

Research Paper

A *de novo* Analysis for the Expression Atlas of Fatty Acid and Tocopherol Biosynthesis in Safflower Oilseed Plants, Cultivar Goldasht

Farshid Sharifian¹, Hassan Jamshidi², Seyed Mehdi Alavi³  and Naser Farrokhi⁴

1 and 2- Ph.D. Student, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, (Corresponding author: mealavi@nigeb.ac.ir)

4- Associate Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 14 December, 2024

Revised: 17 March, 2025

Accepted: 23 May, 2025

Extended Abstract

Background: The safflower oilseed plant (*Carthamus tinctorius* L.) has favorable agronomic and yield characteristics that make it a suitable crop for various practical purposes and achieving sustainable development in the food, energy, and pharmaceutical industries. This plant has various medical, industrial, and nutritional applications. The high quality of the oil (more than 90% unsaturated fatty acids of oleic and linoleic acids), high tolerance to abiotic stresses (cold, salinity, and drought), and the wide range of cultivation have always been of interest. Knowledge of the expression atlas of this plant during its growth and development helps to modify agricultural characteristics, including improving yield, quality, nutritional, and health factors. Due to the good quality of the oil extracted from its seeds, the cultivation of this industrial plant has recently received attention in countries with hot and dry ecosystems. The lack of detailed knowledge about the genome structure and the function of genes is one of the limiting factors to accelerate safflower breeding programs to improve the quality and quantity of this plant. Most safflower NGS studies have been conducted to investigate genetic diversity and identify molecular markers. In this study, the molecular factors involved in the biosynthesis of fatty acids and tocopherol of safflower seeds are considered based on RNA-seq data.

Methods: In this research, the Goldasht variety was selected among the local and commercial safflower varieties available in Iran. This variety has outstanding features, such as high tolerance to salinity and drought, red flowers, spineless, medium height, and large capitula. The seeds were planted in the research farm of the National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology in the 2018-2019 cultivation year. The plants were sampled with the daily monitoring of plant growth after the start of reproductive growth. Samples were collected from seed development stages, including seed formation (14 days after flowering), seed filling (28 days after flowering), and physiological ripening (35 days after flowering), to examine the transcriptome of safflower seed development. Each sample consisted of five sub-replicates and two replicates. Total RNA was extracted from the samples using a modified Trizol method. In this study, the BGISEQ-500 platform was used for sequencing and produced 100 bp pair-end reads for each library. FastQC and Trimmomatic software were used to evaluate the quality and clean up the raw reads of each library, respectively. Trinity software was used to assemble the filtered reads of all samples. Differentially Expressed Transcripts (DETs) and their clustering were obtained using the DESeq2 package in R. Functional annotation was performed using Trinotate, gene enrichment was performed using the goseq package in R, and the biochemical pathway was identified using the KEGG database.

Results: An average of 71 million reads was obtained from each library. As a result of reassembling and creating a reference transcriptome, the alignment rate of raw data against the final assembled file was 97.29%. After screening the data, 86,585 transcripts were categorized into 68,809 genes. A total of 16,755 DETs were identified in this analysis. The highest number of transcripts identified with differential expression in pairwise comparisons and during the seed development stages belonged to the transition phase from seed filling to seed maturation, with 10,198 transcripts. Three main patterns of gene expression were evident based on the results of seed transcriptome atlas data analysis. Most genes at 14 days after flowering (DAF) coincided with a rapid increase in oil content during seed development. Genes that were highly expressed at 14 and 28 DAF were related to the formation of metabolites and early stages of oil biosynthesis,

including the formation of pyruvate and acetyl-CoA. Moreover, genes related to protein storage peaked at 35 DAF. Genes were identified using five public databases (NR, COG, Swiss-Prot, KEGG, and GO). In the KEGG database, all identified genes were classified into 398 biological pathways and eight functional categories, which were related to fatty acid and tocopherol biosynthesis, with the synthesis of lipid metabolites and ubiquinone during safflower seed growth and development.

Conclusion: The expression profile of the genes involved in the biosynthesis of unsaturated fatty acids showed a higher frequency of their expression in the first stage of seed development. Furthermore, this level of expression was at its lowest level during seed maturation. Studying the expression profile of the genes involved in the metabolic pathway of tocopherol biosynthesis showed a higher frequency of occurrence of these genes in the middle and final stages of seed development, which indicates a clear temporal relationship between oil accumulation and physiological changes in safflower seeds. This study shows that the increased expression of genes related to fatty acid biosynthesis occurs earlier than seed development. Besides, oil accumulation begins before the accumulation of proteins in safflower seeds. Identifying the molecular factors involved in improving plant yield and the identification of the interaction between them as well as with the environment can be a valuable tool for better crop management and breeding activities.

Keywords: *De novo* RNA-seq, Gene expression, Safflower, Tocopherol, Unsaturated fatty acids

How to Cite This Article: Sharifian, F., Jamshidi, H., Alavi S. M., & Farrokhi, N. (2025). A de novo Analysis for the Expression Atlas of Fatty Acid and Tocopherol Biosynthesis in Safflower Oilseed Plants, Cultivar Goldasht. *J Crop Breed*, 17(3), 60-73. DOI: 10.61882/jcb.2024.1571



مقاله پژوهشی

بررسی ازنو اطلس بیوسنتز اسید چرب و توکوفرول در گیاه دانه روغنی گلرنگ، رقم زراعی گلدشت

فرشید شریفیان^۱، حسن جمشیدی^۲، سید مهدی علوی^۳ و ناصر فرخی^۴

۱ و ۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
 ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، (نویسنده مسؤل: mealavi@nigeb.ac.ir)
 ۴- دانشیار، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷
صفحه: ۶۰ تا ۷۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گیاه دانه روغنی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) دارای ویژگی‌های زراعی و عملکردی مطلوبی است که آن را به گزینه‌ای مناسب برای اهداف کاربردی مختلف و دستیابی به توسعه پایدار در صنعت غذا، انرژی و دارو تبدیل می‌کند. این گیاه کاربردهای مختلفی از جمله استفاده‌های پزشکی، صنعتی و تغذیه‌ای دارد. کیفیت بالای روغن (بیش از ۹۰ درصد اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک)، تحمل بالا در برابر تنش‌های غیرزیستی (سرما، شوری و خشکی) و دامنه وسیع کشت، همیشه مورد توجه بوده‌اند. آگاهی از اطلس بیانی این گیاه در طول دوره رشد و نمو برای بهینه‌سازی و تکامل ویژگی‌های زراعی، بهبود عملکرد، کیفیت محصول و اطمینان از عوامل تغذیه‌ای و سلامتی که امکان تولید یک محصول کاربردی را فراهم می‌کند، بسیار مهم است. کشت و کار این گیاه صنعتی به واسطه‌ی کیفیت مطلوب روغن استحصال‌شده از بذور آن اخیراً در کشورهای با اکوسیستم گرم و خشک، مورد توجه قرار گرفته است. عوامل محدودکننده در تسریع برنامه‌های اصلاحی گلرنگ، کمبود دانش دقیق در مورد ساختار ژنوم و عملکرد ژن‌ها به‌منظور بهبود کیفیت و کمیت این گیاه است. بیشتر مطالعات NGS گلرنگ برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی در گلرنگ انجام شده‌اند. در این مطالعه، عوامل مولکولی دخیل در بیوسنتز اسیدهای چرب و توکوفرول بذرهای گلرنگ بر پایه داده‌های RNA-seq مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، رقم گلدشت از میان ارقام بومی و تجاری گلرنگ موجود در کشور انتخاب شد. این رقم دارای ویژگی‌های برجسته‌ای از جمله تحمل بالا به شوری و خشکی، گل‌های قرمز، عدم وجود خار، ارتفاع متوسط و قوزه‌های بزرگ است. بذور در سال زراعی ۹۷-۹۸ و در مزرعه تحقیقاتی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری کشت شدند. نمونه‌گیری بر نظارت روزانه در خصوص رشد گیاه پس از آغاز رشد زایشی از بافت بذر انجام شد. نمونه‌ها از مراحل نمو بذر شامل تشکیل بذر (۱۴ روز پس از شروع گلدهی)، پر شدن بذر (۲۸ روز پس از شروع گلدهی) و رسیدن فیزیولوژیک (۳۵ روز پس از شروع گلدهی) برای بررسی ازنو اطلس ترانسکریپتوم نمو بذر گلرنگ جمع‌آوری شدند. هر نمونه شامل پنج زیرتکرار و دو تکرار بود. RNA کل از نمونه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته ترانزکریپتوم استخراج شد. در این مطالعه از پلتفرم BGISEQ-500 برای توالی‌یابی استفاده شد و خوانش‌هایی با طول ۱۰۰ جفت باز برای هر کتابخانه به‌صورت pair-end تولید کرد. برای ارزیابی کیفیت و پاکسازی خوانش‌های خام هر کتابخانه، به‌ترتیب از نرم‌افزارهای Trimmomatic و Trimmomatic استفاده شد. برای سرهم‌بندی خوانش‌های فیلترشده همه نمونه‌ها از نرم‌افزار Trinity استفاده شد. ترانسکریپت‌های با بیان متمایز (DETs) و خوشه‌بندی آنها با استفاده از DESeq2 در R به‌دست آمد. حاشیه‌نویسی عملکردی با استفاده از Trinotate و غنی‌سازی ژن با استفاده از بسته goseq و R و شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی با استفاده از پایگاه داده KEGG انجام شدند.

یافته‌ها: در نتیجه توالی‌یابی به‌طور متوسط از هر کتابخانه بالغ بر ۷۱ میلیون خوانش به دست آمد. در نتیجه سرهم‌بندی ازنو و ایجاد ترانسکریپتوم مرجع، نرخ هم‌ردیفی داده‌های خام بر علیه فایل نهایی سرهم‌بندی شده ۹۷/۲۹ درصد بود. پس از غربال‌گری داده‌ها، تعداد ۸۶،۵۸۵ ترانسکریپت در قالب ۶۸،۸۰۹ ژن دسته‌بندی شدند. در مجموع، تعداد ۱۶،۷۵۵ ترانسکریپت با بیان افتراقی شناسایی گردید. بیشترین میزان ترانسکریپت‌های شناسایی شده با بیان افتراقی در مقایسات دوتایی و در طول مراحل نمو بذر مربوط به فاز گذر از مرحله‌ی پر شدن بذر (seed filling) به مرحله‌ی بلوغ بذر (seed maturation) با ۱۰،۱۹۸ ترانسکریپت بود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های اطلس ترانسکریپتوم بذر، سه الگوی اصلی بیان ژن مشهود بود. بیشتر ژن‌ها در ۱۴ روز پس از گل‌دهی (DAF) به اوج رسیدند که هم‌زمان با افزایش سریع محتوای روغن در طول توسعه بذر بود. ژن‌هایی که در ۱۴ و ۲۸ روز پس از گل‌دهی بیان بالایی داشتند، با تشکیل متابولیت‌ها و مراحل اولیه سنتز روغن، از جمله تشکیل پیرووات و استیل-CoA، مرتبط بودند. همچنین، ژن‌های مرتبط با ذخیره‌سازی پروتئین در ۳۵ روز پس از گل‌دهی به اوج خود رسیدند. ژن‌ها با استفاده از پنج پایگاه داده عمومی (GO، KEGG، Swiss-Prot، COG، NR) شناسایی شدند. در پایگاه داده KEGG، همه ژن‌های شناسایی‌شده در ۳۹۸ مسیر زیستی و هشت دسته عملکردی طبقه‌بندی شدند که بیوسنتز اسید چرب و توکوفرول با سنتز متابولیت‌های لیپید و یوبی‌کینون در طول رشد و توسعه بذر گلرنگ مرتبط بودند.

نتیجه‌گیری: پروفایل بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسیدچرب غیر اشباع، نشان از تمرکز بیان آن‌ها در مرحله اول نمو بذر داشت. همچنین، این میزان بیان در مرحله بلوغ در کمترین میزان خود قرار داشت. بررسی پروفایل بیانی ژن‌های درگیر در مسیر متابولیکی بیوسنتز توکوفرول نشان از تمرکز بروز این ژن‌ها در مراحل میانی و پایانی نمو بذر داشت که نشان‌دهنده رابطه زمانی واضح بین تجمع روغن و تغییرات فیزیولوژیکی در دانه‌های گلرنگ است. این مطالعه بیان می‌کند که اوج بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب زودتر از توسعه دانه رخ می‌دهد. همچنین، تجمع روغن قبل از تجمع پروتئین‌ها در دانه‌های گلرنگ آغاز می‌شود. شناسایی عوامل مولکولی دخیل در بهبود عملکرد گیاه و تبیین ارتباط بین آنها با یکدیگر و همچنین محیط، می‌تواند ابزار ارزشمندی برای مدیریت بهتر زراعی و فعالیت‌های اصلاحی در اختیار اصلاح‌گران قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: اسید چرب غیر اشباع، بیان ژن، توکوفرول، گلرنگ، De novo RNA-seq

مقدمه

زراعی آن‌ها، یکی از راه‌های رسیدن به توسعه پایدار و تحقق اهداف اقتصادی، اجتماعی و زیست‌محیطی خواهد بود. در میان محصولات روغنی، گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L) دارای ویژگی‌های مطلوبی است که آن را به

امروزه، دستیابی به توسعه پایدار یکی از اهداف مهم کشاورزی مدرن، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک است. کشت محصولات چندمنظوره با توجه به ظرفیت‌های اقلیمی و

گزینه‌ای مناسب برای این هدف و همچنین دستیابی به توسعه پایدار در صنعت غذا، انرژی و دارو تبدیل می‌کند (Mani et al., 2020). گلرنگ یک گیاه دولپه، دیپلوئید ($2n = 2x = 24$) و خودبارور از خانواده Asteraceae است (Chen et al., 2023). جنس *Carthamus* دارای ۱۸ گونه مختلف است که گونه زراعی آن به *tinctorius* تعلق دارد (Golkar et al., 2006; Singh et al., 2011). کشت این گیاه به ۴۰۰۰ سال پیش بازمی‌گردد و ایران یکی از غنی‌ترین مناطق جهان از نظر منابع ژنتیکی گلرنگ است که به‌عنوان یکی از مراکز تنوع برای این گیاه شناخته می‌شود (Singh et al., 2006).

این گیاه کاربردهای مختلفی از جمله استفاده‌های پزشکی، صنعتی و تغذیه‌ای دارد. از طرفی، ویژگی‌های خاصی از جمله کیفیت بالای روغن (بیش از ۹۰ درصد اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک)، تحمل بالا در برابر تنش‌های غیر زیستی (سرما، شوری و خشکی) و دامنه وسیع کشت، همیشه مورد توجه بوده‌اند (Gecgel et al., 2017; Nazari et al., 2023). امروزه، تولید روغن هدف اصلی کشت و کار گلرنگ است (Golkar et al., 2011). محتوای روغن بذر گلرنگ از ۲۰ تا ۴۵ درصد متغیر است که به نوع و شرایط محیطی و ژنتیکی بستگی دارد (Gecgel et al., 2017). ۲۳ تا ۶۰ درصد از بذر گلرنگ شامل پوست بذر است و تخمین زده می‌شود که این مقدار برای مغز بذر حدود ۴۰ تا ۶۷ درصد باشد (Singh et al., 2006; Golkar et al., 2011). طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و فیزیوشیمیایی نشان‌دهنده تنوع و توزیع بالای ویژگی‌های مختلف در این محصول است که تحت تأثیر محیط، ژنتیک و تعاملات آنها قرار دارد (Amini et al., 2008). استفاده از گلرنگ در صنایع دارویی و آرایشی نیز به دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی و آلکالوئیدی در اندام‌های مختلف گیاه (گل‌ها، برگ‌ها و بذرها) به مدت طولانی مد نظر قرار گرفته است (Jeong et al., 2020; Mani et al., 2020). این محصول به تازگی توجه جهانی را در صنایع سوخت و روغن‌های صنعتی را نیز جلب کرده است (Nosheen et al., 2018). با وجود مزایای زراعی، اقتصادی و زیست‌محیطی ذکر شده برای گلرنگ، این محصول کمتر از سایر دانه‌های روغنی مورد توجه قرار گرفته است. عملکرد پایین، دوره رشد طولانی، آسیب‌پذیری در برابر تنش‌های زیستی و محدود بودن دانش مولکولی در مورد این محصول از جمله عواملی هستند که توسعه کشت و استفاده از این گیاه را محدود می‌کنند (Golkar et al., 2011; Sehgal et al., 2009). گلرنگ در حال حاضر در بیش از ۲۵ کشور کشت می‌شود و روسیه، قزاقستان، هند، آرژانتین، مکزیک و ایالات متحده آمریکا، ازبکستان و ترکیه کشورهای اصلی کشت گلرنگ هستند (FAOSTAT Online Database., 2022). ابزارهای مولکولی برای شناسایی، تفکیک، طبقه‌بندی و بهره‌برداری صحیح از ژرمپلاسماهای گیاهی ضروری هستند. بیشتر تحقیقات در مورد گلرنگ بر ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرمپلاسماهای جمع‌آوری شده متمرکز شده‌اند (Vijay et al.,

2009; Ebrahimi et al., 2017; Nazari et al., 2023). عوامل محدودکننده در تسریع برنامه‌های اصلاحی گلرنگ، کمبود دانش دقیق در مورد ساختار ژنوم و عملکرد ژن‌ها به منظور بهبود کیفیت و کمیت این گیاه است. بیشتر مطالعات NGS^۱ گلرنگ برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی در گلرنگ انجام شده‌اند (Lulin et al., 2009; Ebrahimi et al., 2017; Vijay et al., 2012). طبق گزارش ارائه‌شده، تعداد بسیار کمی برچسب ژنتیکی برای این محصول در پایگاه‌های داده ژنتیکی وجود دارند (Wu et al., 2021). این اطلاعات به توالی نوکلئوتیدی این گیاه محدود می‌شود که برای شناسایی نشانگرهای SNP و میکروساتلایت (Ambreen et al., 2015; Ambreen et al., 2018) و ترانسکریپتوم‌های چندین بافت خاص مانند برگ‌ها، بذرها و گل‌ها (Lulin et al., 2012; Liu et al., 2015; Li et al., 2021) با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای بالقوه برای بیوسنتز اولئوسین (Chen et al., 2018)، فلاونوئیدها و رنگدانه‌ها (Wang et al., 2018; Chen et al., 2020) و microRNAs (Bowers et al., 2016) درگیر در این فرآیندها متمرکز است. ایالات متحده، چین، هند و استرالیا کشورهایی هستند که از سال ۲۰۱۱ فعالیت‌های مولکولی و اصلاحی در مورد گلرنگ انجام داده‌اند (Ambreen et al., 2015; Bowers et al., 2016).

سال ۲۰۱۱ را می‌توان به‌عنوان آغاز مطالعات مولکولی گلرنگ در نظر گرفت که تاکنون ادامه داشته‌اند. با توجه به اهمیت گلرنگ، استفاده از تکنولوژی‌های تعیین توالی و بیوانفورماتیک می‌تواند در شناسایی اطلاعات مولکولی گلرنگ و تسریع برنامه‌های اصلاح مولکولی آن بسیار مؤثر باشد. امروزه، فناوری RNA-Seq به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی ترانسکریپتوم‌های گیاهی استفاده می‌شود. اندازه ژنوم هاپلوئید گلرنگ به‌طور تخمینی ۱/۴ گیگاباز (Gbp) است (Bowers et al., 2016). این مسئله به‌علاوه پیچیدگی ساختاری‌اش، مطالعات ژنومی گلرنگ را تا حدی محدود کرده است. به‌عنوان جایگزین، مطالعه ترانسکریپتوم امکان شناسایی عوامل عملکردی گیاه تحت شرایط محیطی خاص و برآورد کمی بیان ژن‌ها و ایزوفرم‌های مختلف را فراهم کرده است. در مورد گلرنگ، مطالعات ترانسکریپتومی عمدتاً محدود به پایش مسیرهای متابولیکی مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فلاونوئیدی و آلکالوئیدی، رنگدانه‌ها، اولئوزین و شناسایی ژن‌های مرتبط با آن‌ها بوده‌اند (Chen et al., 2020; Li et al., 2015; Ren et al., 2018). مقدار و کیفیت روغن از جمله عوامل اصلی در ارزیابی محصولات روغنی به‌شمار می‌آیند (Nikpour et al., 2023). شناسایی اجزای مولکولی مرتبط و تلاش برای بهبود و اصلاح آن‌ها همواره مورد توجه بوده‌اند (Fan et al., 2023; Ghanbari et al., 2022). محتوای هر متابولیت و ترکیب آن‌ها در روغن محصولات روغنی، تحت تأثیر نوع گیاه و شرایط محیطی حاکم بر رشد و توسعه آن قرار دارند و در مراحل

¹ Next generation sequencing

مختلف رشد و نمو تغییر می کنند (Yang *et al.*, 2019; Abdullah *et al.*, 2016; Ghanbari *et al.*, 2022). استفاده از ترانسکریپتوم برای بررسی بیان ژن ها در محصولات روغنی به ویژه در سال های اخیر روند رو به رشدی داشته است (Bordbar *et al.*, 2023). گیاهان روغنی مانند کلزا (Shahid *et al.*, 2019)، کرچک (Brown *et al.*, 2012)، سویا (Yang *et al.*, 2019)، کاملینا (Abdullah *et al.*, 2016) و sunflower (Pilorgé *et al.*, 2020) در این مطالعات مورد بررسی قرار گرفته اند.

هدف از این مطالعه، شناسایی عوامل مولکولی مؤثر در بهبود ارزش غذایی روغن این محصول با ارزیابی اطلس ترانسکریپتوم مراحل رشد دانه در رقم گلرنگ ایرانی گلدشت با استفاده از تکنیک RNA-Seq بود. این مطالعه به ارزیابی بیان ژن و پروفایل های بیان در طول مراحل رشد بذر در گلرنگ مربوط می شود. این یافته ها می توانند در ایجاد و روشن کردن فرآیندهای درگیر در توسعه کشت و کار این گیاه بسیار مؤثر باشند و پایه مناسبی را برای فعالیتهای اصلاحی آینده گلرنگ فراهم کنند.

ترانسکریپت های با بیان متمایز (DETs) و خوشه بندی آنها بر اساس الگوی بیان در نمونه ها با استفاده از بسته DESeq2 در R به دست آمد. ترانسکریپت های با $FDR \leq 0.0001$ و تغییرات $FC > 2$ به عنوان ترانسکریپت های با بیان افتراقی (DETs) در نظر گرفته شدند. سپس، بیان خاص هر نمونه در مقایسه های جفتی ارزیابی شد تا مسیرهای تغییرات پروفایل بیان در طول رشد دانه تعیین شوند.

مناطق کدکننده (ORF) در چهار گروه ORF های کامل، ORF های انتهایی ۵'، ORF های انتهایی ۳' و ORF های داخلی دسته بندی شدند. جستجوی همولوژی با استفاده از BLASTp علیه پایگاه داده Uniprot و Pfam انجام شد.

حاشیه نویسی عملکردی با استفاده از Trinotate و غنی سازی آناتومی ژن با استفاده از بسته goseq در R انجام شدند. همچنین، شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی با استفاده از پایگاه داده KEGG انجام شد.

نتایج و بحث

در نتیجه توالی یابی RNA، به طور متوسط از هر کتابخانه بالغ بر ۷۱ میلیون خوانش با طول ۱۰۰ جفت باز و Q20 بیشتر از ۹۶ درصد به عنوان معیاری برای نشان دادن کیفیت خوانش ها در توالی یابی که برای Q20 یعنی احتمال خطا در تشخیص باز، ۱ درصد است، به دست آمد (جدول ۱). در نتیجه سرهم بندی از نو و ایجاد ترانسکریپتوم مرجع، نرخ هم ردیفی داده های خام بر علیه فایل نهایی سرهم بندی شده ۹۷/۲۹ درصد همخوانی مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از اجرای Busco در جهت map کردن ترانسکریپت های سرهم بندی شده بر علیه پایگاه داده های گیاهی completeness برابر با ۹۲/۲۰ درصد تخمین زده شد. در مجموع و از میان ۲۰۴،۲۵۶،۷۳۳ نوکلئوتید سرهم بندی شده (شامل ۱۶۰،۲۱۴ ژن و ۲۲۴،۹۵۱ ترانسکریپت)، متوسط طول کانتیگ ۴۳۷ جفت باز با N50 برابر با ۱۶۲۴ جفت باز و محتوای GC برابر با ۴۰/۱۴ درصد ایجاد گردید (شکل ۲).

هدف از این مطالعه، شناسایی عوامل مولکولی مؤثر در بهبود ارزش غذایی روغن این محصول با ارزیابی اطلس ترانسکریپتوم مراحل رشد دانه در رقم گلرنگ ایرانی گلدشت با استفاده از تکنیک RNA-Seq بود. این مطالعه به ارزیابی بیان ژن و پروفایل های بیان در طول مراحل رشد بذر در گلرنگ مربوط می شود. این یافته ها می توانند در ایجاد و روشن کردن فرآیندهای درگیر در توسعه کشت و کار این گیاه بسیار مؤثر باشند و پایه مناسبی را برای فعالیتهای اصلاحی آینده گلرنگ فراهم کنند.

مواد و روش ها

برای این تحقیق، رقم گلدشت از میان ارقام بومی و تجاری گلرنگ موجود در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران انتخاب شد. این رقم دارای ویژگی های برجسته ای از جمله تحمل بالا به شوری و خشکی، گل های قرمز، عدم وجود خار، ارتفاع متوسط و قوزه های بزرگ است (Omid & Sharifmogadas, 2010). کشت بذور در سال زراعی ۲۰۱۸-۲۰۱۹ و در مزرعه تحقیقاتی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شد (این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی 687 در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به انجام رسیده است).

نمونه گیری از بذور پس از شروع گلدهی و رشد زایشی در گیاه انجام شد. نمونه های بذر در قالب پنج زیر تکرار و دو تکرار نهایی برای سه مرحله نمو بذر شامل ۱۴ روز پس از شروع گلدهی (seed formation; S1)، ۲۸ روز پس از شروع گلدهی (seed filling; S2) و ۳۵ روز پس از شروع گلدهی (maturation; S3) تهیه شد (شکل ۱).

بلافاصله پس از نمونه گیری، نمونه ها در نیتروژن مایع (۸۰- درجه) ذخیره و تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. RNA کل از نمونه ها با استفاده از روش تغییر یافته TRIzol (Invitrogen) طبق دستورالعمل تولید کننده استخراج شد. RNA استخراج شده با DNase (Invitrogen) برای حذف DNA ژنومی تیمار شد. کیفیت و کمیت RNA به ترتیب با استفاده از ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ (w/v) و همچنین دستگاه Nanodrop (Thermo Scientific) ارزیابی شدند. در نهایت، نمونه هایی با $RNA\ integrity > 7$ برای توالی یابی انتخاب شدند.

مقادیر مساوی RNA از پنج زیر تکرار مربوط به هر تکرار تجمیع شدند. کتابخانه های cDNA با استفاده از کیت آماده سازی (mRNA stranded TruSeq Illumina) آماده سازی

(شکل ۶). غالب ژن‌های حاشیه‌نویسی شده در کلاستر متابولیسم قرار گرفتند (۴۲/۵۹ درصد). در راستای شناسایی ژن‌های مربوط به متابولیسم اسیدهای چرب، ۱۷۷ ژن شناسایی شد، که تعداد ۳۲ ژن در متابولیسم گلیسروفوسفولیپید، ۲۶ ژن گلیسرولیپید، ۱۵ ژن در مسیر متابولیسمی بیوستنژ اسیدهای چرب، ۱۵ ژن مربوط به بیوستنژ آلفالینولیک اسید، ۱۴ ژن در مسیر تجزیه‌ی اسید چرب، ۱۸ ژن در مسیر بیوستنژ استروئید، ۵ ژن در مسیر توسعه زنجیره کربنی اسید چرب، ۴ ژن در مسیر سنتز و تجزیه کتون بادی‌ها، هشت ژن در مسیر بیوستنژ واکس و موم، سه ژن درگیر در مسیر بیوستنژ هورمون استروئید، هشت ژن در مسیر متابولیسم اترلیپید، ۱۰ ژن در متابولیسم اسفنیگولیپید، هفت ژن در مسیر متابولیک آراشیدونیک اسید، چهار ژن در متابولیسم لینولئیک اسید و هشت ژن مربوط به مسیر بیوستنژ چربی‌های غیر اشباع بودند (شکل ۶). در مجموع، تعداد ۵۹ ORF از ژن‌های حاشیه‌نویسی شده مربوط به مسیرهای متابولیسمی شناسایی شده در زیرگروه مسیر متابولیسمی بیوستنژ اسیدهای چرب قرار گرفت (شکل ۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده، مسیر متابولیسمی بیوستنژ اسید چرب را می‌توان در سه بخش مورد بررسی قرار داد: تشکیل اسید چرب، توسعه زنجیره کربنی اسیدهای چرب و پایان تشکیل اسید چرب. بیشترین میزان بیان ژن‌های مربوط به شروع تشکیل اسید چرب، مربوط به نمونه‌ی ۲۸ روز بعد از گلدهی بود و بیان آن‌ها در طول مدت زمان نمو بذر و در گذر از فاز پرشدن به بلوغ بذر به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند.

پس از غربال‌گری داده‌ها بر اساس TPM و C.V، تعداد ۸۶،۵۸۵ ترانسکریپت در قالب ۶۸،۸۰۹ ژن غربال شدند (شکل ۳). در مجموع، تعداد ۱۶،۷۵۵ ترانسکریپت با بیان افتراقی (FC = 2 و FDR = 0.0001) شناسایی گردیدند (شکل ۴). بیشترین میزان ترانسکریپت‌های شناسایی‌شده با بیان افتراقی در مقایسات دوتایی و در طول مراحل نمو بذر مربوط به فاز گذر از مرحله‌ی پر شدن بذر (S2) به مرحله‌ی بلوغ بذر (S3) (با ۱۰۱۹۹ ترانسکریپت بود (شکل ۴). بنا به نتایج آنالیز ترانسکریپت‌های با بیان افتراقی، بین نمونه‌ها و تکرارهای مربوط به آن، بیشترین تغییرات به لحاظ مولکولی، در نمونه‌ی مربوط به مرحله‌ی پر شدن بذر مشاهده شد. از این نظر، می‌توان این مرحله از نمو بذر را (۲۸ روز بعد از شروع گلدهی؛ S2)، به‌عنوان مرحله‌ای مهم و تاثیرگذار در نمو بذر به لحاظ تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی در طول رشد و نمو این گیاه دانه روغنی قلمداد کرد (شکل ۵).

جهت شناسایی ORF در قالب ۸۶،۵۸۵ ترانسکریپت، از transdecoder استفاده گردید. در نهایت، تعداد ۳۵،۲۳۲ ORF نهایی در قالب چهار تیپ مختلف شناسایی شد. حدود ۶۰ درصد از مجموع ORF‌های نهایی در تیپ ORF کامل قرار گرفت (شکل ۳). در نتیجه حاشیه‌نویسی کاربردی ORF‌های شناسایی شده، نهایتاً تعداد ۲۸،۹۶۴ پروتئین شناسایی شد. در نتیجه بررسی تعداد ۳۵،۲۳۲ توالی پپتیدی شناسایی شده بر علیه پایگاه داده KEGG، نرخ حاشیه‌نویسی ۳۸/۶ درصد در قالب ۳۹۸ مسیر بیولوژیکی و هشت گروه کاربردی مشاهده شد.



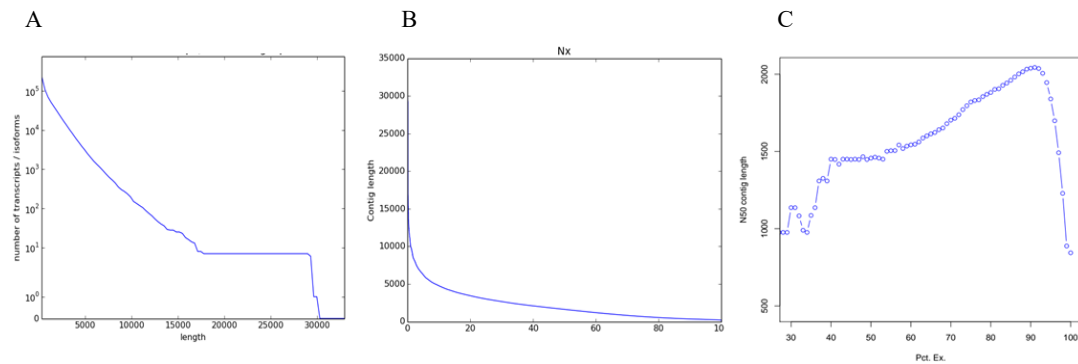
شکل ۱- مراحل رشد بذر (S1 (14 DAF)، S2 (28 DAF) و S3 (35 DAF) از چپ به راست.
Figure 1. Seed developmental stages (S1 (14 Days After Flowering), S2 (28 Days After Flowering), and S3 (35 Days After Flowering) from left to right)

جدول ۱- نتایج RNAseq، پاکسازی شده مربوط به مراحل سه‌گانه‌ی نمو بذر در گلرنگ

Table 1. Trimmed RNAsed data from safflower three seed developmental stages

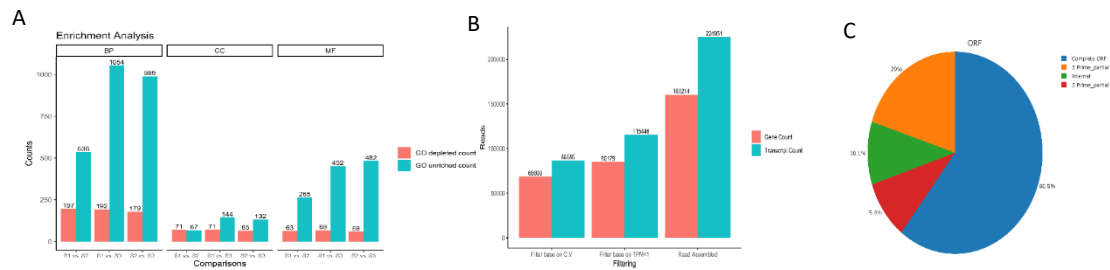
مونه	مرحله نمو (DAF)*	خوانش تمیز Clean Reads	باز تمیز Clean Bases	طول خوانش Base Pair(bp)	N (%)	Q20 (%)	GC (%)
2-2	14	71,995,424	7,199,542,400	100	0	96.58	46.13
3-4	14	72,264,782	7,226,478,200	100	0	96.63	46.10
4-3	28	71,962,214	7,196,221,400	100	0	96.55	48.08
5-4	28	71,432,198	7,143,219,800	100	0	97.13	46.81
6-2	35	71,448,676	7,144,867,600	100	0	96.74	47.90
6-4	35	74,124,754	7,412,475,400	100	0	96.67	47.83

*Day after flowering



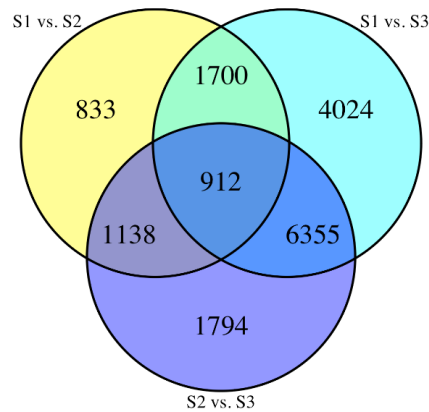
شکل ۲- طول کانتیگ‌های سرهم‌بندی شده. (A): تعداد ترانسکرپت‌های شناسایی شده به‌ازای هر ایزوفرم (B): توزیع طول کانتیگ‌های سرهم‌بندی شده (C): N50 مربوط به طول کانتیگ‌های سرهم‌بندی شده

Figure 2. Cumulative transcripts and contig length plot. (A): Number of transcript/isoform, (B): Conntig length, C: N50 contig lenght



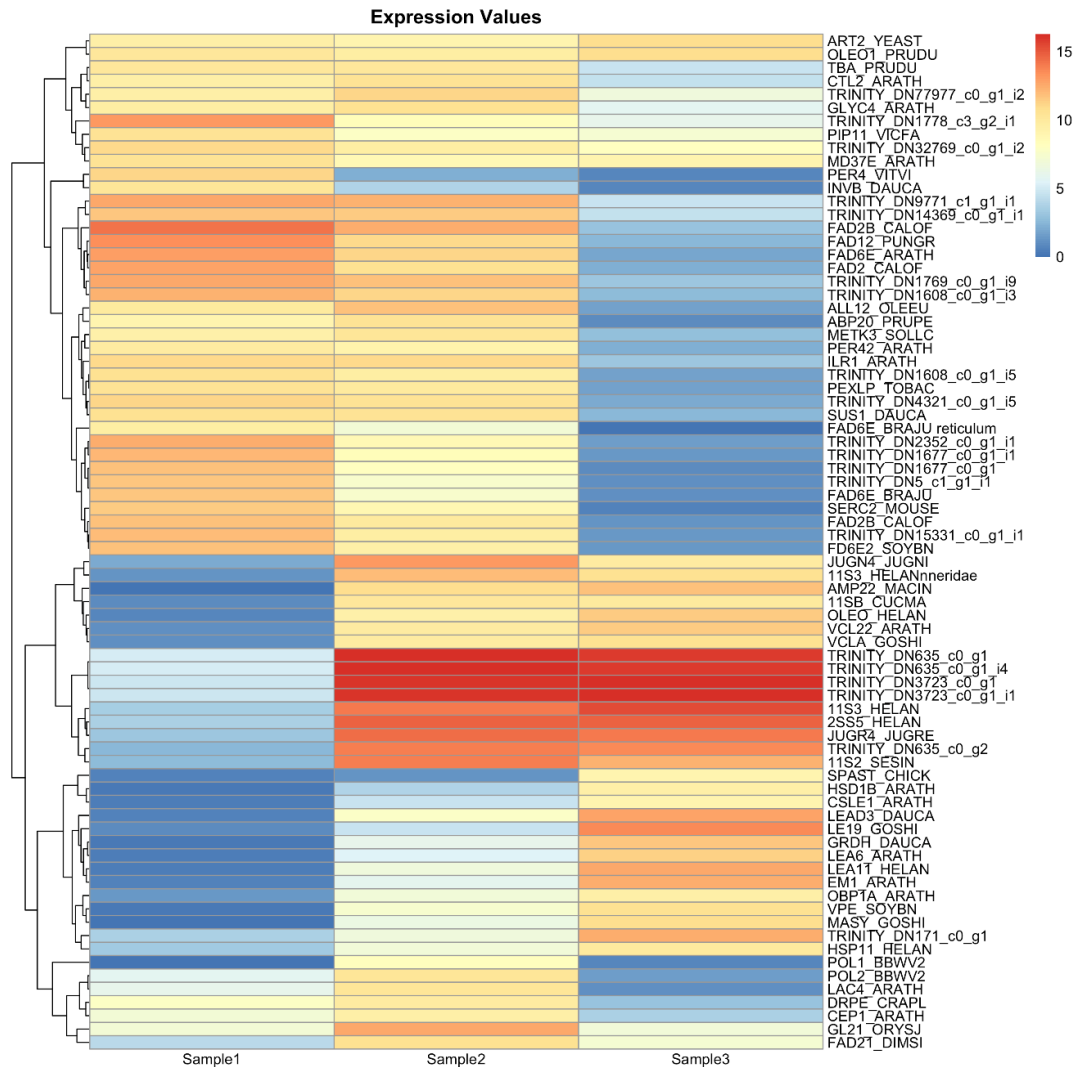
شکل ۳- (A) نتایج آنالیز ژن انتولوژی (GO) ترانسکرپت‌های با بیان افتراقی (BP: Biological Process, CC: Cellular Component, MF: Molecular Function). (B) نتایج فیلترینگ داده‌های تمیز، بر اساس $TPM > 1$ و انحراف از معیار (C.V.). (C) فراوانی ORF‌های شناسایی شده در قالب چهار فرم (Complete ORF (60.5 %، 5 prime_partial (20 %، internal (10.1 % و 3 prime_partial (9.4 %)

Figure 3. (A) Gene ontology (GO) enrichment analysis of the defferential expression transcripts (BP: Biological Process, CC: Cellular Component, MF: Molecular Function). (B) Results of filtering based on $TPM < 1$ and coefficient of variation (C.V.). (C): The frequency of identified ORFs in the form of four complete ORF forms (60.5%), five prime_partial (20%), internal (10.1%), and three prime_partial (9.4%).



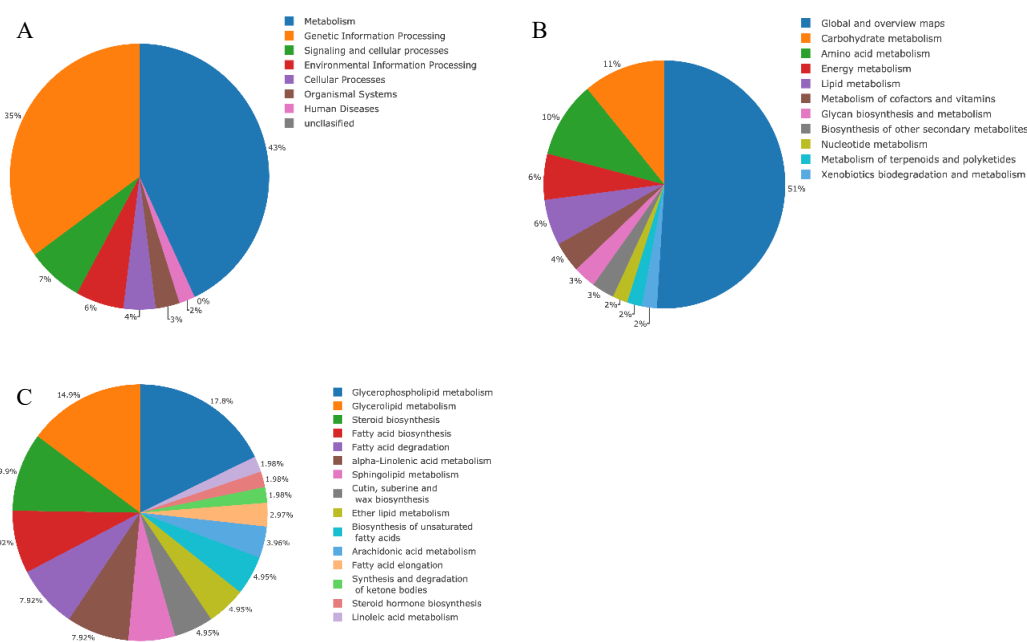
شکل ۴- ترانسکرپت‌های شناسایی شده با بیان افتراقی (DETs) در مقایسات دوتایی (S1: ۱۴ روز پس از گلدهی، S2: ۲۸ روز پس از گلدهی، S3: ۳۵ روز پس از گلدهی)

Figure 4. Defferential expression transcripts in pairwise comparison (S1: 14 Days After Flowering, S2: 28 Days After Flowering, S3: 35 Days After Flowering)



شکل ۵- هیت مپ مربوط به ۵۰ ژن با بیان افتراقی دارای بیشترین میزان بیان در هر مرحله نمونه (Sample 1: ۱۴ روز پس از گلدهی، Sample 2: ۲۸ روز پس از گلدهی، Sample 3: ۳۵ روز پس از گلدهی).

Figure 5. Heat maps of 50 differentially expressed genes with the highest expression in sample dates (Sample 1: 14 DAF, Sample 2: 28 DAF, Sample 3: 35 DAF).



شکل ۶- بررسی توالی پروتئین‌های شناسایی شده در پایگاه داده ۸: KEGG (A): خوشه‌ی کاربردی شناسایی شده در نتیجه‌ی بررسی پروتئین شناسایی شده در پایگاه داده ۱۱: KEGG (GHOSTX) (B): مسیر متابولیسمی شناسایی شده در خوشه‌ی مربوط به متابولیسم (C): فراوانی ژن‌های شناسایی شده در مسیر متابولیسمی تولید چربی و اسید چرب

Figure 6. Examining the sequences of proteins identified in the KEGG database (A): eight functional clusters identified as a result of examining 35,252 proteins identified in the KEGG database (GHOSTX) (B): 11 Metabolomic Pathways Identified in the Metabolism Cluster (C): (C): The frequency of identified genes involved in the metabolic pathway of fat and fatty acid production.

بررسی پروفایل ۵۰ ژن برتر با بیشترین میزان بیان در مراحل سبزه گانه نمو بذری جهت تعیین تمرکز بیان در مراحل نموی بذری انجام شد، که نتایج بدست آمده سه الگوی متفاوت بیانی را در قالب سه مرحله‌ی نموی نمایان ساختند (شکل ۵). این پروفایل نشان می‌دهد که بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسیدچرب غیر اشباع نشان از تمرکز بیان آن‌ها در مرحله اول نمو بذری دارد و میزان بیان آن در مرحله بلوغ در کمترین مقدار خود است. غالب ژن‌های شناسایی شده دارای بیشترین فراوانی در مرحله اول نمو بذری مرتبط با تولید و تجمع اسیدهای چرب بودند. در این مورد، مشخصاً ژن‌های FAD2B، FAD2، FAD6E و FAD12 با فراوانی بیان بالا شناسایی شدند (شکل ۵). این ژن‌ها متعلق به خانواده Acyl-lipid $\Delta 12$ fatty acid desaturase هستند و نقش‌های حیاتی در مسیر متابولیکی تولید اسیدهای چرب اشباع نشده ایفا می‌کنند. به‌طور خاص، این آنزیم‌ها اسید اولئیک را به اسید لینولئیک با واردکردن یک پیوند دوگانه در موقعیت $\Delta 12$ در اسید چرب تبدیل می‌کنند که در شبکه داخلی و کلروپلاست‌ها انجام می‌شود (Los & Murata, 1998). این با نسبت بالای اسید لینولئیک (۷۰٪) که در ترکیب اسید چرب در گونه گلرنگ Goldasht یافت می‌شود، مطابقت دارد.

در مرحله دوم نمو، تمرکز در ارتباط با ۵۰ ژن دارای بیشترین فراوانی میزان بیان مرتبط با تولید و ذخیره‌ی پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه برعلیه پاتوژن‌ها و در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی بود. ژن‌هایی مانند FAD2B، CTL2، AMP22، GL21، ALL12، LAC4، FAD21 و JUGN4 و 11S2 در این مرحله با نرخ بیان بالا شناسایی شدند (شکل ۵). با پیشرفت به ۳۵ روز پس از گل‌دهی، بالاترین میزان بیان مربوط به پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه مشاهده شد. ژن‌های کلیدی در این مرحله شامل 11S3، JUGN4، LEA11/19، CSLE1 و OLEO3 بودند (شکل ۵). این ژن‌ها برای مرحله نهایی توسعه دانه، که بر روی ذخیره‌سازی پروتئین‌ها و دیگر اجزای ضروری تمرکز دارد، اهمیت زیادی دارند. پروفایل‌های بیان ۵۰ ژن با بالاترین بیان مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب عمدتاً در خوشه‌های I و II یافت شدند که به بیان بالا در بیشتر موارد در ۲۸ روز پس از گل‌دهی مربوط می‌شود. این الگو نشان می‌دهد که تجمع اسیدهای چرب زودتر از تجمع پروتئین‌ها آغاز می‌شود (Hill & Breidenbach, 1974).

DEGs مربوط به بیوسنتز اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده عمدتاً در مراحل S1 و S2 مشاهده شدند. این مراحل بیان بالایی نسبت به S3 نشان دادند، که نشان‌دهنده رابطه زمانی واضح بین تجمع روغن و تغییرات فیزیولوژیکی در دانه‌های گلرنگ است. در کل، مطالعه نشان می‌دهد که اوج بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب زودتر در توسعه دانه‌ها رخ می‌دهد، که با زمان بندی تجمع روغن مطابقت دارد. ژن‌های مربوط به خانواده FAD کاتالیز اسید اولئیک به اسید لینولئیک را بر عهده دارند. فعالیت FAD منجر به افزایش محتوای اسیدهای چرب دی‌نوئیک می‌شود و از این رو مقاومت در برابر سرما و تنش شوری را افزایش می‌دهد (Dar et al., 2019).

بررسی پروفایل ۵۰ ژن برتر با بیشترین میزان بیان در مراحل سبزه گانه نمو بذری جهت تعیین تمرکز بیان در مراحل نموی بذری انجام شد، که نتایج بدست آمده سه الگوی متفاوت بیانی را در قالب سه مرحله‌ی نموی نمایان ساختند (شکل ۵). این پروفایل نشان می‌دهد که بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسیدچرب غیر اشباع نشان از تمرکز بیان آن‌ها در مرحله اول نمو بذری دارد و میزان بیان آن در مرحله بلوغ در کمترین مقدار خود است.

غالب ژن‌های شناسایی شده دارای بیشترین فراوانی در مرحله اول نمو بذری مرتبط با تولید و تجمع اسیدهای چرب بودند. در این مورد، مشخصاً ژن‌های FAD2B، FAD2، FAD6E و FAD12 با فراوانی بیان بالا شناسایی شدند (شکل ۵). این ژن‌ها متعلق به خانواده Acyl-lipid $\Delta 12$ fatty acid desaturase هستند و نقش‌های حیاتی در مسیر متابولیکی تولید اسیدهای چرب اشباع نشده ایفا می‌کنند. به‌طور خاص، این آنزیم‌ها اسید اولئیک را به اسید لینولئیک با واردکردن یک پیوند دوگانه در موقعیت $\Delta 12$ در اسید چرب تبدیل می‌کنند که در شبکه داخلی و کلروپلاست‌ها انجام می‌شود (Los & Murata, 1998). این با نسبت بالای اسید لینولئیک (۷۰٪) که در ترکیب اسید چرب در گونه گلرنگ Goldasht یافت می‌شود، مطابقت دارد.

در مرحله دوم نمو، تمرکز در ارتباط با ۵۰ ژن دارای بیشترین فراوانی میزان بیان مرتبط با تولید و ذخیره‌ی پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه برعلیه پاتوژن‌ها و در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی بود. ژن‌هایی مانند FAD2B، CTL2، AMP22، GL21، ALL12، LAC4، FAD21 و JUGN4 و 11S2 در این مرحله با نرخ بیان بالا شناسایی شدند (شکل ۵). با پیشرفت به ۳۵ روز پس از گل‌دهی، بالاترین میزان بیان مربوط به پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه مشاهده شد. ژن‌های کلیدی در این مرحله شامل 11S3، JUGN4، LEA11/19، CSLE1 و OLEO3 بودند (شکل ۵). این ژن‌ها برای مرحله نهایی توسعه دانه، که بر روی ذخیره‌سازی پروتئین‌ها و دیگر اجزای ضروری تمرکز دارد، اهمیت زیادی دارند. پروفایل‌های بیان ۵۰ ژن با بالاترین بیان مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب عمدتاً در خوشه‌های I و II یافت شدند که به بیان بالا در بیشتر موارد در ۲۸ روز پس از گل‌دهی مربوط می‌شود. این الگو نشان می‌دهد که تجمع اسیدهای چرب زودتر از تجمع پروتئین‌ها آغاز می‌شود (Hill & Breidenbach, 1974).

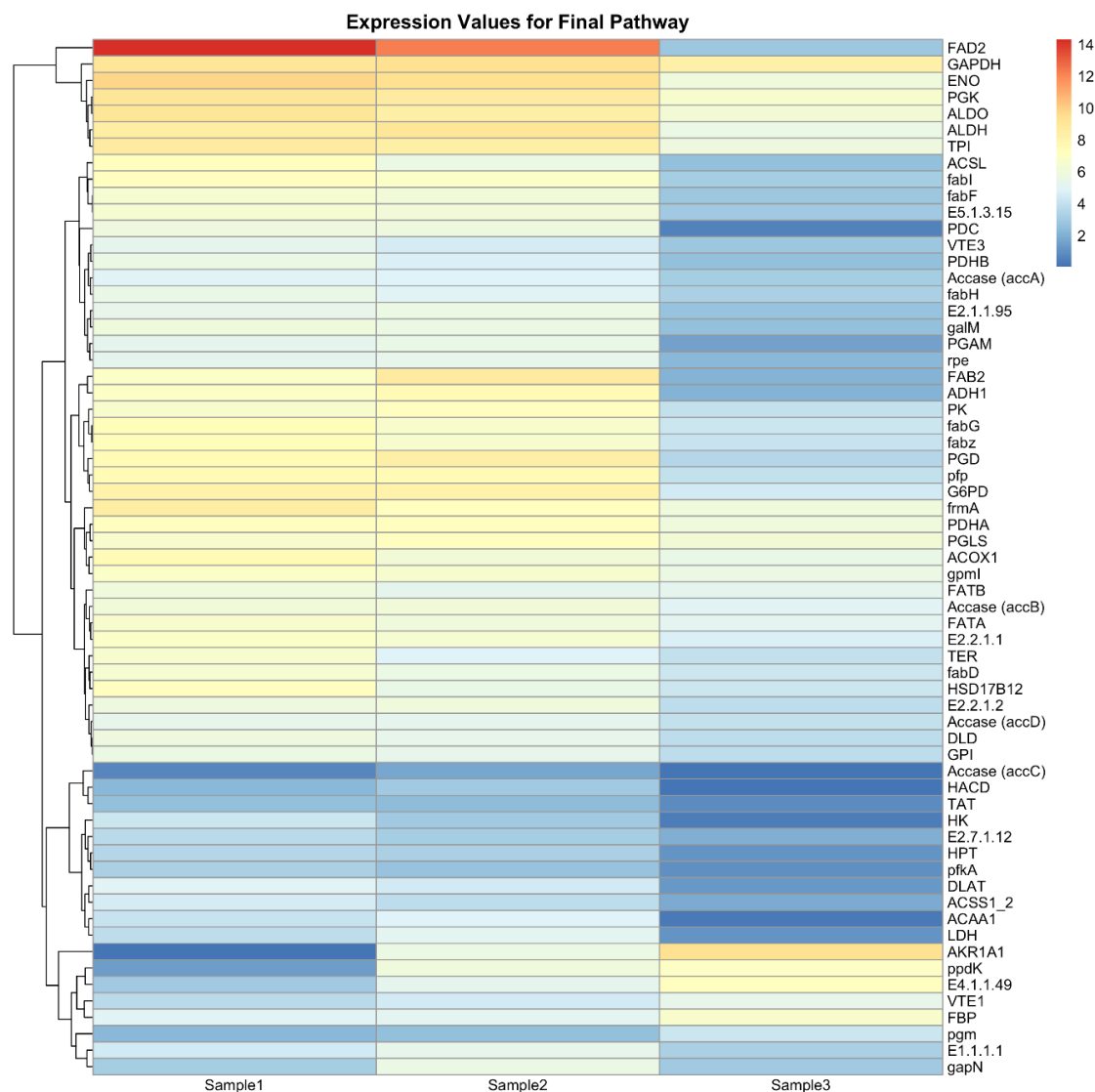
DEGs مربوط به بیوسنتز اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده عمدتاً در مراحل S1 و S2 مشاهده شدند. این مراحل بیان بالایی نسبت به S3 نشان دادند، که نشان‌دهنده رابطه زمانی واضح بین تجمع روغن و تغییرات فیزیولوژیکی در دانه‌های گلرنگ است. در کل، مطالعه نشان می‌دهد که اوج بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب زودتر در توسعه دانه‌ها رخ می‌دهد، که با زمان بندی تجمع روغن مطابقت دارد. ژن‌های مربوط به خانواده FAD کاتالیز اسید اولئیک به اسید لینولئیک را بر عهده دارند. فعالیت FAD منجر به افزایش محتوای اسیدهای چرب دی‌نوئیک می‌شود و از این رو مقاومت در برابر سرما و تنش شوری را افزایش می‌دهد (Dar et al., 2019).

شده است که به خواص عملکردی آن به عنوان یک ماده غذایی با اثرات بالقوه ضد کلسترول و مزایای محافظتی قلب و عروق کمک میکند (Mani *et al.*, 2020). عملکردهای آنتی اکسیدانی استثنایی توکوفرول ناشی از ظرفیت آنها برای درگیر شدن با گروه‌های آسیل غیراشباع، خنثی کردن موثر رادیکال‌های پراکسیل لیپیدی و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) هستند، بنابراین از اسیدهای چرب در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند (Meena *et al.*, 2025). وراثت ژنتیکی توکوفرول در محصولات مختلف یک ویژگی پیچیده است، همراه با محصولات مختلف که معماری ژنتیکی منحصر به فردی را نشان می‌دهند. درک این الگوهای وراثتی برای توسعه انواع محصولات با پروفایل توکوفرول بهبود یافته ضروری است، که می‌تواند پیامدهای قابل توجهی را برای تغذیه انسان و کیفیت کلی محصولات کشاورزی داشته باشد. تحقیقات کنونی در این زمینه به تدریج مکانیسم‌های ژنتیکی را که بر سنتز و تجمع توکوفرول در گونه‌های مختلف زراعی حاکم هستند، روشن می‌کنند. تحقیق در مورد بیوسنتز توکوفرول و استراتژی‌های تقویت، پیچیدگی مکانیسم‌های ژنتیکی حاکم بر تولید ویتامین E در محصولات را برجسته می‌کند (Meena *et al.*, 2025).

2017). محققین متوجه شدند که این ژن‌ها عامل اصلی تعیین کننده سطوح اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری^۲ (PUFAs) در روغن دانه هستند و نقش مهمی در بیوسنتز اسیدهای چرب دارند (Du *et al.*, 2018). در پژوهش گان و همکاران، ژن‌های FAD و FATB یک الگوی بیان بسیار مشابه را در مسیر بیوسنتز اسید چرب نشان دادند (Gan *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر، افزایش بیان و فعالیت این ژن در هر دو مرحله رشد دانه S1 و S2 مشاهده شد.

این نتایج نشان می‌دهند که تجمع روغن قبل از تجمع پروتئین‌ها در دانه‌های گلرنگ آغاز می‌شود. الگوهای مشاهده شده با فرآیندهای فیزیولوژیکی شناخته شده در گلرنگ همخوانی دارند و بینش‌های ارزشمندی را برای بهینه‌سازی تولید و کیفیت روغن در این محصول فراهم می‌کنند. بررسی پروفایل بیانی ژن‌های درگیر در مسیر متابولیکی بیوسنتز توکوفرول نشان از تمرکز بروز این ژن‌ها در مراحل میانی و پایانی نمو بذر داشت (شکل ۷). همچنین، باتوجه به نتایج حاصل از بررسی مسیر بیوسنتزی توکوفرول، تعداد شش ژن TAT، HPD، Tcopherol o-methyl transfrase، Tcopherol o-methyl transfrase، HPT، homogentisate phytyltransfrase و cyclase شناسایی شدند. این آنزیم‌ها به عنوان عناصر کلیدی بیوسنتز توکوفرول در گیاهان مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند (Fritsche, *et al.*, 2017; Matthaus, *et al.*, 2015). روغن گلرنگ به دلیل محتوای توکوفرول بالا شناخته

² Polyunsaturated fatty acids



شکل ۷- هیت مپ پروفایل بیانی ژن‌های دخیل در مسیر متابولیتی بیوسنتز اسید چرب و توکوفرول (Sample 1: ۱۴ روز پس از گلدهی، Sample 2: ۲۸ روز پس از گلدهی، Sample 3: ۳۵ روز پس از گلدهی)

Figure 7. The heat map expression profile of unigenes related to fatty acid and tocopherol biosynthesis in sample dates (Sample 1: 14 DAF, Sample 2: 28 DAF, Sample 3: 35 DAF).

دانه‌های گلرنگ آغاز می‌شود. شناسایی عوامل مولکولی دخیل در بهبود عملکرد گیاه و تبیین ارتباط بین آنها با یکدیگر و همچنین محیط، می‌تواند ابزار ارزشمندی برای مدیریت بهتر زراعی و فعالیت‌های اصلاحی در اختیار اصلاحگران قرار دهد. مطالعات بیشتری می‌توانند بر شناسایی سطوح بیانی نسبی ژن‌هایی که به مسیرهای آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، اجزای اسید آمید فنول و غیره مرتبط هستند، از مجموعه داده‌های ترانسکریپتوم فعلی تمرکز کنند. یافته‌های این مطالعه می‌توانند به درک بهتر فرایندهای بیوشیمیایی و متابولیکی در گلرنگ کمک کنند و زمینه‌های جدیدی را برای بهبود کیفیت و کمیت روغن در این گیاه فراهم آورند. بررسی دقیق‌تر این فرایندها می‌تواند به بهینه‌سازی روش‌های کشت و برداشت گلرنگ و افزایش بهره‌وری اقتصادی آن منجر شود. مطالعه الگوی ظهور

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر به بررسی الگوهای بیانی برخی از ژن‌های نامزد حیاتی در بیوسنتز اسیدهای چرب و توکوفرول پرداخته است.

پروفایل بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب غیر اشباع نشان از تمرکز بیان آن‌ها در مرحله اول نمو بذر داشت. همچنین، این میزان بیان در مرحله بلوغ در کمترین میزان خود قرار داشت. بررسی پروفایل بیانی ژن‌های درگیر در مسیر متابولیکی بیوسنتز توکوفرول نشان از تمرکز بروز این ژن‌ها در مراحل میانی و پایانی نمو بذر داشت که نشان‌دهنده رابطه زمانی واضح بین تجمع روغن و تغییرات فیزیولوژیکی در دانه‌های گلرنگ است. این مطالعه بیان می‌کند که اوج بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز اسیدهای چرب زودتر از توسعه دانه‌ها رخ می‌دهد. همچنین، تجمع روغن قبل از تجمع پروتئین‌ها در

تشکر و قدردانی

ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) در مراحل توسعه‌ی دانه بر ماهیت دینامیکی مولکولی توسعه دانه تأکید می‌کند. این تحقیق در قالب طرح تحقیقاتی 687 در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری به انجام رسیده است.

References

- Abdullah, H. M., Akbari, P., Paulose, B., Schnell, D., Qi, W., Park, Y., & Dhankher, O. P. (2016). Transcriptome profiling of *Camelina sativa* to identify genes involved in triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the developing seeds. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0608-9>
- Ambreen, H., Kumar, S., Kumar, A., Agarwal, M., Jagannath, A., & Goel, S. (2018). Association mapping for important agronomic traits in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) core collection using microsatellite markers. *Frontiers in Plant Science*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00402>
- Ambreen, H., Kumar, S., Variath, M. T., Joshi, G., Bali, S., Agarwal, M., & Goel, S. (2015). Development of genomic microsatellite markers in *Carthamus tinctorius* L. (safflower) using next generation sequencing and assessment of their cross-species transferability and utility for diversity analysis. *PLoS One*, 10(8), e0135443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135443>
- Amini, F., Saeidi, G., & Arzani, A. (2008). Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. *Euphytica*, 163(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9612-2>
- Bowers, J. E., Pearl, S. A., & Burke, J. M. (2016). Genetic mapping of millions of SNPs in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) via whole-genome resequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7), 2203-2211. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029298>
- Bordbar, M., Darvishzadeh, R., & Pazhouhandeh, M. (2023). Molecular techniques for plants gene expression analysis at the transcriptomics level. *Journal of Crop Breeding*, 15(45), 83-104. <https://doi.org/10.61186/jcb.15.45.83> [In Persian]
- Brown, A. P., Kroon, J. T., Swarbreck, D., Febrer, M., Larson, T. R., Graham, I. A., ... & Slabas, A. R. (2012). Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. *PLoS One*, 7(2), e30100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>
- Chen, J., Guo, S., Hu, X., Wang, R., Jia, D., Li, Q., ... & Pei, J. (2023). Whole-genome and genome-wide association studies improve key agricultural traits of safflower for industrial and medicinal use. *Horticulture Research*, 10(11), uhad197. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad197>
- Chen, J., Tang, X., Ren, C., Wei, B., Wu, Y., Wu, Q., & Pei, J. (2018). Full-length transcriptome sequences and the identification of putative genes for flavonoid biosynthesis in safflower. *BMC Genomics*, 19(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4708-8>
- Chen, J., Wang, J., Wang, R., Xian, B., Ren, C., Liu, Q., ... & Pei, J. (2020). Integrated metabolomics and transcriptome analysis on flavonoid biosynthesis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under MeJA treatment. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2264-2>
- Dar, A. A., Choudhury, A. R., Kancharla, P. K., & Arumugam, N. (2017). The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01789>
- Du, C., Chen, Y., Wang, K., Yang, Z., Zhao, C., Jia, Q., Taylor, D. C., & Zhang, M. (2018). Strong co-suppression impedes an increase in polyunsaturated fatty acids in seeds overexpressing FAD2. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 985-994. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery378>
- Ebrahimi, F., Majidi, M. M., Arzani, A., & Mohammadi-Nejad, G. (2017). Association analysis of molecular markers with traits under drought stress in safflower. *Crop and Pasture Science*, 68(2), 167-175. <https://doi.org/10.1071/CP16294>
- Fan, K., Qin, Y., Hu, X., Xu, J., Ye, Q., Zhang, C., ... & Qin, R. (2023). Identification of genes associated with fatty acid biosynthesis based on 214 safflower core germplasm. *BMC Genomics*, 24(1), 763. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09874-5>
- FAOSTAT. (2022). FAOSTAT online database. Retrieved February 2, 2024, from <http://faostat3.fao.org/safflower>
- Fritsche, S., Wang, X., & Jung, C. (2017). Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: An overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. *Antioxidants*, 6(4), 99. <https://doi.org/10.3390/antiox6040099>
- Gan, Y., Song, Y., Chen, Y., Liu, H., Yang, D., Xu, Q., & Zheng, Z. (2018, Nov 26). Transcriptome analysis reveals a composite molecular map linked to unique seed oil profile of *Neocinnamomum caudatum* (Nees) Merr. *BMC Plant Biology*, 18(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1525-9>
- Gecgel, U., Demirci, M., Esendal, E., & Tasan, M. (2007). Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(1), 47-54. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1007-3>

- Ghanbari, A., Soltani Najafabadi, M., Abbasi, A. R., & Bi Hamta, M. R. (2022). Functional factor analysis in safflower. *Journal of Crop Breeding*, 14(41), 163-173. <https://doi.org/10.52547/jcb.14.41.163> [In Persian]
- Golkar, P., Arzani, A., & Rezaei, A. M. (2011). Genetic variation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for seed quality-related traits and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2664-2677. <https://doi.org/10.3390/ijms12042664>
- Hill, J. E., & Breidenbach, R. W. (1974). Proteins of soybean seeds: II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. *Plant Physiology*, 53(5), 747-751. <https://doi.org/10.1104/pp.53.5.747>
- Jeong, E. H., Yang, H., Kim, J. E., & Lee, K. W. (2020). Safflower seed oil and its active compound acacetin inhibit UVB-induced skin photoaging. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(12), 3356-3364. <https://doi.org/10.1111/jocd.13389>
- Li, D., Wang, Q., Xu, X., Yu, J., Chen, Z., Wei, B., & Wu, W. (2021). Temporal transcriptome profiling of developing seeds reveals candidate genes involved in oil accumulation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *BMC Plant Biology*, 21(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02964-0>
- Liu, X., Dong, Y., Yao, N., Zhang, Y., Wang, N., Cui, X., ... & Li, X. (2015). De novo sequencing and analysis of the safflower transcriptome to discover putative genes associated with safflower yellow in *Carthamus tinctorius* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25657-25677. <https://doi.org/10.3390/ijms161025657>
- Los, D. A., & Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1394(1), 3-15. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00091-5)
- Lulin, H., Xiao, Y., Pei, S., Wen, T., & Shangqin, H. (2012). The first Illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers. *PLoS One*, 7(6), e38653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038653>
- Mani, V., Lee, S. K., Yeo, Y., & Hahn, B. S. (2020). A metabolic perspective and opportunities in pharmacologically important safflower. *Metabolites*, 10(6), 253. <https://doi.org/10.3390/metabo10060253>
- Matthaus, B., Özcan, M. M., & Al Juhaimi, F. Y. (2015). Fatty acid composition and tocopherol profiles of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oils. *Natural Product Research*, 29(2), 193-196. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.971316>
- Mani, V., Lee, S.-K., Yeo, Y., & Hahn, B.S. (2020). A metabolic perspective and opportunities in pharmacologically important safflower. *Metabolites*, 10, 253.
- Meena, V.K., Chand, S., & Shekhawat, H.V.S. (2025). Advances in plant tocopherol biosynthesis: from pathway elucidation to crop biofortification strategies. *Discov. Plants*, 2, 9. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00093-8>
- Nazari, M., Shariati, F., Sadeghi Garmaroodi, H., & Jabbari, H. (2022). Evaluation of genetic diversity in 273 safflower genotypes collected from different regions of the world. *Journal of Crop Breeding*, 14(44), 174-180. <https://doi.org/10.52547/jcb.14.44.174> [In Persian]
- Nikpour, B., Nazari, M., & Abbasi, A. (2023). Assessment of the genetic diversity in 160 safflower genotypes focusing on oil quality characteristics. *Journal of Crop Breeding*, 15(48), 113-122. <https://doi.org/10.61186/jcb.15.48.113> [In Persian]
- Nosheen, A., Naz, R., Tahir, A. T., Yasmin, H., Keyani, R., Mitrevski, B., ... & Hussain, I. (2018). Improvement of safflower oil quality for biodiesel production by integrated application of PGPR under reduced amount of NP fertilizers. *PLoS One*, 13(8), e0201738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201738>
- Omidi, A. H., & Sharifmogadas, M. R. (2010). Evaluation of Iranian safflower cultivars reaction to different sowing dates and plant densities. *World Applied Sciences Journal*, 8(8), 953-958.
- Pilorgé, E., Daguét, S., Jestin, C., & Mestries, E. (2020). The main dynamics of sunflower research presented at the 19th International Sunflower Conference in 2016. *OCL Oilseeds and Fats Crops and Lipids*, 27, 10. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020010>
- Ren, C., Wang, J., Xian, B., Tang, X., Liu, X., Hu, X., ... & Pei, J. (2020). Transcriptome analysis of flavonoid biosynthesis in safflower flowers grown under different light intensities. *PeerJ*, 8, e8671. <https://doi.org/10.7717/peerj.8671>
- Sehgal, D., Rajpal, V. R., Raina, S. N., Sasanuma, T., & Sasakuma, T. (2009). Assaying polymorphism at DNA level for genetic diversity diagnostics of the safflower (*Carthamus tinctorius* L.) world germplasm resources. *Genetica*, 135(3), 457-470. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9291-5>
- Shahid, M., Cai, G., Zu, F., Zhao, Q., Qasim, M. U., Hong, Y., ... & Zhou, Y. (2019). Comparative transcriptome analysis of developing seeds and silique wall reveals dynamic transcription networks for effective oil production in *Brassica napus* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1982. <https://doi.org/10.3390/ijms20081982>
- Singh, V., & Nimbkar, N. (2006). Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). In R. J. Singh (Ed.), Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: *Oilseed crops* (pp. 167-194). CRC Press.

- Vijay, D., Dadlani, M., Kumar, P. A., & Panguluri, S. K. (2009). Molecular marker analysis of differentially aged seeds of soybean and safflower. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(3), 282-291. <https://doi.org/10.1007/s11105-009-0107-2>
- Wang, R., Ren, C., Dong, S., Chen, C., Xian, B., Wu, Q., ... & Chen, J. (2021). Integrated metabolomics and transcriptome analysis of flavonoid biosynthesis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with different colors. *Frontiers in Plant Science*, 12, 712038. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.712038>
- Wu, Z., Liu, H., Zhan, W., Yu, Z., Qin, E., Liu, S., ... & Qin, R. (2021). The chromosome-scale reference genome of safflower (*Carthamus tinctorius*) provides insights into linoleic acid and flavonoid biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1725-1742. <https://doi.org/10.1111/pbi.13586>
- Yang, S., Miao, L., He, J., Zhang, K., Li, Y., & Gai, J. (2019). Dynamic transcriptome changes related to oil accumulation in developing soybean seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2202. <https://doi.org/10.3390/ijms20092202>.