การแสดงออกของยีน antisense *LIM* ในยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส ที่ได้รับการถ่ายยีน

Expression of Antisense *LIM* Gene in Transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh

สุบิน หินจันทร์ [1,4], สนธิชัย จันทร์เปรม [1,3,4] และเสริมศิริ จันทร์เปรม [1,2,4]
Subin Hinjan[1,4], Sontichai Chanprame [1,3,4] and Sermsiri Chanprame[1, 2,4]

Abstract

To determine the effects of *LIM* gene on lignin biosynthesis in *Eucalyptus camaldulensis*, partial *LIM* gene isolated from *E. camaldulensis* was constructed in an antisense orientation into binary vector pCAMBIA1301 carrying hygromycin (*hpt*) resistant gene. The recombinant plasmid was transformed to elite clone of *E. camaldulensis via Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The integration of antisense *LIM* transgene in putative transgenic line was confirmed by PCR analysis. Eight selected transgenic lines were grown in1 m diameter x 1 m height cement tube in a bio-safety greenhouse. After six months, transgenic lines had slightly better growth than wild type and no visible abnormal phenotype. The expression of endogenous *LIM* gene was evaluated by real-time PCR with xylem RNA of 1-year-old transgenic lines. The results showed that *LIM* expression in transgenic eucalyptus lines were significantly reduced to 0.07-0.2 % comparing to *LIM* expression of the wild type. However, total lignin content in transgenic lines was not different from the wild type as determined by NIR.

Keyword; Eucalyptus, genetic transformation, lignin, *LIM* gene

1 ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 และ
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สบว. สกอ.
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (Ag-BIO/PERDO-CHE), Thailand.

2 ภาควิชาพืชสวน และ 3 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
Department of Horticulture, 3 Department of Agronomy, Faculty of Agricultural at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

4 ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพฯ 10900
Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart university Institute for Advanced Studies (CASAF,NRU-KU), Bangkok 10900 Thailand

รับเรื่อง : พฤศจิกายน 2553

* Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th, sermsiri.c@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้โคลนบางส่วนของยีน *LIM* จากยูคาลิปตัส และถ่ายยีนแบบ antisense เข้าสู่ยูคาลิปตัสสายต้นที่ใช้เป็นการค้า เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการสังเคราะห์ลิกนินในยูคาลิปตัส โดยการถ่ายยีนนี้ใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีเวคเตอร์ pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน antisense *LIM* และมียีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hpt*) เป็นยีนคัดเลือก การตรวจสอบโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถยืนยันว่ายูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนที่คัดเลือกไว้จำนวน 8 สายต้น เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งเมื่อนำไปปลูกในโรงเรือน bio-safety พบว่าความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางของยูคาลิปตัสอายุ 6 เดือน ดีกว่าต้นปกติเล็กน้อย และไม่ปรากฏอาการผิดปกติทางสรีระ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIM* ในบริเวณ ไซเลมของลำต้นอายุ 1 ปี โดยเทคนิค real time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *LIM* ที่มีอยู่ตามธรรมชาติลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.07-0.2 ของต้นปกติที่ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกนินในเนื้อไม้อายุ 1 ปี ด้วยเครื่อง NIR พบว่าปริมาณลิกนินทั้งหมดไม่แตกต่างจากต้นปกติ

คำนำ

ผนังเซลล์ของพืชประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เซลลูโลสสร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้กับพืช และเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมสันใย และเยื่อกระดาษ (Stephens and Halpin, 2007) ในไม้เนื้อแข็งประกอบด้วยเซลลูโลสประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ลิกนินเป็นสารโพลิเมอร์ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ของท่อลำเลียงในพืชชั้นสูง ซึ่งพบมากเป็นอันดับสองในองค์ประกอบของเนื้อไม้รองจากเซลลูโลส โดยคิดเป็นปริมาณร้อยละ 20 – 30 ของน้ำหนักแห้ง ลิกนินทำให้เกิดการลำเลียงน้ำและธาตุอาหารผ่านทางท่อลำเลียง และช่วยป้องกันการเข้าทำลายของโรคและแมลงให้กับพืช (Haggman *et al*, 2006)

ในการผลิตเยื่อกระดาษ ลิกนินจะต้องถูกแยกออกจากเส้นใยเซลลูโลสด้วยสารเคมีที่อันตรายและใช้พลังงานสูง ซึ่งถือว่าเป็นค่าใช้จ่ายที่สำคัญทั้งในส่วนของโรงงานและสิ่งแวดล้อม การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อลดหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิกนินกำลังได้รับความสนใจการศึกษา เพื่อปรับปรุงเนื้อไม้ให้เหมาะสมกับการเป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ (Boerjan, 2003)

transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนินได้ถูกค้นพบและศึกษา (Roger and Campbell, 2004, Goicoechane *et al*., 2005) และหนึ่งในจำนวนนั้นก็คือ *Ntlim1* ที่แสดงออกในยาสูบซึ่งสามารถจับกับตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีลำดับดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะที่เรียกว่า PAL Box ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน จากการถ่ายยีนแบบ antisense ของ *Ntlim1* เข้าสู่ยาสูบ พบว่าสามารถลดการแสดงออกของยีนหลายยีนซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ลิกนิน ได้แก่ *PAL, 4CL* และ *CAD* และมีปริมาณลิกนินลดลง โดยไม่เกิดความผิดปกติทางสรีระ (Kawaoka *et al*., 2000) และต่อมานักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ (Kawaoka *et al*., 2006) ได้รายงานผลการถ่ายยีน *Ntlim1* แบบ antisense เข้าสู่ *E. camaldulensis* พบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนินลดลง เช่น *PAL CAD* และ *C3H* และมีปริมาณลิกนินลดลง

LIM โปรตีนได้รับการตั้งชื่อโดยนำอักษรตัวแรกของกลุ่มโปรตีนสามชนิดที่ได้มีการค้นพบก่อนหน้านี้ คือ LIN11 จาก *Caenorhabditis elegans*, ISL-1 จากหนู (rat) และ MEC-3 จาก *C. elegans* (Cristain *et al*., 2003) โดยใน *Arabodopsis* มีรายงานว่าพบยีนนี้จำนวน 6 ยีน (Rider *et al*., 2003) ใน *Poplar trichocarpa* พบยีนนี้จำนวน 12 ยีน (Arnaud *et al*., 2007) โดยมีการแสดงออกในหลายบริเวณเช่น ผนังเซลล์ pollen และ cytoskeleton เป็นต้น (Thomas *et al*., 2006) แสดงให้เห็นว่า LIM โปรตีนทำหน้าที่หลายประการในพืช

ยูคาลิปตัส เป็นไม้ยืนต้นที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย และเนื้อไม้ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใย และเยื่อกระดาษ การพัฒนาการถ่ายยีนในยูคาลิปตัส เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะสามารถปรับปรุงคุณภาพของยูคาลิปตัสที่เหมาะสมต่อการใช้งานในอุตสาหกรรม มากขึ้น (Ho *et al*., 1998) ในงานวิจัยนี้ ได้โคลนยีน *LIM* จากยูคาลิปตัส (*E. camaldulensis*) และทำการถ่ายยีนแบบ antisense เข้าสู่ยูคาลิปตัสสายต้นการค้าที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน ตรวจวัดการเจริญเติบโตของต้นไม้ที่ปลูกในโรงเรือน bio-safety และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIM* ในเนื้อเยื่อไซเลม โดยวิธี real time PCR และตรวจสอบปริมาณลิกนินทั้งหมดด้วยเครื่อง NIR

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัสเพื่อใช้สำหรับถ่ายยีน

ฟอกฆ่าเชื้อยอดอ่อนจากต้นกล้ายูคาลิปตัสสายต้นการค้า H1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) ดัดแปลงที่เติม benzyladenine (BA) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin (Kn) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร , น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร, ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อให้เท่ากับ 5.80 ให้แสงความเข้มแสง 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 20 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนอาหารใหม่โดยใช้สูตรอาหารเดิมทุก 4 สัปดาห์ เพื่อขยายจำนวนให้เพียงพอ

การโคลนยีน *LIM* จากยูคาลิปตัสและสร้างพลาสมิดสายผสมสำหรับถ่ายยีน

สกัด RNA จากใบอ่อนยูคาลิปตัสโดยใช้วิธีการตามรายงานของ Casic *et al*. (2004) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Reverse transcriptase (Qiagen) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการโคลนยีน โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *LIM* คือ forward 5’ GGTAACCCAGGAACAACCCAGAAG 3’ และ reverse 5’ CATGCCATGGCATGTATGATTCAGGAGCCATTGTT 3’ โดยออกแบบจากฐานข้อมูลที่รายงานใน Genbank หมายเลข AB208712 โดยไพรเมอร์มีจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bat*EII และ *Nco*I เพื่อใช้กำหนดทิศทางการวางตัวแบบ antisense หลังจากนั้นบรรจุผลผลิตของพีซีอาร์เข้าสู่โคลนนิ่งเวคเตอร์ pGEM -T easy ® แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นตัดต่อยีน *LIM* เข้าในเวคเตอร์ pCAMBIA1301 โดยแทนที่ยีน *gus* โดยมียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก พลาสมิดสายผสมถูกถ่ายเข้าสู่เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

การถ่ายยีนเข้าสู่ยูคาลิปตัส

ตัดใบยูคาลิปตัสจากยอดที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสูตรอาหารดัดแปลง MS6 ที่เจริญเติบโตเต็มที่ใบที่ 3-7 โดยใช้เฉพาะส่วนโคนใบที่มีก้านใบติดมาด้วย นำไปแช่ในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefacienes* ที่มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.8-1.0 นาน 2 ชั่วโมง นำมาซับด้วยกระดาษซับที่ปลอดเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นนำใบไปเลี้ยงร่วม (co-cultivate) บนอาหารสูตร WPM เติม NAA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร, BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ casein enzyme hydrolyze 1 กรัมต่อลิตร และเติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B5 ดัดแปลงที่เติม NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร, N' -(2-chloro-4-pyridyl)-N' -phenyl-urea (4PU) 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygromycin 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียพร้อมกับคัดเลือกและชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 6 เดือน หลังจากนั้นตัดยอดที่สมบูรณ์มาชักนำให้ออกรากบนอาหารสูตร MS6 ที่เติม NAA 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อยอดมีรากที่สมบูรณ์แล้วนำยอดไปย้ายชำในโรงเรือน bio-safety

การตรวจสอบยูคาลิปตัสที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนโดย PCR

สกัดแยกจีโนมิคดีเอ็นเอจากใบอ่อนยูคาลิปตัส ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนตามวิธีการ CTAB method (Roger and Bendich, 1994) นำดีเอ็นเอทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และยีนเป้าหมาย *LIM* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *hpt* คือ forward 5'GCCCTCGGACGAGTGCTG3' และ reverse 5'-CGACAGCGTCTCCGACCT G3' และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *LIM* คือ forward 5' CATGGCATGTAT GATTCAGGAGC 3' และ reverse 5' TTCTGGGTT GTTCCTGGGTTAC 3' ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซ็นต์

การปลูกทดสอบยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน

นำยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR แล้วไปย้ายปลูกในโรงเรือน bio-safety และคัดเลือกต้นที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน *hpt* และ *LIM* จำนวน 8 สายต้นที่มีการเจริญเติบโตดี ไปปลูกในท่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร สูง 1 เมตร ในโรงเรือน bio-safety เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ตรวจวัดการเจริญเติบโต และ ตรวจสอบคุณสมบัติของเนื้อไม้เมื่ออายุ 1 ปี

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIM* โดย Real time PCR

สกัด RNA จากเนื้อเยื่อ ไซเลม ของลำต้นยูคาลิปตัสอายุ 1 ปี ตามวิธีการของ Casic *et al*., (2004) แล้วสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcriptase โดยใช้ oligo dT primer แล้วนำ cDNA ไปทำปฏิกิริยา real time PCR (KAPA SYBR® FAST qPCR Kits) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบ relative expression โดยใช้ยีน *TuberlinA* (*TubA*) เป็น housekeeping gene และเปรียบเทียบกับยูคาลิปตัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *TubA* คือ forward 5'CGGATTCAAGTGCGGTATCA 3' reverse 5' AAT ACTCGTCACCCTCATCAT 3' และไพรเมอร์ที่จะเพาะกับยีน *LIM* คือ forward 5' CTGGGTTGTTCCTGG GTTAC 3' reverse ' 5'GCTCCTGAATCATACATGC CAT 3' โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยาตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Mastercycle ep® realplex, Smart cycle สามช่วงคือ ช่วงที่หนึ่ง enzyme activation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ช่วงที่สองจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 20 วินาทีและ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที โดยวัดการการเปล่งแสงของสี syber green ที่ระยะการ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ช่วงสุดท้าย และตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำ melting curve analysis

การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินในเนื้อไม้

การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินทั้งหมด ในเนื้อไม้วิเคราะห์จากต้นยูคาลิปปตัสอายุ 1 ปี ที่ปลูกในท่อซีเมนต์ในโรงเรือน bio-safety โดยตัดไม้ให้เป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปบดให้เป็นผงไม้โดยใช้เครื่องบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงเพื่อคัดเอาผงไม้ที่มีขนาด 40-60 เมซ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 2 วัน แล้วเก็บในถุงพลาสติกเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณลิกนิน โดยใช้เครื่อง Near Infrared Spectroscopy (NIR) ซึ่งดำเนินการโดยศูนย์พัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยี บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) โดยใช้วิธีการและสมการที่ใช้ในการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Nuttaporn (2006)

ผลและวิจารณ์

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และ ยีน *LIM* ในต้นยูคาลิปตัส

ผลสำเร็จของการถ่ายยีนเข้าสู่ยูคาลิปตัส ในการศึกษาครั้งนี้คือร้อยละ 0.013 ซึ่งถือว่าต่ำ เนื่องจากยูคาลิปตัสเป็นพืชที่ถ่ายยีนยาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Labate *et al.* (2009) และการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืชที่มีอายุมากจะยากกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนพืชที่อายุน้อย Nehra *et al.* (2005) การถ่ายยีนในครั้งนี้ใช้ชิ้นส่วนที่อายุ

มากจึงทำให้อัตราความสำเร็จในการถ่ายยีนต่ำ

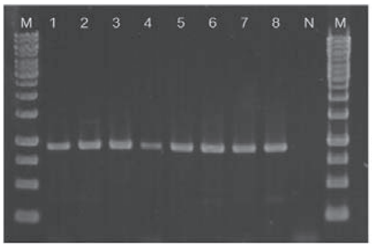
เมื่อตรวจสอบหายีนคัดเลือกและยีนเป้าหมาย ในสายต้นที่คัดเลือกไว้จำนวน 8 สายต้น ด้วยวิธี PCR พบว่า ยูคาลิปตัสทั้งหมด ปรากฏแถบของดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายทั้งสองยีน คือยีน *hpt* ขนาดประมาณ 800 bp และ antisense *LIM* ขนาดประมาณ 580 bp แสดงว่าการส่งถ่ายยีนเข้าสู่จีโนมของยูคาลิปตัสเป็นไปอย่างสมบูรณ์ไม่มีลักษณะที่ถ่ายเข้าไปได้เพียงบางส่วน และการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะ hygromycin ควาเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนได้

การรอดตายของกล้าไม้ยูคาลิปตัสหลังการย้ายปลูก

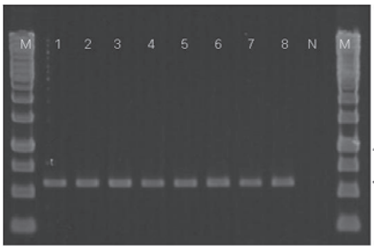
เมื่อนำยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน ไปย้ายปลูกทั้งสิ้น 3 ครั้ง รวมทั้งหมด 121 ต้น โดยในครั้งแรกย้ายปลูกจำนวน 40 ต้น ครั้งที่ 2 จำนวน 50 ต้น และครั้งที่ 3 จำนวน 31 ต้น พบว่าในทุกครั้งที่ทำการย้ายปลูก ต้นกล้าสามารถรอดตายได้ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าปกติในสายต้นเดียวกันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งมีอัตราการรอดตายร้อยละ 20-60 โดยการตายของกล้าไม้ในระยะแรกของการย้ายปลูกนี้เกิดจากการเข้าทำลายของโรคพืช ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุคือ *Cylindrocladium scoparium* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งทำให้เกิดการเน่าของรากและลำต้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าว่าการลดการแสดงออกของยีน *LIM* ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายีนแบบ antisense ในงานวิจัยนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณของสารต่าง ๆ ในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน แล้วช่วยส่งเสริมให้ยูคาลิปตัสทนทานต่อโรครากและลำต้นเน่าได้ดีขึ้น

การเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส

จากการวัดการเจริญเติบโตทั้งด้านความสูง และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโคนต้น พบว่ายูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนใน 8 สายต้นที่คัดเลือกไว้ มีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นปกติเล็กน้อย (ภาพที่ 4) ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kawaoka *et al*. (2000) ที่รายงานว่าการลดการแสดงออกของยีน *Ntlim* ในยาสูบทำให้ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตทางความสูงดีกว่ายาสูบปกติเล็กน้อย และสอดคล้องกับรายงานของ Hu *et al*. (1999) ที่พบว่าการลดการแสดงออกของยีน *4CL* ใน *Poplar trichocarpa* สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตทั้งส่วนของลำต้น ปริมาณราก และขนาดของใบ ให้มากกว่าต้นปกติ โดยการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้น poplar ที่ได้รับการถ่ายยีนเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ โดยพบสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นของ galactan: arabinan สารประกอบคาร์โบไฮเครตเหล่านี้อาจช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ เนื่องจากสารเหล่านี้มีหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นโมเลกุลนำสัญญาณ และ เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต

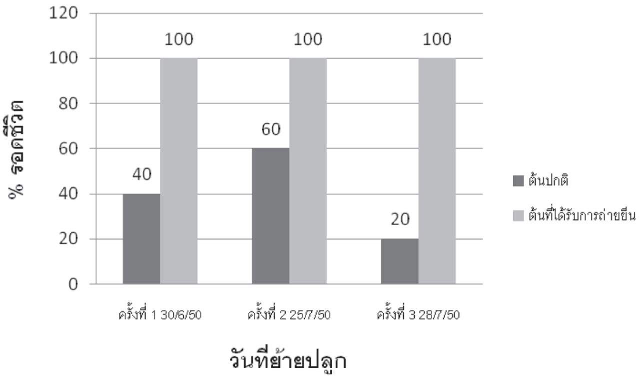


ก.

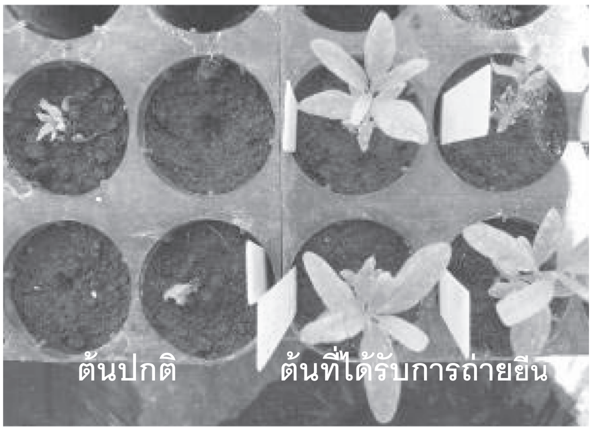


ข.

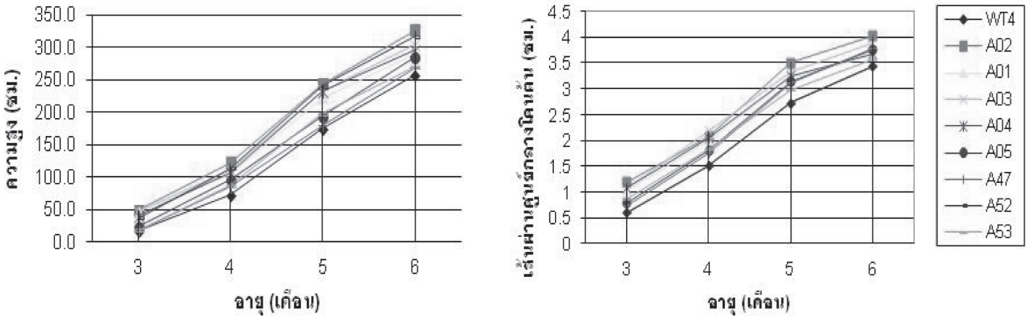
ภาพที่ 1 ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* (ก.) ขนาดประมาณ 800 bp และ antisense *LIM* (ข.) ขนาดประมาณ 580 bp เมื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder (Fermentas) 1-8 คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอจากยูคาลิปตัสที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ N คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอจากยูคาลิปตัสปกติ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ



ภาพที่ 2 การรอดชีวิตของต้นกล้ายูคาลิปตัสภายหลังการย้ายปลูกในโรงเรือน bio-safety



ภาพที่ 3 ต้นกล้าของยูคาลิปตัสปกติ และยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน อายุ 1 เดือนหลังการย้ายปลูกในโรงเรือน bio-fasety



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ H1 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *LIM* (A01-53) และยูคาลิปตัสปกติ (WT4) ช่วงอายุ 3-6 เดือนที่ปลูกในโรงเรือน bio-safety

การแสดงออกของยีน *LIM* ในเซลล์ xylem บริเวณลำต้น

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *LIM* โดยวิธี real time PCR เซลล์ไซเลมของลำต้นของยูคาลิปตัสที่ปลูกในโรงเรือนชีวภาพนิรภัยอายุ 1 ปี ด้วยการเปรียบเทียบแบบ relative expression กับยูคาลิปตัสปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่อายุเท่ากันและปลูกในโรงเรือนเดียวกัน พบว่ายูคาลิปตัสที่ถ่ายยีนทั้งหมดทั้ง 8 สายต้นมี

การแสดงออกของยีน *LIM* ตามธรรมชาติเพียงร้อยละ 0.07-0.2 เมื่อเปรียบเทียบสายต้นปกติซึ่งการแสดงออกของยีน *LIM* เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) แสดงว่าการถ่ายบางส่วนของยีน *LIM* แบบ antisense เพื่อลดการแสดงออกของยีน *LIM* ที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโต ที่พบว่ามีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นปกติเล็กน้อย และไม่มีความผิดปกติทางสรีระใด ๆ ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แสดงให้เห็นว่าการลดการแสดงออกของยีน *LIM* ในยูคาลิปตัสในงานวิจัยนี้ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสรีระของยูคาลิปตัส

การแสดงออกของยีน LIM ต่อการเปลี่ยนแปลงลิกนิน

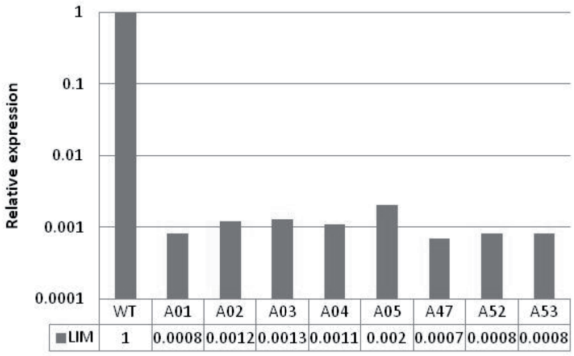
ผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกนินทั้งหมด ในเนื้อไม้อายุ 1 ปี ด้วยเครื่อง NIR พบว่า ปริมาณลิกนินทั้งหมดไม่แตกต่างจากต้นปกติ (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดปริมาณลิกนิน ด้วยการวัดปริมาณลิกนินทั้งหมดนั้นไม่สามารถบอกความแตกต่างขององค์ประกอบ และชนิดของโมโนเมอร์ที่เข้าไปประกอบรวมกันเป็นลิกนินโพลิเมอร์ได้ การถ่ายยีนในบางครั้งไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณลิกนินทั้งหมดลดลง แต่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของลิกนิน เช่น จากรายงานของ Pilate *et al*., (2002) ที่ศึกษาการต้มเยื่อในต้น poplar ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense *CAD* อายุ 4 ปี พบว่าต้นที่ดัดแปลงพันธุกรรมมีปริมาณผลผลิตเยื่อสูงกว่า และมีการใช้สารเคมีในการต้มเยื่อต่ำกว่าต้นปกติ แต่ปริมาณลิกนินทั้งหมดไม่แตกต่างกัน แต่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารโมโนเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของลิกนิน ทำให้ต้มเยื่อได้ง่ายขึ้นโดยไม่มีผลต่อปริมาณลิกนิน (Ralph *et al*., 2001) และจากรายงานของ Doorssalaere *et al*., (1995) ที่ได้ถ่ายยีนเพื่อลดการแสดงออกของยีน *COMT* ใน polar แล้วพบว่าส่งผลให้สาร 5-hydroxyguaicyl สามารถเข้าไปร่วมสร้างเป็นลิกนินโพลิเมอร์ได้ ทำให้สัดส่วนของ syringyl ต่อ guiacyl ลิกนินและองค์ประกอบของลิกนินเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการศึกษาถึงสัดส่วนและองค์ประกอบของลิกนินจึงมีความสำคัญ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

สรุป

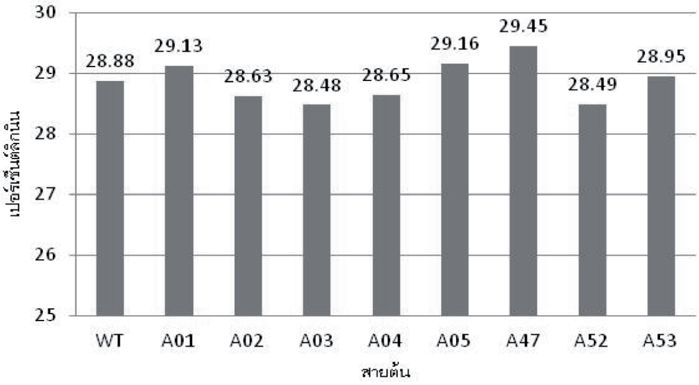
การถ่ายบางส่วนของยีน *LIM* ที่ได้จากยูคาลิปตัส (*E. camaldulensis*) เข้าสู่ยูคาลิปตัสสายต้นการค้า H1 โดยใช้เทคนิค antisense เมื่อตรวจสอบต้นที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี PCR พบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และยีน antisense *LIM* ในทุกสายต้นที่ศึกษา และเมื่อนำกล้าไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนไปย้ายปลูกในโรงเรือน bio-safety พบว่ายูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนมีการรอดตายสูงกว่าต้นปกติ ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIM* ในเซลล์ไซเลม ของลำต้นยูคาลิปตัสอายุ 1 ปี ด้วยเทคนิค real time PCR พบว่าการแสดงออกของยีนที่มีอยู่ตามธรรมชาติลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.07-0.2 เมื่อเปรียบเทียบกับยูคาลิปตัสปกติ แต่ผลการวิเคราะห์ปริมาณลิกนินรวมในเนื้อไม้อายุ 1 ปี ด้วยเครื่อง NIR พบว่าปริมาณลิกนินรวมไม่แตกต่างจากต้นปกติ สำหรับการเจริญเติบโตของต้นยูคาลิปตัสที่ปลูกในโรงเรือนชีวภาพนิรภัยอายุ 6 เดือน พบว่าต้นยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นปกติเล็กน้อยทั้งด้านความสูงและเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโคนต้นและไม่ปรากฏอาการผิดปกติทางสรีระ

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ซึ่งสนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และ การจ้างบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ซึ่งทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี คือ ศูนย์พัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยี บริษัท เอสซีจีเปเปอร์ จำกัด (มหาชน) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร / ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Ag-BIO/PERDO-CHE) และ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา



ภาพที่ 5 การแสดงออกของยีนแบบ relative expression ของยีน *LIM* ตรวจวัดด้วยเทคนิค real time PCR WT คือยูคาลิปตัสปกติ A01- A53 คือยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ลิกนินทั้งหมดในเนื้อไม้ยูคาลิปตัสอายุ 1 ปีด้วยเครื่อง NIR WT คือยูคาลิปตัสปกติ A01- A53 คือยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน

เอกสารอ้างอิง

Arnaud, D., A. Dejardin, J.C. Leple, M.C. Lesage-Descause and G. Pilate. 2007. Genome-wide analysis of *LIM* gene family in *Poplar trichocarpa*, *Arabodopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **DNA Research** 14: 103-116

Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. **Annual Review Plant Biol**. 54: 519-546.

Casic, K., A. Hernandez and S.S. Korban. 2004. RNA extraction from different tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter** 22: 437a- 437g

Christian, B., A.C. Bordel, H. Barthou, A. Jauneau , A. Steinmetz , G. Alibert and M. Petitprez. 2001. Is the LIM-domain protein HaWLIM1 associated with cortical microtubules in sunflower protoplasts ?. **Plant Cell Physiol**. 10: 1055-1063

Goicoechea, M., E. Lacombe, S. Legay, S. Mihaljevic, P. Rech, A. Juaneau, C. Lapierre., B. Pollet, D. Verhaegen, N. Chaubet-Gigot and J. Grima-Pettenati. 2005. EgMYB2, a new transcription activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. **Plant J.** 43: 553-567

Haggman, H., K. Niemi, H. Timonen, T. Ylioya and V. Chiang. 2006. Environmental aspects of lignin modification trees. pp. 105-122. *In* M. Fladung and D. Ewald, eds. **Tree Transgenesis**. Spriger-Verlag, Berlin.

Hu, W.J., S.A. Harding, J. Lung, J. Popko, J. Ralph, D.D.Stokke, C.J. Tsai and V.L. Chaing. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology** 17: 808- 812.

Ho, C.K., S.H. Chang, J.Y. Tsay, C.J. Tsai, V.L. Chiang and Z.Z. Chen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports** 17: 675–680.

Kawaoka, A. and E. Hiroyasu. 2001. Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. **Photochemistry** 57: 1149-1157.

Kawaoka, A., K. Nanto, K. Ishii and H. Ebinuma. 2006. Reduction of lignin content by suppression of expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. **Silvae Genetica** 55: 296-277

Kawaoka, A.,P. Kaothien, K. Yoshida, S. Endo, K. Yamada and H. Ebinuma. 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein *Ntlim1* involved in lignin biosynthesis, **Plant J.** 22: 289–301

Krisna, P. n.d. **Diseases of *Eucalyptus* in Thailand and options for reducing their impact**. Available source: http://www.dnp.go.th/foremic/fmo/fmoproject/IUFROnair.pdf, May 25, 2010.

Labate, C.A., T.F. Assis, S. Oda, J.M. Eduardo, E.R.González, E.A.V. Zauza, E.S. Mori, M.L.T. de Moraes, L.P.B. Cid, A.C. Alfenas, C. Foelkel, D.H. Moon, M.C. Carvalho, D.G.G. Caldas, R.T. Carneiro, A. de Andrade and G.R. Salvatierra. 2009. Eucalyptus. pp.35-108. *In* K. Chittaranjan and C.H. Timothy (eds). **Transgenic Forest Tree Species**, Vol 9. Available source: http:// mrw.interscience.wiley.com/emrw/9781405181099/home, May 2, 2010.

Nehra, N.S., M.R Becwar, W.H.Rottmann, L. Pearson, K. Chowdhury, S. Chang, W.H. Dayton, R. Kodrzycki, C. Zhang, K. Gause, D. Parks and M. Hinchee. 2005. Forest Biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. ***In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant** 41: 701–717.

Nuttaporn, S. 2006. Determination of chemical composition and Pulp yield of *Eucalyptus camaldulensis* Wood by Near Infrared Spectroscopy. M.S. Thesis, Kasetsart University. (in Thai)

Rider, S.D., J.T. Handerson, R.E. Jerome, H.J. Edenberg, J. Romero-Sevenson and J. Ogas. 2003. Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. **Plant J.** 35: 33-43

Roger, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. Pp. 1-8. *In* S.B. Gelvin and R.A. Schilperoort (eds). **Plant Molecular Biology Manual**. Kluwer Acadamic Publisher, Dordrect.

Roger, L. and M.M. Campbell. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist** 164:17-30

Stephen, J. and C. Halpin. 2007. Lignin manipulation for fiber improvement. pp 129-153 *In* P. Ranalli ed. **Improvement of Crop Plants for Industry End Uses**. Springer, Netherlands.

Thomas, C., C. Hoffmann, M. Dieterle, M. V. Troys, C. Ampe and A. Steinmetz. 2006. Tobacco WLIM1 is a novel F-actin binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling. **The Plant Cell** 18: 2194-2206.