Agrobacterium, which was likewise verified via colony PCR. Calli were generated from sterile duckweed fronds and transformed with recombinant Agrobacterium. Subsequently, on regeneration-selective media, transgenic *L. minor* regenerated from the calli. Using primers FFucT and RFucT1, the FucT gene fragment (968 bp) was amplified to determine indels in transgenic lines. Sequencing of the purified PCR product showed indels at the target site compared to the wild-type plant. Sequence analysis revealed that transgenic lines exhibited both chimeric and biallelic mutations. GEAR tool (Rausch et al., 2020) was used to deconvolute overlapping traces. Lines 13 and 22 exhibited biallelic edits: each had a 1 bp insertion in one allele and a 12 bp deletion in the other.

Conclusions

Duckweed is considered a promising platform for recombinant protein production (Heenatigala and Hou, 2024). The presence of plant-specific sugars, in particular α -(1,3)-fucose, in N-glycosylation pathways creates challenges for the development of human therapeutic proteins in plants (Göritzer et al., 2022). A key strategy to overcome these problems is the engineering of the N-glycosylation pathway, in particular by targeting plant glycosyltransferases such as FucT (Bosch et al., 2013). To introduce mutations in the *FucT* gene in *L. minor*, a recombinant gene construct was developed for this purpose. Sequence analysis of the *FucT* gene in transgenic duckweed lines showed that both alleles of this gene contained targeted mutations. Under in vitro culture conditions, the genome-edited plant lines in this study showed no significant differences in viability, phenotype, or growth compared to non-transgenic (wild-type) plants. While sequencing confirmed target-site mutations, further analysis at the protein and glycan levels is needed to confirm complete *FucT* gene inactivation.

Author contributions

AHS and KS conceived and supervised the project, and finalized the manuscript. SSHB performed the experiments and analyzed the data, wrote the first draft of the manuscript. ET, NR contributed to plant collection. ET, NR contributed to plant transformation.

Data availability statement

Not applicable.

Ethical considerations

This investigation did not involve human or animal subjects; thus, ethical approval was not needed. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding


This research only technically was supported by National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB).

Conflict of interest


The authors declare no conflict of interest.

طراحی، ساخت و انتقال سازه بیانی واجد sgRNA به منظور ایجاد جهش هدفمند در ژن

α -(۱،۳) فوکوزیل ترانسفراز در گیاه عدسک آبی با استفاده سیستم کریسپر

صادق شجاعی باغینی 

دانشجو دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: s_shojaei@nigeb.ac.ir

علی هاتف سلمانیان 


استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: salman@nigeb.ac.ir

الهام تقی پور

دانشجو دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: e_taghipour@nigeb.ac.ir

نیما راد 

دانشجو دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: nima.rad@ut.ac.ir

کسری اصفهانی 

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: kasra@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: گیاه عدسک آبی (*Lemna minor*) به دلیل رشد سریع، ساختار ساده و قابلیت کشت آسان، به عنوان یک میزبان گیاهی نوظهور برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب انسانی مورد توجه قرار گرفته است. با این حال، تفاوت‌های موجود در مسیر N-گلیکوزیلاسیون بین گیاهان و انسان، به ویژه حضور قندهای گیاهی مانند α -(۱،۳) فوکوز، محدودیتی اساسی در کاربرد این سیستم

برای تولید تجاری پروتئین‌های نو ترکیب انسانی در کشاورزی مولکولی ایجاد می‌کند. در این پژوهش، به منظور حذف این قند گیاهی، ژن رمز کننده آنزیم α -(۱,۳) فوکوزیل ترانسفراز (*FucT*) در گیاه *L. minor* با استفاده از سامانه ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9 هدف قرار گرفت.

مواد و روش: به منظور ایجاد جهش هدفمند در ژن *FucT* در گیاه *L. minor* ابتدا توالی ژن هدف از پایگاه‌های داده استخراج و با استفاده از PCR و توالی‌یابی، ناحیه مورد نظر در *L. minor* بومی ایران شناسایی و تأیید شد. سپس sgRNA با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی طراحی و به صورت الیگونوکلئوتیدهای پیشرو و معکوس مکمل سنتز شد. الیگونوکلئوتیدهای پیش ساز پس از واکنش اتصال و تشکیل ساختار دو رشته ای در پلاسمید pRGEB32 همسانه‌سازی و سازه نو ترکیب ابتدا به باکتری *E. Coli* و سپس به *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شد. تراریختی گیاه عدسک آبی با استفاده از آگروباکتریوم انجام گرفت. در نهایت، تأیید انتقال سازه و آنالیز جهش‌های ایجاد شده در ناحیه هدف ژن *FucT* از طریق PCR و تعیین توالی انجام شد.

نتایج: فرآیند باززایی لاین‌های احتمالی تراریخت عدسک آبی، ۶ تا ۸ هفته پس از انتقال ژن به واسطه‌ی *A. tumefaciens* با موفقیت انجام شد. تجزیه و تحلیل توالی ناحیه هدف ویرایش در گیاهان دست‌ورزی شده ژنتیکی، با استفاده از PCR، توالی‌یابی و انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی، وقوع انواع جهش‌های حذف و درج نوکلئوتیدی (INDELS) را در ژن *FucT* تأیید کرد. آنالیزهای دقیق کروماتوگرام‌ها نشان داد که سامانه CRISPR/Cas9 موجب القای جهش‌های دوآلی (biallelic) و کایمیریک در برخی از گیاهان شده است.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سیستم CRISPR/Cas9 توانسته است در محل مورد نظر از ژن *FucT* گیاه عدسک آبی، جهش ایجاد کند. لاین‌های ویرایش شده فنوتیپ بارزی را از خود نشان ندادند. اگرچه وقوع جهش‌های ژنومی در ناحیه هدف با توالی‌یابی تأیید گردید، اما اثبات قطعی خاموشی کامل ژن *FucT* و تغییر در الگوی گلیکوزیلاسیون، مستلزم آنالیزهای تکمیلی در سطح پروتئین و گلیکان در مطالعات آینده است.

کلیدواژه‌ها: CRISPR/Cas9، N-گلیکوزیلاسیون، α -(۱,۳) فوکوزیل ترانسفراز

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: شجاعی باغینی صادق، سلمانیان علی هاتف، تقی پور الهام، راد نیما، اصفهانی کسری (۱۴۰۵) طراحی، ساخت و انتقال سازه بیانی واجد sgRNA به منظور ایجاد جهش هدفمند در ژن α -(۱,۳) فوکوزیل ترانسفراز در گیاه عدسک آبی با استفاده سیستم کریسپر. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۸(۲)، ۱۳۵-۱۵۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian



Biotechnology Society.

© the authors

عدسک آبی (Duckweed)، گیاهی تک‌لپه‌ای و آبزی متعلق به خانواده Lemnaceae، به‌عنوان یکی از ساده‌ترین و کوچک‌ترین گیاهان گلدار در جهان شناخته می‌شود (Heenatigala and Hou, 2024). این خانواده شامل ۳۷ گونه است که در پنج جنس اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: Wolffia و Spirodela، Landoltia، Lemna، Wolffia و Spirodela (Sree et al., 2016). تنوع در این خانواده، عدسک آبی را به گیاهی جالب توجه برای مطالعات زیست‌شناسی و زیست‌فناوری تبدیل کرده است. در میان جنس‌های خانواده Lemnaceae، جنس Lemna با داشتن ۱۳ گونه‌ی متنوع که در سراسر جهان پراکنده شده‌اند، جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات علمی به خود اختصاص داده است (Pasos-Panqueva et al., 2024). گونه *L. minor* به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، از جمله اندازه کوچک، ساختار ساده‌ی گیاهی، رشد سریع و سهولت کشت در شرایط آزمایشگاهی، به‌عنوان یک سیستم مدل ایده‌آل برای کاربردهای زیست‌فناورانه مانند تولید پروتئین‌های نوترکیب شناخته می‌شود (Sosa et al., 2024; Yang et al., 2021). با این حال، یکی از چالش‌های مهم کشاورزی مولکولی برای استفاده از گیاهان به‌عنوان میزبانی برای پروتئین‌های نوترکیب، تفاوت در مسیرهای پس از ترجمه‌ای به‌ویژه N-گلیکوزیلاسیون است (Mammedov & Gun, 2022). برخلاف سلول‌های پستانداران، گیاهان دارای قندهای خاصی نظیر α -(۱,۳)-فوکوز و β -(۱,۲)-زایلوز در ساختار N-گلیکان‌ها هستند که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی یا آلرژیک در انسان ایجاد کنند (Strasser, 2022; Mercx et al., 2017). برای رفع نگرانی‌های مربوط به تفاوت‌های N-گلیکوزیلاسیون بین گیاهان و پستانداران در تولید پروتئین‌های دارویی در سامانه‌های گیاهی، محققان تمرکز خود را بر مهار آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز گیاهی، به‌ویژه α -(۱,۳)-فوکوزیل ترانسفراز (FucT) و β -(۱,۲)-زایلوزیل ترانسفراز (XylT) معطوف کرده‌اند. این آنزیم‌ها به‌ترتیب مسئول افزودن قندهای α -(۱,۳)-فوکوز و β -(۱,۲)-زایلوز به زنجیره‌های قندی N-گلیکان گلیکوپروتئین‌ها هستند (Harmoko et al., 2016; Sim et al., 2018). بنابراین مهندسی مسیر N-گلیکوزیلاسیون، به‌ویژه از طریق خاموش‌سازی یا حذف ژن‌های *XylT* و *FucT* می‌تواند گامی مؤثر در تولید گلیکوپروتئین‌های نوترکیب مطلوب انسانی باشد (Harmoko et al., 2016; Dicker & Strasser, 2015). از سوی دیگر، سیستم CRISPR (تکرارهای کوتاه پالیندرومیک پراکنده منظم خوشه‌ای) برای اصلاح دقیق ژنوم در مهندسی ژنتیک مهم می‌باشد. توسعه پیشرونده فناوری، امکان استفاده از تکنیک‌هایی جهت تغییرات در ژنوم را فراهم کرده است. نوع جدیدی از فناوری مهندسی ژنوم مبتنی بر سیستم CRISPR می‌باشد، که به‌عنوان یک سازوکار ایمنی تطبیقی در باکتری‌ها عمل می‌کند و قادر به شناسایی عناصر خارجی مانند پلاسمید و ویروس است، و ابزاری قدرتمند در تنظیم دقیق بیان ژن‌ها مطرح شده و امکان ویرایش هدفمند ژنوم را با دقت بالا فراهم می‌کند (Kazemipour et al., 2025). سامانه CRISPR/Cas9 از دو جزء اصلی تشکیل شده است: آنزیم Cas9 که نقش یک قیچی مولکولی را ایفا می‌کند و یک RNA راهنما کوچک (sgRNA) که وظیفه هدایت آنزیم به ناحیه هدف ویرایش را بر عهده دارد. در این فرآیند، sgRNA با اتصال به ناحیه مکمل خود در DNA، آنزیم Cas9 را به آن نقطه هدایت کرده و این

آنزیم یک برش دو رشته‌ای در DNA ایجاد می‌کند. پس از ایجاد برش، سلول از مکانیسم‌های ترمیمی خود برای اتصال دوباره رشته‌های DNA استفاده می‌کند. رایج‌ترین مسیر ترمیمی اتصال انتهای غیرهمسان (NHEJ) است. از آنجایی که این مسیر مستعد خطا است، اغلب منجر به جهش‌های حذف یا درج (INDELS) در محل برش می‌شود. این تغییرات معمولاً باعث تغییر در قاب خواندن باز (Frame-shift) و ایجاد کدون توقف زودرس شده و در نهایت منجر به غیرفعال شدن یا اصطلاحاً خاموشی ژن هدف می‌گردد (Asmamaw & Zawdie, 2021). در این راستا، فناوری CRISPR/Cas9 به‌عنوان ابزاری دقیق و کارآمد برای ویرایش ژنومی هدفمند، فرصت مناسبی برای اصلاح ساختار گلیکان‌ها در گیاهان فراهم کرده است. در پژوهش حاضر، هدف ساخت ناقل نوترکیب جهت ایجاد جهش در ژن α -(۱،۳) فوکوزیل ترانسفراز (*FucT*) و ویرایش این ژن در گیاه *L. minor* با بهره‌گیری از روش CRISPR/Cas9 و بررسی صحت ویرایش ژنی در گیاهان ویراسته احتمالی، از طریق انجام واکنش PCR و توالی‌یابی ناحیه اگزونی هدف در سطح DNA ژنومی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و استریل سازی: نمونه‌های استریل عدسک آبی (*L. minor*) از کلکسیون گیاهی عدسک آبی موجود در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (Taghipour et al., 2022).

آنالیز بیوانفورماتیکی ساختار پروتئین و استراتژی انتخاب محل هدف در ژن *FucT*: به‌منظور انتخاب هدفمند محل برش توسط سامانه CRISPR/Cas9، ابتدا ساختار پروتئینی آنزیم α -(۱،۳) فوکوزیل ترانسفراز مورد بررسی قرار گرفت. توالی آمینواسیدی این آنزیم برای شناسایی دومین‌های عملکردی و جایگاه‌های حفاظت شده در پایگاه (Paysan-Lafosse et al., 2023) InterPro مورد جستجو قرار گرفت. استراتژی طراحی sgRNA بر پایه هدف‌گیری اگزون‌های ابتدایی و پیش از دومین عملکردی شناسایی شده استوار گردید. این استراتژی باعث می‌شود که در صورت بروز جهش‌های درج و حذف و ایجاد تغییر در چارچوب قرائت خواندن باز (Frame-shift)، پروتئین حاصل نه تنها در مراحل اولیه کوتاه شود، بلکه دومین‌های عملکردی و جایگاه فعال آنزیم نیز مختل گردد و منجر به سرکوب بیان آن گردد.

شناسایی و تایید ترادف ناحیه هدف ویرایش: به منظور اطمینان از ترادف ژن مورد نظر (*FucT*) در نمونه عدسک ایرانی، توالی‌های گزارش شده مربوط به mRNA ژن *FucT* از پایگاه داده NCBI و پایگاه ژنومی عدسک آبی (www.lemna.org) استخراج و تحت آنالیز هم‌ردیفی قرار گرفت. با استناد به توالی‌های به‌دست‌آمده، آغازگرهای پیشرو و معکوس (RFucT1 و FFucT، جدول ۱) برای تکثیر اگزون اول و دوم ژن *FucT* طراحی شد. سپس DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی *L. minor* (کشت شده در شرایط استریل آزمایشگاهی) بر اساس پروتکل Lodhi et al. (۱۹۹۴) استخراج شد. کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز و با کمک اسپکتروفوتومتر بررسی و سپس واکنش PCR با آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر

اگزون‌های اول تا دوم ژن *FucT* انجام شد. محصولات PCR برای تعیین توالی ارسال و نتایج حاصل با توالی ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار Snap Gene 3.2.1 مقایسه و تأیید شدند.

طراحی و ساخت RNA راهنما (sgRNA): برای طراحی sgRNA براساس توالی اگزون اول ژن *FucT* از

نرم‌افزارهای آنلاین Cas-Designer (Park et al., 2015) و CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018) استفاده شد. به‌منظور به حداقل رساندن برش‌های خارج از هدف ژنومی (Off-targets)، توالی sgRNA طراحی‌شده تحت آنالیز دقیق بیوانفورماتیکی قرار گرفت. برای این منظور، توالی مورد نظر در برابر کل ژنوم گیاه *L. minor* با استفاده از ابزار آنلاین Cas-OFFinder (Bae et al., 2014) مورد جستجو قرار گرفت. پارامترهای انتخاب بر اساس کمترین تعداد عدم تطابق نوکلئوتیدی (Mismatch) در کل ژنوم، به‌ویژه در ۱۲ جفت‌باز ابتدایی مجاور توالی PAM تنظیم شد. از آنجایی که ژنوم عدسک آبی (*L. minor*) توالی‌یابی شده و در پایگاه Lemna.org موجود است، هم‌ردیفی نوکلئوتیدی در سطح کل ژنوم نیز انجام شد. ساختار ثانویه sgRNAهای پیشنهادی نیز با نرم‌افزار RNAstructure (Reuter & Mathews, 2010) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، بر اساس درصد GC مناسب، عدم وجود ترادف‌های نوکلئوتیدی نامطلوب و ساختار ثانویه مناسب، بهترین sgRNA انتخاب و توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پیشرو و معکوس مکمل آن برای ساخت به شرکت سیناکلون (ایران) ارسال شد. همچنین که در ابتدای ناحیه ۵' الیگونوکلئوتیدهای پیشرو و معکوس، توالی‌های مکمل برای هم‌سانه‌سازی در جایگاه هضم آنزیم *BsaI* در پلاسمید pRGE32 طراحی شد (جدول ۲). اتصال الیگونوکلئوتیدهای پیش‌ساز sgRNA طبق دستورالعمل Xie & Yang (2013) انجام پذیرفت. برای تأیید اتصال رشته‌های پیشرو و معکوس sgRNA به یکدیگر، از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل TBE پلی‌آکرلامید درصد ۱۲ (فاقد SDS) استفاده شد (Green & Sambrook, 2020).

ساخت سازه نوترکیب CRISPR/Cas9: برای آماده‌سازی پلاسمید بیانی pRGE32 به‌منظور هم‌سانه‌سازی

sgRNA، از آنزیم محدودکننده *BsaI* جهت خطی‌سازی پلاسمید استفاده شد. فرآیند هم‌سانه‌سازی sgRNA در پلاسمید pRGE32 بر اساس پروتکل Xie & Yang (2013) و تراریختی سلول‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α با استفاده از روش‌های استاندارد Sambrook & Russell (2001) انجام پذیرفت. کلنی‌های *E. coli* رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (R32 و FsgRNA، جدول ۱ و ۲) و روش کلنی PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای اطمینان بیشتر از صحت هم‌سانه‌سازی، از کلنی‌های مثبت از نظر PCR، کشت شبانه تهیه و پس از استخراج پلاسمید (با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation, Roche)، ساختار پلاسمید نوترکیب نهایی با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و توالی‌یابی تأیید شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های آگروباکتریوم مستعد: برای انتقال سازه پلاسمیدی نوترکیب به *A.*

tumefaciens سویه EHA101، از روش انجماد و ذوب با استفاده از کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار و نیتروژن مایع استفاده شد

(Holsters et al., 1978). پس از کشت باکتری‌ها بر روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین، حضور پلاسمید نوترکیب در آگروباکتریوم با استفاده از آزمون کلنی PCR و آغازگرهای اختصاصی پلاسمید (R32 و FsgRNA، جدول ۱ و ۲) مورد تأیید قرار گرفت.

آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی تلقیح: باکتری آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی مورد نظر در محیط کشت مایع

LB حاوی غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک (۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپیسین) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شد. پس از رسیدن میزان جذب نوری (OD₆₀₀) محیط کشت به ۰.۵، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح (محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون و pH ۵/۶) مخلوط شد و برای رشد باکتری‌های تازه، در دستگاه شیکر انکوباتور قرار گرفت. OD₆₀₀ مناسب باکتری جهت تلقیح در این مطالعه ۰/۸-۰/۶ در نظر گرفته شد.

القای کالوس از گیاه عدسک آبی: به‌منظور آغاز فرایند کالوس‌زایی، نمونه‌های گیاهی عدسک آبی استریل، در محیط

کشت ویژه القای کالوس کشت داده شدند. ترکیب این محیط کشت شامل محیط MS به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D با غلظت ۷/۵ میکرومولار و BAP با غلظت ۱۵ میکرومولار بود. ساکارز با غلظت ۲ درصد نیز به محیط افزوده شد و pH نهایی محیط پیش از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم گردید (Taghipour et al., 2025).

تراریختی کالوس‌های عدسک آبی: برای انتقال سازه کربسپری طراحی شده به گیاه عدسک آبی از سامانه تراریختی

مبتنی بر *A. tumefaciens* استفاده شد. در این فرایند، کالوس‌های حاصل از فراندهای عدسک آبی در تماس مستقیم با سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند و به مدت ۸ دقیقه در حمام اولتراسوند با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و در ادامه، تحت تیمار خلاً به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس، کالوس‌ها به محیط هم‌کشتی منتقل شدند. این محیط بر پایه MS تهیه شده و حاوی ۲ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، ۱۵ میکرومولار 2,4-D، ۷/۵ میکرومولار BAP و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون بود و pH آن روی ۵/۶ تنظیم گردید. تمامی کشت‌ها در اتاقک کشت در شرایط تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Liu et al., 2019).

باززایی گیاهان عدسک آبی تراریخت: پس از اتمام دوره هم‌کشتی، کالوس‌ها به محیط کشت استراحت منتقل شدند.

این محیط بر پایه MS تهیه شده و شامل ۲ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP به ترتیب با غلظت‌های ۱۵ و ۷/۵ میکرومولار بود و pH آن ۵/۸ تنظیم گردید. نمونه‌ها در تاریکی و در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس به مدت چهار هفته نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها جهت القای باززایی به محیط جامد MS حاوی ۱ درصد ساکارز، ۴ میکرومولار BAP و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزینشگر هیگرومایسین منتقل شدند (Taghipour et al., 2025).

آنالیز گیاهان تراریخت: استخراج DNA از فرندهای تراریخته و غیرتراریخته عدسک آبی، با روش Lodhi et al. (۱۹۹۴) انجام شد. جهت تأیید انتقال ناحیه T-DNA، آنالیز PCR با آغازگرهای اختصاصی پلاسمید نوترکیب pRGEB32 (R32) و (جدول ۱) انجام شد. به منظور بررسی جهش‌های ایجاد شده توسط سیستم CRISPR، PCR با استفاده از آغازگرهای طرفین ناحیه هدف ویرایش (RFucT1 و FFucT) (جدول ۱) انجام شد و پس از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز، باندهای مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification, Roche) خالص‌سازی و برای تعیین توالی به شرکت بایومجیک ژن (ایران) ارسال شدند. نتایج توالی‌یابی با نرم‌افزار Snap Gene 3.2.1 با توالی ژن هدف در گیاه وحشی هم‌ردیف و مقایسه شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای پیشرو و معکوس مورد استفاده

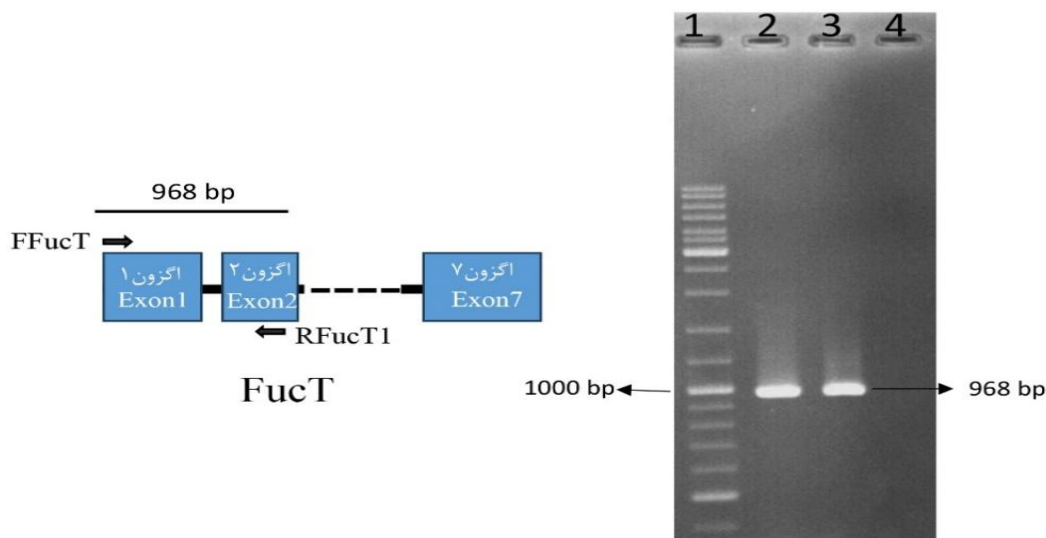
Table 1. The sequences of forward and reverse specific primers

توالی آغازگر Primer sequence	نام آغازگر Primer name	شماره Number
5'ATGGCCACCTCTGCTG3'	FFucT	1
5'GTCGTGCATTATCAAGATTATTCTCC3'	RFucT1	2
5'CTGTTTCAGCGTCATTTACCAG3'	RFucT	3
5'AGCGGATAACAATTTACACAGG3'	F32	4
5'CGAATTTGTGGACCTGC3'	R32	5

نتایج و بحث

تأیید صحت توالی اگزون هدف ویرایش: به منظور اطمینان از صحت توالی اگزون اول ژن *FucT* در ژنوم عدسک آبی بومی ایران، توالی موجود در پایگاه داده NCBI به صورت تجربی تأیید شد. با استفاده از آغازگرهای RFucT1 و FFucT، قطعه DNA مورد انتظار شامل اگزون اول و دوم این ژن به طول تقریبی ۹۶۸ جفت باز به طور اختصاصی تکثیر و بر روی ژل مشاهده شد (شکل ۱). پس از تأیید اندازه باند هدف، محصول PCR خالص‌سازی و توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی و هم‌ردیفی با استفاده از ClustalW، تطابق کامل توالی اگزون اول ژن *FucT* با توالی موجود در NCBI (شماره دسترسی: DQ789145) را در این گیاه نشان داد.

طراحی sgRNA: پس از اطمینان از صحت توالی اگزون اول ژن *FucT* در عدسک آبی، طراحی sgRNA بر اساس معیارهای کلیدی (درصد GC، ساختار ثانویه، کمترین اثرات خارج از هدف و موقعیت ژنی مناسب) برای دستیابی به عملکرد بالا انجام شد (جدول ۲).



شکل ۱. تکثیر اگزون اول و دوم ژن *FucT* با PCR. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی Ladder Mix 100bp. ستون ۲ و ۳: محصول PCR اگزون اول و دوم ژن *FucT* بر روی DNA (Thermo Fisher Scientific)؛ ستون ۴: کنترل منفی (فاقد نمونه DNA). محل اتصال آغازگرها در تصویر شماتیک با فلش مشکی نشان داده شده است

Figure 1. PCR amplification of exons 1 and 2 of the *FucT* gene. Lane 1: 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific); Lanes 2 and 3: PCR products of exon 1 and exon 2 amplified from *L. minor* genomic DNA. The primer binding sites are indicated by black arrows in the schematic diagram

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

FucTNCBI FucT	ATGGCCACCTCTGCTGCTGGTGTCTCAACGCCGGTGGCAGGGTCGGGGGCAGGAGGAGT ATGGCCACCTCTGCTGCTGGTGTCTCAACGCCGGTGGCAGGGTCGGGGGCAGGAGGAGT *****
FucTNCBI FucT	TGGGTCAGATTTRCTTCCCTTCTTTGTGTTGATGCTGGTGGTAGGGGAGATCTGGTTCCCTC TGGGTCAGATTGCTTCCCTTCTTTGTGTTGATGCTGGTGGTAGGGGAGATCTGGTTCCCTC *****
FucTNCBI FucT	GGGCGGCTGGATGTGGTCAAGAACGCCGCTATGGTTCAAACACTGGACTTCTCCCAC TTG GGGCGGCTGGATGTGGTCAAGAACGCCGCTATGGTTCAAACACTGGACTTCTCCCAC TTG *****
FucTNCBI FucT	TTTTTCTTACCAGTTTCTTCTACACGTGGTCCGAGACCGTCAAGGAGGAAGAGGATTGC TTTTTCTTACCAGTTTCTTCTACACGTGGTCCGAGACCGTCAAGGAGGAAGAGGATTGC *****
FucTNCBI FucT	AAGGACTGGCTGGAAGAGTAGATGCGGTCGATTACAAGAGAGATTTCCGTGTGGAACCC AAGGACTGGCTGGAAGAGTAGATGCGGTCGATTACAAGAGAGATTTCCGTGTGGAACCC *****
FucTNCBI FucT	GTTCTGGTAAATGACGCTGAACAGG GTTCTGGTAAATGACGCTGAACAGG *****

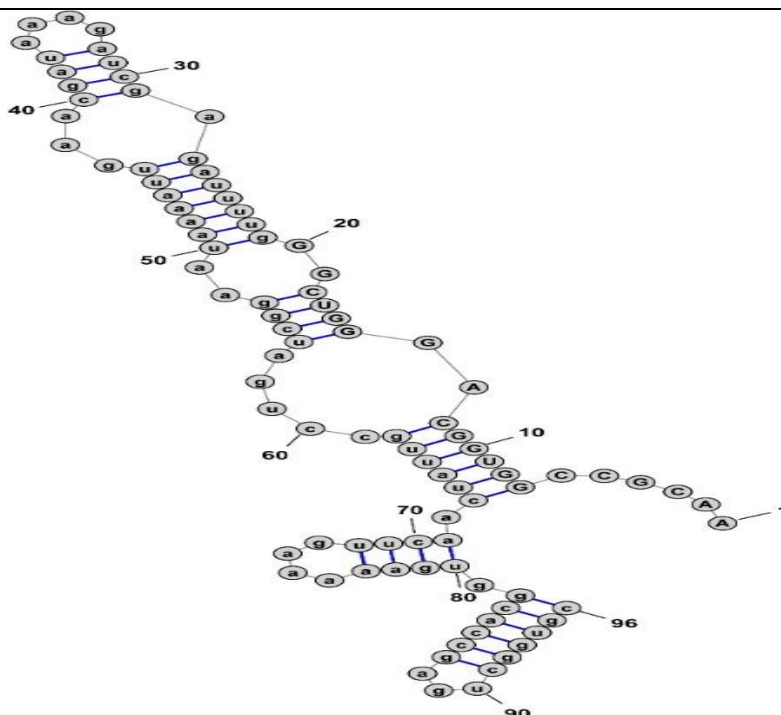
شکل ۲. هم‌ردیفی اگزون اول ژن *FucT* ثبت شده در NCBI با توالی اگزون اول این ژن در گیاه عدسک آبی بومی ایران با استفاده از ClustalW

Figure 2. The first exon of the *FucT* gene from NCBI (Acc. No. DQ789145) was aligned using ClustalW with the first exon of the same gene from native Iranian duckweed.

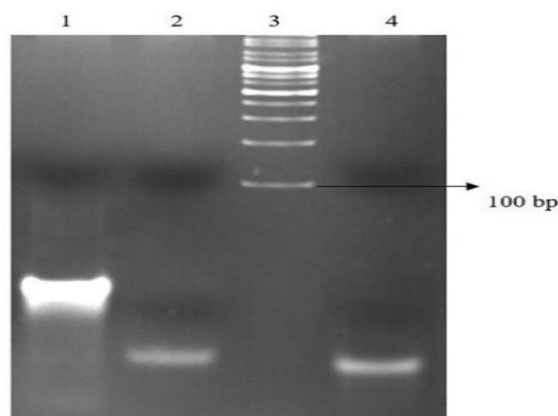
علاوه بر این، ساختار ثانویه sgRNA منتخب با نرم افزار RNA Structure بررسی و پیش بینی شد که ساختار ثانویه مطلوب و بهینه برای عملکرد مؤثر آن ایجاد می شود (شکل ۳). پس از ساخت و انجام واکنش اتصال الیگونوکلوئوتیدهای پیش ساز sgRNA، صحت اتصال دو رشته با بررسی نتایج واکنش بر روی ژل TBE پلی آکرلامید ۱۲ درصد تأیید شد (شکل ۴).
تأیید ساخت سازه پلاسمید کریسپری نوترکیب: پس از همسانه سازی sgRNA در پلاسمید pRGE32، صحت ساخت پلاسمید نوترکیب با انجام کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی R32 و FsgRNA تأیید شد (شکل ۵).

جدول ۲. الیگونوکلوئوتیدهای پیش ساز sgRNA برای القاء جهش هدفمند در ژن *FucT* گیاه عدسک آبی
Table 2. sgRNA precursor oligonucleotides for targeted mutation of the *FucT* gene in duckweed

درصد GC	طول SgRNA	توالی SgRNA
GC percent	SgRNA length	SgRNA sequence 5' —————> 3'
75	20	FsgRNA 5'GGCAACGCCGGTGGCAGGGTCGG3' RsgRNA 5'AAACCCGACCCTGCCACCGGCGT3'



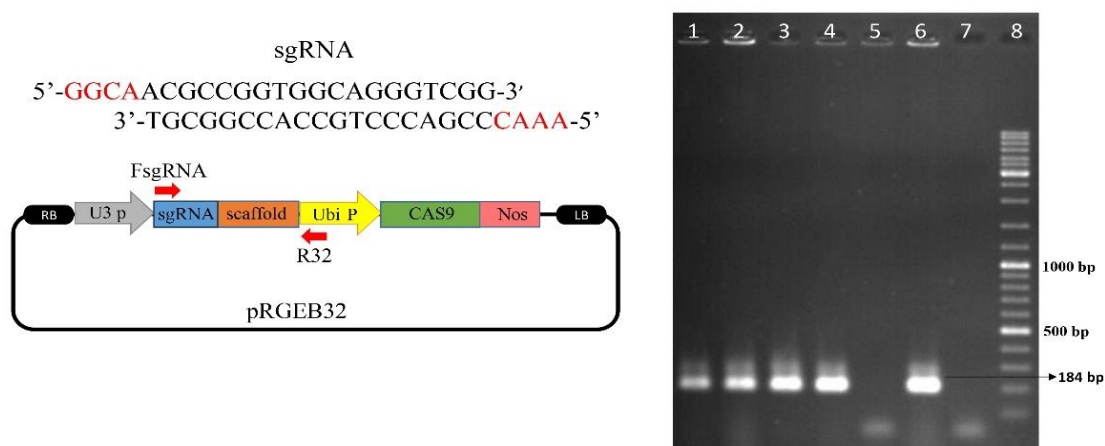
شکل ۳. پیش بینی ساختار ثانویه sgRNA با نرم افزار RNA Structure
Figure 3. Prediction of the secondary structure of sgRNA using RNA Structure software



شکل ۴. الگوی الکتروفورز الیگونوکلئوتیدهای پیشرو و معکوس و sgRNA دو رشته‌ای بر روی ژل TBE پلی آکریلامید ۱۲٪. ستون ۱: sgRNA دو رشته‌ای؛ ستون ۲: رشته پیشرو sgRNA؛ ستون ۳: رشته معکوس

sgRNA؛ ستون ۴: نشانگر وزن مولکولی (Ladder Mix 100 bp (Thermo Fisher Scientific))

Figure 4. Electrophoresis pattern of double-stranded sgRNA with forward and reverse oligonucleotides on a 12% TBE polyacrylamide gel. Lane 1: Double-stranded sgRNA; Lane 2: sgRNA reverse strand; Lane 3: sgRNA forward strand; 100 bp DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)



شکل ۵. الکتروفورز محصول کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای R32 و FsgRNA. ستون ۱ الی ۶: کلن‌های احتمالی واجد سازه ژنی نو ترکیب؛ ستون ۸: نشانگر وزن مولکولی (Ladder Mix 100bp (Thermo Fisher Scientific))؛ ستون ۷: کنترل منفی (فاقد نمونه DNA). توالی sgRNA به رنگ مشکی نمایش داده شده است. توالی‌های مکمل جایگاه همسانه‌سازی در پلاسمید به رنگ قرمز مشخص شده‌اند. جایگاه همسانه‌سازی sgRNA در پلاسمید pRGEB32 به صورت یک مستطیل آبی برجسته گردیده است. محل‌های اتصال

آغازگرها نیز با فلش‌های قرمز نشان داده شده‌اند

Figure 5. Electrophoresis of Colony PCR Product Using R32 and FsgRNA Primers. Lanes 1-6: Putative colonies containing the recombinant gene construct; Lane 7: Negative control (Sample without DNA); Lane 8: 100 bp DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). The sgRNA sequence is shown in black. The plasmid's complementary cloning sites are indicated in red. red arrows indicate primer binding sites, and the blue rectangle marks the sgRNA cloning site in the pRGEB32 plasmid.

تراریختی گیاه عدسک آبی: پس از کشت باکتری آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی نوترکیب، کالوس‌های عدسک آبی در محیط تلقیح قرار داده شد و سپس به محیط هم کشتی انتقال یافتند. پس از گذشت ۳ روز، کالوس‌ها به محیط استراحت (rest) منتقل شده و پس از سه هفته، بر روی محیط باززایی حاوی گزینشگر هیگرومایسین با غلظت ۵۰ mg/ml قرار گرفتند (شکل ۶). پس از باززایی گیاهان تراریخت (فراندهای تراریخت)، آن‌ها به محیط تکثیر انتخابی برای انجام آزمایش‌های بعدی منتقل شدند.

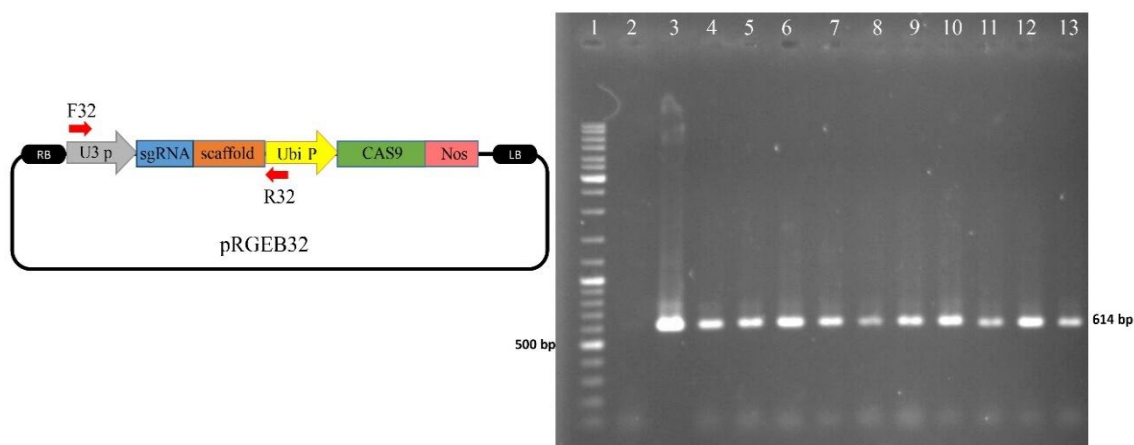


شکل ۶. مراحل کشت بافت و تراریختی گیاه عدسک آبی توسط *Agrobacterium tumefaciens* سویه EHA101 حامل سازه ژنی نوترکیب pRGE32. (الف): تشکیل کالوس از فراندهای استریل عدسک آبی در محیط کالوس‌زایی؛ (ب): کالوس‌های تراریخته پس از انتقال از محیط هم‌کشتی به محیط استراحت رشد کرده و توده‌هایی با پتانسیل باززایی تشکیل داده‌اند؛ (ج): باززایی فراندهای عدسک آبی در محیط انتخابی باززایی با فلش مشکی مشخص شده است

Figure 6. Tissue culture stages and duckweed transformation with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 carrying the recombinant pRGE32 gene construct: (A) Callus formation from sterile duckweed fronds on callus induction medium; (B) Transformed calli grew and formed regenerating masses after transfer from the co-cultivation medium to the rest medium. The black arrow indicates regeneration of duckweed fronds on selective regeneration medium.

ارزیابی گیاهان عدسک آبی تراریخت برای تایید لاین‌های ویراسته: برای اطمینان از تراریختی و حضور سازه

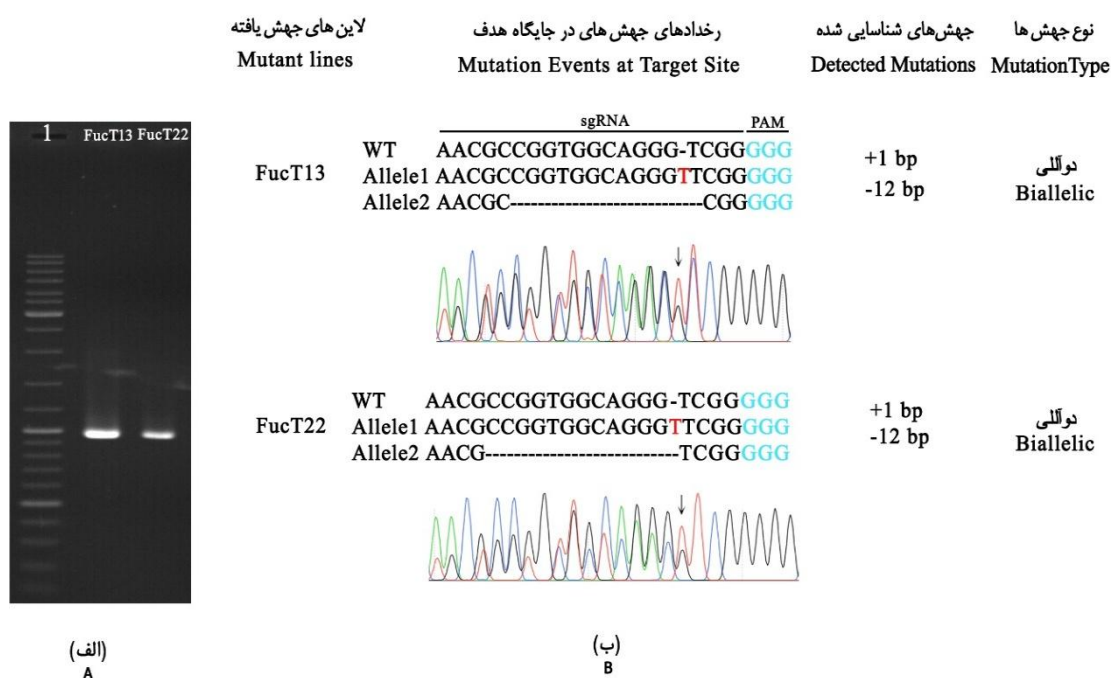
ژنی در ژنوم گیاهان عدسک آبی تراریخت، واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی سازه ژنی (F32 و R32، جدول ۱) انجام و محصول نهایی آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. محصول PCR حاصل با این آغازگرهای اختصاصی، قطعه DNA به طول ۶۱۴ جفت باز را تکثیر نمود که نشان دهنده ورود موفقیت آمیز سازه ژنی واجد توالی رمز کننده پروتئین Cas9 و sgRNA مربوط به ژن *FucT* به ژنوم گیاه است (شکل ۷). به منظور بررسی تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی ژن‌های هدف در ژنوم گیاهان عدسک آبی تراریخت، از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی (RFucT1 و FFucT، جدول ۱) برای تکثیر نواحی هدف و ویرایش استفاده شد و باند مورد نظر با اندازه تقریبی ۹۶۸ جفت باز بر روی ژل آگارز مشاهده شد (۸ الف). برای بررسی دقیق‌تر توالی نوکلئوتیدی ناحیه هدف و ویرایش، باندهای مورد نظر از روی ژل تخلیص و برای تعیین توالی با آغازگرهای RFucT و FFucT (جدول ۱) ارسال شدند.



شکل ۷. تایید حضور سازه ژنی نو ترکیب در ژنوم گیاهان عدسک آبی تراریخت با PCR. ستون ۴ الی ۱۳: محصول PCR بر روی DNA ژنومی گیاهان عدسک تراریخت واجد T-DNA؛ ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی (Ladder Mix 100bp (Thermo Fisher Scientific)؛ ستون ۳: کنترل مثبت واکنش (پلاسمید نو ترکیب pRGEB32)؛ ستون ۲: کنترل منفی واکنش (محصول PCR بر روی DNA ژنومی گیاه عدسک وحشی). محل اتصال آغازگرها در تصویر شماتیک با فلش قرمز نشان داده شده است

Figure 7. Confirmation of recombinant gene construct integration into the genome in the of transgenic duckweed plants by PCR. Lanes 4-13: PCR product from transgenic duckweed plants genomic DNA carrying T-DNA; Lane 1: 100 bp DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific); Lane 3: Positive control (recombinant pRGEB32 plasmid); Lane 2: Negative control (PCR product from wild-type duckweed genomic DNA). The primer binding sites are indicated by red arrows in the schematic diagram

نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار SnapGene 3.2.1 و از طریق مقایسه با توالی گیاه غیرتراریخت (وحشی) مورد آنالیز قرار گرفت و وجود حذف‌ها و اضافه‌های نوکلئوتیدی تأیید شد. تجزیه و تحلیل دقیق نتایج توالی‌یابی نواحی هدف در ژن *FucT* در لاین‌های مختلف گیاه عدسک آبی تراریخت، الگوهای جهشی دو آللی (Biallelic) و کایمریک را نشان داد. برای تفکیک گراف‌های کروماتوگرام توالی‌یابی از وب سرور GEAR (<https://www.gear-genomics.com>) استفاده شد (Rausch et al., 2020). داده‌های مربوط به توالی‌ها و کروماتوگرام‌های توالی‌یابی لاین‌های کایمریک نشان داده نشده‌اند. لاین‌های گیاهی کایمریک حاصل از ویرایش ژنومی با CRISPR به گیاهانی اطلاق می‌شود که تنها بخشی از سلول‌های آن‌ها در محل هدف ژنومی به‌طور موفقیت‌آمیز ویرایش شده‌اند، در حالی که سایر سلول‌ها بدون تغییر باقی مانده‌اند؛ این امر منجر به تشکیل گیاهانی می‌شود که از نظر ژنتیکی ناهمگن بوده و شامل مخلوطی از سلول‌ها با ژنوتیپ‌های متفاوت هستند. دو لاین گیاهی ۱۳ و ۲۲، جهش دو آللی را نشان دادند؛ در این حالت، هر دو آلل یک ژن دچار جهش شده‌اند، اما نوع جهش در هر آلل متفاوت است. در لاین ۱۳، یک آلل درج یک جفت باز و آلل دیگر حذف ۱۲ جفت باز را نشان داد. به همین ترتیب، در لاین ۲۲ نیز، یک آلل دارای یک جفت باز اضافه و آلل دیگر فاقد ۱۲ جفت باز بود (۸ ب).



شکل ۸. الکتروفورز محصول PCR و توالی‌یابی ناحیه هدف در ژن *FucT* در لاین‌های عدسک آبی ویراسته. (الف): تکثیر قطعه مورد نظر (۹۶۸ جفت باز) در لاین‌های عدسک. (ب): هم‌ردیفی نتایج توالی‌یابی ناحیه هدف در ژن *FucT* در لاین‌های عدسک آبی ویراسته در مقایسه با عدسک آبی وحشی؛ فلش‌ها نشان دهنده نوکلئوتیدهای تغییر یافته است. خطوط منقطع نشان دهنده نوکلئوتیدهای حذف شده است و نوکلئوتیدهای قرمز نشان دهنده درج در توالی آل ویرایش شده می‌باشد

Figure 8. PCR product electrophoresis and target region sequencing of the *FucT* gene in edited duckweed lines. (A): amplification of the desired fragment (968 bp) in duckweed lines (B): Sequence alignment of the target region of the *FucT* gene in edited and wild-type duckweed lines.; Arrows indicate altered nucleotides. Dashed lines represent deleted nucleotides, and red nucleotides indicate insertions in the sequence

نتیجه گیری: حضور قندهای اختصاصی مانند (۱،۳)- α -فوکوز در مسیر N-گلیکوزیلاسیون گیاهان، چالشی اساسی برای تولید پروتئین‌های درمانی انسانی محسوب می‌شود (Göritzer et al., 2022). لذا، مهندسی این مسیر از طریق هدف‌گیری ژن‌های کلیدی مانند *FucT* می‌تواند راهبردی موثر برای بهینه‌سازی این سیستم بیانی باشد (Bosch et al., 2013). در راستای این هدف، پژوهش حاضر با تمرکز بر گیاه *L. minor* به ساخت یک سازه ژنی نو ترکیب مبتنی بر سامانه CRISPR/Cas9 برای ایجاد جهش در ژن (۱،۳)- α -فوکوزیل ترانسفراز (*FucT*) پرداخته است. نتایج حاصل از آنالیز توالی ژن *FucT* در لاین‌های ویراسته عدسک آبی نشان داد که سامانه CRISPR/Cas9 موجب القای جهش‌های هدفمند در هر دو آل این ژن شده است. شناسایی الگوهای جهشی دوآلی در لاین‌های ۱۳ و ۲۲، که در آن‌ها هر دو آل ژن *FucT* به طور مستقل دچار تغییراتی با ماهیت متفاوت (درج و حذف بازها) شده‌اند، گویای عملکرد مناسب این سیستم در ایجاد شکست‌های دو رشته‌ای (DSB) و ترمیم آن‌ها به طور مستقل از طریق مسیر ترمیمی اتصال انتهایی غیر همسان (NHEJ) می‌باشد. با این وجود، حصول اطمینان از خاموشی کامل ژن

FucT در لاین‌های ویراستاری شده ژنتیکی، مستلزم انجام بررسی‌های تکمیلی در سطح پروتئین و الگوی گلیکوزیلاسیون می‌باشد. انجام آنالیزهایی نظیر وسترن بلات با آنتی بادی اختصاصی آنزیم *FucT* و فنل (۱،۳)- α -فوکوز و روش‌هایی نظیر MALDI-TOF MS جهت تحلیل ساختار و الگوی گلیکان‌ها، در مراحل آتی پژوهش برنامه‌ریزی شده است. اگرچه سامانه-CRISPR/Cas9 از دقت و کارایی بالایی برخوردار است، اما با محدودیت‌هایی نیز مواجه است. یکی از مهم‌ترین این محدودیت‌ها، پدیده اثرات خارج از هدف ژنومی (off-target effects) است. در این حالت، آنزیم Cas9 احتمال دارد در نواحی غیرهدف نیز باعث ایجاد شکست دو رشته‌ای DNA شود. این ویرایش‌های ناخواسته می‌توانند به تغییرات ژنتیکی غیرقابل پیش‌بینی و مضر در ژنوم منجر شوند (Fu et al., 2013; Zhang et al., 2015). لاین‌های گیاهی ویراسته شده ژنتیکی حاصل از این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی (کشت درون شیشه ای) از لحاظ زنده مان، فنوتیپی و شرایط رشدی تفاوت قابل توجهی در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت (وحشی) از خود نشان ندادند. این موضوع همچنین در سایر گیاهان مدل مانند *Nicotiana benthamiana* عموماً با عوارض فنوتیپی و رشد و نمو غیر طبیعی همراه نبوده است (Strasser et al., 2008; Hanania et al., 2017). با این حال، عدم بروز فنوتیپ بارز در شرایط استاندارد رشد درون شیشه‌ای (in vitro) یا گلخانه‌ای، لزوماً به معنای بی‌اثر بودن این خاموش‌سازی در تمامی شرایط نیست. مطالعات جامع‌تری مورد نیاز است تا مشخص شود که حذف ژن *FucT* در شرایط محیطی واقعی و به‌ویژه تحت تنش‌های زیستی (مانند حمله آفات، بیماری‌ها یا ویروس‌ها) و غیرزیستی (مانند خشکی، شوری، یا دمای بالا)، چه پیامدهایی را به همراه دارد. نتایج این مطالعه، راه را برای تحقیقات آتی در زمینه مهندسی کامل مسیر N-گلیکوزیلاسیون در *L. minor* از طریق هدف قرار دادن همزمان یا متوالی سایر ژن‌های کلیدی هموار می‌سازد. کاربرد موفقیت‌آمیز سیستم CRISPR/Cas9 برای جهش‌زایی هدفمند ژن *FucT* در *L. minor* همانطور که با حضور حذف و اضافه‌های نوکلئوتیدی در چندین لاین تراریخت مشهود است، پتانسیل این فناوری را برای ویرایش دقیق ژنوم عدسک آبی همچون سایر گیاهان نشان می‌دهد.

سپاسگزاری: از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به خاطر پشتیبانی

تجهیزاتی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Asmamaw, M., & Zawdie, B. (2021). Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *Biologics: targets and therapy*, 353–361. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- Bae, S., Park, J., & Kim, J.-S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473–1475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu048>

- Bosch, D., Castilho, A., Loos, A., Schots, A., & Steinkellner, H. (2013). N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Current pharmaceutical design*, 19(31), 5503–5512. <https://doi.org/10.2174/1381612811319310006>
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic acids research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Dicker, M., & Strasser, R. (2015). Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert opinion on biological therapy*, 15(10), 1501–1516. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1069271>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Göritzer, K., Grandits, M., Grünwald-Gruber, C., Figl, R., Mercx, S., Navarre, C., Ma, J. K., & Teh, A. Y. (2022). Engineering the N-glycosylation pathway of *Nicotiana tabacum* for molecular pharming using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1003065. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1003065>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(12). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>
- Hanania, U., Ariel, T., Tekoah, Y., Fux, L., Sheva, M., Gubbay, Y., Weiss, M., Oz, D., Azulay, Y., & Turbovski, A. (2017). Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant biotechnology journal*, 15(9), 1120–1129. <https://doi.org/10.1111/pbi.12702>
- Harmoko, R., Yoo, J. Y., Ko, K. S., Ramasamy, N. K., Hwang, B. Y., Lee, E. J., Kim, H. S., Lee, K. J., Oh, D. B., & Kim, D. Y. (2016). N-glycan containing a core α 1, 3-fucose residue is required for basipetal auxin transport and gravitropic response in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 212(1), 108–122. <https://doi.org/10.1111/nph.14031>
- Heenatigala, P., & Hou, H. (2024). Duckweed, an Efficient Green Bio-Factory for the Production of Recombinant Proteins. *Applications of Plant Molecular Farming*, 613–630. https://doi.org/10.1007/978-981-97-0176-6_22
- Holsters, M., De Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., & Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 163(2), 181–187. <https://doi.org/10.1007/BF00267408>
- Kazempour, E., Sasan, H., Mohammadabadi, M. (2025). The effect of the intrinsic resistance of *Shigella flexneri* 2a to spectinomycin on the efficiency of the CRISPR/Cas9 system. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(3), 177-200. <https://doi.org/10.22103/jab.2025.25382.1717>
- Liu, Y., Wang, Y., Xu, S., Tang, X., Zhao, J., Yu, C., He, G., Xu, H., Wang, S., & Tang, Y. (2019). Efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Lemna*

- aequinoctialis. *Plant biotechnology journal*, 17(11), 2143–2152. <https://doi.org/10.1111/pbi.13128>
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant molecular biology Reporter*, 12(1), 6–13. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- Mammedov, T., & Gun, N. (2022). Post-translational modifications of recombinant proteins produced in plants: review. *MedScience*, 5, 154–161. <https://doi.org/10.5455/medscience.2021.07.242>
- Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M., & Navarre, C. (2017). Inactivation of the β (1, 2)-xylosyltransferase and the α (1, 3)-fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans. *Frontiers in Plant Science*, 8, 403. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>
- Park, J., Bae, S., & Kim, J.-S. (2015). Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*, 31(24), 4014–4016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv537>
- Pasos-Panqueva, J., Baker, A., & Camargo-Valero, M. A. (2024). Unravelling the impact of light, temperature and nutrient dynamics on duckweed growth: A meta-analysis study. *Journal of environmental management*, 366, 121721. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121721>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., & Colwell, L. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic acids research*, 51(D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Rausch, T., Fritz, M. H.-Y., Untergasser, A., & Benes, V. (2020). Tracy: basecalling, alignment, assembly and deconvolution of sanger chromatogram trace files. *BMC genomics*, 21(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6635-8>
- Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC bioinformatics*, 11(1), 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Detection of DNA in agarose gels. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 5–14.
- Sim, J.-S., Kesawat, M. S., Kumar, M., Kim, S.-Y., Mani, V., Subramanian, P., Park, S., Lee, C.-M., Kim, S.-R., & Hahn, B.-S. (2018). Lack of the α 1, 3-Fucosyltransferase gene (*Osfuct*) affects anther development and pollen viability in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1225. <https://doi.org/10.3390/ijms19041225>
- Sosa, D., Alves, F. M., Prieto, M. A., Pedrosa, M. C., Heleno, S. A., Barros, L., Feliciano, M., & Carochi, M. (2024). *Lemna minor*: Unlocking the value of this duckweed for the food and feed industry. *Foods*, 13(10), 1435. <https://doi.org/10.3390/foods13101435>

- Sree, K. S., Bog, M., & Appenroth, K.-J. (2016). Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 28(5). <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-038>
- Strasser, R. (2022). Recent developments in deciphering the biological role of plant complex N-glycans. *Frontiers in Plant Science*, 13, 897549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.897549>
- Strasser, R., Stadlmann, J., Schähs, M., Stiegler, G., Quendler, H., Mach, L., Glössl, J., Weterings, K., Pabst, M., & Steinkellner, H. (2008). Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant biotechnology journal*, 6(4), 392–402. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x>
- Taghipour, E., Bog, M., Frootan, F., Shojaei, S., Rad, N., Arezoumandi, M., Jafari, M., & Salmanian, A. H. (2022). DNA barcoding and biomass accumulation rates of native Iranian duckweed species for biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1034238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1034238>
- Taghipour, E., Rad, N., Shojaei, S., Arezoumandi, M., Frootan, F., Yaghoubi, S., Jafari, M., & Salmanian, A. H. (2025). The Effect of culture conditions and medium on the in-vitro cultivation of three species of duckweed native to Iran as a plant with biotechnological applications. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 38(4), 405–420. <https://doi.org/10.22034/jpr.2024.8458.3356>
- Xie, K., & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular plant*, 6(6), 1975–1983. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>
- Yang, G.-L., Feng, D., Liu, Y.-T., Lv, S.-M., Zheng, M.-M., & Tan, A.-J. (2021). Research progress of a potential bioreactor: duckweed. *Biomolecules*, 11(1), 93. <https://doi.org/10.3390/biom11010093>
- Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., & Yang, S.-H. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular therapy Nucleic acids*, 4. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>