Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

A study of possibility of expression of an alternasucrase gene in sugar beet to produce alternan biopolymer

Farhad Nazarian-Firouzabadi

*Professor, Agronomy and plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad. Email: Nazarian.f@lu.ac.ir

Ahmad Ismaili

Associate Professor, Agronomy and plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad. Email: ismaili.a@lu.ac.ir

Daryoush Goodarzi

Instructor, Agronomy and plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad.Email: goodarzidariush@yahoo.com

Abstract

Objective

Lactic acid bacteria (LAB) synthesize valuable industrial and pharmaceutical important biopolymers, such as Alternan, by expressing glycosyltransferase enzymes by utilizing extracellular sucrose. In this study, due to the importance of such versatile biopolymers in the industry and medicine, a gene encoding an Altranansucrase (*Asr*) was introduced to sugar beet plants.

Materials and methods

A gene encoding the Asr gene was isolated from Leuconostoc mesenteroides bacterium and introduced to sugar beet plants by using Agrobacterium-mediated transformation. Molecular techniques were used to analyse transgenic plants and sugar content of sugar beet lines.

Results

Out of 131 transformed explants, only three transgenic plants were produced, showing a transformation efficiency of 2.3%. The Asr gene integration in transgenic plants

genome and expression were confirmed by specific PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis, respectively. Sugar analysis of sugar beet transgenic plants showed that control plants with a 19.6% brix value (Sucrose) had more sucrose than transgenic plants with an average brix value of 14.4%. Brix in transgenic plants was lower than that of control plants. The amount of sugar (sucrose) in the transgenic asr-expressing plants reduced by 36.1% relative to the untransformed control plants.

Conclusions

The results of this study showed that Altrenansucrase can convert substantial amount of sugar beet sucrose into Alternan biopolymer, producing 36.6 mg/g FW alternan biopolymer with pharmaceutical and industrial applications.

Keywords: Bacterium, Biotechnology, Gene transfer, Gene manipulation, Glucansucrases, Sugar plants

Citation: Nazarian-Firouzabadi F, Goodarzi D, Ismaili, A (2019) A study of possibility of expression of an alternasucrase gene in sugar beet to produce alternan biopolymer. Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 105-120.

Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 105-120.

DOI: 10.22103/jab.2019.12975.1086

Received: July 9, 2019; Accepted: November 7, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی امکان بیان ژن آلترنان سوکراز در گیاه چغندرقند برای تولید بیوپلیمر آلترنان

فرهاد نظریان فیروزآبادی

*نویسنده مسئول، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد. ایمیل: Nazarian.f@lu.ac.ir

احمد اسماعیلی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد. ایمیل: ismaili.a@lu.ac.ir

داریوش گودرزی

مربی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد. ایمیل: goodarzidariush@yahoo.com

تاریخ دریافت: 1398/04/18، تاریخ پذیرش: 1398/08/16

چکیده

هدف: باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از ساکارز موجود در محیط خارج سلولی و با بیان آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز، بیوپلیمرهای ارزشمندی مانند آلترنان تولید کنند که در صنعت و پزشکی کاربرد دارند. بنابراین در مطالعه حاضر به دلیل اهمیت این بیوپلیمرها در صنعت و پزشکی، ژن کد کننده آنزیم آلترنان سوکراز باکتری *Leuconostoc mesenteroides* به گیاه چغندرقند منتقل گردید.

مواد و روش‌ها: ژن کد کننده آنزیم آلترنان سوکراز(*Asr*) از ژنوم باکتری *Leuconostoc mesenteroides* جداسازی و پس از همسانه‌سازی در یک ناقل بیانی به وسیله اگروباکتریوم به گیاه چغندرقند منتقل گردید. از تکنیک‌های مولکولی برای بررسی گیاهان تراریخت و آنالیز شیمیایی قندها استفاده شد.

نتایج: از مجموع 131 ریزنمونه تراریزش شده، تنها سه گیاه تراریخت تولید شد که کارایی تراریزش 2/30 درصد را نشان داد. الحاق ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز در ژنوم گیاهان تراریخت و همچنین بیان این ژن به ترتیب توسط آزمون PCR اختصاصی و RT-PCR نیمه کمی تائید شد. آنالیز قند گیاهان تراریخت چغندر قند نشان داد که گیاه شاهد با میزان پل (ساکارز)

19/6 درصد دارای ساکارز بیشتری نسبت به گیاهان تراریخت با میزان پل متوسط 14/4 بود. همچنین میزان بریکس در گیاهان تراریخت پایین‌تر از گیاهان شاهد بود و میزان کاهش قند (ساکارز) در گیاه تراریخت دارای ژن *Asr* نسبت به شاهد در حدود 36/1 درصد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آنزیم آلترنان سوکراز باکتریایی قادر است میزان 36/6 mg/g FW بیوپلیمر آلترنان را در ریشه‌های چغندرقند تولید کند و مقادیر قابل توجهی از ساکارز ریشه را به بیوپلیمر آلترنان با کاربردهای صنعتی و دارویی تبدیل کند.

کلمات کلیدی: انتقال ژن، باکتری، دست ورزی ژن، گلوکان سوکراز، گیاهان قندی

مقدمه

کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک مهمترین مولکول‌های زیستی تشکیل دهنده اکثر مواد ارگانیک موجود در کره زمین هستند (Kralj et al. 2004). کربوهیدرات‌ها به‌عنوان مواد غذایی و منابع تأمین انرژی به مصرف می‌رسند و به طور معمول توسط گیاهان سبز تولید می‌شوند (Suresh Kumar et al. 2007; Rehm 2010; Freitas et al. 2011).

کربوهیدرات‌ها بر اساس وزن مولکولی به منوساکاریدها، اولیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها طبقه‌بندی می‌شوند (Krishnaswamy 2011). سلولز به عنوان عامل تشکیل‌دهنده ساختمان دیواره سلولی، نشاسته و گلیکوژن به عنوان منابع غذایی، از اتصال تعداد زیادی واحدهای گلوکز تبا پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل می‌شوند. D-گلوکز واحد مونومریک سازنده سلولز و نشاسته است اما پیوند گلیکوزیدی در سلولز از نوع β و در نشاسته از نوع α است (Krishnaswamy 2011).

علاوه بر گیاهان، باکتری‌ها نیز پلی‌ساکاریدهای متفاوتی با وزن مولکولی بالا مانند؛ آلگینات[1]، گلان[2]، زانتان[3]، آلترنان[4]، موتان[5] و ... را سنتز می‌کنند که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند (Van Geel-Schutten et al. 1999; Kralj 2004; Kralj et al. 2004). به طور کلی، بسیاری از باکتری‌ها، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS)[6] را تولید می‌کنند که روی سطح باکتری به شکل کپسول متصل شده یا به شکل مایع مخاطی به بیرون از سلول باکتری ترشح می‌شوند (Vuyst & Degeest 1999). این پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، روی سطح سلول باکتری تجمع می‌یابند و حفاظت از سلول‌ها را با استحکام بخشی به ساختار غشا در مقابل محیط خارجی بر عهده دارند. همچنین پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به عنوان ذخایر کربن و انرژی به کار می‌روند. معمولاً ماتریکس پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ترکیب غیر یکنواختی از پلیمر پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها و

[1] Alginates
2 Gellan
3 Xanthan
4 Alternan
5 Mutan
[6] Exopolysaccharides

اسیدهای نوکلئیک است. میکروارگانیسم‌های تولید کننده پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در محیط‌های مختلفی مانند آب آشامیدنی، آب دریا، پساب، خاک و همچنین چشمه‌های آب گرم، محیط‌های سرد، محیط‌های شور، دریاچه‌های نمک (Kavita et al. 2011) و حتی شیره گیاهان (Mousavi et al. 2017) زندگی می‌کنند. به طورکلی، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک به دو گروه هموپلی ساکاریدها و هتروپلی‌ساکاریدها تقسیم‌بندی می‌شوند (Vuyst & Degeest 1999). هموپلی‌ساکاریدها اغلب توسط فعالیت گلیکوزیل‌ترانسفرازها (GTFs) یا به عبارت دیگر گلوکان‌سوکرازهای (GS) خارج سلولی یا فروکتوزیل ترانسفرازها (FTFs) از ساکارز سنتز می‌شوند. این آنزیم‌ها از انرژی حاصل از هیدرولیز زنجیره‌های ساکارز برای انتقال فروکتوز یا گلوکز به یک مولکول پذیرنده استفاده می‌کنند (Kralj et al. 2004). آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز پس از شکستن مولکول‌های ساکارز، واحدهای گلوکز را ممکن است به یک زنجیره گلوکان در حال رشد، یک سوبسترای دیگر مانند مالتوز یا ایزومالتوز منتقل کرده و گلیکوالیگوساکاریدها را ایجاد کنند (Moulis et al. 2006). به علاوه، این آنزیم‌ها ممکن است نقش هیدرولیزی (انتقال واحدهای گلوکز به آب) نیز داشته باشند (Monchois et al. 1999).

گلوکان‌سوکرازها عمدتاً توسط باکتری‌های لوکونوستوک مزنتروئیدس[7]، گونه‌های استرپتوکوکوس فلور دهانی و گونه‌های لاکتوباسیل تولید می‌شوند (Yan et al. 2018). با توجه به سیستم طبقه‌بندی CAZY (http://www.cazy.org) و براساس شباهت توالی اسیدآمینه‌هایشان، گلوکان‌سوکرازها به‌عنوان آنزیم‌های گلیکوزید هیدرولاز خانواده 70(GH70) طبقه‌بندی شده‌اند. تاکنون بیش از 60 آنزیم از این خانواده شناسایی شده‌اند که همگی توسط باکتری‌های چهار جنس *Leuconostoc*، *Streptococcus*، *Lactobacillus* و *Weissella* تولید می‌شوند (Gangoiti et al. 2018). با این حال، برخی از ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها در برخی دیگر از باکتری‌های اسید لاکتیک همانند *Oenococcus*،*Fructobacillus* و *Enterococcus* نیز شناسایی شده‌اند (Gangoiti et al. 2018). در تولید محصولات گلوکان‌سوکراز کیفیت بالا و هزینه کم مهم است. اگرچه سنتز تخمیری گلوکان‌ها توسط باکتری‌های اسید لاکتیک ارزان‌ترین روش است، اما کنترل نسبتاً کمی روی شرایط واکنش و غلظت ساکارز اولیه وجود دارد (Santos et al. 2000; Årsköld et al. 2007). در مقابل، استفاده از گلوکان‌سوکرازها به‌عنوان بیوکاتالیست، امکان کنترل کامل pH، دما، سوبسترا و در نتیجه کنترل جرم مولکولی آلفاگلوکان‌های حاصل را فراهم می‌سازد (Falconer et al. 2011). برای مثال، بیان ژن کد کننده *Gsy* در باکتری‌های جنس *Leuconostoc* تحت تاثیر وجود ساکارز در محیط است (Yan et al. 2016) که این مسئله تولید بیوپلیمرها را در راکتورهای باکتریایی با مشکل مواجهه می‌کند.

تولید آلفاگلوکان‌های اگزوپلی‌ساکاریدی در خمیر ترش گزارش شده است. رویکرد اصلی این است که وجود ساکارز برای باکتری‌های اسیدلاکتیک در شروع تخمیر، باعث تولید گلوکان‌ها می‌شود (Lacaze et al. 2007). چندین جنس از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *Weissela* و *Lactobacillus* قادرند تا حدود 16 g دکستران و گلیکوالیگوساکارید به ازای هر کیلوگرم از

[7] *Leuconostoc mesenteroides*

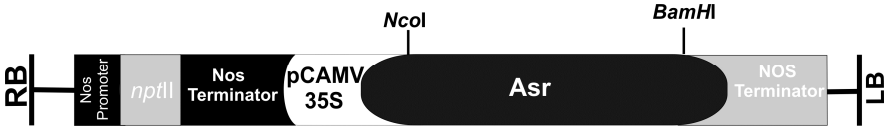
وزن خشک خمیر ترش با کمی اسید تولید کنند (Katina et al. 2009; Galle et al. 2010). از دیدگاه پزشکی، به طور بالقوه آلفاگلوکان‌ها، اگزوپلی‌ساکاریدها ارزشمندی هستند، زیرا توسط آنزیم‌های دستگاه گوارش انسان هضم نمی‌شوند. آلفاگلوکان‌های اگزوپلی‌ساکاریدی انتهای فوقانی دستگاه گوارش را بدون تغییر سپری نموده و در روده بزرگ توسط باکتری‌های روده بزرگ تخمیر می‌شوند. بنابراین می‌توان از محصولات گلوکان‌سوکرازبه‌عنوان فیبر در تغذیه انسان استفاده کرد، زیرا این قبیل بیوپلیمرها باعث آزادسازی سریع قند خون نمی‌شوند. علاوه بر این، آلفاگلوکان‌های اگزوپلی‌ساکاریدی به طور بالقوه پری‌بیوتیک محسوب می‌شوند. به عبارت دیگر، این پلیمرها به صورت انتخابی تخمیر شده و سبب می‌شوند تا تغییرات خاصی در ترکیب یا فعالیت میکروبی دستگاه گوارش صورت گیرد که برای رفاه و سلامت میزبان مفید است (Roberfroid 2007). آلترنان پلیمری با وزن مولکولی بسیار بالا (10^{6}-10^{7}) است که توزیع جرم مولی آن می‌تواند در صدها میلیون گرم به ازای هر مول گسترش یابد (Leathers et al. 2002). آلترنان از تعداد فراوانی واحدهای گلوکز ساخته شده است که توسط پیوندهای متناوب $\alpha(1\rightarrow3)$ به میزان 46 درصد و $\alpha(1\rightarrow6)$ به میزان 54 درصد به شکل خطی به هم متصل شده‌اند و توسط باکتری *Leuconostoc mesenteroides* سویه NRRL B-1355 سنتز می‌شود. سنتز آلترنان توسط باکتری *Leuconostoc mesenteroides* به کمک آلترنان سوکراز صورت می‌گیرد که یک گلوکان سوکراز بزرگ با 2057 اسید آمینه است. (Arguello-Morales et al. 2000). آلترنان دارای خواص انحلال‌پذیری بالا و ویسکوزیته پایین و همچنین مقاوم به هضم توسط اکثر میکروب‌های شناخته شده و آنزیم‌های پستانداران است(Cote 1992). آلترنان بیوپلیمر مهمی است که از آن به عنوان یک جایگزین صمغ عربی بویژه در برنامه‌های غذایی با ویسکوزیته پایین یاد می‌شود. همچنین آلترنان ممکن است به عنوان یک افزودنی غذایی با کالری کم یا بدون کالری به عنوان یک پرکننده و عامل حجم دهنده برای محصولات غذایی، در ساخت جوهر، چسب، لوازم آرایشی و بهداشتی،کرم‌ها و پمادها و پوششی برای آزادسازی دارو استفاده شود (Cote 1992). تولید ترکیبات جدید در گیاهان با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، یکی از اهداف روش‌های انتقال ژن است (Verpoorte 2000). بنابراین به جای استفاده از بیوراکتورهای باکتریایی، می‌توان آلترنان را به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان تولید نمود. با توجه باینکه ساکارز به مقدار زیادی در ریشه چغندر قند تولید می‌شود و آنزیم آلترنان سوکراز از این ماده برای سنتز آلترنان بهره می‌برد، هدف از مطالعه حاضر، بررسی امکان تولید این بیوپلیمر ارزشمند در چغندر قند با بیان ژن آلترنان سوکراز است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از دو لاین مولتی ژرم و مونوژرم چغندرقند به نام‌های SBSI-04 (لاین گرده افشان) و SBSI-02 (لاین اوتایپ) استفاده شد که از موسسه اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کشور تهیه شدند. مراحل ضد عفونی بذرها و کشت بافت بر اساس روش خادمی و نظریان فیروزآبادی صورت گرفت (Khademi & Nazarian-Firouzabadi 2014). بدین صورت که تمام نمونه‌های کشت بافتی شامل گیاهچه‌ها و گیاهان گلدانی در اتاقک رشد با دمای 22 ± 2 °C و رطوبت 70 درصد تحت تناوب

نوری 12 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. همچنین برای کشت بافت از محیط کشت MS (Murashige & Skoog 1962) و ساکارز (3 درصد) به‌عنوان منبع کربن و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد کینتین (Kinetin؛ 2 mg/L) ، نفتالین استیک اسید (NAA؛ 1 mg/L) و بنزیل آدنین (BA؛ 0/25 mg/L) استفاده شد. از محیط کشت LB[8] مایع و جامد، برای کشت باکتری *E.coli* و اگروباکتریوم تومافیشنس در کلیه مراحل تراریزش استفاده شد. از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ریفامپسین، آمپی‌سیلین، بسته به نوع ناقل استفاده شد.

برای تکثیر و همسانه سازی ژن *Asr* به کمک نرم افزار Vector NTI و با استفاده از توالی ژن آلترنان سوکراز موجود در پایگاه NCBI (به شماره دسترسیAJ250173) یک جفت آغازگر رفت (5'-ACAGTC*CATGG*CGGATACAAATTCG-3') و برگشت (3'-5'-TTCGAGCTCTTAAGCTTGCAAAGCA) به گونه‌ای طراحی شد تا ژن مورد نظر به صورت یک ORF کامل به طول 6171 جفت باز از ژنوم باکتری *Leuconostoc mesenteroides* سویه NRRL B-1355 به کمک PCR و بر اساس شرایط ذکر شده توسط شرفی (Sharafi 2013) تکثیر و در ناقل بیانی pBINPLUS (Sharafi 2013) تحت پیش‌بر 35S همسانه‌سازی گردد تا ناقل بیانی pBINPlus/*Asr* ساخته شود (شکل 1). در توالی آغازگر رفت جایگاه آنزیم *NcoI* و کدون آغاز(ATG) و جایگاه برش آنزیم *SacI* و کدون پایان (TAA) درآغازگر برگشت در نظر گرفته شد. به دلیل بلندی ژن *Asr*، تعدادی آغازگر همپوشان در داخل این ژن طراحی و از آنها برای توالی‌یابی به روش سانگر استفاده گردید. سپس به کمک نرم افزار Vector NTI، توالی کامل ژن از توالی‌های کوچک بازیابی و صحت توالی مورد تائید قرار گرفت. از ناقل pBINPlus/*Asr* به عنوان ناقل دوگانه برای تراریزش چغندرقند به روش هم‌کشتی و بر اساس روش Norouzi et al (2005) استفاده شد.



شکل 1. تصویر شماتیک سازه مورد استفاده برای تراریزش چغندر قند و بیان ژن *Asr*، *npt*II: ژن مقاومت به کانامایسین neomycin phosphotransferase؛ pCAMV 35S: پروموتر ژن 35S RNA ویروس موزائیک گل کلم

Figure 1. Schematic representation of a construct used for sugarbeet transformation and expression of Asr gene. pCAMV 35S: The cauliflower mosaic virus 35S RNA. nptII: neomycin phosphotransferase

[8]Luria-Bertani

انتقال ریزنمونه‌ها به محیط گزینش: برای تولید گیاهچه‌های تراریخت، ریزنمونه‌ها به محیط کشت حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند (Norouzi et al. 2005) . عمل واکشت ریز نمونه‌های برگی هر دو هفته یکبار تکرار شد. پس از گذشت 60 روز از دوره گزینش، جوانه‌های در حال باززایی از روی برگ‌ها جدا و به محیط کشت بدون کانامایسین منتقل شدند. بعد از دوره گزینش، گیاهچه‌های موجود بر روی برگ انتهای برش داده شدند و سپس به محیط ساقه‌دهی منتقل گردیدند (Khademi & Nazarian-Firouzabadi 2014). ریزنمونه‌ها به مدت 6 هفته در این محیط باقی ماندند و هر دو هفته یکبار واکشت انجام شد. پس از رشد نسبی، جوانه‌ها (3 تا 5 سانتی‌متری) به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شدند (Khademi & Nazarian-Firouzabadi 2014). هر دو هفته یکبار جوانه‌ها واکشت شدند. در نهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار جهت سازگاری به محیط طبیعی گلدان با شرایط رطوبت بالا به مدت 2 تا 4 هفته انتقال یافتند. در مرحله بعد گیاهان تراریخت و شاهد جهت تولید ریشه به گلخانه‌ای با دمای$^{\circ}$C 18 در روز و $^{\circ}$C 15 در شب و فتوپریود 14 ساعت روشنایی منتقل شدند تا تولید ریشه نمایند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و اجرای RT-PCR نیمه کمی: به منظور بررسی و تایید بیان ژن *Asr* در گیاهان تراریخت چغندر قند، RNA کل استخراج و پس از سنتز cDNA، واکنش RT-PCR نیمه کمی صورت گرفت. به همین منظور از گیاهان تراریخت و شاهد، RNA کل با استفاده از روش کلرید لیتیم استخراج شد. کیفیت RNA استخراجی با الکتروفورز ژل آگارز و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری صورت گرفت. برای حذف آلودگی ژنومی از تیمار با آنزیم DNaseI استفاده شد و عدم حضور DNA با استفاده از واکنش PCR بر روی RNA استخراجی تایید شد. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Thermo Fisher) و آغازگرهای OligodT، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای تایید بیان ژن *Asr* و مقایسه میزان بیان در گیاهان تراریخت، واکنش RT-PCR نیمه کمی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (*Asr*RT_F:5'-ACCGGTTCCATCAACTAATAAT-3'; *Asr*RT_R:5'-GACATCTCGGAAGGATCCC-3') در حجم نهایی 20 میکرولیتر انجام گرفت. از ژن یوبی کوتین (Ubi3) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و شرایط واکنش RT-PCR مشابه روش Kok Kok-Jacon et al. (2007) در نظر گرفته شد.

آنالیز قند گیاهان تراریخت و شاهد: در این مطالعه از ریشه‌های 5 ماهه چغندرقندهای شاهد و تراریخت استفاده شد. درصد پل(Pol) با استفاده از پلاریمتر و درصد بریکس (Brix) با استفاده از رفرکتومتر (Whalley 1964) اندازه‌گیری شد. برای مقایسه گیاهان شاهد و تراریخت از آزمون تی- استیودنت (O'Connor & Robertson 2003) به کمک نرم‌افزار SAS استفاده شد (SAS Institute 2011).

برای اندازه‌گیری ساکارز و قندهای ساده، قند کل بر اساس روش Vasanthan et al. (2001) استخراج شد. به طور خلاصه، مقدار 100 میلی‌گرم از نمونه‌ها به در داخل تیوپ‌های 1/5 میلی‌لیتری حاوی 1 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر انتقال یافت و به

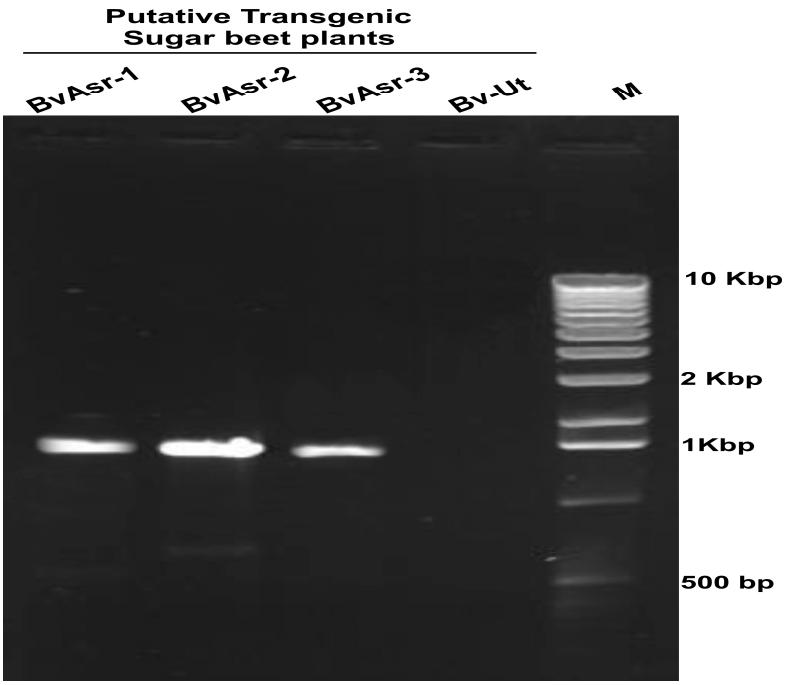
مدت 30 دقیقه هر پنج دقیقه یکبار، در دمای اطاق ورتکس شدند. سپس به مدت 30 دقیقه نمونه‌ها در 5000 دور در دقیقه و در دمای محیط سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، 800 میکرولیتر از محلول روشناور به تیوپ جدید انتقال داده شد. سپس محلول با استفاده از فیلتر 0/45 نانومتر فیلتر شد. مقدار ساکارز، D- فروکتوز و D- گلوکز با استفاده از کیت شرکت Megazyme (Catalog number K-SUFRG, Megazyme International, Ireland Ltd) اندازه‌گیری شد. غلظت D- گلوکز بر اساس هیدرولیز ساکارز توسطβ-fructosidase تعیین شد و محتوای D-فروکتوز بعد از ایزومرازیسیون D-گلوکز توسط فسفوگلوکز ایزومراز تعیین گردید. تمام آنالیزها سه بار انجام شدند و انحراف معیار میانگین‌ها محاسبه شد.

استخراج پلی ساکاریدهای محلول: پلی ساکارید محلول در آب به روش Ahmadi et al. (2018) در سه تکرار استخراج شد. مقدار 1 گرم ریشه چغندقندر پودر شده در ازت مایع در 50 حجم از بافر استخراج (30mM Heps، $MgCl_2$ 10mM، اتانل 96 درصد) هموژن گردید. نمونه‌های هموژن شده به مدت 15 دقیقه در دستگاه فراصوت در حمام آب گرم 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا سلول‌ها شکسته شوند. پس از انجام سانتریفیوژ در 13000 دور در دقیقه برای مدت 10 دقیقه، پلی ساکاریدهای محلول در آب رسوب داده شدند. رسوب حاصل سه مرتبه با اتانل 70 درصد شستشو و سپس در دمای اتاق خشک شد. پلی ساکاریدهای رسوب داده شده، یک بار دیگر با اضافه نمودن 5 حجم آب به مدت 24 ساعت و به دنبال آن، یک ساعت در 50 درجه سانتی گراد استخراج شدند.

نتایج و بحث

در این مطالعه، ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز باکتری *Leuconostoc mesenteroides* سویه NRRL B-1355 به طول حدود 6 کیلوجفت باز و 2057 اسید آمینه به کمک آگروباکتری در گیاه چغند قند بیان شد. از مجموع 131 گیاهچه‌ای که عمل تراریزش روی آنها صورت گرفت، تنها 3 گیاهچه توانستند از محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین سالم وارد گلدان‌های کوچک شوند که میزان کارایی تراریزشی در حدود 2/3 درصد را نشان داد. آزمون PCR بر روی DNAی ژنومی گیاهان به ظاهر تراریخت نشان داد که هر سه گیاه تراریخت هستند و ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز در ژنوم آنها وارد شده است (شکل 2).

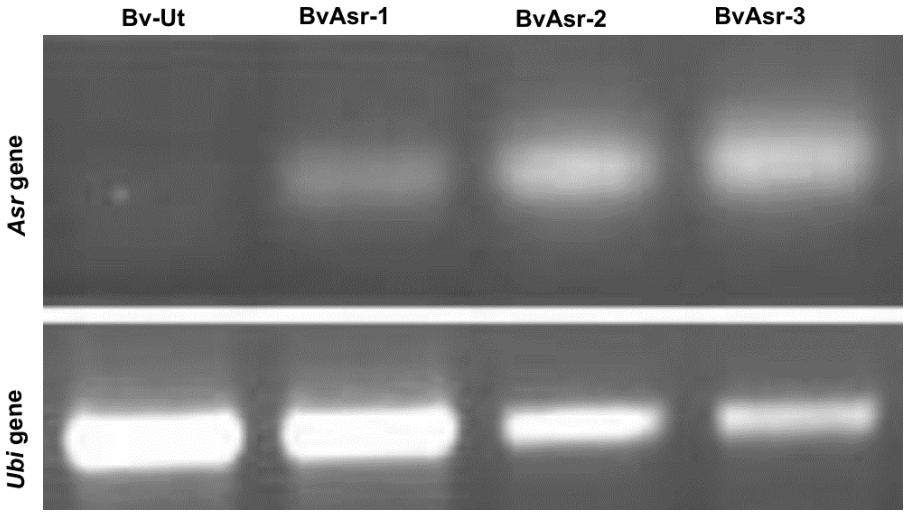
میزان کارایی تراریزش در این مطالعه پائین بود. البته این موضوع چندان هم عجیب نیست، زیرا از چغندرقند به عنوان یک گیاه مقاوم به تراریزش یاد می‌شود. Hall et al. (1996) فراوانی تراریختی در چغندرقند به واسطه آگروباکتریوم را 3 درصد گزارش دادند. این در حالی است که Hisano et al. (2004) فراوانی تراریختی را در این گیاه 30 درصد گزارش دادند. همچنین Gould (1997) درصد تراریختی به واسطه آگروباکتریوم در گیاهان را بین 10 تا 30 درصد گزارش کرد.



شکل 2. آنالیز PCR **گیاهان تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن** *Asr*

Figure 2. PCR analysis of putative transgenic sugar beet lines, using *Asr* specific primers

به منظور پاسخ به این سوال که آیا ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز در ژنوم گیاهان تراریخت نسخه‌برداری می‌شود یا نه؟ بر روی هر سه گیاهچه تراریخت به همراه شاهد آزمون RT-PCR نیمه کمی صورت گرفت (شکل 3). نتایج این آزمون نشان داد که ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز نسخه‌برداری می‌شود. همانطوری که مشاهده می‌شود، هیچ نوع نسخه mRNAی از ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز در گیاه شاهد دیده نشده است. آزمون RT-PCR نیمه کمی نشان داد که هر سه گیاه، میزان قابل توجهی از نسخه‌های mRNA ژن کدکننده آنزیم آلترنان سوکراز را تولید می‌کنند. همچنین به نظر می‌رسد که گیاه تراریخت Bv*Asr*-1 میزان بیان کمتری در مقایسه با دو گیاه تراریخت دیگر دارد. اگرچه از تعداد نسخه‌های ژن *Asr* در ژنوم گیاهان تراریخت اطلاعی در دست نیست، با این حال، میزان کمتر نسخه برداری در گیاه تراریخت Bv*Asr*-1 می‌تواند به دلایلی مانند؛ تعداد نسخه کمتر، فعالیت کمتر نسخه‌های الحاقی به دلیل مجاورت در نزدیکی مناطق هتروکروماتینی اتفاق افتاده باشد. به منظور بررسی تاثیر معرفی ژن *Asr* به گیاهان تراریخت چغندرقند، آنالیز قند هر سه گیاه تراریخت چغندرقند صورت گرفت. نتایج ا نشان داد که گیاه شاهد با میزان پل (ساکارز) 19/6 درصد دارای ساکارز بیشتری نسبت به گیاهان تراریخت حاوی ژن *Asr* با میزان پل از 13/8 تا 15/4 بود.



شکل 3. آنالیز RT-PCR نیمه کمی گیاهان تراریخت شاهد چغندرقند. از ژن داخلی یوبی کوتین (Ubi3) به عنوان ژن کنترل داخلی برای مقایسه میزان بیان استفاده شد

Figure 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of control and transgenic sugar beet lines. The ubiquitin-ribosomal gene expression (Ubi3) was used as an internal control

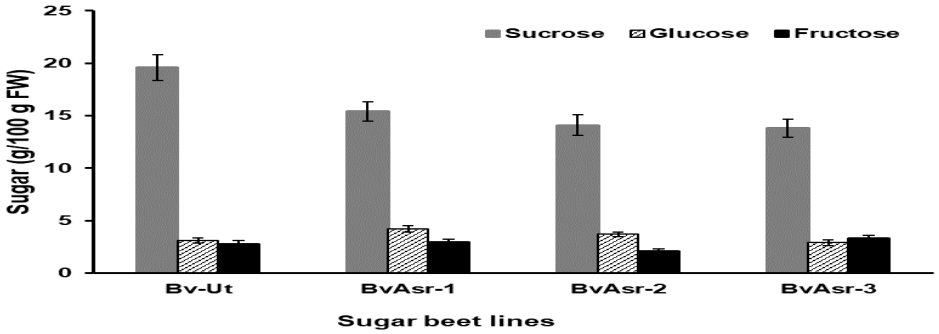
جدول 1. آنالیز قند در گیاهان شاهد و تراریخت چغندرقند (میانگین ± SD)

Table 1. Sugar analysis of control and transgenic sugar beet lines (Mean±SD)

میانگین (Mean)	شاهد(Bv-Ut)	لاین تراریخت (Transgenic line)		
		Bv*Asr*-1	Bv*Asr*-2	Bv*Asr*-3
پل (%Pol)	19.6±0.82	15.4±1.3	14.1±1.63	13.8±0.9
بریکس(%Brix)	21.9±0.14	18.4±0.65	17.4±0.85	20.8±0.66
خلوص (%Purity)	85.9	83.7	81.0	66.3

همانگونه که مشاهده می‌شود، بین دو گیاه تراریخت و شاهد نیشکر از نظر درصد پل (ساکارز)، درصد خلوص شربت در ساقه، درصد بریکس (درصد مواد جامد محلول) در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری($P\leq0.01$) وجود دارد. درصد پارامتر پل که بیانگر میزان ساکارز موجود در ساقه نیشکر است، در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (جدول 1). میزان کاهش قند (ساکارز) در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد در گیاهان تراریخت دارای ژن آلترنان حدود 36/1 درصد است. از آنجایی که ساکارز تنها سوبسترا برای سنتز گلوکان‌سوکرازها است (Hehre 1943)، این موضوع نشان می-دهد که با بیان ژن *Asr* ساکارز ریشه احتمالاً برای تولید بیوپلیمر آلترنان مصرف شده باشد. همچنین میزان بریکس نیز در گیاهان

تراریخت پایین‌تر از گیاهان شاهد بود. Bauer et al. (2012) نشان دادند که انتقال ژن‌های کدکننده ریوتران سوکراز و لوان سواکراز به گیاه نیشکر، همانند نتایج این مطالعه سبب کاهش معنی‌دار محتوای ساکارز قلمه‌ها به تقریبا دو سوم گیاه شاهد گردید. هم راستا با کاهش میزان قند ساکارز، میانگین بریکس نیز به همان نسبت کاهش یافت. همچنین Ahmadi et al. (2018) با بیان ژن موتان سوکراز (*gtf*I) در گیاه نیشکر که همانند آلترنان سوکراز از ساکارز به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند، نشان دادند که میزان ساکارز در گیاهان تراریخت حدوداً 30 درصد کمتر از شاهد بود. اندازه‌گیری میزان پلیمر تولیدی در گیاهان شاهد نشان داد که در لاین‌های تراریخت موتان سوکراز، میزان 36/6 mg/g FW بیوپلیمر آلترنان تولیدمی‌شود. همچنین نسبت شاخص پل به بریکس که به عنوان خلوص عصاره از آن یاد می‌شود، در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد معنی‌دار بود.



شکل 4. میزان قندهای مختلف (میانگین ±SE) موجود در ریشه چغندرقندهای شاهد و تراریخت

Figure 4. The amount of different sugars (Mean±SE) in control and transgenic sugar beet lines

از آنجایی که آنزیم آلترنان سوکراز از ساکارز به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و همچنین آنزیم‌های خانواده گلوکان سوکرازها در شرایطی مانند pH بین 6-4/5 و میزان بالای ساکارز فعالیت هیدرولازی دارند (Johansson et al. 2016)، میزان قندهای ساده گلوکز، فرکتوز و میزان ساکارز نیز اندازه گیری شد. شکل 4 میزان تغییرات این سه قند را در گیاهان تراریخت متفاوت و شاهد نشان می‌دهد. میزان ساکارز به شکل معنی‌داری در گیاهان تراریخت کاهش یافت. با این حال، به نظر می رسد که میزان قندهای ساده در گیاهان تراریخت در مقایسه با شاهد تغییر معنی‌داری نکرد. مقایسه نتایج این آنالیزها با نتایج Ahmadi et al. (2018) در گیاه نیشکر تا حدودی متفاوت بود. بیان ژن موتان سوکراز در نیشکر ضمن اینکه سبب تولید مقادیر بیشتری از بیوپلیمر موتان شد، سبب افزایش دو برابری قندهای ساده گلوکز، فرکتوز در مقایسه با شاهد گردید. اگر چه دو آنزیم موتان سوکراز و آلترنان سوکراز از نظر محصول نهایی حاصل از تبدیل ساکارز با هم متفاوت هستند، با این حال مکانیسم عمل هر دو آنزیم

یکسان است (Johansson et al. 2016)، لذا علت فعالیت بیشتر موتان سوکراز در نیشکر در مقایسه با فعالیت کمتر آلترنان سوکراز را شاید بتوان به نوع گیاه، تعداد کپی‌های وارد شده مرتبط دانست.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان بخشی از ساکارز موجود در ریشه چغندر قند را به کمک روش‌های انتقال ژن به بیوپلیمرهای ارزشمندی با کاربردهای صنعتی و داروی تبدیل کرد. اگر چه میزان تولید آلترنان چندان زیاد نبود، اما با توجه به عملکرد بالای گیاه چغندر قند در واحد سطح، شاید این موضوع بتواند پس از بهینه‌سازی‌های بعدی در زمینه‌های مهندسی ژنتیک، ادامه تحقیقات در این راستا را توجیه نماید.

منابع

خادمی میترا، نظریان فیروزآبادی فرهاد (1392) تاثیر دو نوع هورمون بر تولید برگ های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم گیاه چغندرقند. فن‌آوری زیستی در کشاورزی 4(1)، 47-52.

شرفی، رضا (1392) همسانه‌سازی ژن کدکننده‌ی آنزیم موتان سوکراز از باکتری Streptococcus doweni. Mfe 28 برای بیان در گیاه چغندرقند. پایاننامه کارشناسی ارشد، دانشگاه لرستان.

موسوی الهام، نظریان فیروزآبادی فرهاد، اسماعیلی احمد (1395) بررسی طیف آنتی بیوگرام و ژن های مرتبط با بیماری زایی دو سویه انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از شیره درخت بلوط(*Quercus brantii* var. persica). مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران 26(146)، 31-46.

References

Ahmadi M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A et al. (2018) Production of microbial mutan polysaccharide by expression of a mutansucrase gene (gtfI) in sugarcane. Mol Breed 38**,** 149.

Arguello-Morales MA, Remaud-Simeon M, Pizzut S et al. (2000) Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1355. FEMS Microbiol Lett 182**,** 81-85.

Årsköld E, Svensson M, Grage H et al. (2007) Environmental influences on exopolysaccharide formation in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. Inter J food Microbiol 116**,** 159-167.

Bauer R, Basson CE, Bekker J et al. (2012) Reuteran and levan as carbohydrate sinks in transgenic sugarcane. Planta 236**,** 1803-1815.

Cote GL (1992) Low-viscosity α-d-glucan fractions derived from sucrose which are resistant to enzymatic digestion. Carbohydrate Polymer 19**,** 249-252.

Falconer DJ, Mukerjea R, Robyt JF (2011) Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC

dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. Carbohydrate Res 346, 280-284.

Freitas F, Alves VD, Reis MA (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trend Biotechnol 29, 388-398.

Galle S, Schwab C, Arendt E et al. (2010) Exopolysaccharide-forming Weissella strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. J Agric Food Chem 58, 5834-5841.

Gangoiti J, Pijning T, Dijkhuizen L (2018) Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α-glucans from starch and sucrose. Biotechnol Adv 36, 196-207.

Gould J (1997) Transformation of the cereals using Agrobacterium. Recombinant Gene Expression Protocols, 491-501.

Hall RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens GJ et al. (1996) A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. Nature Biotechnol 14, 1133-1138.

Hehre EJ (1943) Comparison of Dextran Synthesis by Leuconostoc Enzyme with Starch Synthesis by Potato Phosphorylase. Proc Society Experim Biol Med 54, 240-241.

Hisano H, Kimoto Y, Hayakawa H et al. (2004) High frequency Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in Beta vulgaris and Beta maritima. Plant Cell Report 22, 910-918.

Johansson S, Diehl B, Christakopoulos P et al. (2016) Oligosaccharide synthesis in fruit juice concentrates using a glucansucrase from Lactobacillus reuteri 180. Food Bioprod Process 98, 201-209.

Katina K, Maina NH, Juvonen R et al. (2009) I*n situ* production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. Food Microbiol 26, 734-743.

Kavita K, Mishra A, Jha B (2011) Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium Vibrio parahaemolyticus. Biofouling 27, 309-317.

Khademi M, Nazarian-Firouzabadi F (2014) The Influence of Two Types of Hormones (BA and NAA) on Appearance of Shoot Base Explants in Sugar Beet (Beta vularis L.). Agric Biotechnol J 4, 47-52 (In Persian).

Kok-Jacon GA, Vincken J-P, Suurs LC et al. (2007) Expression of alternansucrase in potato plants. Biotechnol Lett 29, 1135-1142.

Kralj S (2004) Glucansucrases of *Lactobacilli*: Characterization of genes, enzymes, and products. Ph.D. thesis. In: Rijksuniversiteit Groningen. University of Groningen.

Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MMG et al. (2004) Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. Microbiol 150**,** 3681-3690.

Krishnaswamy NR (2011) Carbohydrate chemistry from Fischer to now. Resonance 16**,** 620-639.

Lacaze G, Wick M, Cappelle S (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. Food Microbiol 24**,** 155-160.

Leathers TD, Nunnally MS, Cote GL (2002) Modification of alternan by novel Penicillium spp. J Indust Microbiol Biotechnol 29**,** 177-180.

Monchois V, Willemot R-M, Monsan P (1999) Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Rev 23**,** 131-151.

Moulis C, Joucla G, Harrison D et al. (2006) Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. J Biol Chem 281**,** 31254-31267.

Mousavi E, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A (2017) Antibiogram Analysis and Detection of Pathogenicity Genes in Two Strains of Enterococcus faecium Isolates from Oak Sap (*Quercus brantii* var. Persica). J Mazandaran Univ Medic Sci 26**,** 31-46 (in Persian).

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15**,** 473-497.

Norouzi P, Malboobi MA, Zamani K, Yazdi-Samadi H (2005) Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (Beta vulgaris L.). In Vitro Cell Develop Biol Plant 41,11-16.

O'Connor JJ, Robertson EF (2003) William Sealy Gosset. MacTutor History of Mathematics archive, University of St Andrews.

Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Rev Microbiol 8**,** 578-592.

Roberfroid M (2007) Prebiotics: the concept revisited. J Nut**,** 830S–837S.

Santos M, Teixeira J, Rodrigues A (2000) Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f). Biochem Engineer J 4**,** 177-188.

SAS Institute (2011) SAS version 9.3. SAS Institute Inc, Cary.

Sharafi R (2013) Cloning Of Gene Encoding mutansucrase enzyme (Gtfi) from *Streptococcus downei*. Mfe 28 for expression in sugar beet plants. MsC thesis, Lorestan University.

Sidebotham RL (1974) Dextrans. Adv Carbohydrate Chem Biochem 30**,** 371-444.

Suresh Kumar A, Mody K, Jha B (2007) Bacterial exopolysaccharides–a perception. J Basic Microbiol 47**,** 103-117.

Van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E et al. (1999) Biochemical and Structural Characterization of the Glucan and Fructan Exopolysaccharides Synthesized by theLactobacillus reuteri Wild-Type Strain and by Mutant Strains. Appl Environment Microbiol 65**,** 3008-3014.

Vasanthan T, Yeung J, Hoover R (2001) Dextrinization of Starch in Barley Flours with Thermostable alpha-Amylase by Extrusion Cooking. Starch-Starke 53**,** 616-622.

Verpoorte R (2000) Secondary metabolism. In: Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Springer. pp. 1-29.

Vuyst L, Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Rev 23**,** 153-177.

Whalley HCSD (1964) ICUMSA methods of sugar analysis : official and tentative methods recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA). (H.C.S. De Whalley edn), Elsevier Pub. Co., Amsterdam.

Yan M, Han J, Xu X et al. (2016) Gsy, a novel glucansucrase from Leuconostoc mesenteroides, mediates the formation of cell aggregates in response to oxidative stress. Sci Report 6**,** 38122.

Yan M, Wang B-h, Xu X et al. (2018) Molecular and functional study of a branching sucrase-like glucansucrase reveals an evolutionary intermediate between two subfamilies of the GH70 enzymes. Appl Environ Microbiol 84, e02810-02817.