การแสดงออกของยีน *FRO2* และผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส ในใบยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน

Expression of *FRO2* Gene in Transgenic *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and Its Effect on Ferric Chelate Reductase in Eucalyptus Leaves

สุบิน หินจันทร์ [1,4], สนธิชัย จันทร์เปรม [1,2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3 *]

Subin Hinjan[1], Sontichai Chanprame [1,2] and Sermsiri Chanprame[1, 3*]

Abstract

Investigation on the transgenic Eucalyptus camaldulesis transformed with FRO2 gene from Arabidopsis via Agrobacterium-mediated transformation was performed. The Agrobacterium tumefaciens strain EHA 105 possessed pCAMBIA 1301 and contained Fro2 and hpt gene under the control of 35SCaMV promoter was used for transformation. The existence of these 2 genes in all transgenic lines were confirmed by PCR with hpt and FRO2 specific primers. Eight weeks after culturing in calcareous mimic medium which was MS medium supplemented with 5 g/l $CaCO_3$ and adjusted pH to 9.00 prior to autoclave, the expression of FRO2 gene was investigated by real time PCR showing the increased in FRO2 expression. The ferric chelate reductase activity and chlorophyll content in leaves were also investigated. The results showed that ferric chelate reductase activity were not corresponded to the chlorophyll content. Cultured in calcareous mimic medium, transgenic and non-transgenic eucalyptus lines had similar leaf ferric chelate reductase activity, but higher than those cultured on normal medium. All transgenic lines demonstrated chlorophyll deficiency similar to the wild type, but the growth of transgenic lines were better than wild type when cultured in calcareous mimic medium.

Key words: calcareous soil, ferric chelate reductase, Eucalyptus, transformation,

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140 และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng- saen Campus/ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (Ag-Bio/PERDO-CHE)

[2] ภาควิชาพืชสวน และ [3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[2] Dept. of Horticulture and [3] Dept. of Agronomy, Faculty of Agricultural at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

[4] ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูง มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[4] Center of Advanced Studies for Agriculture and Food, KU Inst. of Advanced Studies (CASAF/NRU-KU), Bangkok 10900 Thailand.

รับเรื่อง : พฤศจิกายน 2553

* corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส *(Eucalyptus camaldulensis*) ที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีเวคเตอร์ pCAMBIA 1301 ซึ่งมียีน *FRO2* จาก *Arabidopsis thaliana* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และมียีนควบคุมลักษณะต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hpt*) เป็นยีนคัดเลือก พบการสอดแทรกของยีน *hpt* และ *FRO2* ในทุกต้น (lines) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR ภายหลังการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่จำลองสภาพดินเนื้อปูน คือ สูตร MS(1962) ที่ดัดแปลงโดยเติม $CaCO_3$ 0.05 โมลาร์ ปรับค่า pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 9.0 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FRO2* ด้วย real time PCR พบการแสดงออกของยีน *FRO2* เพิ่มขึ้น ส่วนการตรวจวัดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน ทั้งยูคาลิปตัสปกติและ ที่ได้รับการถ่ายยีนมีปฏิกิริยาเฟอริกรีดักเทสที่ใบสูงขึ้นกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* กับต้นปกติ และการเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ตรวจวัดได้ไม่สอดคล้องกับปริมาณคลอโรฟิลด์ในใบ โดยยูคาลิปตัสทั้งหมดยังแสดงภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ทั้งในต้นปกติและต้นที่ได้รับการถ่ายยีน อย่างไรก็ตามต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเจริญเติบโตดีกว่ายูคาลิปตัสปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่สภาพจำลองดินเนื้อปูน.แสดงว่าการถ่ายยีนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *FRO2* อาจจะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสที่ปลูกในดินเนื้อปูนได้

คำนำ

ปัญหาของการปลูกพืชในดินเนื้อปูน คือ การขาดธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุเหล็ก ซึ่งพบในพืชหลายชนิด เช่น แอบเปิ้ล ท้อ ส้ม องุ่น และข้าว (Marschner, 1995) และในยูคาลิปตัส (Hinjan, 2005) การขาดธาตุเหล็กทำให้เกิดอาการใบเหลือง (Zohlen, 2002) อาการขาดจะปรากฏระหว่างเส้นใบ และเกิดกับใบอ่อนเนื่องจากเหล็กไม่สามารถจะเคลื่อนย้ายจากใบแก่ไปยังใบอ่อนได้ ถ้าหากเกิดการขาดเป็นเวลานานจะทำให้ทั้งใบเป็นสีขาวเนื่องจากเหล็กเป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และโปรตีนในคลอโรพลาสต์ (Yolanda *et al*., 2000) กลไกการดูดเหล็กจากดินของพืชแยกเป็น 2 กลุ่มคือพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีการขับสารไฟโตซิเดอโรฟอร์ (phytosiderophore) ส่วนพืชใบเลี้ยงคู่จะมีการเพิ่มการรีดิวซ์เฟอริก(ferric;Fe^{3+}) ให้เป็นเฟอรัส (ferrous; Fe^{2+}) ซึ่งเรียกว่าปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส และการขับโปรตอน H^+ เพื่อลด pH รอบ ๆ ราก เพื่อเพิ่มการละลายของเหล็กในดิน (Marschner, 1995)

ในดินเนื้อปูนเมื่อเกิดการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนตจะก่อให้เกิดไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทางเคมีของดินคือ ทำให้สารละลายดินเป็นด่าง ซึ่งมีผลทำให้กลไกการขับโปรตอนเพื่อลดความเป็นด่างรอบๆ รากมีประสิทธิผลลดลง เนื่องจากโปรตอนที่ขับออกมาทำปฏิกริยากับไบคาร์บอเนตหมด ส่งผลทำให้การละลายของเหล็กลดลง นอกจากนั้นยังส่งผลต่อการรีดิวซ์เฟอริกให้เป็นเฟอรัส ซึ่งเป็นกลไกสำหรับการเปลี่ยนรูปของเหล็ก ก่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรนของราก หลังจากเฟอรัสเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรน จะเกิดการออกซิไดซ์เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นเฟอริก ซึ่งเป็นรูปของเหล็กที่ไม่ทำปฏิกิริยา (inactive iron) เพื่อลำเลียงผ่านทางท่อลำเลียงไปใช้ประโยชน์ยังใบ ซึ่งที่ใบจะมีการเปลี่ยนฟอริกกลับไปให้อยู่ในรูปเฟอรัส (active iron) อีกครั้ง (Mengel *et al*.,1994) ดังนั้นปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสจึงมีความสำคัญต่อพืชทั้งการดูดเหล็กจากดินและการใช้ประโยชน์ (Brain *et al*., 2002)

Hinjan *et al.* (2005)ได้รายงานว่าปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ใบสามารถแยกความแตกต่างระหว่างยูคาลิปตัสกลุ่มที่ทนทานและไวต่อดินเนื้อปูนได้ ยูคาลิปตัสกลุ่มที่ทนทานจะเกิดปฏิกิริยาที่ใบที่สูงกว่าและมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่ากลุ่มที่อ่อนแอ เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายที่จำลองสภาพดินเนื้อปูนและการปลูกในดินเนื้อปูน และ

ต่อมา Intong (2005) ได้ศึกษาโดยการปลูกต้นกล้ายูคาลิปตัสในสารละลายธาตุอาหาร ในสภาพที่มีไบคาร์บอเนตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้ววัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เฟอริกคีเลตรีดักเทส พบว่าต้นที่ทนทานต่อดินเนื้อปูนมีกิจกรรมของเอนไซม์เฟอริกคีเลตรีดักเทสสูงกว่า ต้นที่อ่อนแอต่อดินเนื้อปูน และพบว่าในต้นที่อ่อนแอต่อดินเนื้อปูนมีการสะสมของกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดมาลิก และกรดซิตริก ในใบ สูงกว่าต้นที่ทนทานต่อดินเนื้อปูน ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถนำมาใช้คัดเลือกยูคาลิปตัสที่ทนทานต่อดินเนื้อปูนได้

การเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส ในใบสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกยูคาลิปตัสที่ทนต่อการขาดธาตุเหล็กในดินเนื้อปูนได้ โดย Hinjan (2005) ได้พัฒนาวิธีการคัดเลือกยูคาลิปตัส ที่ทนทานต่อดินเนื้อปูนโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่จำลองสภาพดินเนื้อปูน คือสูตร MS (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติม benzyladenine (BA) 2.21 ไมโครโมลาร์ kinetin (Kn) 0.93 ไมโครโมลาร์ และ $CaCO_3$ 0.05 โมลาร์ และปรับ pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 9.0 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งพบว่ากลุ่มที่ทนทานมีปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในสูตรอาหารปกติส่วนกลุ่มที่อ่อนแอจะมีอาการใบเหลืองซีด และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารปกติ

ในสภาพที่พืชขาดเหล็กจะมีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่รีดักเทส เช่นเดียวกับโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของเหล็ก (Robinson *et al*.,1999) ซึ่ง Mok *et al*., (2000) ได้ถ่ายยีน *FRE1* และ *FRE2* จากยีสต์ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ที่ส่งผลในปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสเข้าไปในยาสูบทำให้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนนี้ทนต่อการขาดเหล็ก เมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายในสภาพขาดเหล็กและเติม $NaHCO_3$ โดยเกิดปฏิกิริยาเฟอริกรีดักเทสเพิ่มขึ้น รวมทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบก็สูงกว่าต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

สำหรับยีน *FRO2* นั้น แปรรหัสได้เป็นโปรตีนเฟอริกคีเลตรีดักเทส ขนาด 725 อะมิโนแอซิด ซึ่งเป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่บริเวณผนังเซลล์ ทำหน้าที่รีดิวซ์เฟอริกให้เป็นเฟอรัส (Robinson *et al*.,1999) และมีรายงานว่าช่วยทำให้เกิดการดูดเหล็กจากดินเข้าสู่พืชได้ดีขึ้น โดย Conelly *et al.,* (2003) ได้ถ่ายยีน *FRO2* ที่ได้จาก *Arabidopsis thaliana* เพื่อเพิ่มการแสดงออกใน *Arabidopsis* เองและพบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *FRO2* และปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพขาดเหล็ก และ *A. thaliana* มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเมื่อปลูกในสภาพที่ขาดเหล็ก นอกจากนี้Vasconcelos *et al.,* (2006) ได้ถ่ายยีน *FRO2* ที่ควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMV ซึ่งทำให้มีการแสดงออกตลอดเวลาเข้าสู่ถั่วเหลือง พบว่าถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *FRO2* และการเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสทั้งบริเวณรากและใบเพิ่มสูงขึ้นกว่าถั่วเหลืองปกติ และเมื่อนำไปปลูกในสารละลายที่ขาดเหล็ก พบว่าถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้ดีกว่าถั่วเหลืองปกติ แต่เมื่อปลูกในสภาพที่มีธาตุเหล็กเพียงพอ พบว่าการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนต่ำกว่าถั่วเหลืองปกติ

การถ่ายยีนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของ *FRO2* ในงานวิจัยนี้ ใช้ยีนที่โคลนได้จาก *A. thaliana* ถ่ายเข้าสู่ยูคาลิปตัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ยูคาลิปตัสให้ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น เมื่อปลูกในดินเนื้อปูน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน การแสดงออกของยีน และการวัดการเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส ในใบของยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

การถ่ายยีนเข้าสู่ยูคาลิปตัส

ฟอกฆ่าเชื้อยอดอ่อนจากต้นกล้ายูคาลิปตัสสายพันธุ์การค้า H1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (1962) ดัดแปลง ที่เติม benzyladenine (BA) 2.21 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ kinetin (Kn) 0.93 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อให้เท่ากับ 5.8 ให้แสงที่ 35 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 20 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใน

สูตรอาหารเดิมทุก 4 สัปดาห์ เพื่อขยายจำนวนให้เพียงพอ จากนั้นถ่ายยีนเข้าสู่ยูคาลิปตัสโดยใช้เฉพาะส่วนโคนใบที่มีก้านใบติดมาด้วย นำไปแช่ในสารละลายเชื้อ *A. tumefa cienes* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.8-1.0 นาน 2 ชั่วโมง นำมาซับด้วยกระดาษซับที่ปลอดเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียส่วนเกินออก จากนั้นนำใบไปเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivate) บนอาหารสูตร WPM เติม NAA 16.11 ไมโครโมลาร์, BA 0.44 ไมโครโมลาร์ และ casein enzyme hydrolyze 1 กรัมต่อลิตร และเติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตร B5 ดัดแปลงที่เติม NAA 0.11 ไมโครโมลาร์, N'-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenyl-urea (4PU) 0.81 ไมโครโมลาร์, cefotaxime 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygromycin 15 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียพร้อมกับคัดเลือก และชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและยอด โดยตัดเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยูคาลิปตัสในสภาพจำลองดินเนื้อปูน

นำยอดยูคาลิปตัสในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์สูตรจำลองสภาพดินเนื้อปูน MS (1962) ที่เติม BA 2.21 ไมโครโมลาร์ Kn 0.93 ไมโครโมลาร์ และ $CaCO_3$ 5 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 9.0 เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ก่อนนำไปสกัด RNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ตรวจวัดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ

การตรวจสอบยูคาลิปตัสที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนโดย พีซีอาร์

สกัดแยกจีโนมิคดีเอ็นเอจากใบอ่อนยูคาลิปตัส ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี CTAB (Roger and Bendich, 1994) นำดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนคัดเลือก *hpt* และยีนเป้าหมาย *FRO2* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *hpt* คือ forward 5' GCC CTC GGA CGA GTG CTG 3' และ reverse 5'CGA CAG CGT CTC CGA CCT G 3' ให้ผลผลิตมีขนาด 960 คู่เบส และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *FRO2* คือ forward 5' CTT GTA GTG CGG CTA TGT TGT 3' และ reverse 5'TCT TGA GAT TAG GTC TTT CTC C 3' ซึ่งให้ผลผลิตขนาด 300 คู่เบส โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาคือ 1X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.2 ไมโครลิตร, dNTP 0.5 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.5 unit และ 50-100 นาโนกรัม DNA template ทำปฏิกิริยาด้วยโปรแกรมดังนี้ คือ 96 องศาเซลเซียส 2 นาที ติดตามด้วย 96 องศาเซลเซียส 20 วินาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาทีและ 72 องศาเซลเซียส 25 วินาที จำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน TBE 1 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FRO2* ด้วยวิธี real time PCR

สกัด RNA จากยูคาลิปตัสที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อด้วยตามวิธีการของ Casic *et al*., (2004) แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcriptase โดยใช้ oligo dT primer ขนาด 20 เบส มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาคือ 5X buffer 8.0 ไมโครลิตร, RNA 2.0 ไมโครลิตร (1.5 ไมโครกรัม), 10 มิลลิโมลาร์ primer oligo dT 4.0 ไมโครลิตร, 5 มิลลิโมลาร์ dNTP 4.0 ไมโครลิตร, Ribolock RNase inhibitor (Fermentas) 0.5 ไมโครลิตร, Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) 2.0 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 19.5 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำ cDNA มาทำปฏิกิริยา quantitative real time PCR (KAPA SYBR® FAST qPCR Kits) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบ absolute expression โดยใช้ยีน *FRO2* ที่บรรจุในพลาสมิด pGEM T-easy ® เป็นตัวเปรียบเทียบ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *FRO2* คือ forward 5'CTT GTA GTG CGG CTA TGT TGT3' และ reverse 5'TCT TGA GAT TAG GTC TTT CTC

C3' โดยปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x Kappa master mixed 10 ไมโครลิตร, cDNA template 5 ไมโครลิตร , forward และ reverse primer 1 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 3 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Mastercycle ep® realplex, Smart cycle ทำปฏิกิริยา 3 ช่วงคือ ช่วงที่หนึ่ง enzyme activation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ช่วงที่สองจำนวน 40 รอบแต่ละรอบประกอบด้วย denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 วินาที และ annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 20 วินาทีและ extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที โดยวัดการการเปล่งแสงของสี syber green ที่ระยะการ extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ช่วงสุดท้ายตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำ melting curve analysis

การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์เฟอริกคีเลตรีดักเทส

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เฟอริกคีเลตรีดักเทสในใบ ทำโดยตัดใบยูคาลิปตัสที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดโตเต็มที่ ใส่ในหลอดแก้วที่มีสารละลายทดสอบปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย $CaSO_4.2H_2O$ 0.2 มิลลิโมลาร์, 2-(N-morpholino)-ethylenesulfonic acid 5.0 มิลลิโมลาร์, Fe (III) EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์, Bathphenanthroline disulfonate 0.2 มิลลิโมลาร์ บ่มปฏิกิริยาไว้ในอุณหภูมิ 25 $\pm$2 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการนำใบออก และนำสารละลายมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ 22.24 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง (Brain *et al*., 2002)

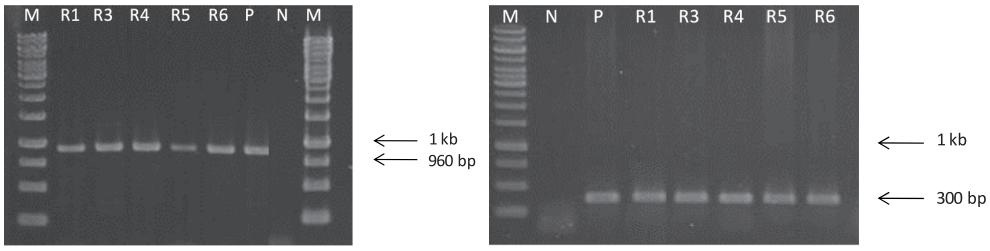
การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

ตัดใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำใบแช่ในอะซิโตน 80 % เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลาย ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการของ Francis (1986)

ผลและวิจารณ์

การสอดแทรกของยีน *FRO2* และยีน *hpt* ในจีโนมยูคาลิปตัส

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *hpt* และ *FRO2* ในจีโนมของยูคาลิปตัสที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนจำนวน 5 ต้นที่รอดชีวิตและพัฒนาเป็นต้นอ่อนในอาหารคัดเลือกที่เติมไฮโกรมัยซิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการมีอยู่ของยีนทั้งสองในทุกต้น (ภาพที่ 1) แสดงว่าการส่งถ่ายยีนเป็นไปอย่างสมบูรณ์



ก. ข.

ภาพที่ 1 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hpt* (ก.) และยีน *FRO2* (ข.) แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์

M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder (Fermentas)

N คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอจากยูคาลิปตัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

P คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอพลาสมิด pCAMBIA: *FRO2* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

R1-6 คือผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ดีเอ็นเอจากยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

การแสดงออกของยีน *FRO2*

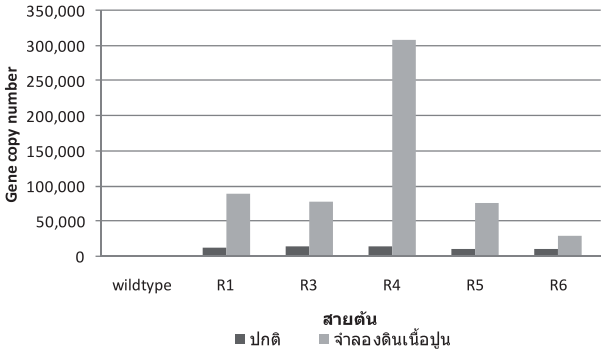
การแสดงออกของยีน *FRO2* ในต้น ที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายยีนเมื่อตรวจสอบโดย real time PCR พบการแสดงออกของยีน *FRO2* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย ส่วนการแสดงออกของต้นยูคาลิปตัสปกตินั้นเป็นผลผลิตที่เป็น non specific ซึ่งยืนยันได้จากการทำ melting curve analysis สำหรับการแสดงออกของยีน *FRO2* ในยูคาลิปตัสได้รับการถ่ายยีนนั้น พบว่าในต้น R4 มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด 309,000 ชุด ส่วนต้น R6 มีการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด 28,964 ชุด (ภาพที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารปกติ กับอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน พบว่ายูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมดมีการการแสดงออกของยีน *FRO2* เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Connolly *et al*., (2003) ที่ได้ถ่ายยีน *FRO2* เข้าสู่ *Arabidopsis* และรายงานว่ามีการแสดงออกในระดับ mRNA เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่เติมเหล็กหรือมีเหล็กไม่เพียงพอ

นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการควบคุมการแสดงออกของยีนนี้หลังการ transcription เป็น mRNA เนื่องจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีธาตุเหล็กเพียงพอ ตรวจพบการแสดงออกของยีนระดับ mRNA เพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vert *et al.,* (2003) ที่รายงานว่าการแสดงออกของยีน *FRO2* ในรากของ *Arabidopsis* ถูกควบคุมจากปริมาณของธาตุเหล็กในส่วนของลำต้น เมื่อพืชมีปริมาณธาตุเหล็กใน ลำต้นต่ำและเพาะเลี้ยงในสภาพขาดเหล็กจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน *FRO2* ให้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณเหล็กในใบสูงขึ้นจะยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้

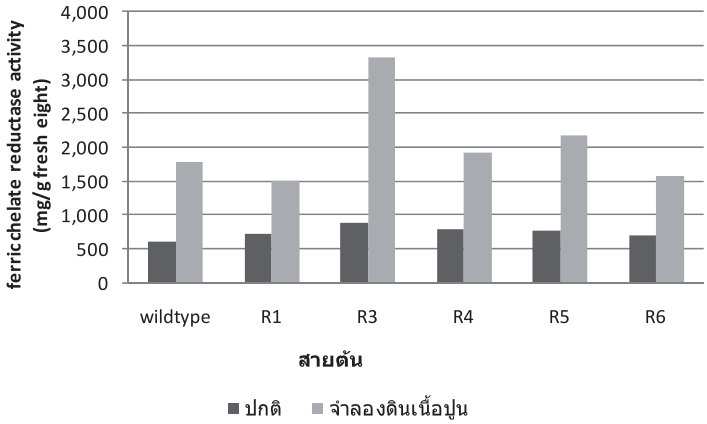
การเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส

การตรวจสอบปฏิกริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ใบของต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารปกติ พบว่าปฏิกริยาในใบยูคาลิปตัสปกติและยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนมีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3)

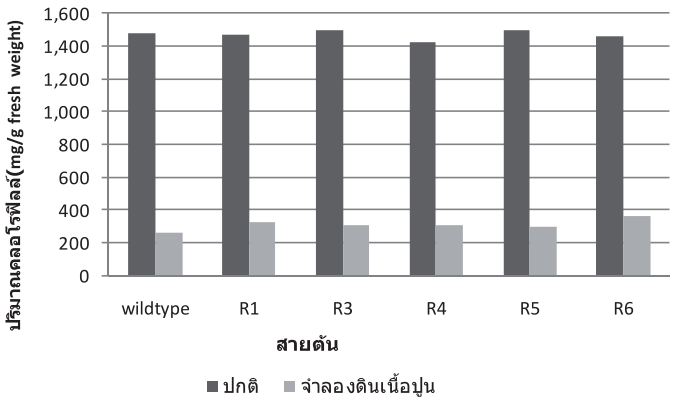
สำหรับปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ใบของต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน พบว่ามีปฏิกิริยานี้ในใบเพิ่มขึ้นทั้งยูคาลิปตัสปกติและยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน แต่การเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ตรวจสอบได้ ไม่สอดคล้องกับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ (ภาพที่ 3 และ 4) โดยปริมาณคลอโรฟิลล์ในต้น R3 ซึ่งมีปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสสูงสุด ไม่แตกต่างจากต้นอื่นๆ และยังพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยานี้ไม่สอดคล้องกับการแสดงออกของยีนโดยพบว่าในต้น R4 ที่มีการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *FRO2* สูงที่สุดแต่เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์นี้ กลับพบว่าไม่ได้เกิดปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของ *FRO2* ไม่ได้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยานี้ที่ส่วนใบ เนื่องจากในยูคาลิปตัสปกติก็มีการเพิ่มการเกิดปฏิกิริยานี้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีนเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพจำลองดินเนื้อปูน และยังอาจเป็นไปได้ว่ามีการควบคุมการแสดงออกของยีน *FRO2* ที่ถ่ายเข้าไปหลังการแปรรหัส ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับผลการศึกษาของ Connolly *et al.* (2003)



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน *FRO2* เมื่อตรวจสอบการแสดงออกแบบ absolute expression ในยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* จาก *Arabidopsis*



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ใบของยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* จาก *Arabidopsis* (R1-R6) เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารปกติ และ บนอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน



ภาพที่ 4 ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบของต้นยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* จาก *Arabidopsis* (R1-R6) และต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารปกติ และอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน

นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่ายีน *FRO2* ไม่ได้ทำหน้าที่บริเวณใบ ซึ่งจากผลการศึกษาของ Mukherjee *et al.*, (2006) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม *FRO* ใน *Arabidopsis* พบว่าการแสดงออกของยีน *FRO2* และ *FRO5* มีการแสดงออกมากในบริเวณราก ส่วนยีน *FRO8* มีการแสดงออกบริเวณลำต้น เป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *FRO2* ที่ได้ถ่ายเข้าไปอาจทำหน้าที่ในราก แต่ในการศึกษาในครั้งนี้ศึกษาเฉพาะในใบเท่านั้น ผลที่ได้จึงไม่สอดคล้องกัน

ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบยูคาลิปตัส

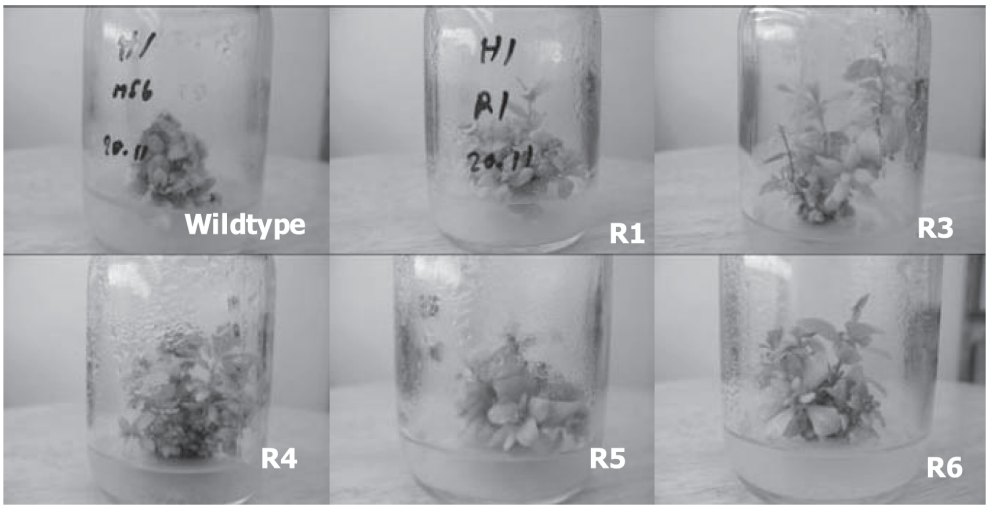
การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ เปรียบเทียบระหว่างต้นปกติกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่จำลองสภาพดินเนื้อปูน พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารปกติ (ภาพที่ 4) แสดงว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *FRO2* นี้ไม่ได้ช่วยบรรเทาภาวการณ์พร่องคลอโรฟิลล์ ซึ่งส่งผลให้ใบเหลืองซีดที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Vasconvelos *et al.*, (2006) ที่ได้ถ่ายยีนนี้ในถั่วเหลืองและพบว่าถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณคลอโรฟิลล์สูงกว่าและมีอาการพร่องคลอโรฟิลล์น้อยกว่าถั่วเหลืองปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในสารละลายที่ขาดธาตุเหล็ก

การเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูน

หลังการเพาะเลี้ยงยูคาลิปตัส ในสูตรอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูนนาน 8 สัปดาห์ พบว่ายูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน (R1-R6) มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่ายูคาลิปตัสปกติ (ภาพที่ 5) ถึงแม้ว่าจะปรากฏอาการพร่องคลอโรฟิลล์เช่นเดียวกันก็ตาม ส่วนในยูคาลิปตัสปกติมีลักษณะทางสรีระที่ผิดปกติอย่างชัดเจน โดยใบมีขนาดเล็กและลำต้นแคระแกรน และมีการตายของใบบางส่วน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *FRO2* ช่วยส่งเสริมการเจริญเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่จำลองสภาพดินเนื้อปูน ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Connolly *et al.* (2003) และ Vanconcelos *et al.* (2006) ที่พบว่า *A. thaliana* และ ถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายยีน *FRO2* เจริญเติบโตดีกว่าพืชปกติเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพขาดเหล็ก อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ทำในสภาพแวดล้อมที่ปลอดเชื้อ และต้นยูคาลิปตัสที่ใช้ในการศึกษาไม่มีราก ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาที่รากได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาในสภาพโรงเรือนด้วยการปลูกในสารละลายและชักนำให้ออกรากเพื่อยืนยันผลการของการถ่ายยีน *FRO2* โดยเฉพาะการแสดงออกและการทำหน้าที่ในราก

สรุป

ยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *FRO2* ที่โคลนได้จาก *Arabidopsis thaliana* พบการแสดงออกของยีน *FRO2* ในระดับ mRNA และอัตราการเกิดปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส ที่ใบเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพจำลองดินเนื้อปูนแต่ปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทสที่ตรวจวัดได้ ไม่สอดคล้องกับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ โดยยูคาลิปตัสทั้งหมดยังแสดงภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ ทั้งในต้นปกติและต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ถึงแม้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *FRO2* และการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาเฟอริกคีเลตรีดักเทส จะไม่สามารถบรรเทาการเกิดภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ได้ แต่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นยูคาลิปตัสที่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพจำลองดินเนื้อปูนได้



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของยูคาลิปตัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารจำลองสภาพดินเนื้อปูนนาน 8 สัปดาห์

คำขอบคุณ

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

เอกสารอ้างอิง

Brian, M.W., D.D. Blevins and D.J. Eide. 2002. Characterization of *FRO2*, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. **Plant Physiology** 129: 85–94.

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.

Connolly, E., N.H. Campbell, N. Grotz, C.L. Prichard and M.L. Guerinot. 2003. Over-expression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. **Plant Physiology** 133: 1102-1110.

Francis, H. W. 1986. **Exercise in plant physiology**. PWS. Publishers, Boston, Massachusetts.

Hinjan, S. 2005. *In vitro* selection technique of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Resistance to calcareous soil. M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok. Thailand (in Thai)

Hinjan, S., S. Chanprame, S. Chanprame and P. Srijantr. The use of ferric chelate reductase enzyme activity to indicate calcareous soil tolerant clones in *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. **Agricultural Sci. J.** 36: 135-142. (in Thai)

Intong, S.. 2005. Effect of nitrate and bicarbonate on chlorosis induced by Fe-deficiency in *Eucalyptus*. M.S. Thesis. Kasetsart University. Bangkok. Thailand (in Thai)

Marschner, H. 1995. **Mineral Nutrition of Higher Plant.** 2nd ed. Academic Press, New York. 889 p.

Mengel, K.. R. Planker and B. Holffmann. 1994. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorrosis of sunflower (*Helainthus annuus* L.) **J. Plant Nutr.** 17: 1053 -1065.

Mok, M.C., A.I. Samuelsen, R.C. Martin, and W.S. Mok. 2000. Fe (III) reductase the *FRE* genes and *FRE* transformed tobacco. **J. Plant Nutr.** 23(11-12): 1941-1951.

Mukherjee, I., N.H. Campbell, A.S. Ash and E.L. Connelly. 2006. Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. **Planta** 223: 1178-1190.

Robinson, N. J., C.M. Procter, E.L. Connolly and M.L. Guerinot . 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature** 397: 694-697.

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.

Vasconcelos, M., H. Eckert, V. Arahana, G. Graef, M.A. Grusak and T. Clemente. 2006. Molecular and phenotypic characterization of transgenic soybean expressing the *Arabidopsis* ferric chelate reductase gene, *FRO2*. **Planta** 244: 1116-1128.

Yolanda, G., J. Abidia and A. Abidia. 2000. Induction of in vitro root ferric chelate reductase activity in fruit tree rootstock. **J. Plant Nutr**. 23: 9-12.

Vert, A.G., J. Brait and C. Curie. 2003. Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. **Plant Physiol.** 132: 796-804.

Zohlen, A. 2002. Chlorosis in wild plant: is it a sign of iron deficiency. **J. Plant Nutr.** 25: 2205- 2228.