

Expression Analysis of Genes Associated with Sucrose Accumulation in Transgenic Sugarcane Lines Expressing a Mutansucrase Gene

Mina Delfan¹  | Farhad Nazarian-Firouzabadi^{1*}  | Bahman Zahedi² 

1-Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: nazarian.f@lu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: December 23, 2025;
Received in revised form: April 15, 2026;
Accepted: April 25, 2026;
Available online: June 30, 2026

Keywords:

Ectopic expression,
Gene expression,
Biopolymer,
Genetic engineering,
Sucrose metabolism

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a prominent industrial crop characterized by its exceptional capacity for culm-localized sucrose accumulation. This accumulated sucrose serves as the primary substrate for diverse biopolymer-synthesizing enzymes. Among these, mutansucrase utilizes sucrose to synthesize mutan, a polysaccharide of high industrial and biomedical value. Heterologous expression of mutansucrase in sugarcane is hypothesized to simultaneously partition stalk sucrose toward mutan production and modulate the transcriptional profiles of key endogenous genes governing carbohydrate metabolism. In this study, we employed semi-quantitative RT-PCR to evaluate the expression levels of core sucrose biosynthetic and catabolic genes, specifically sucrose-phosphate synthase (*Sps*), sucrose synthase (*Susy*), soluble acid invertase (*Sai*), and neutral/alkaline invertase (*Inv*) in both leaves and stem tissues of transgenic mutansucrase-expressing lines (B9, B11 and B38) and non-transgenic controls. The results of present study demonstrated that the expression of endogenous machinery involved in sucrose metabolism was significantly modulated by heterologous mutansucrase activity. Specifically, *Sps* transcript levels were upregulated in transgenic lines relative to wild-type controls, whereas *Susy* expression exhibited no substantial variation between the experimental groups. Conversely, both *Sai* and *Inv* transcripts were more abundant in control plants than in the transgenic counterparts. Among the evaluated transgenic population, line B38 exhibited the most pronounced alterations in gene expression. Taken together, these findings indicate that transgenic mutansucrase activity triggers targeted transcriptional reprogramming of the host plant's sucrose metabolic pathway. We propose that the depletion of the internal sucrose pool by the exotic enzyme activates a compensatory feedback mechanism aimed at replenishing the substrate. Consequently, targeted genetic strategies overexpressing key sucrose biosynthetic genes could increase substrate availability, thereby metabolic flux toward enhanced mutan biopolymer production.



Cite this article: Delfan, M., Nazarian-Firouzabadi, F. and Zahedi, B. (2026). Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation in transgenic sugarcane lines expressing a mutansucrase Gene. *Plant Genetic Research*, 13(1): 101–110 (In Persian).

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2026.2089379.1035>

Introduction

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a highly strategic and valuable industrial crop characterized by its exceptional capacity to accumulate substantial quantities of sucrose within the vacuoles of stalk storage cells. Beyond serving as the primary energy reservoir for the plant, this vacuolar sucrose represents an ideal substrate for heterologous bacterial enzymes engineered to produce high-value biopolymers. One such enzyme, mutansucrase (*gtfI*), directly utilizes sucrose to synthesize mutan, a functional biopolymer with diverse industrial and biomedical applications. However, introducing a foreign gene as a major sugar-consuming enzyme into the host system inevitably alters endogenous carbohydrate homeostasis. This study aimed to investigate whether the ectopic expression of a mutansucrase gene, and the resulting continuous consumption of sucrose, acts as a metabolic signal that modulates the transcriptional profile of core endogenous genes governing sucrose biosynthesis and accumulation.

Materials and Methods

In this study, the expression profiles of genes encoding sucrose-phosphate synthase (*Sps*), sucrose synthase (*Susy*), invertase (*Inv*), and soluble acid invertase (*Sai*) were evaluated across three transgenic sugarcane lines (B9, B11, and B38) and a non-transgenic (UT) control. Tissue sampling was performed on two distinct anatomical compartments: the leaf (source tissue) and the stalk/culm cuttings (sink tissue). Following total RNA extraction and first-strand cDNA synthesis, transcript abundance was quantified using semi-quantitative RT-PCR. The endogenous housekeeping gene *Actin* served as the internal reference control for normalization across samples.

Results and Discussion

Transcriptional profiling revealed a marked upregulation of the primary sucrose-biosynthetic gene *Sps* in the transgenic sugarcane lines compared to the wild-type control, alongside a concurrent downregulation of the sucrose-hydrolyzing genes *Sai* and *Inv*. In contrast, *Susy* expression remained stable across all genotypes, with the transgenic line B38 displaying the most pronounced transcriptional shifts. These findings indicate that the metabolic drain on the carbohydrate pool imposed by heterologous mutansucrase expression triggers a compensatory feedback mechanism in sugarcane. To counteract artificial sucrose depletion and maintain carbon homeostasis, the host plant simultaneously accelerates sucrose resynthesis via *Sps* activation and minimizes futile carbohydrate cleavage by suppressing invertase expression. This adaptive metabolic buffering suggests that future engineering strategies aimed at optimizing mutan production should incorporate the co-overexpression of endogenous sucrose-synthesizing machinery, thereby sustaining the foreign metabolic sink without compromising host agronomic fitness.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates that heterologous mutansucrase expression in sugarcane establishes a competing carbon sink that triggers an adaptive, compensatory transcriptional response to maintain carbohydrate homeostasis. By simultaneously upregulating sucrose biosynthesis (*Sps*) and suppressing hydrolytic pathways (*Sai* and *Inv*), the host plant actively buffers against artificial sugar depletion. To build upon these insights, future research should focus on developing multi-gene co-expression systems that intentionally upregulate endogenous sucrose-synthesizing machinery alongside the transgene. Characterizing the exact signaling molecules such as trehalose 6-phosphate that mediate this feedback loop could uncover precise master regulators for optimizing biopolymer yield without compromising host fitness.

Author Contributions

M. Delfan conducted the experiment. F. Nazarian-Firouzabadi designed the experiment, supervised the research, wrote and revised the final draft of the manuscript. B. Zahedi helped to design some of the experiments.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

We thank the Vice Chancellor for Research at the Lorestan University for his financial support and collaboration in this research.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.



بررسی تغییرات بیان مهم‌ترین ژن‌های درگیر در تجمع ساکارز در لاین‌های نیشکر تراریخت دارای ژن موتان سوکروز

مینا دلفان^۱ | فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۱*} | بهمن زاهدی^۲

۱- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۱/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

بیان اکتوپیک،

بیان ژن،

بیوپلیمر،

مهندسی ژنتیک،

متابولیسم ساکارز

نیشکر (*Saccharum officinarum*) یکی از گیاهان صنعتی مهم دنیا است که مقادیر زیادی ساکارز را در ساقه‌ها ذخیره می‌کند. ساکارز سوبسترای اصلی آنزیم‌های کلیدی مسئول سنتز شمار زیادی از بیوپلیمرها ارزشمند صنعتی است. آنزیم موتان سوکروز (*Gtfl*) با استفاده از ساکارز، بیوپلیمر صنعتی-پزشکی موتان (*Mutan*) را سنتز می‌کند. در نتیجه، انتظار می‌رود که بیان ژن *gtfl* علاوه بر تبدیل بخشی از ساکارز ساقه به موتان، سبب تغییر الگوهای بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز ساکارز سلول‌های نیشکر شود. در این پژوهش، سطوح بیان ژن‌های سوکروز فسفات سنتاز (*Sps*)، سوکروز سنتاز (*Susy*)، سولوبل اسید اینورتاز (*Sai*) و اینورتاز (*Inv*) به عنوان ژن‌های اصلی کنترل‌کننده مسیرهای سنتز و تجمع ساکارز، در هر دو بافت برگ و قلمه ساقه در سه لاین تراریخته (B9، B11 و B38) بیان‌کننده ژن موتان سوکروز باکتریایی و شاهد غیرتراریخت با استفاده از روش Semi-quantitative RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های درگیر در سنتز و تجمع ساکارز در لاین‌های تراریخت، تحت تأثیر افزایش بیان ژن موتان سوکروز قرار گرفتند. به طور مشخص، سطوح رونویسی ژن *Sps* در گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. در مقابل، بیان ژن *Susy* تفاوت چندانی را بین لاین‌های تراریخت و شاهد نشان نداد. برعکس، میزان رونویسی ژن‌های *Sai* و *Inv* در گیاهان شاهد بیشتر از لاین‌های تراریخت بود. در میان لاین‌های تراریخت مورد ارزیابی، لاین B38 بیشترین تغییرات را در بیان ژن‌ها از خود نشان داد؛ بنابراین، دست‌ورزی‌های ژنتیکی هدفمند با هدف بیش‌بیان (*Overexpression*) ژن‌های درگیر در بیوسنتز ساکارز، به طور بالقوه می‌تواند در دسترس بودن سوبسترای ساکارز را افزایش داده و از این طریق، آنزیم موتان سوکروز را جهت تولید بهینه‌ی بیوپلیمر موتان تغذیه کند.

مقدمه

نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) یکی از مهمترین محصولات زراعی جهان از نظر اقتصادی-اجتماعی است که نقشی اساسی در تأمین امنیت غذایی و انرژی ایفا می‌کند. نیشکر منبع اصلی بیش از ۸۰ درصد از تولید شکر در جهان است و امروزه جایگاه ویژه‌ای در بخش تولید انرژی‌های زیستی (بیوانرژی) دارد (FAO, 2024) و به‌عنوان ماده اولیه تولید بیواتانول، نقش مهمی در کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای دارد (De Almeida and Colombo, 2023). به‌طور کلی، دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان ابرازی قدرتمند برای ارتقای هم‌زمان پتانسیل عملکرد و شاخص‌های کیفی در محصولات زراعی به‌شمار می‌رود (Zakerghoran et al., 2025; Souri et al., 2020).

تبدیل مستقیم ساکارز به اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی ارزشمند، مانند آلتران و دکستران از طریق رویکردهای مهندسی ژنتیک، رهکاری ارزشمند در زیست‌فناوری گیاهی برای تولید ترکیبات ارزشمند صنعتی-دارویی در گیاهان است. این هوموپلی‌ساکاریدها که به‌طور طبیعی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک سنتز می‌شوند، توسط آنزیم‌های گلوکان‌سوکروز (به‌ویژه آلتران‌سوکروز و دکستران‌سوکروز) سنتز می‌شوند. این آنزیم‌ها بر خلاف آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز آمیلوز و آمیلوپکتین نشاسته، از انرژی شیمیایی پیوند گلیکوزیدی ساکارز استفاده کرده و نیازی به پیش‌سازهای قندی گران‌قیمت و نایاب نوکلئوتیدی مانند ADP-glucose یا UDP-glucose برای سنتز بیوپلیمرهای ارزشمند ندارند (Meng et al., 2017; Molina et al., 2021). پژوهشگران با انتقال ژن‌های باکتریایی به گیاهان زراعی غنی از ساکارز (مانند چغندر قند و نیشکر)، می‌توانند مسیرهای استاندارد سنتز نشاسته یا سایر قندها را به سمت تولید پلیمرهای زیستی مورد نظر در درون خود گیاه (*in planta*) هدایت کنند (Kok-Jacon, 2005; Kok-Jacon et al., 2005; Nazarian Firouzabadi et al., 2007).

آلتران و دکستران به‌دلیل پیوندهای ساختاری منحصربه‌فرد خود، حلالیت استثنایی، گرانی (ویسکوزیته) پایین، اهمیت بسیار بالایی در صنایع غذایی و دارویی دارند، زیرا این

ویژگی‌های سبب می‌شوند تا از آن‌ها به‌عنوان قوام دهنده‌های غذایی، پری‌بیوتیک‌ها و ترکیبات دارویی استفاده شود (Kok-Jacon, 2005; Wang et al., 2023). در نتیجه، مهندسی ژنتیک گیاهان برای تبدیل آن‌ها به کارخانه‌های زنده تولید بیوپلیمرهای مشتق از ساکارز، جایگزینی پایدار و مقرون‌به‌صرفه برای فرآیندهای صنعتی تخمیر میکروبی و مواد سنتزی با پایه نفتی فراهم می‌آورد.

بیان هترولوگ ژن‌های گلوکان‌سوکروز از منابع دیگر مانند باکتری‌های اسید لاکتیک، سبب ایجاد رقابت برای مصرف ساکارز در داخل سلول شده که این امر به‌طور ذاتی، منجر به یک پاسخ جبرانی آبشاری در بیان ژن‌های اصلی کنترل‌کننده متابولیسم کربوهیدرات گیاه منجر می‌شود. هنگامی که آنزیم‌هایی مانند دکستران‌سوکروز یا آلتران‌سوکروز به‌طور فعال ذخایر درون‌سلولی ساکارز را برای سنتز بیوپلیمرها تخلیه می‌کنند، این امر سبب می‌شود که هومئوستازی و تعادل ظریف انرژی سلول دستخوش تغییر شود. در نتیجه، گیاهان اغلب برای متابولیسم ساکارز بیشتر و رقابت با ترانزژن جدید، بیان ژن‌های اصلی و مهم سلول مانند سوکروز ستاز (*Sucrose Synthase: Susy*) و اینورتاز (*Invertase: Inv*) را در افزایش دهند (Van Der Meer et al., 1994). هم‌زمان، این انحراف متابولیکی در متابولیسم ساکارز، به‌دلیل جابجایی شدید جریان کربن به سمتی خارج از مسیرهای ذخیره‌سازی سنتی، به‌طور معمول منجر به کاهش بیان ژن‌های درگیر در سنتز نشاسته سلول، مانند *AGPase* در مراحل پایین دست می‌شود (Gerrits et al., 2001). علاوه بر این، از آنجا که ساکارز به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان حیاتی عمل می‌کند، این تغییرات در جریان‌های متابولیکی می‌توانند مسیرهای سنجش قند (*sugar sensing*)، بیان ناقلان ساکارز (*SUTs*) و مسیرهای مرتبط با هگزوکیناز را تعدیل کنند و در نهایت، کل پروفایل ترانسکریپتومی گیاه را در رابطه با تسهیم کربن اولیه بازآرایی نمایند (Smekens et al., 2010). احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2018) نشان دادند که بیان ژن موتان سوکروز (*Mutansucrase: GtfI*) در گیاه نیشکر، سبب کاهش میزان ساکارز کل به‌دلیل تبدیل آن به بیوپلیمر موتان گردید. با این حال میزان قندهای ساده در حدود دو برابر افزایش یافت که نشان داد این آنزیم در شرایط خاصی علاوه بر سنتز بیوپلیمر

موتان، عمل هیدرولیز ساکارز را نیز انجام می‌دهد. با این حال، نشان این مطالعه مشخص نکرد که آیا بیان ژن موتان سوکروز احتمالا تغییر در بیان ژن‌های مهم درگیر در متابولیسم ساکارز ایجاد می‌کند یا نه (Ahmadi et al., 2018). از این‌رو، هدف از این تحقیق بررسی میزان بیان ژن‌های *Inv*، *Susy* و سوکروز فسفات سنتاز (*Sucrose phosphate synthase: Sps*)، در لاین‌های نیشکر تراریخته دارای ژن موتان سوکروز در مقایسه با لاین‌های شاهد نیشکر بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش تعداد سه لاین تراریخته حاصل از پژوهش‌های احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2018) شامل لاین‌های B9، B11 و B38 همراه با لاین شاهد غیرتراریخت آزمایش بود. از برگ و قلمه لاین‌های تراریخت و شاهد مورد نظر برای انجام آزمایش‌های این مطالعه استفاده شد (Ahmadi et al., 2018).

استخراج RNA کل: مقدار سه گرم پودر بافت قلمه یا برگ از نمونه‌های گیاهی در سه میلی‌لیتر از بافر استخراج (SDS دو درصد، ۵۰ mM Tris-HCl (pH=۹) و ۱۰ mM EDTA (pH=۸) و ۳ میلی‌لیتر فنل) حل شد. نمونه‌ها پس از ورتکس در ۴۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به لوله جدیدی منتقل شد و میزان سه میلی‌لیتر مخلوط فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل (با نسبت ۱:۲۴:۲۵) اضافه شد و نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، فاز رویی به لوله جدیدی منتقل شد و میزان سه میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد، ته‌نشین (رسوب) در ۱۱۲۵ میکرولیتر آب مقطر حل شد و ۳۷۵ میکرولیتر کلرید لیتیم ۸ مولار به محلول اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، فاز رویی دورریخته شد و ته‌نشین در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد

و ۴۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار (pH=۵) اضافه شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر اتانول سرد به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از خارج‌سازی از فریزر، نمونه‌ها، در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شدند و ته‌نشین با الکل ۷۰ درصد شسته شد. بعد از خشک نمودن رسوب برای حذف الکل، رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد. به‌منظور حذف DNA از آنزیم *DNAase I* در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در نهایت با افزودن یک میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ mM و تیمار حرارتی در ۶۵ °C برای ۱۰ دقیقه آنزیم *DNAase* غیرفعال گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتری (OD_{۲۶۰}/OD_{۲۸۰} nm) و با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱ درصد) بررسی گردید.

سنتز cDNA: سنتز cDNA توسط شیوه نامه مربوط به کیت سنتز cDNA (شرکت فرمتاز) صورت گرفت. پس از هم‌غلظت نمودن نمونه‌ها (۳۰ ng از نظر میزان RNA کل)، به هر نمونه مقدار یک میکرولیتر آغازگر الیگو dT، ۴ میکرولیتر بافر واکنش، ۱ میکرولیتر *RNase Inhibitor*، ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر آنزیم *Revert Aid M-Mulv* اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، به‌منظور غیرفعال‌سازی واکنش، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

طراحی آغازگر: توالی کدکننده ژن‌های سوکروز فسفات سنتاز (*Sps*)، سوکروز سنتاز (*Susy*)، اسیداینورتاز (*Sai*) و اینورتاز (*Inv*) و ژن خانه‌دار *Actin* گیاه نیشکر از پایگاه داده NCBI دانلود شدند. برای طراحی آغازگرها از برنامه Primer 3 بر اساس پیش فرض‌های نرم‌افزار استفاده شد. آغازگرهای پیشنهادی (جدول ۱) توسط نرم‌افزارهای *Oligo Analyser* از نظر تشکیل ساختار ساقه و حلقه و *Self-Dimer* مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت، آغازگرهای انتخاب شده به‌منظور اطمینان از اختصاصی بودن توسط نرم‌افزار *Primer Blast* علیه پایگاه داده‌های ژنومی گیاه نیشکر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مربوط به ژن‌های گیاه نیشکر برای واکنش RT-PCR نیمه کمی

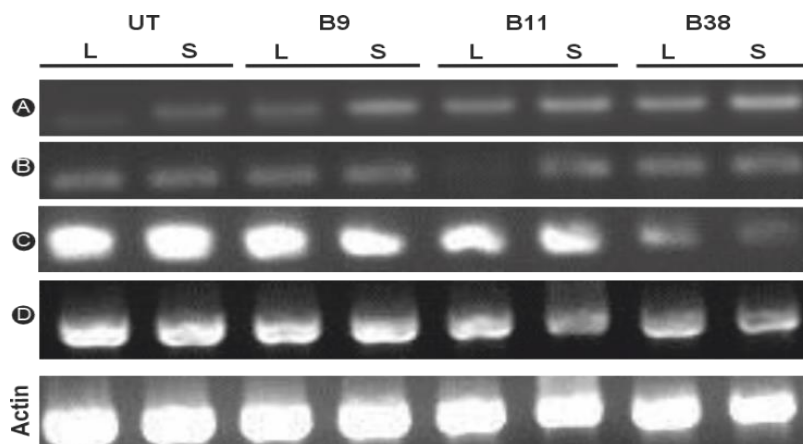
Table 1. List of primers associated with sugarcane plant sucrose metabolism genes for semi-quantitative RT-PCR analysis.				
نام ژن	شماره دسترسی	دمای اتصال (°C)	توالی آغازگر (5'→3')	طول قطعه (جفت باز)
Gene name	Accession number	Annealing temperature (°C)	Primer sequence	Amplicon length (bp)
<i>Inv</i>	KC145798.1	57	Forward: TGTGAACAATGGATCAAAA Reverse: GCTGGGTAGCATATCTTGAG	399
<i>Susy</i>	AY118266	54	Forward: CAGCATAGCTTGTTAAGTAATAC Reverse: CTGGTGATGATGAAATCAGTGTG	126
<i>Sps</i>	M854011.1	61	Forward: TCITCTCAAACCCCGTAAGC Reverse: CAGTTCACGATGTTACCAAATG	104
<i>Sai</i>	X975052.1	60	Forward: GCAGCGCACGGGATTCCACT Reverse: GCCAGGTGTTGTCCGACGGG	464
<i>Actin</i>	CA148161	59	Forward: CTGGAATGGTCAAGGCTGGT Reverse: TCCTTCTGTCCCATCCCTACC	110

از طریق تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار ImageJ از طریق نرمال سازی شدت باندهای ژن هدف نسبت به کنترل‌های داخلی مربوطه تعیین شدند.

نتایج و بحث

به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های سوکروز فسفات سنتاز (*Sps*)، سوکروز سنتاز (*Susy*)، اینورتاز (*Inv*) و سولوبل اسید اینورتاز (*Sai*) در گیاهان تراریخته B11، B9 و B38 به همراه شاهد غیرتراریخت نیشکر، از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های مختلف با توجه به نوع بافت با هم اختلاف دارند. همچنین مشخص است که میزان بیان همه ژن‌ها صرف نظر از بافت، برای گیاه تراریخت B38 کمتر از دو گیاه تراریخت دیگر است؛ با این حال به نظر می رسد که بیان ژن سوکروز فسفات سنتاز در این مورد در حد و یا کمی بالاتر از دو لاین دیگر باشد. به علاوه، نیشکر در پژوهش‌های پیشین، به عنوان گیاهی معرفی شده است که می توان بخشی از ساکارز آن را به پلیمرهای زیستی ارزشمند تبدیل کرد (Ahmadi et al., 2018). در مطالعه احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2018)، با استفاده از انتقال ژن موتان سوکروز به نیشکر در حدود ۵۹ mg/gFW پلیمر موتان در لاین‌های تراریخته تولید شد. از آنجایی که تبدیل بخشی از ساکارز ذخیره‌ای گیاه می‌تواند سبب تغییر بیان ژن‌های مهم درگیر در بیوسنتز ساکارز گردد، به نظر می‌رسد که بیان ژن‌های مورد مطالعه در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد افزایش نشان دادند.

واکنش RT-PCR نیمه کمی: جهت بررسی و مقایسه بیان ژن‌های سوکروز فسفات سنتاز، سوکروز سنتاز و اینورتاز در گیاهان تراریخته و شاهد از واکنش RT-PCR نیمه کمی (Semi-quantitative RT-PCR) استفاده شد. واکنش Semi-quantitative RT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۴ میکرولیتر cDNA با غلظت ۱۰ ng، مقدار ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی هر ژن با غلظت ۱۰ pmol/μL و ۰/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰۰ mM، مقدار ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA polymerase با غلظت ۵U/μL، مقدار ۳/۲ بافر و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. شرایط چرخه‌ی حرارتی شامل واسرشت سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود که متعاقب آن تعداد ۳۰ چرخه، شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای مناسب T_a هر جفت از آغازگرها (جدول ۱) و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد بسته به طول قطعه از ۳۰ ثانیه برای ژنهای *Sai*، *Sps*، *Susy* و *Actin* تا یک دقیقه برای ژن‌های *Inv* و *Sai* صورت گرفت. در نهایت، یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. چرخه‌های تکثیر برای هر ژن از پیش بهینه سازی شدند تا اطمینان حاصل شود که واکنش‌ها به اندازه کافی برای مقایسه‌های کمی مناسب هستند. در این آزمایش از ژن کنترل داخلی *Actin* استفاده شد. در نهایت محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و پس از آن در زیر نور UV توسط دستگاه ژل‌داک عکسبرداری شدند. سطوح بیان نسبی هر ژن



شکل ۱- آنالیز RT-PCR نیمه کمی گیاهان تراریخته (B9، B11 و B38) و شاهد نیشکر (UT) برای ژن‌های (A) سوکروز فسفات سنتاز (*Sps*)؛ (B) سوکروز سنتاز (*Susy*)؛ (C) اینورتاز (*Inv*) و (D) سولوبل اسید اینورتاز (*Sai*)؛ L: برگ؛ S: ساقه. از ژن داخلی اکٲین (*Actin*) به عنوان ژن کنترل داخلی برای مقایسه میزان بیان ژن‌ها استفاده شد

Figure 1. Semi-quantitative RT-PCR analysis of transgenic (B9, B11, and B38) and the sugarcane control (UT) plants for sucrose metabolism genes: (A) Sucrose phosphate synthase (*Sps*), (B) Sucrose synthase (*Susy*), (C) Invertase (*Inv*), and (D) Soluble acid invertase (*Sai*). L: Leaf, S: Stem. The Actin gene was used as an internal control to compare gene expression levels

می‌شوند تا هومئوستازی (تعادل پایدار) سلولی را حفظ کرده و جریان کربن مختل شده را متوازن سازند (Mehdi *et al.*, 2024). تخصیص مکانی و وابسته به مراحل نمو گیاه ذخایر ساکارز در نیشکر به طور دقیق توسط الگوهای بیان متفاوت ژن‌های *Sps*، *Susy* و اینورتازهای مختلف میان بافت‌های برگ و ساقه در جریان رشد و نمو گیاه تغییر می‌کند. در مزوفیل برگ‌های کاملاً توسعه یافته، تخصیص کربن توسط فعالیت رونویسی بالای ژن *Sps* هدایت می‌شود که به عنوان موتور اصلی بیوسنتز اولیه ساکارز، مستقیماً با نرخ تثبیت فتوسنتزی C4 مرتبط است (Chandra *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2019). در مقابل، بیان آنزیم‌های اصلی تجزیه کننده ساکارز یعنی سولوبل اسید اینورتاز در برگ‌های بالغ به شدت پائین باقی می‌ماند تا از تخریب بیهوده مواد فتوسنتزی تازه سنتز شده پیش از بارگیری در بافت آبکش جلوگیری شود (Verma *et al.*, 2019).

با انتقال به ساقه، رونویسی این قبیل ژن‌ها دچار تغییری بنیادین می‌شود که با بلوغ میان‌گره‌ها بیشتر دچار تغییر می‌شود. در میان‌گره‌های بالایی نابالغ که به سرعت در حال طویل شدن هستند، بیان ژن *Sps* و *Sai* به شدت افزایش می‌یابد. به طوری که در ساقه، ژن *Sai* فعالیت آنزیمی بالایی را در آپوپلاست و واکوئل حفظ می‌کند تا غلظت‌های داخلی ساکارز را کاهش دهد و از این طریق، یک شیب اسمزی ایجاد کند که موجب ورود آب به درون سلول شود، در حالی که آنزیم *Susy* ساکارز را می‌شکند تا پیش‌سازهای UDP-گلوز را برای بیوسنتز دیواره سلولی فراهم آورد (Rae *et al.*, 2005). در بافت‌های ساقه بالغ،

بر اساس شواهد آزمایشگاهی، بیان اکٲوپیک یک ترانس ژن بیگانه مانند ژن موتان سوکروز باکتریایی بیان شده در لاین‌های تراریخت مطالعه حاضر که از ساکارز به عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند، تعادل منابع کربن درون سلول‌های گیاه میزبان را به طور بنیادین تغییر می‌دهد. چنین ترانس ژن‌هایی به جای عمل به عنوان یک ژن جدید و بیگانه، یک مخزن (sink) متابولیکی مصنوعی برای خود اختصاص می‌دهند که به طور مستقیم با مسیرهای اصلی ذخیره سازی و مصرف کربن گیاه به رقابت می‌پردازد. مصرف مداوم ساکارز توسط این آنزیم‌های بیگانه، توازن پایدار ذخیره کربوهیدرات‌ها را مختل کرده و مکانیسم‌های بازخورد پیچیده‌ای را از طریق شبکه‌های سیستمیک پیام‌رسانی قند تحریک می‌کند. در گونه‌های با میزان ساکارز بالا مانند نیشکر، تجمع ساکارز به طور دقیق توسط یک شبکه ارتباطی پیچیده میان منبع و مخزن (source-sink) کنترل می‌شود؛ جایی که غلظت ساکارز در ساقه (مخزن) به عنوان سیگنال تعیین کننده کارایی فتوسنتز برگ‌ها (منبع) وارد عمل می‌شود (Verma *et al.*, 2019). هنگامی که ژن بیگانه پیوسته ذخایر موقت ساکارز را مصرف می‌کند، این موضوع توسط گیاه به عنوان یک تقاضای فزاینده از سوی مخزن در نظر گرفته شده و یک نوسان در رونویسی آنزیم‌های متابولیکی کلیدی درگیر در متابولیسم ساکارز ایجاد می‌کند. در نتیجه، ژن‌های اصلی مانند سوکروز سنتاز (*Susy*)، سوکروز فسفات سنتاز (*Sps*) و ایزوزیم‌های مختلف از جمله اینورتازها دچار تغییرات تنظیمی شدیدی

نیز به همان نسبت کاهش یافت (Bauer et al., 2012). نتایج حاصله از تحقیق حاضر نشان داد که بیان این ژن‌ها در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد به‌جز برای ژن سوکروز سستاز تغییرات نشان داد. اگر چه در یک مطالعه مشخص شد که افزایش بیان ژن *Sps* در نیشکر منجر به افزایش بیان ژن *Sai* می‌شود (Anur et al., 2020)، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش بیان ژن *Sps* با افزایش بیان ژن *Sai* همراه نبود.

به‌طور خلاصه، هدف از این مطالعه پاسخ به این سوال بود که بیان ژن موتان سوکروز باکتریایی در لاین‌های تراریخت نیشکر چه تأثیری روی بیان ژن‌های درگیر در تجمع ساکارز نیشکر می‌گذارند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌ها درگیر در بیوسنتز و متابولیسم ساکارز در نیشکر، نسبت به گیاهان شاهد به‌جز ژن سوکروز سستاز تغییر کرد که این موضوع احتمالاً نشان‌دهنده این حقیقت است که بیان این ژن‌ها در سوخت‌وساز ساکارز دخیل هستند. در بین لاین‌های تراریخته لاین B38 نسبت به لاین‌های تراریخت B11 و B9 بیشترین تغییرات را در بیان هر سه ژن نشان داد؛ با این حال به‌نظر می‌رسد که بیان ژن سوکروز فسفات سستاز تا حدودی در لاین B38 نسبت به دو لاین دیگر بالاتر بود؛ بنابراین برای ادامه برنامه‌های به‌نژادی می‌توان از این لاین برای تولید پلیمر زیستی موتان در آینده استفاده کرد. تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت قلمه نسبت به برگ بیشتر بود. این موضوع دور از ذهن نبود زیرا ساکارز عمدتاً در بافت قلمه تجمع بیشتری دارد و فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز ساکارز در سلول‌های قلمه نسبت به سلول‌های بافت برگ بیشتر است.

به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که انتقال ژن برای تولید پلیمرهای زیستی ارزشمند با کاربردهای صنعتی و دارویی در گیاهان قندی مانند نیشکر و چغندر قند موفقیت‌آمیز است. با این حال، پژوهش‌های بیشتری لازم است تا فرآیندهای انتقال ژن، آنالیز گیاهان تراریخت و کارایی کشت بافت و تراریزش در گیاه تک‌لپه‌ای نیشکر بهینه‌سازی شود.

رونویسی ژن *Sai* به‌شدت کاهش یافته یا به‌طور کامل خاموش می‌شود تا تجمع بدون وقفه ساکارز در واکوئل میسر گردد (McCormick et al., 2009; Verma et al., 2019).

به‌طور کلی تحلیل بیان ژن‌ها نشان داد که بیان ژن‌های سه‌گانه در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد افزایش نشان دادند، با این حال با توجه به ماهیت RT-PCR نیمه‌کمی، امکان مقایسه دقیق‌تر همانند روش مقایسه‌ای ریل‌تایم میسر نشد. با این حال، می‌توان چنین استنباط کرد که در لاین‌های تراریخته افزایش بیان ژن‌های *Susy* و *Sps* سبب افزایش تولید ساکارز به‌عنوان پیش‌ماده تولید پلیمر موتان شد. برای مثال در یک پژوهش مشخص شد که بیان بالای ژن *SPs* در نیشکر سبب افزایش میزان ساکارز گردید (Anur et al., 2020). در تائید نتایج این مطالعه احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2018) نشان دادند که در لاین‌های تراریخت، میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد کاهش نشان داد که بیشترین کاهش مربوط به قند ساکارز بود. از آنجایی که این ژن‌ها از مهم‌ترین ژن‌ها در مسیر ساخت و سنتز ساکارز هستند، می‌توان نتیجه گرفت که از ساکارز نیشکر برای ساخت پلیمر موتان استفاده شده است، هر چند قندهای دیگر مانند گلوکز و فروکتوز هم ممکن است مشارکت داشته باشند. در همین راستا، نظریان فیروزآبادی و همکاران (Nazarian-Firouzabadi et al., 2019) ژن کدکننده آنزیم آلتران سوکروز (*Asr*) از ژنوم باکتری *Leuconostoc mesenterioide* را به گیاه چغندر قند منتقل کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان ساکارز در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد کمتر بود. این پژوهشگران نتیجه گرفتند که گیاهان تراریخت دارای ژن کدکننده آلتران سوکروز، ساکارز بیشتری را صرف تولید پلیمر زیستی آلتران کرده‌اند (Nazarian-Firouzabadi et al., 2019). همچنین در مطالعه دیگری، انتقال ژن‌های کدکننده ریوتران سوکروز و لوان سواکراز به گیاه نیشکر، سبب کاهش معنی‌دار محتوای ساکارز قلمه‌ها به تقریباً دو سوم گیاه شاهد گردید. با کاهش میزان قند ساکارز، میانگین بریکس

References

- Ahmadi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A., Bajelan, B. and Karboune, S. (2018). Production of microbial mutan polysaccharide by expression of a mutansucrase gene (gtfI) in sugarcane. *Molecular Breeding*, 38: 1-11.
<https://doi.org/10.1007/s11032-018-0881-3>
- Anur, R.M., Mufithah, N., Sawitri, W.D., Sakakibara, H. and Sugiharto, B. (2020). Overexpression of sucrose phosphate synthase enhanced sucrose content and biomass production in transgenic sugarcane. *Plants*, 9: 200.
<https://doi.org/10.3390/plants9020200>
- Bauer, R., Basson, C.E., Bekker, J., Eduardo, I., Rohwer, J.M., Uys, L., van Wyk, J.H. and Kossmann, J. (2012). Reuteran and levan as carbohydrate sinks in transgenic sugarcane. *Planta*, 236: 1803-1815.
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1731-x>

- Chandra, A., Jain, R. and Solomon, S. (2012). Complexities of invertases controlling sucrose accumulation and retention in sugarcane. *Current Science*: 857-866.
- De Almeida, M.A. and Colombo, R. (2023). Production chain of first-generation sugarcane bioethanol: characterization and value-added application of wastes. *BioEnergy Research*, 16: 924-939.
<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10301-4>
- FAO (2024) Food and agriculture organization corporate statistical database (FAOSTAT) in, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome,
- Gerrits, N., Turk, S.C., van Dun, K.P., Hulleman, S.H., Visser, R.G., Weisbeek, P.J. and Smeekens, S.C. (2001). Sucrose metabolism in plastids. *Plant Physiology*, 125: 926-934.
<https://doi.org/10.1104/pp.125.2.926>
- Kok-Jacon, G. (2005) Expression of different glucansucrases in potato tubers: implications for starch biosynthesis, Wageningen University and Research.
- Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.-P., Suurs, L.C., Wang, D., Liu, S. and Visser, R.G. (2005). Production of dextran in transgenic potato plants. *Transgenic Research*, 14: 385-395.
<https://doi.org/10.1007/s11248-005-0439-0>
- Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.P., Suurs, L.C. and Visser, R.G. (2005). Mutan produced in potato amyloplasts adheres to starch granules. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 341-351.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00128.x>
- McCormick, A., Watt, D. and Cramer, M. (2009). Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany*, 60: 357-364.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern310>
- Mehdi, F., Galani, S., Wickramasinghe, K.P., Zhao, P., Lu, X., Lin, X., Xu, C., Liu, H., Li, X. and Liu, X. (2024). Current perspectives on the regulatory mechanisms of sucrose accumulation in sugarcane. *Heliyon*, 10.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27277>
- Meng, X., Pijning, T., Tietema, M., Dobruchowska, J.M., Yin, H., Gerwig, G.J., Kralj, S. and Dijkhuizen, L. (2017). Characterization of the glucansucrase GTF180 W1065 mutant enzymes producing polysaccharides and oligosaccharides with altered linkage composition. *Food Chemistry*, 217: 81-90.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.087>
- Molina, M., Cioci, G., Moulis, C., Séverac, E. and Remaud-Siméon, M. (2021). Bacterial α -glucan and branching sucrases from GH70 family: discovery, structure-function relationship studies and engineering. *Microorganisms*, 9: 1607.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081607>
- Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and Goodarzii, D. (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 (In Persian).
<https://doi.org/10.22103/jab.2020.2526>
- Nazarian Firouzabadi, F., Kok-Jacon, G.A., Vincken, J.-P., Ji, Q., Suurs, L.C. and Visser, R.G. (2007). Fusion proteins comprising the catalytic domain of mutansucrase and a starch-binding domain can alter the morphology of amylose-free potato starch granules during biosynthesis. *Transgenic Research*, 16: 645-656.
<https://doi.org/10.1007/s11248-006-9053-z>
- Rae, A.L., Grof, C.P., Casu, R.E. and Bonnett, G.D. (2005). Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crops Research*, 92: 159-168.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.027>
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J. and Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion In Plant Biology*, 13: 27.287-3.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>
- Souri, A., Mirzaie-asl, A., Khodaei, L. and Abdollahi, M. R. (2020). Comparison of Promoter Sequences of Flowering Control Genes, FT1 and Three Versions of VIN3, in Susceptible and Resistant Sugar Beet Genotypes to Bolting. *Plant Genetic Research*, 6(2), 21-32 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.6.2.21>
- Van Der Meer, I.M., Ebskamp, M.J., Visser, R.G., Weisbeek, P.J. and Smeekens, S.C. (1994). Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *The Plant Cell*, 6: 561-570.
<https://doi.org/10.1105/tpc.6.4.561>
- Verma, I., Roopendra, K., Sharma, A., Chandra, A. and Kamal, A. (2019). Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation and its effect on source-sink relationship in high sucrose accumulating early maturing sugarcane variety. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25: 207-220.
<https://doi.org/10.1007/s12298-018-0627-z>
- Wang, B., Sun, X., Xu, M., Wang, F., Liu, W. and Wu, B. (2023). Structural characterization and partial properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* RSG7 from pepino. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1108120.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1108120>
- Zakerghoran, B., Rajabi Memari, H., Nabati Ahmadi, D. and Siahmard, M. (2025). Cloning, transformation and stable expression of a fusion of human interferon gamma and bar genes in tobacco plant (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi). *Plant Genetic Research*, 1(1), 27-36 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.1.1.27>