

# อิทธิพลของแสงต่อการควบคุมการแสดงออกของยูคาลิปตัส KORRIGAN โปรโมเตอร์ในต้นยาสูบ Effect of Light to Expression Control of Eucalyptus KORRIGAN Promoter in Tobacco

อาทิตย์ วิมลทัศน<sup>1/, 2/, 4/</sup> วิชัย ไชลิตรัตน์<sup>1/, 2/, 3/</sup> ศรีเมฆ ชาวโพงพาง<sup>5/</sup>  
Artit Vimoltust<sup>1/, 2/, 4/</sup> Wichai Kositratana<sup>1/, 2/, 3/</sup> Srimek Chowpongpan<sup>5/</sup>

Received 29 Oct 2018/Revised 13 Feb 2019/ Accepted 9 April 2019

## ABSTRACT

Cellulose is the most important structural component of plant cell wall. Due to the enormous economic benefit of tree cellulose for paper, pulp, lumber and packaging industries, understanding the mechanism of cellulose biosynthesis is important for the sustainability of these industrial businesses. KORRIGAN gene (*Kor*) encodes a plasma membrane bound enzyme, endo-1, 4-β-D-glucanase, which is member of cellulose biosynthesis genes. This research focused on the analysis of the promoter region of the *Kor* gene, promoter structure and gene expression control under dark and light conditions. The *Kor* promoter region of *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, and *E. urophylla* were cloned and sequenced. Sequences were analyzed by alignment against the *E. grandis* genome sequences using a ClustalW 2.1 program. The gene expression control of *Kor* promoter was tested, recombinant plant transformation plasmid, pCAMBIA1304, with the *Kor* promoter fused to the reporter gene, β-glucuronidase (*gusA*) was transferred to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and the gene expression controls were analyzed by real time PCR. Results revealed that *Kor* promoter nucleotide sequences from *E. grandis*, *E. camaldulensis*, and *E. urophylla*, are high similar to *E. grandis* *Kor* promoter database at the percentages of 97, 95 and 96 respectively. Two transgenic tobacco lines, 15k2 and 15K3, showed the specific expressions of the reporter gene, *gusA*, but limited only in the vascular tissues, and the levels of gene expression were regulated by light, Under lighting conditions of 8 and 16 hrs. expression reduction from those under dark condition of 29%, 36%, 36% and 31% respectively were observed.

**Key words:** KORRIGAN Promoter, Gene expression, Light and dark gene control Cellulose biosynthesis

<sup>1/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140  
(Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand)

<sup>2/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 (Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand)

<sup>3/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 (Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand)

<sup>4/</sup> ศูนย์พัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยี บริษัทเอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด (มหาชน) ราชบุรี 70110  
(Product & Technology Development Center, SCG Packaging Public Company Limited, Ratchaburi 70110, Thailand)

<sup>5/</sup> ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120  
(National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Science Park, Pathum Thani 12120, Thailand)

\* Corresponding author: konggiggs@gmail.com

## บทคัดย่อ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดของผนังเซลล์พืช และมีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจ ในอุตสาหกรรมกระดาษ เยื่อกระดาษ ไม้ และบรรจุภัณฑ์ การศึกษาและเข้าใจถึงกลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสจึงมีความสำคัญต่อความยั่งยืนของอุตสาหกรรมดังกล่าว ยีน KORRIGAN (*Kor*) เป็นยีนสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ plasma membrane bound, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase ในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสในพืช งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* จากต้นยูคาลิปตัสสามชนิดเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรโมเตอร์และการควบคุมการแสดงออกของยีน การโคลนส่วนโปรโมเตอร์ *Kor* ของยูคาลิปตัสสามชนิด ได้แก่ *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, และ *E. urophylla* เปรียบเทียบกับจีโนมของยูคาลิปตัส *E. grandis* จากฐานข้อมูลวิเคราะห์ส่วนโปรโมเตอร์ *Kor* ด้วยโปรแกรม ClustalW 2.1 และการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเลือกใช้โปรโมเตอร์ *Kor* ของ *E. grandis* เชื่อมเข้ากับยีนรายงานผล  $\beta$ -glucuronidase (*gusA*) บนพลาสมิด pCAMBIA1304 แล้วถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) การศึกษาพบว่า โปรโมเตอร์ *Kor* จาก *E. grandis*, *E. camaldulensis*, และ *E. urophylla* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนโปรโมเตอร์ *Kor* ของจีโนมยูคาลิปตัส *E. grandis* บนฐานข้อมูล มีความเหมือนกันร้อยละ 97 95 และ 96 ตามลำดับ และพบว่า โปรโมเตอร์ *Kor* สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน *gusA* ในต้นยาสูบสองโคลน คือ 15K2 และ 15K3 ได้ โดยมีการแสดงออกของยีนรายงานผลที่เฉพาะเจาะจงในส่วนของเนื้อเยื่อท่อลำเลียงและตอบสนองต่อแสง โดยในสภาพที่ให้แสง 8 และ 16 ชม. การแสดงออกของยีน

จะลดลงร้อยละ 29 36 36 และ 31 ตามลำดับจากในสภาพที่มีด

**คำสำคัญ:** KORRIGAN โปรโมเตอร์, การแสดงออกของยีน, แสงและความมืดในการควบคุมยีน กระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส

## บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของผนังเซลล์พืช ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ในการคงสภาพของรูปร่างทางกายภาพและการเจริญเติบโตของต้นพืช และเซลลูโลสจากพืชยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมาก เช่น ในอุตสาหกรรมไม้ เยื่อกระดาษ กระดาษ บรรจุภัณฑ์ และสิ่งพิมพ์ เซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่จับต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ  $\beta$  (1-4) โดยเซลลูโลสจะสังเคราะห์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ด้วยโครงสร้าง cellulose synthase complex (CSC) ที่ทำการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibrils) ด้วยเอนไซม์ cellulose synthase (*CesA*) จำนวน 18 ชนิด ที่สังเคราะห์จากกลุ่มยีน *CesAs* (Maleki *et al.*, 2016) นอกเหนือจากเอนไซม์ *CesA* แล้วยังพบว่ามี microtubules, actin cytoskeleton, เอนไซม์ sucrose synthase (*SuSy*) โปรตีน COBRA-like และโปรตีน KORRIGAN (*Kor*) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสด้วย จากการศึกษาของ Vain *et al.*, (2014) พบว่า โปรตีน *KOR* ซึ่งเป็นเอนไซม์ membrane-bound endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (*EGase*) ที่จับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทที่สำคัญไม่เฉพาะกับการสังเคราะห์สายโพลีเมอร์ของกลูโคส (glucan chain) และการรวมกันเป็นเส้นใยเซลลูโลสเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทต่อการเคลื่อนย้าย

ของโครงสร้าง CSC ภายในเซลล์ด้วย ดังนั้นการศึกษาให้เข้าใจถึงโปรตีน *Kor* และยีน *Kor* ที่ควบคุมการสังเคราะห์จะทำให้สามารถนำความรู้มาใช้ในการปรับปรุงการสังเคราะห์เซลลูโลสของพืชและส่งผลต่ออุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ และอุตสาหกรรมต่อเนื่องได้

โปรโมเตอร์ของยีนทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นถอดรหัสของยีน ควบคุมการทำงานของยีน ทั้งในด้านปริมาณ ช่วงเวลาที่แสดงออก และเนื้อเยื่อเป้าหมาย ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถูกจดจำโดยโปรตีนที่จะนำเอนไซม์ RNA polymerase เข้ามาจับและเริ่มถอดรหัสยีน (Brown, 2002) โปรโมเตอร์ *Kor* เป็นโปรโมเตอร์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า TATA boxless promoter ส่วนมากพบควบคุมยีนในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส แป้งและน้ำตาลในพืชหลายชนิด และมีส่วน Downstream promoter element (DPE) เหมือนกับโปรโมเตอร์จากยีน photosystem I (PsaDb) ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อแสง (Vimoltust *et al.*, 2018) งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *Kor* จากต้นยูคาลิปตัส 3 ชนิด ที่ปลูกใช้เชิงพาณิชย์ในเมืองไทย และทดสอบอิทธิพลของแสงต่ออัตราการแสดงออกของโปรโมเตอร์ โดยการเชื่อมต่อเข้ากับยีนรายงานผล *gusA* บนพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ ตรวจการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *Kor* ในต้นยาสูบที่อยู่ในที่มืดและที่สว่าง เพื่อเป็นแนวทางที่จะเข้าใจถึงกลไกการทำงานของยีน *Kor* ในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต้นยูคาลิปตัสและพืชเส้นใยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การสกัดดีเอ็นเอจากยูคาลิปตัส

เก็บใบยูคาลิปตัสจากต้นยูคาลิปตัสสามชนิด ดังนี้ *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* และ *E. urophylla* จากแปลงปลูกของบริษัทเอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด (มหาชน) ตำบลท่าพา อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี แล้วนำมามาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ออกจากเนื้อเยื่อส่วนใบด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C. เพื่อใช้ต่อไป

### 2. การออกแบบไพรเมอร์และการโคลน *Kor* โปรโมเตอร์จากยูคาลิปตัส

สร้างไพรเมอร์จากฐานข้อมูล NCBI ของยีน *Kor* จาก Gen Bank Accession No. JX904062 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวไปหาส่วนเหนือยีน (upstream sequences) โดยการเทียบจากฐานข้อมูลจีโนมของ *E. grandis* ในโปรแกรม Phytozome บนฐานข้อมูล <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> เมื่อพบส่วนของยีนแล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer จากบริเวณของลำดับเบสที่อยู่เหนือ start codon (ATG) ของยีน *Kor* ขึ้นไปจากตำแหน่ง -1591 ถึงตำแหน่ง -1567 โดยเติมให้มีตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR I* (GAATCC) ที่ปลายด้าน 3 ไพร์ให้ชื่อว่าไพรเมอร์ F1591 *Korpro* (5GAATTC-CAGCCGGCCATACCATATGACAACG 3) และ reverse primer จากตำแหน่ง -1 ถึงตำแหน่ง -25 ของ start codon และเติมตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ *Nco I* (CCATGG) ที่ปลาย 5 ไพร์ ให้ชื่อว่าไพรเมอร์ R1*Korpro* (5CCATGGGCT-CATCCTCGCTCCGACGCGAACT3) ทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T (Promega,

Wisconsin, USA) และถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ตามวิธีการของ Vimoltust *et al.*, (2018) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Applied Biosystems<sup>®</sup> Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers ใช้สารเคมี BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry, ThermoFisher scientific ตามกรรมวิธีของบริษัท 1<sup>st</sup> BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

### 3. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *Kor*

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนยูคาลิปดัสทั้ง 3 ชนิด มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของโปรโมเตอร์ *Kor* กับฐานข้อมูลจีโนมของ *E. grandis* ด้วยโปรแกรม Phytozome บนฐานข้อมูล <https://phytozome.jgi.doe.gov/pzportal.html> โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ ClustalW 2.1 (Larkin *et al.*, 2007)

### 4. การสร้าง Recombinant plasmid และการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

นำพลาสมิด pG+15E.g*Kor*pro ที่ได้จากการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR ของ *E. grandis* เข้ากับพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T จากการทดลองที่ 2 และพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีนเข้าสู่พืช pCAMBIA 1304 มาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NcoI* เพื่อตัดส่วนโปรโมเตอร์ *Kor* ของ *E. grandis* ออกจากพลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T และตัดส่วนของยีน LacZ $\alpha$  และ 35sCaMV promoter ออกจากพลาสมิด pCAMBIA 1304 จากนั้นเชื่อมต่อบริเวณของโปรโมเตอร์ *Kor* เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA 1304 ให้ชื่อพลาสมิดที่ได้ว่า pC15*Kor*pro ถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA

4404 ด้วยวิธี electroporation และถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* 'Xanthi') ด้วยวิธี leaf-disc co-cultivation method ตามวิธีการของ Vimoltust *et al.*, (2018)

### 5. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนรายงานผล

ตัดชิ้นส่วนจากต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมตามข้างต้น มาตรวจการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยวิธี GUS histochemical assay โดยเตรียมสารละลาย X-gluc ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0, 10 mM EDTA pH 7.0, 0.5 mM potassium ferricyanide pH 7.0, 0.5 mM potassium ferrocyanide pH 7.0, 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide) และ 0.1% Triton X-100 นำชิ้นส่วนยาสูบแช่ในสารละลาย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37<sup>o</sup>C. ซ้ำมคีน นำมาหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างเนื้อเยื่อด้วย ethanol 95% ตรวจผลการแสดงออกของยีน *gusA* จากการเกิดสีน้ำเงินของชิ้นเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stomp, 1992; Jefferson *et al.*, 1987)

### 6. การศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการแสดงออกของยีนรายงานผลด้วยเทคนิค real-time PCR

ทำการสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด RNeasy<sup>®</sup> PlusMini Kit (Qiagen Inc., USA) โดยใช้เนื้อเยื่อ 0.2 กรัม จากก้านใบจากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 2 โคลน คือ 15*Kor*2 และ 15*Kor*3 อายุ 60 วัน นำมาเพาะเลี้ยงให้อยู่ในที่มืดเป็นเวลา 8 ชม. เก็บตัวอย่างสำหรับการแสดงออกในที่มืด จากนั้นให้รับแสงเป็นเวลา 8 ชม. และ 16 ชม. สำหรับการแสดงออกเมื่อได้รับแสง ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา real-time

PCR ในแต่ละตัวอย่างจะทดสอบ 3 ซ้ำ โดยใช้ KAPA SYBR® FAST qPCR Kits (KAPA Biosystems, Massachusetts, USA) ปฏิบัติการประกอบด้วย KAPA master mixed (2X) 10 µl cDNA template 5µl Forward primer 1µl Reverse primer 1µl น้ำกลั่น 3µl โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ซึ่งเป็นยีนรายงานผลจากการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* เทียบกับการแสดงออกแบบ relative expression ใช้ 18s rRNA ซึ่งเป็น housekeeping gene และทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany) โดยใช้โปรแกรมการทำปฏิกิริยา enzyme activation step ที่ 96°C. 2 นาที จากนั้น step cycling จำนวน 35 รอบ ดังนี้ ที่ 95°C. 30 วินาที ที่ 60°C. 20 วินาที และ ที่ 72°C. 20 วินาที ตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยวัดค่าการเรืองแสงของสี SYBR® Green

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเหนือของยีน *Kor* จากยูคาลิปตัส 3 ชนิด

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หน้ายีน *Kor* โดยใช้โปรแกรม F1591Korpro และ R1Korpro ซึ่งออกแบบให้เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ก่อนหน้ายีน *Kor* จำนวน 1,591 คู่เบส พบว่าโคลนที่ได้จาก *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis* และ *E. urophylla* มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,587, 1,575 และ 1,588 คู่เบสตามลำดับ และมีความเหมือนกันร้อยละ 97, 95 และ 96 กับลำดับเบสของจีโนมของ *E. grandis* จากฐานข้อมูล Phytozome เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW 2.1 และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละคู่ระหว่างต้นยูคาลิปตัสสามชนิดที่ใช้ในการ

ทดลองพบว่า *E. grandis* กับ *E. camaldulensis* มีความเหมือนกันร้อยละ 95 *E. grandis* กับ *E. urophylla* ความเหมือนกันร้อยละ 98 และ *E. camaldulensis* กับ *E. urophylla* ความเหมือนกันร้อยละ 95 รายละเอียดดังแสดงใน Table 1 ผลจากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ *Kor* เป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความอนุรักษ์สูงซึ่งอาจบ่งชี้ถึงความสำคัญของโปรโมเตอร์ *Kor* ที่มีต่อการควบคุมการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสของต้นยูคาลิปตัสจึงเลือกโปรโมเตอร์ *Kor* จากของ *E. grandis* มาเพื่อศึกษาถึงกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน เนื่องจากเป็นยูคาลิปตัสชนิดที่มีฐานข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ นำมาใช้สนับสนุนการวิเคราะห์ข้อมูลได้ และโปรโมเตอร์ *Kor* ซึ่งเป็นชนิดที่ไม่มี TATA box (TATA boxless promoter) ซึ่งประกอบด้วย ส่วนประกอบของ core promoter 2 ชนิด คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ CTCACCTTTC ชื่อ INRNTPSADB (Initiator; Inr) ที่เป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการเกิด transcription (transcription start site) และ ส่วน Downstream promoter element (DPE) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ AGACC เช่นเดียวกับโปรโมเตอร์จากยีน *photosystem I (PsaDb)* ในต้นยาสูบ (*N. tabacum*) และพบส่วนของ proximal promoter ที่อยู่เหนือส่วนของ transcription start site ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลในพืชหลายชนิด เช่น มันเทศ ข้าวบาเลย์ และ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเป็นกระบวนการที่ตอบสนองต่อแสง (Vimoltust et al., 2018) จึงทำการศึกษาผลการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ *Kor* ในสภาวะมีแสงและไม่มีแสงดังแสดงในผลการทดลองขั้นต่อไป

**Table 1** Nucleotide sequence homology of the upstream nucleotides of *Kor* gene from three eucalyptus species, *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis*, and *E. urophylla*, compare to *E. grandis* genome database

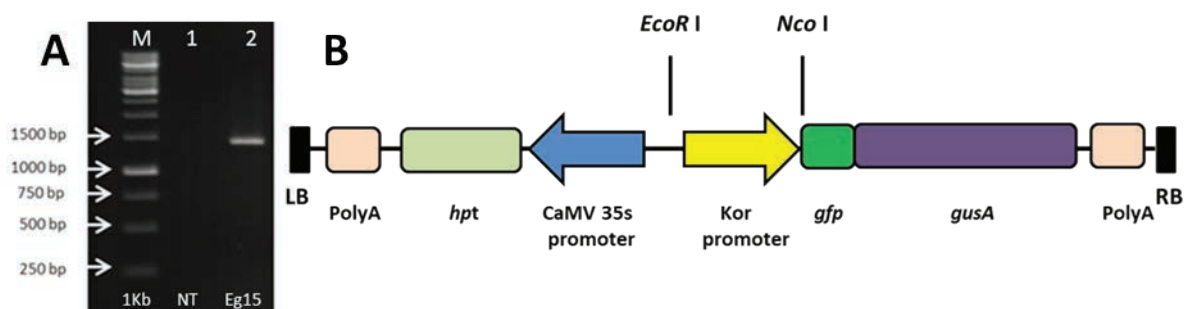
No.	Name <sup>1</sup>	Length	No.	Name <sup>1</sup>	Length	Score (%)
1	15E.gKorpro	1587	2	15E.cKorpro	1575	95
1	15E.gKorpro	1587	3	15E.uKorpro	1588	98
1	15E.gKorpro	1587	4	15E.gGenome	1591	97
2	15E.cKorpro	1575	3	15E.uKorpro	1588	95
2	15E.cKorpro	1575	4	15E.gGenome	1591	95
3	15E.uKorpro	1588	4	15E.gGenome	1591	96

<sup>1</sup> 15E.gKorpro promoter sequence from *E. grandis*, 15E.cKorpro promoter sequence from *E. camaldulensis*, 15E.uKorpro promoter sequence from *E. urophylla* and 15E.gGenome promoter sequence from eucalyptus genome (phytozome)

## 2. การโคลนโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* จากยูนิตไลบรารี และเชื่อมต่อ *Kor* promoter เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA 1304 สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่พืช

ผลวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ *Kor* ของ *E. grandis* ขนาด 1,587 นิวคลีโอไทด์ ในการควบคุมการแสดงออกของยีนรายงานผล โดยตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA 1304 กับพลาสมิด pG+15Korpro ด้วยเอ็นไซม์ *EcoR* I และ *Nco* I ซึ่งจะตัดปลายขึ้นของโปรโมเตอร์ให้ปลายทั้งสองด้านมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พร้อมจะเชื่อมต่อกันกับพลาสมิด

pCAMBIA 1304 ที่ตัดบริเวณส่วนของดีเอ็นเอในส่วนของการกำหนดการสร้างโปรตีน LacZα และโปรโมเตอร์ 35s CaMV ที่มีขนาดรวม 813 คู่เบส ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *gfp* และ *gusA* ออกด้วยคู่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Nco* I ที่เหมือนกันเชื่อมต่อกับส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* เข้ากับพลาสมิด ถ่ายยีนสู่พืช pCAMBIA1304 ที่ส่วนต้นของยีน *gusA* รวมพลาสมิดมีขนาด 13,136 คู่เบส และให้ชื่อว่า pC15Korpro (Figure 1)



**Figure 1** PCR product of *Kor* promoter element of *Eucalyptus grandis* and recombinant plant transformation plasmid, (A) Gel electrophoresis of *Kor* promoter element of *E. glandis*, 1587 bp (E.g15), lane2; NT, non-transform, lane1; and M, molecular marker, laneM; (B) Recombinant plasmid pC15Korpro, which the *Kor* promoter ligated to *gusA* gene of plant transformation plasmid, pCAMBIA 1304

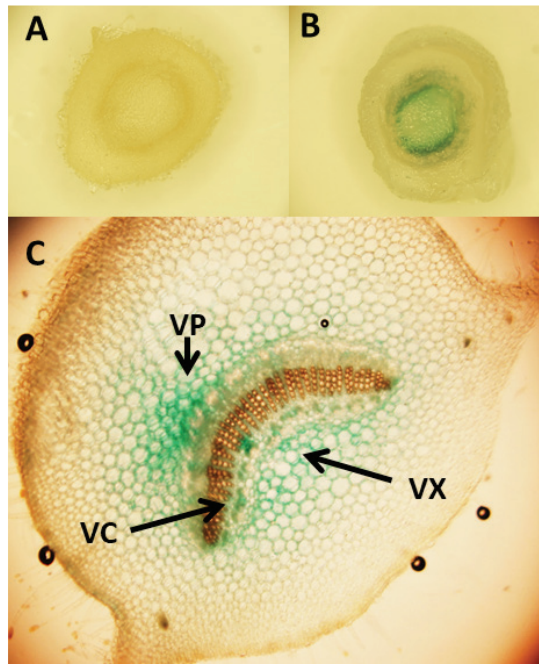
### 3. การถ่ายโปรโมเตอร์และยีนรายงานผลเข้าสู่ยาสูบ

การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ต้นยาสูบหลังจากเลี้ยงชิ้นใบบนอาหารคัดเลือกที่มีสาร hygromycin เป็นเวลา 60 วัน พบว่า มีชิ้นใบที่ยังมีชีวิต และเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยในการทดสอบครั้งที่ 1 พบต้นรอดชีวิตเพียง 1 โคลน (1/8) ไม่ได้เลือกมาใช้ทดลองต่อ การทดสอบครั้งที่ 2 พบต้นรอดชีวิต จำนวน 4 โคลน (2/4; 2/6; 2/7; และ 2/8) เลือกนำโคลนที่ 2/4 มาใช้ทดสอบ เนื่องจาก ตรวจพบการแสดงออกของยีนรายงานผลที่ชัดเจน และให้ชื่อว่า โคลน 15K2 และการทดสอบครั้งที่ 3 พบต้นรอดชีวิตจำนวน 4 โคลน (3/1; 3/3; 3/4; และ 3/5) เลือกโคลน 3/3 มาใช้ศึกษาและให้ชื่อว่าโคลน 15K3

### 4. การตรวจการแสดงออกของยีนรายงานผล

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase (GUS) จากยีน *gusA* ที่ถูกควบคุมการแสดงออกในต้นยาสูบโดยโปรโมเตอร์

จากยีน *Kor* การแสดงออกของยีน *gusA* สามารถยืนยันถึงการทำงานของโปรโมเตอร์ได้ว่าสามารถทำงานให้เกิดการแสดงออกในต้นยาสูบ และยังสามารถใช้ตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ในการควบคุมการแสดงออกที่จำเพาะเจาะจงในเนื้อเยื่อของพืชได้เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ GUS จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรท 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) และเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (X-X dimer precipitate) สามารถตรวจได้ด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCa+15Korpro จำนวน 2 โคลน ได้แก่ 15K2 และ 15K3 ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ 1587 *Korpro* ควบคุมยีน *gusA* นั้นมีการแสดงออกของเอนไซม์ GUS และติดสีน้ำเงินพบการแสดงออกในเนื้อเยื่อกลุ่มท่อลำเลียงทั้งในลำต้น และก้านใบ ผลการตัดชิ้นส่วนแบบตัดขวาง (cross section) ของลำต้นเพื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการติดสีน้ำเงินเฉพาะในเนื้อเยื่อกลุ่มท่อลำเลียงในส่วนของลำต้นเท่านั้น (Figure 2)



**Figure 2** Histochemical localization of GUS expression with *Kor* promoter in transgenic tobacco, (A) Non transformed plant stem cross-section, (B) Transgenic tobacco stem cross-section and (C) Transgenic tobacco leaf petiole cross-section at high magnification 400X; (VC) vascular cambium (VP) phloem and (VX) xylem

### 5. อิทธิพลของแสงต่อการแสดงออกของยีน รายงานผลด้วยเทคนิค real-time PCR

จากผลการวิเคราะห์โปรโมเตอร์ *Kor* ในการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อที่ 4 พบว่า โปรโมเตอร์ *Kor* เป็นโปรโมเตอร์ชนิด TATA box-less promoter และเป็นชนิดที่ตอบสนองการ แสดงออกด้วยแสง (Nakamura *et al.*, 2002) จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *Kor* ในที่มีมืดและที่สว่าง โดยทำการทดลองโดยใช้

$$R = 2^{-[(Ct \text{ sample} - Ct \text{ housekeeping gene}) - (Ct \text{ calibrator} - Ct \text{ housekeeping gene})]}$$

และเปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของ ยีนที่แตกต่างกันหรือแสดงอัตราการแสดงออก ของยีนในเวลาที่ต่างกัน (Livak and Schmittgen, 2001) โดยใช้การแสดงออกในที่มีมืดเป็นตัวตั้งเทียบ

ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน 2 โคลน คือ 15K2 และ 15K3 เปรียบเทียบโดยใช้การหาเชิงปริมาณ สัมพัทธ์ (relative quantification PCR) โดยการนำ ค่าของ threshold cycle (Ct) ที่ได้จากการทำ ปฏิกริยา (Ct sample) นำมาเทียบกับค่าที่ได้จาก กลุ่มที่ต้องการคำนวณเปรียบเทียบในกรณีนี้ใช้ housekeeping gene 18s rRNA เปรียบเทียบ (Ct housekeeping gene) โดยการใช้วิธีการ วิเคราะห์แบบเปรียบเทียบ Ct มีสมการ ดังนี้

กับให้แสงสว่างที่ 8 และ 16 ชม. พบว่า ต้นยาสูบ 2 โคลน คือ 15K2 และ 15K3 ในที่สว่าง มีการแสดงออกเพียงร้อยละ 71 64 64 และ 69 ตามลำดับ หรือมีอัตราการแสดงออกลดลง



เมื่อได้รับแสงร้อยละ 29 36 36 และ 31 ตามลำดับ (Table 2) โดยที่โปรโมเตอร์ *Kor* ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gusA* ลดลงเมื่อพืชได้รับแสงและสอดคล้องกับการทำงานของยีน *Kor* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสในพืช (Plasma membrane-bound endo-1,4-β-D-glucanase) ทำหน้าที่ในการนำเอาสาย glucan

ออกจาก sterol sitosterol เพื่อนำไปต่อเป็นสายเซลลูโลส (micobril) ร่วมกับเอ็นไซม์ cellulose sythase ที่สังเคราะห์มาจากกลุ่มยีน *CesAs* ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์สายเซลลูโลสส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในเวลากลางคืนหลังจากที่พืชได้สังเคราะห์แสงผลิตโมเลกุลของน้ำตาลสะสมในเวลากลางวัน (Jdeniro and Cooper, 1989)

**Table 2** Analysis of the *gusA* gene expression rate which control by *Kor* promoter element of two transgenic tobacco clones, 15K2 and 15K3 under dark and light conditions by real-time PCR

Tobacco clones	Light conditions	Duration (hr)	Expression rate			
			gene <i>gusA</i>	gene <i>18s rRNA</i>	R = 2 <sup>- [AACT]</sup>	R 100 (%)
			Ct Mean	Ct Mean		
15 <i>Kor2</i>	Dark	8	25.33±0.1	13.13±0.1	1	100
15 <i>Kor2</i>	Light	8	25.89±0.1	13.20±0.1	0.71	71
15 <i>Kor2</i>	Light	16	26.09±0.1	13.25±0.1	0.64	64
15 <i>Kor3</i>	Dark	8	26.64±0.1	13.70±0.1	1	100
15 <i>Kor3</i>	Light	8	26.80±0.1	13.21±0.1	0.64	64
15 <i>Kor3</i>	Light	16	26.76±0.1	13.28±0.1	0.69	69

**Note:** (R = 2<sup>- [AACT]</sup>) R = 2 - [(Ct sample – Ct housekeeping gene)-(Ct calibrator – Ct housekeeping gene)] (sample) gene *gusA*, (housekeeping) gene *18s rRNA*, (calibrator) *gusA* gene in dark conditions Ct mean from 3 replications

### สรุปผลการทดลอง

ส่วนนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์ *Kor* จากต้นยูคาลิปตัส 3 ชนิด คือ *Eucalyptus grandis*, *E. camaldulensis* และ *E. urophylla* มีลำดับเบสของจีโนมที่มีความเหมือนร้อยละ 97 95 และ 96 เมื่อนำมาเชื่อมต่อยีน *gusA* และ

ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ พบว่า ควบคุมการแสดงออกของยีน *gusA* ได้ โดยแสดงออกจำเพาะในเนื้อเยื่อกลุ่มท่อลำเลียงน้ำ (xylem) และท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ทั้งที่ส่วนลำต้นและก้านใบและพบว่าโปรโมเตอร์ *Kor* มีการแสดงออกในที่มืดได้ดีกว่าในที่สว่าง ซึ่งการแสดงออกจะลดลงประมาณ

ร้อยละ 33 เมื่ออยู่ในแสงเป็นเวลา 8 ชม. และ การแสดงออกจะลดลงประมาณร้อยละ 34 เมื่อ อยู่ในแสงเป็นเวลา 16 ชม ซึ่งสอดคล้องกับการ ทำงานของยีนสังเคราะห์เซลลูโลสพืชที่ทำงานได้ ดีในสภาพที่ไม่มีแสงจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอา โปรโมเตอร์ *Kor* มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุง พันธุ์พืชเนื่องจากสามารถเลือกการแสดงออกของ ยีนในช่วงเวลาที่ไม่มีแสง และแสดงออกจำเพาะ ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำและอาหาร และยังเป็น ประโยชน์ในการศึกษายีนต่าง ๆ ในกระบวนการ สังเคราะห์เซลลูโลสในพืชต่อไปในอนาคต

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิต ศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่สนับสนุน ทุนการวิจัย และบริษัท เอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด (มหาชน) ที่สนับสนุนทุนการวิจัยและ ต้นทุนคาลิปดัสในการทดลอง

### เอกสารอ้างอิง

Brown, T. A. 2002. *Genome 2<sup>nd</sup> Ed.*, Oxford University Press, Oxford. 572 p.  
Doyle, J. and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical* 1: 11-15.  
Horsch, R.B; J.E. Fry; N.L. Hoffmann; D. Eichholtz; S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general-method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Jdeniro, M. and L.W. Cooper. 1989. Post-photosynthetic modification of oxygen isotope ratios of carbohydrates in the potato: Implications for paleoclimatic reconstruction based upon isotopic analysis of wood cellulose. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53: 2573-2580.

Jefferson, R.A; T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Larkin, M.A; G. Blackshields; N.P. Brown; R. Chenna; P.A. McGettigan; H. McWilliam; F. Valentin; I.M. Wallace; A. Wilm; R. Lopez; J.D. Thompson; T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Livak K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-CT Method. *Methods* 25: 402-408.

Nakamura, M.; T. Tsunoda and J. Obokata. 2002. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29: 1-10.

- Stomp, A. M. 1992. Histochemical localization of  $\beta$ -glucuronidase. In Gallagher S.R. (Ed), *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, New York. 221 p.
- Vain, T; E.F. Crowell; H. Timpano; E. Biot; T. Desprez; N. Mansoori; L.M. Trindade; S. Pagant; S. Robert; H. Hfte; M. Gonneau and S. Vernhettes. 2014. The cellulase KORRIGAN is part of the cellulose synthase complex. *J. Plant Physiol.* 165:1521–1532.
- Vimoltust, A; W. Kositratana and S. Chowpongpan. 2018. Expression rate of gus driven by eucalyptus KORRIGAN promoter in tissue specific tobacco. *Agric. Sci. J.* 49: 217–229